

Luana Taquette Dalvi

**Mecanismos de ação de antioxidantes de origem  
vegetal: estudo do polifenol ácido elágico e do  
extrato de caqui (*Diospyros kaki*)**

**BRASÍLIA  
2008**

Luana Taquette Dalvi

**Mecanismos de ação de antioxidantes de origem vegetal: estudo do polifenol ácido elágico e do extrato de caqui (*Diospyros kaki*)**

**Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau Mestre em Nutrição Humana pela Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.**

**Orientador:** Prof. Dr. Marcelo Hermes-Lima

**Co-orientador:** Prof<sup>ª</sup>. Dra. Isa Gomes Jorge de Avellar

**BRASÍLIA  
2008**

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Marcelo Hermes-Lima**  
(Orientador - IB / UnB)

**Prof. Dr. Daniel Rettori**  
(ICS / UNIBAN)

**Prof. Dra. Egle Machado de Almeida Siqueira**  
(IB / UnB)

**Prof. Dra. Natacha Carvalho Ferreira Santos**  
(CNPq e Faculdade de Farmácia/ UNIP)

**A Deus, por iluminar todos os passos da minha vida  
e por ter me dado coragem para enfrentar os grandes desafios.**

## AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial meus pais, João e Glória, por toda dedicação, amor e apoio emocional;

Ao Thiago, por sua paciência, carinho e compreensão;

Ao professor Marcelo Hermes, pela oportunidade de me abrir as portas para a ciência e por dividir parte de seu vasto conhecimento acadêmico;

À professora Isa, por ter me ensinado os conhecimentos básicos de laboratório e pela ajuda final na escrita desta dissertação;

Ao Thiago, ao Roberto e à Juliana, pelas várias discussões sobre ciência que muito acrescentaram a este trabalho;

Aos demais amigos do laboratório, em especial à Janini, pela amizade e momentos de descontração e pela ajuda inicial no projeto do ácido elágico;

Às alunas de IC, Rafaela e Ana Carolina, que me ajudaram na realização de alguns experimentos;

Aos professores da Biofísica, Fernando Fortes, Egle, Sandra e Sônia, pelos anos de ótimo convívio e algumas colaborações;

Ao professor Antônio Alonso, pela sua colaboração nos experimentos de EPR;

A CAPES, pela concessão da bolsa de pesquisa;

Ao CNPq e ao Milênio-Redoxoma, por terem fomentado os projetos de pesquisa desenvolvidos pelo Grupo de Pesquisa em Radicais Livres (GPRO) do qual eu faço parte.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ESQUEMAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xiv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
2.1 Radicais Livres.....	3
2.1.2 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	3
2.1.3 Efeitos Biológicos dos radicais livres.....	6
2.1.4 Importância do cobre e ferro nas reações de oxi-redução <i>in vivo</i> .....	8
2.1.4.1 Doenças genéticas relacionadas ao aumento de ferro e cobre no organismo.....	10
2.1.5 Mecanismo de defesa antioxidante.....	12
2.2 Polifenóis.....	15
2.3 Ácido elágico.....	19
2.3.1 Biodisponibilidade do ácido elágico.....	22
2.3.2 Atividade biológica do ácido elágico.....	23
2.4 Importância das frutas como fontes de compostos antioxidantes.....	24
2.4.1 Alterações ocorridas durante a maturação do fruto.....	26
2.5 Caqui ( <i>Diospyros kaki</i> ).....	29
2.5.1 Análise de compostos antioxidantes presentes no caqui.....	30
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
<b>Capítulo 1 – Análise do potencial antioxidante do AE em sistemas geradores de radicais livres mediados por Cu(II) e ascorbato.....</b>	<b>33</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
4.1 Reagentes.....	33
4.2 Dano oxidativo à 2-Desoxi-D-ribose.....	34
4.3 Cinética de oxidação do ascorbato.....	35
4.4 Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE): Radical ascorbil.....	36
4.5 Cinética de consumo de oxigênio.....	37

4.6 Degradação oxidativa do DNA.....	38
4.7 Análise espectrofotométrica do complexo AE-cobre.....	39
4.8 Análise da redução do Cu(II) pelo AE por meio do ensaio da neocuproína...	39
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>40</b>
5.1 Análise do complexo AE-cobre.....	40
5.2 Inibição da degradação oxidativa da 2-DR pelo AE.....	42
5.3 Efeito do AE no dano oxidativo ao DNA plasmidial (pUC18).....	49
5.4 Análise da cinética de oxidação de ascorbato.....	52
5.5 Efeito do AE na formação de radical ascorbil.....	55
5.6 Efeito do AE na cinética de consumo de oxigênio.....	58
5.7 Análise da redução do Cu(II) pelo AE.....	61
<b>6. CONCLUSÕES DO CAPÍTULO 1.....</b>	<b>63</b>
<b>Capítulo 2 – Atividade antioxidante do extrato aquoso da polpa de caqui Rama Forte (<i>Diospyros kaki</i>).....</b>	<b>69</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>69</b>
4.1 Extrato aquoso da polpa de caqui.....	69
4.2 Dano oxidativo à 2-Desoxi-D-ribose.....	70
4.3 Ensaio de peroxidação lipídica.....	71
4.4 Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE): Radical ascorbil.....	72
4.5 Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE): Radical DMPO- <sup>•</sup> OH.....	72
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>74</b>
5.1 Identificação dos caquis coletados.....	74
5.2 Efeito da concentração do extrato de caqui na formação do aduto DMPO- <sup>•</sup> OH.....	75
5.3 Efeito do extrato aquoso da polpa de caqui no dano oxidativo à 2-DR.....	77
5.4 Atividade antioxidante do extrato aquoso da polpa de caqui contra peroxidação lipídica de fígado de rato.....	91
5.5 Estudo do mecanismo pró-oxidante do extrato aquoso de caqui.....	95
5.6 Atividade antioxidante do extrato aquoso de caqui contra peroxidação lipídica mediada por Fe(III)-citrato e ascorbato.....	102
<b>6. CONCLUSÕES DO CAPÍTULO 2.....</b>	<b>108</b>

<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>114</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>116</b>

### LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>·OH</b>	Radical hidroxil
<b>2-DR</b>	2-desoxi-D-ribose
<b>A</b>	Absorbância
<b>Asc·</b>	Radical ascorbil
<b>Asc</b>	Ácido ascórbico, ascorbato
<b>AT</b>	Ácido tânico
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CTE</b>	Cadeia transportadora de elétrons
<b>CuZn-SOD</b>	Superóxido dismutase cobre-zinco dependente
<b>DFO</b>	Desferral
<b>DMPO</b>	5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido
<b>DMPO-·OH</b>	Aduto 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido hidroxilado
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucléico
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>EPR</b>	Ressonância paramagnética eletrônica
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>G6PDH</b>	Glicose-6-fosfato desidrogenase
<b>GPX</b>	Glutaciona peroxidase
<b>GR</b>	Glutaciona redutase
<b>GSH</b>	Glutaciona reduzida
<b>GSSG</b>	Glutaciona oxidada
<b>HEPES</b>	Ácido n-(2-hidroxi-etil)piperazina-n'-(2-etenosulfônico)
<b>HNE</b>	4-hidroxi-2-nonenal
<b>HOO·</b>	Radical hidroperoxil
<b>LO·</b>	Radical alcolxil
<b>LOO·</b>	Radical peroxil
<b>LOOH</b>	Radical hidroperóxido
<b>KPi</b>	Tampão fosfato
<b>MDA</b>	Malonaldeído (ou malonil dialdeído)
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
<b>NTA</b>	Ácido nitrilotriacético
<b>O<sub>2</sub><sup>·-</sup></b>	Ânion radical superóxido
<b>PIH</b>	Piridoxal isonicotinoil hidrazona
<b>Pi</b>	Fosfato inorgânico
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>TBA</b>	Ácido tiobarbitúrico



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Distribuição eletrônica do oxigênio, do ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio .....	4
<b>Figura 2:</b> Formação de ácido elágico .....	20
<b>Figura 3:</b> espectro do radical ascorbil .....	36
<b>Figura 4:</b> Efeito da concentração de Cu(II) no espectro do AE .....	38
<b>Figura 5:</b> Efeito da variação da concentração do AE sobre a degradação oxidativa da 2-DR .....	43
<b>Figura 6:</b> Estrutura do polifenol ácido tânico.....	44
<b>Figura 7:</b> Efeito da variação da concentração de Cu(II) nos danos oxidativos à 2-DR na ausência e na presença de AE .....	46
<b>Figura 8:</b> Efeito da variação da 2-DR na ausência e na presença de AE .....	47
<b>Figura 9:</b> Efeito do tempo de pré-incubação do AE com o Cu(II) na degradação oxidativa da 2-DR .....	49
<b>Figura 10:</b> Foto do gel de agarose mostrando o efeito da variação de AE na degradação oxidativa do DNA .....	50
<b>Figura 11:</b> Efeito da variação concentração do AE sobre o percentual de DNA super enovelado .....	51
<b>Figura 12:</b> Cinética de oxidação do ascorbato na presença de diferentes concentrações de AE .....	54
<b>Figura 13:</b> Representação gráfica do sinal do radical ascorbil em 3 condições ...	56
<b>Figura 14:</b> Efeito da concentração de AE na intensidade do sinal de radical ascorbil .....	57
<b>Figura 15:</b> Cinética de consumo do oxigênio em diferentes concentrações de AE .....	59
<b>Figura 16:</b> Cinética de formação do complexo Neocuproína-Cu(I) .....	61
<b>Figura 17:</b> Representação gráfica do espectro do aduto DMPO- $\cdot$ OH e sua formação .....	73
<b>Figura 18:</b> Efeito da concentração do extrato aquoso de caqui na intensidade do sinal de DMPO- $\cdot$ OH.....	76
<b>Figura 19:</b> Sinal do aduto DMPO- $\cdot$ OH sem e com 5 mg/mL de caqui.....	76
<b>Figura 20:</b> Efeito da variação do extrato aquoso dos caquis n <sup>o</sup> 3 e n <sup>o</sup> 17 na degradação oxidativa da 2-DR.....	78

<b>Figura 21:</b> Efeito de diferentes extratos aquoso de caqui do tipo Rama Forte na degradação oxidativa da 2-DR.....	<b>80</b>
<b>Figura 22:</b> Estudo do efeito da concentração de FeIII-Citrato e FeIII-EDTA na degradação oxidativa da 2-DR na ausência e na presença de caqui.....	<b>81</b>
<b>Figura 23:</b> Estudo do efeito da concentração de EDTA na degradação oxidativa da 2-DR na ausência e na presença de caqui.....	<b>85</b>
<b>Figura 24:</b> Efeito do tempo de pré-incubação do extrato de caqui com o Fe(III)-EDTA na degradação oxidativa da 2-DR.....	<b>87</b>
<b>Figura 25:</b> Efeito do tempo de pré-incubação do AT com Fe(III)-EDTA na degradação da 2-DR.....	<b>88</b>
<b>Figura 26:</b> Estudo do efeito da concentração de 2-DR no percentual de proteção do extrato de caqui.....	<b>89</b>
<b>Figura 27:</b> Efeito do extrato de caqui no curso temporal da peroxidação lipídica mediado por reagentes de Fenton.....	<b>91</b>
<b>Figura 28:</b> Efeito do extrato aquoso de caqui no curso temporal da peroxidação lipídica em diferentes concentrações de ascorbato.....	<b>94</b>
<b>Figura 29:</b> Efeito da concentração ascorbato na peroxidação lipídica em meio sem e com extrato de caqui.....	<b>96</b>
<b>Figura 30:</b> Estudo do efeito da concentração de ascorbato na degradação oxidativa da 2-DR na ausência e presença de extrato aquoso de caqui.....	<b>97</b>
<b>Figura 31:</b> Efeito da concentração do extrato aquoso de caqui na intensidade do sinal do radical ascorbil.....	<b>99</b>
<b>Figura 32:</b> Sinal do radical ascorbil produzido pelo espectrômetro de massa na ausência e presença de 5 mg/mL de caqui.....	<b>99</b>
<b>Figura 33:</b> Formação de quinona a partir de compostos fenólicos.....	<b>101</b>
<b>Figura 34:</b> Curso temporal da peroxidação lipídica na presença de caqui mediado por Fe(III)-citrato e ascorbato.....	<b>103</b>
<b>Figura 35:</b> Efeito da concentração FeIII-Citrato (1:1) na peroxidação lipídica na ausência e presença de extrato de caqui.....	<b>104</b>
<b>Figura 36:</b> Efeito de diferentes extratos aquoso de caqui do tipo Rama Forte na peroxidação lipídica.....	<b>105</b>
<b>Figura 37:</b> Análise da correlação do percentual de dano na 2-DR com o dano à membrana lipídica de fígado de rato de cada extrato de caqui.....	<b>106</b>

**Figura 38:** Capacidade antioxidante de diferentes frutas obtida pelo método de TEAC. **109**

### LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1:</b> Reações da peroxidação lipídica.....	<b>7</b>
<b>Esquema 2:</b> Mecanismo de defesa antioxidante enzimático.....	<b>14</b>
<b>Esquema 3:</b> sistema gerador de radical hidroxil mediado por Cu(II) na presença do redutor ascorbato.....	<b>34</b>
<b>Esquema 4:</b> Competição entre ascorbato e AE pela complexação com o Cu(II).....	<b>54</b>
<b>Esquema 5:</b> Hipóteses que podem ocorrer após a formação do complexo AE-Cu(II).....	<b>65</b>
<b>Esquema 6:</b> Formação hipotéticada da malha de AE com íons de cobre.....	<b>66</b>
<b>Esquema 7:</b> Hipótese do mecanismo seqüestrador de radical hidroxil exercido pelo AE.....	<b>67</b>
<b>Esquema 8:</b> sistema gerador de radical hidroxil mediado por Fe(III)-co-quelante e ascorbato.....	<b>70</b>
<b>Esquema 9:</b> Demonstração da competição entre os co-quelantes (EDTA e citrato) e os compostos presente no extrato de caqui para formar complexo com o Fe(III).....	<b>82</b>
<b>Esquema 10:</b> Representação do efeito da concentração da molécula alvo na degradação oxidativa da 2-DR.....	<b>89</b>
<b>Esquema 11:</b> Proposta do mecanismo pró-oxidante do extrato de caqui em sistema contendo elevadas concentrações de ascorbato.....	<b>113</b>

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1:</b> Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	<b>3</b>
<b>Tabela 2:</b> Exemplos de enzimas que possuem ferro ou cobre como co-fatores para atividades catalíticas.....	<b>9</b>
<b>Tabela 3:</b> Classes de polifenóis.....	<b>16</b>
<b>Tabela 4:</b> Estudos realizados com o AE para a análise da atividade anticarcinogênicos, antimutagênica e antioxidante.....	<b>21</b>
<b>Tabela 5:</b> Sabor conferido aos polifenóis presentes em alimentos vegetais.....	<b>26</b>
<b>Tabela 6:</b> Alterações fisiológicas e bioquímicas observadas no estágio de maturação da fruta.....	<b>27</b>
<b>Tabela 7:</b> Identificação dos caquis selecionados no estudo.....	<b>75</b>

## RESUMO

O presente trabalho foi dividido em dois capítulos. No primeiro capítulo, investigamos o mecanismo antioxidante do ácido elágico (AE) contra formação de oxirradicais em sistemas contendo íons Cu(II) e ascorbato. A propriedade antioxidante da polpa de caqui em processos oxidativos mediados por Fe(III) *in vitro* foi estudada no segundo capítulo. O estudo do AE demonstrou que este polifenol inibe a degradação da 2-desoxirribose (2-DR) mediada por 15  $\mu\text{M}$  de Cu(II) e 500  $\mu\text{M}$  de ascorbato, mostrando uma atividade antioxidante máxima com 15  $\mu\text{M}$  de AE. Além disso, o percentual de proteção contra a degradação da 2-DR diminuiu com o aumento da concentração de Cu(II). Estes resultados sugerem que o AE inibe a degradação da 2-DR devido à formação de um complexo 1:1 cobre-AE. Entretanto, ao variar a concentração de 2-DR, foi observado que o percentual de proteção diminuiu significativamente à medida que a concentração de 2-DR aumentou. Este resultado sugere que a atividade antioxidante do AE se deve também à capacidade do complexo cobre-AE em seqüestrar radicais livres. O AE também foi capaz de prevenir a quebra do DNA plasmidial e inibir consideravelmente a oxidação do ascorbato e o consumo de oxigênio na razão 1:1 Cu(II):AE. Experimentos de EPR mostraram que o AE inibe a formação de radical ascorbil mediada por Cu(II) e ascorbato e uma completa inibição ocorre com uma relação 1:1 Cu(II):AE. Concluímos que o AE diminui a velocidade de redução de Cu(II) mediada por ascorbato e que o complexo cobre-AE pode ser capaz de seqüestrar radical hidroxil, prevenindo assim o dano oxidativo ao DNA e à 2-DR. Com relação ao estudo antioxidante do caqui, foi observado que o extrato da polpa de caqui inibe a degradação oxidativa da 2-DR induzida por 50  $\mu\text{M}$  de Fe(III)-citrato e 500  $\mu\text{M}$  de ascorbato ( $I_{50}$  ~0,5 a 1,5 mg/mL). O efeito antioxidante varia entre frutas (2 mg/mL de diferentes frutas inibem a degradação da 2-DR de 52 a 91%). A prevenção do dano oxidativo à 2-DR pelo extrato de caqui foi inversamente proporcional à concentração de ferro-ligante (citrato ou EDTA). Entretanto, a concentração de EDTA e o tempo de pré-incubação não alteraram a capacidade antioxidante do extrato de caqui indicando, possivelmente, que compostos com propriedades quelantes não estariam presentes em meio aquoso. No ensaio de peroxidação lipídica feito em homogenato de fígado de rato induzido por Fe(III)-citrato e ascorbato, o extrato de caqui apresentou atividade antioxidante somente em pequenas concentrações de ascorbato e apresentou efeito pró-oxidante em concentrações de ascorbato superiores a 0,25 mM. O extrato de caqui também aumentou o sinal de EPR do radical ascorbil na presença de 1 mM de ascorbato e Fe(III)-citrato. Tais resultados sugerem que compostos oxidados presentes no caqui podem oxidar ascorbato a ascorbil. Entretanto, quando o estudo foi feito com reagentes de Fenton, o extrato do caqui apresentou efeitos antioxidantes ao inibir a peroxidação lipídica. Este perfil antioxidante também foi observado na presença de 50  $\mu\text{M}$  de ascorbato.

**Palavras chave:** radicais livres, ácido elágico, caqui, antioxidante, metais.

## ABSTRACT

The present work was divided in 2 chapters. In the first chapter, we investigated the antioxidant mechanism of ellagic acid (EA) to prevent oxyradical formation in a system containing Cu(II) plus ascorbate. The antioxidant property of persimmon pulp in oxidative processes mediated by Fe(III) in vitro was studied in the second chapter. EA study demonstrated that this polyphenol inhibited 2-deoxyribose (2-DR) degradation mediated by 15  $\mu$ M Cu(II) and 0.5 mM ascorbate, showing a maximum antioxidant activity with 15  $\mu$ M EA. Moreover, the protection against 2-DR degradation decayed with the increase in Cu(II) concentration. These results suggest that EA inhibits 2-DR degradation due to the formation of a 1:1 copper-EA complex. However, performing a variation of 2-DR concentration it was observed that the percent protection highly decreased as the 2-DR concentration increased. This result suggested that EA antioxidant activity was also due to the copper-EA complex ability to scavenge free radicals. In addition, EA prevented in vitro plasmid DNA breakage and strongly inhibited ascorbate oxidation and O<sub>2</sub> consumption with a 1:1 Cu(II):EA ratio. EPR studies showed that EA inhibits ascorbyl formation mediated by Cu(II) and ascorbate and a complete inhibition is observed at 1:1 Cu(II):EA ratio. We concluded that EA slows down ascorbate-mediated Cu(II) reduction and that the copper-EA complex may scavenge hydroxyl radicals, thus preventing DNA damage and 2-DR degradation. Relating to persimmon antioxidant study, it was observed that persimmon pulp extract inhibited the 2-DR oxidative degradation induced by 50  $\mu$ M Fe(III)-citrate and 0.5 mM ascorbate (I<sub>50</sub> ~ 0.5 to 1.5 mg/mL). The antioxidant effect varied among the fruits (2 mg/mL of different individual fruit extracts protect 2-DR degradation in a range of 52 to 91%). The prevention of 2-DR oxidative degradation by persimmon extract was inversely dependent to the iron-complex (with EDTA or citrate) concentration. Although, the EDTA concentration and pre-incubation time variation did not change antioxidant capacity of persimmon extract indicating that chelating properties does not exist in aqueous solution. When determining lipid peroxidation in rat liver homogenates induced by Fe(III)-citrate plus ascorbate, the persimmon extract presented an antioxidant effect only with low ascorbate concentrations and exhibited pro-oxidative effect in ascorbate concentrations higher than 0.25 mM. Persimmon extract also increased ascorbyl radical EPR signals in the presence of ascorbate (1 mM) and Fe(III)-citrate. Those results suggest that oxidized compounds present in persimmon may oxidize ascorbate to ascorbyl. Although, when Fenton reagents were employed, persimmon extract showed an antioxidant effect inhibiting lipid peroxidation. The same antioxidant profile was observed in the presence of 50  $\mu$ M ascorbate.

**Key words:** free radical, ellagic acid, persimmon, antioxidant, metals.

## 1 – Introdução

Segundo a Organização Mundial da Saúde, dietas ricas em frutas e hortaliças podem diminuir a prevalência de doenças crônicas não transmissíveis como obesidade, diabetes Mellitus, doenças cardiovasculares, hipertensão e alguns tipos de câncer (WHO/FAO, 2003). Esta ação benéfica das plantas já tem sido fundamentada em diversos estudos epidemiológicos que sugerem correlação inversa do consumo de frutas e verduras com incidência de mortes por câncer e doenças cardiovasculares (Hertog et al, 1993; Michels et al, 2006; Tobias et al, 2006). Desde então, os estudos realizados com plantas se popularizaram e, hoje, é possível encontrar centenas de publicações que abordam este assunto.

O mecanismo de ação protetora das plantas ainda não foi totalmente esclarecido, entretanto, sabe-se que ele está relacionado com a presença de compostos fenólicos - denominados polifenóis - que possuem atividade antioxidante, antiinflamatória, antimutagênica e anticarcinogênica (Chung et al., 1998; Ferguson, 2001; Prior 2003). Além disso, a presença de outras substâncias antioxidantes, como os carotenóides, a vitamina C e outros, também auxilia na ação benéfica de frutas e hortaliças.

Diversos estudos evidenciaram que a ação dos polifenóis está relacionada com seu efeito preventivo contra os danos oxidativos causados por radicais livres (Ferguson, 2001; Kaur & Kapoor, 2001; Halliwell, 2007). O efeito antioxidante encontrado nos polifenóis minimiza a ação deletéria dos radicais livres ou, até mesmo, evita sua formação. Conhecer o potencial antioxidante de alimentos de origem vegetal e o mecanismo de ação antioxidante dos polifenóis presentes em tais alimentos é fundamental para estabelecer o seu papel preventivo de danos oxidativos.

Além disso, é importante lembrar que o aporte de polifenóis é realizado principalmente por meio da dieta. Portanto, analisar como os compostos fenólicos agem em seu estado natural, ou seja, no tecido vegetal, é fundamental para reforçar a importância do consumo das suas fontes alimentares.

Tendo em vista a importância dos antioxidantes na prevenção de danos oxidativos causados pelos radicais livres, este trabalho visou avaliar a atividade antioxidante do polifenol ácido elágico (AE) e do extrato aquoso de caqui Rama Forte *in vitro*.

O presente trabalho foi dividido em dois capítulos distintos. O primeiro capítulo aborda o mecanismo de ação do polifenol ácido elágico contra o dano oxidativo mediado por Cu(II) e ascorbato. O mecanismo de ação antioxidante do AE já foi sugerido em outros estudos realizados em nosso laboratório que utilizaram os sistemas Fe(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Fe(III)-EDTA/ascorbato para a geração de radical hidroxil (Ginani, 2005). De acordo com esses estudos, a atividade antioxidante em concentrações micromolares caracteriza um comportamento quelante importante do AE. Entretanto, não se sabe ao certo como o AE se comportaria em sistemas geradores de radicais livres mediados por Cu(II) e ascorbato.

O segundo capítulo desse trabalho avaliou o potencial antioxidante do extrato aquoso da polpa de caqui do cultivar Rama Forte. Estudos realizados com o caqui já evidenciaram que esta fruta apresenta potencial antioxidante considerável (Katsube et al., 2004; Gorinstein et al., 1998a; Garsía-Alonso et al., 2004) Os ensaios foram desenvolvidos a fim de se estabelecer um mecanismo de ação do extrato contra danos oxidativos mediados por Fe(III)-EDTA ou Fe(III)-citrato/ascorbato.



## 2 - Revisão Bibliográfica

### 2.1 - Radicais Livres:

Um radical livre é qualquer espécie (átomo, íon ou molécula) capaz de existir de maneira independente (livre) que contém um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital mais energético (Halliwell, 2006). Espécies radicalares podem ser formadas por meio da subtração ou adição de um elétron de uma molécula não radicalar. Além disso, pode ser formado pela fissão homolítica da ligação covalente de uma molécula (Hermes-Lima, 2004a; Halliwell, 2006).

Muitos radicais livres são encontrados naturalmente nos seres vivos. Os metais de transição, como por exemplo, o ferro ( ${}_{26}\text{Fe}$ ), cobre ( ${}_{29}\text{Cu}$ ) e o manganês ( ${}_{25}\text{Mn}$ ), possuem elétrons desemparelhados e são considerados radicais livres (Augusto, 2006). Nos seres vivos também são produzidos radicais livres de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio em moléculas presentes no meio biológico. Os radicais livres de oxigênio possuem destaque devido a sua importância na etiologia de inúmeras doenças, inclusive no processo de envelhecimento que serão abordados posteriormente.

#### 2.1.2 - Espécies Reativas de Oxigênio (EROs):

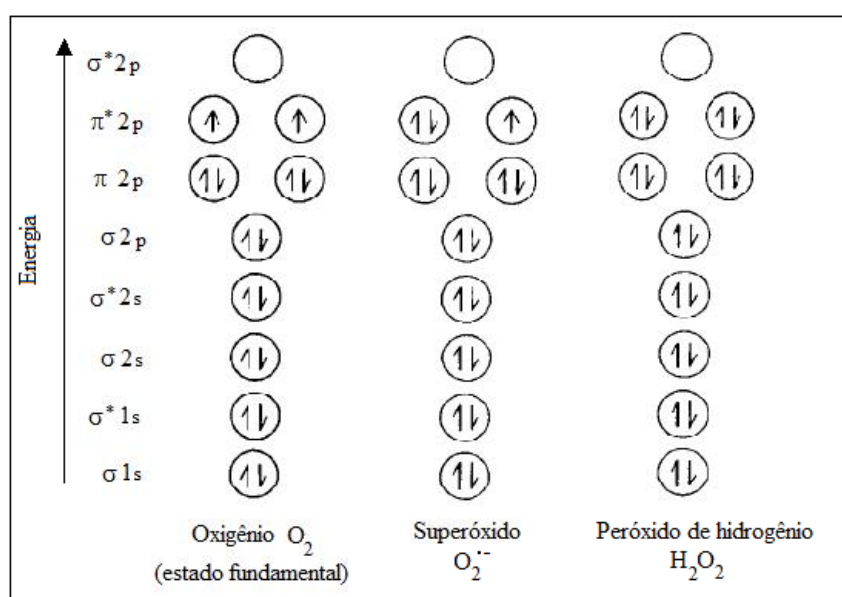
As espécies reativas de oxigênio (EROs) incluem espécies radicalares e não-radicalares (tabela 1). Apesar do uso do termo “reativo”, nem todas as espécies reativas de oxigênio reagem rapidamente com biomoléculas.

**Tabela 1:** Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

<b>Espécies Radicalares</b>	<b>Espécies Não-radicalares</b>
Superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )	Peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )
Hidroperoxil ( $\text{HOO}^{\cdot}$ )	Hidroperóxido (LOOH)
Peroxil ( $\text{LOO}^{\cdot}$ )	Oxigênio singlete ( ${}^1\text{O}_2$ )
Alcolxil ( $\text{LO}^{\cdot}$ )	Ozônio ( $\text{O}_3$ )
Hidroxil ( ${}^{\cdot}\text{OH}$ )	Ácido hipocloroso (HClO)

O gás oxigênio ( $\text{O}_2$  no estado fundamental) é uma espécie radicalar, pois apresenta dois elétrons desemparelhados com spins paralelos (fig.1). Sendo assim, o

oxigênio não pode receber um par de elétrons (de spins opostos) da maioria das moléculas, pois teria que ocorrer a inversão do spin, o que não é possível. Dessa forma, o oxigênio deve receber um elétron por vez (Halliwell, 2006). A redução de um elétron do oxigênio leva a formação do ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), a segunda redução gera peróxido, produzindo peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que é uma espécie não radicalar. Por último, o  $H_2O_2$  pode ser reduzido formando radical hidroxil ( $\cdot OH$ ) e ânion hidroxila ( $OH^-$ ). O radical hidroxil é uma espécie altamente reativa capaz de reagir com a maioria das biomoléculas em uma constante de velocidade na faixa de  $10^7$  a  $10^{10} M^{-1} s^{-1}$  (Hermes-Lima, 2004a).



**Figura 1:** Distribuição eletrônica do oxigênio, do ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio (Adaptado de Halliwell, 2006).

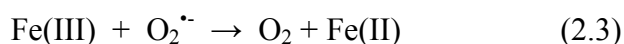
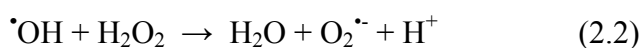
A formação de radical superóxido em seres vivos pode ocorrer por diversas vias, tais como: i) oxidação de NADPH pela NADPH oxidase no processo de fagocitose; ii) oxidação da xantina ou hipoxantina pela xantina oxidase no metabolismo das purinas; iii) ganho de um elétron pelo oxigênio em processos que ocorrem no citocromo P450; iv) autooxidação de monoaminas (dopamina; epinefrina e norepinefrina) (Fang et al, 2002; Zangar et al, 2004; Berry & Hare, 2004). Entretanto, a formação de superóxido na cadeia transportadora de elétrons (CTE) da mitocôndria é o processo que possui maior relevância.

Na CTE, durante o transporte dos elétrons pela coenzima Q (ou ubiquinona), o  $O_2^{\cdot-}$  pode ser formado por meio da transferência de um elétron do radical ubisemiquinona (intermediário formado entre o estado oxidado (Q) e reduzido ( $QH_2$ )) da

coenzima Q) ao oxigênio (Cadenas & Davies, 2000). Em condições normais, estima-se que 0,1% do oxigênio consumido seja convertido a  $O_2^{\cdot-}$  (Fridovich, 2004). O superóxido possui capacidade oxidante e redutora, sendo esta última mais relevante para o organismo. A taxa de oxidação de lipídios, proteínas e DNA pelo radical superóxido é relativamente baixa. Porém, sua importância em processos oxidativos está relacionada a sua capacidade de gerar outras espécies reativas de oxigênio, como o  $\cdot OH$  que possui alta reatividade.

Após ser formado, o  $O_2^{\cdot-}$  pode sofrer dismutação espontânea ou catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) gerando  $H_2O_2$  e oxigênio. Como foi apresentado anteriormente, o  $H_2O_2$  não é um radical livre, mas é um oxidante e apresenta um outro perigo em potencial, pois é capaz de gerar  $\cdot OH$ . O peróxido de hidrogênio, por ser uma molécula estável, pode entrar na célula, inclusive difundir-se até o núcleo, e formar  $\cdot OH$  ocasionando a oxidação de proteínas, carboidratos, lipídeos e danos no DNA nuclear e mitocondrial (Hermes-Lima, 2004a).

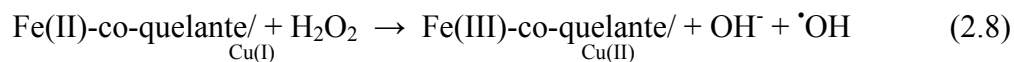
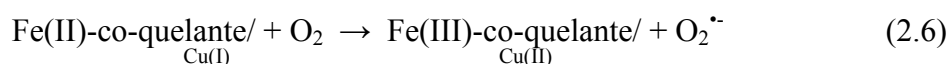
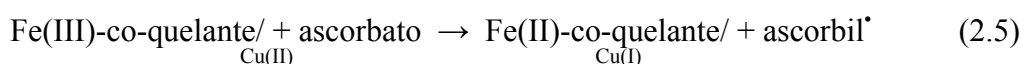
O radical hidroxil pode ser formado por meio da redução do  $H_2O_2$  por íons metálicos, como por exemplo, Fe(II) e Cu(I) que podem agir com redutores, oxidando-se a estados superiores de oxidação (reação 2.1). Essa reação foi descrita pela primeira vez em 1894, quando H.J.H Fenton verificou que a combinação de  $H_2O_2$  com íons ferrosos levava à oxidação de ácido tartárico (Fenton, 1894). Anos depois, uma série de estudos desenvolvidos por Haber, Weiss, Wilstätter e Barb revelaram a continuação dessa reação por meio da redução do Fe(III) a Fe(II) pelo superóxido formado no meio reacional (reações 2.2 a 2.4) (Liochev & Fridovich, 2002). A reação 2.4, catalisada pelos íons metálicos, é denominada reação de Haber-Weiss e representa a soma das equações 2.1 e 2.3.



Outros metais de transição, que possuem variados estados de oxidação, como estanho, cromo e vanádio, também são capazes de realizar reações tipo-Fenton (Stoh &

Bagchi, 1995; Gomes, 2005). Entretanto, as ações com cobre e ferro serão enfatizadas neste texto, uma vez que os sistemas geradores de radicais livres utilizados no presente estudo tiveram a presença desses dois metais.

Os metais de transição em seu estado de maior oxidação (Fe(III) e Cu(II)) também podem formar radical hidroxil quando adicionados na presença de agentes redutores, tais como radical superóxido, ácido ascórbico e glutatona reduzida (GSH) (reação 2.5 a 2.8) (McCord & Day, 1978). O íon Fe(III) apresenta baixa solubilidade em pH fisiológico (em torno de 7), portanto, em ensaios realizados nessa faixa de pH, o Fe(III) necessita ser adicionado ao meio reacional junto a um co-quelante que complexa o íon metálico disponibilizando-o para reações de oxi-redução. Entre os co-quelante mais utilizados, destacam-se o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), o NTA (ácido nitrilotriacético) e o citrato de sódio.



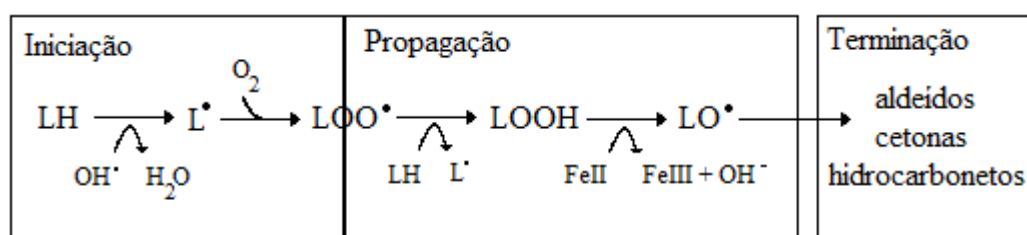
### 2.1.3 - Efeitos biológicos dos radicais livres

Quando um radical livre reage com outra espécie química (moléculas, etc.) não-radicalar um novo radical é formado. A reação do radical livre com uma espécie não-radicalar pode ocorrer das seguintes maneiras (Halliwell, 2006):

- I. Adição do radical a outra molécula formando um aduto radicalar;
- II. O radical pode agir como agente redutor doando um elétron à espécie não-radicalar;
- III. O radical pode agir como agente oxidante recebendo um elétron da espécie não-radicalar;
- IV. Abstração de um átomo de hidrogênio de uma ligação C-H da molécula pelo radical livre.

O radical hidroxil pode reagir com a membrana das células acarretando a peroxidação dos fosfolípidios. A peroxidação lipídica danifica a membrana que pode culminar na alteração da sua fluidez e, até mesmo, em sua ruptura (Halliwell & Gutteridge, 1999). A peroxidação lipídica apresenta 3 fases distintas: iniciação, propagação e terminação.

O início da peroxidação lipídica se dá pela abstração do hidrogênio do ácido graxo insaturado formando um radical lipídico ( $L^{\bullet}$ ), que se rearranja formando dieno conjugado (esquema 1). Em seguida, uma molécula de oxigênio se adiciona ao dieno conjugado, gerando o radical lipoperoxil ( $LOO^{\bullet}$ ). O radical lipoperoxil é responsável pela propagação da cadeia de reações da peroxidação lipídica, uma vez que este radical também é capaz de abstrair o hidrogênio dos ácidos graxos insaturados adjacentes formando um hidroperóxido lipídico ( $LOOH$ ). O término da peroxidação lipídica é caracterizado pela decomposição das espécies radicalares e do  $LOOH$ , formando aldeídos (principalmente malonaldeído (MDA) e 4-hidroxi-2-nonenal (HNE)), cetonas, alcoóis e hidrocarbonetos, inclusive gasosos (como etano, propano, pentano e hexano) (Savin & Balmori, 2008).



**Esquema 1:** Reações da peroxidação lipídica

Durante a fase de iniciação, a cinética de formação de radical lipídico é lenta, também denominada como fase lag da reação de peroxidação lipídica. Na fase de propagação, a produção de radicais livres é bastante rápida e é denominada fase log da peroxidação lipídica.

O MDA formado na peroxidação lipídica possui efeito carcinogênico e mutagênico podendo reagir com proteínas e ácidos nucleicos do DNA formando adutos estáveis (Marnett, 2000). O HNE também reage rapidamente com proteínas, ligando-se ao grupamento tiol (-SH), e com o grupo amino das bases do DNA (Halliwell & Gutteridge, 1999).

O DNA também pode ser oxidado pelo  $^{\bullet}\text{OH}$  que reage com o açúcar deoxirribose e com as bases purínicas e pirimidínicas. O  $^{\bullet}\text{OH}$  ao ser adicionado ao

carbono C-8 da base guanina do DNA forma o aduto 8-hidroxi-guanina (8-OH-Gua) que pode ser quantificado por técnica de HPLC e por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS) (Breen & Murphy, 1995). O 8-OH-Gua ocasiona a mutação do DNA por meio da transversão GC-TA (Toyokuni & Sagripanti, 1996). A abstração de um hidrogênio da deoxirribose leva, após uma série de reações, à quebra da ligação C-C do açúcar, ocasionando a fragmentação da fita de DNA (Meneghini, 1997; Breen & Murphy, 1995).

A oxidação de proteínas ocorre principalmente nos resíduos de cisteína e metionina da estrutura protéica, formando um radical livre derivado de aminoácido (Hermes-Lima, 2004a). Os grupamentos tiol presentes nesses aminoácidos são facilmente oxidado pelas EROs, em especial  $\cdot\text{OH}$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HClO}$  (Halliwell & Gutteridge, 1999). A oxidação de proteínas possui papel biológico importante, pois ocasiona danos em receptores, enzimas, proteínas transportadoras e na cascata de transdução de sinal. A oxidação das enzimas reparadoras do DNA, por exemplo, pode aumentar os níveis de danos oxidativo no DNA e aumentar a frequência de mutações (Halliwell & Gutteridge, 1999).

De um modo geral, as células apresentam certa tolerância aos danos oxidativos provocados pelos radicais livres. Essa tolerância ocorre devido ao sistema de defesa antioxidante que o organismo dispõe e que promove um equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. Quando há um aumento na produção de radicais livres ou uma diminuição da capacidade antioxidante do organismo, ou mesmo na ocorrência de ambas situações, os danos oxidativos às estruturas celulares aumentam, podendo levar à morte celular por apoptose ou necrose (Halliwell, 2006). O distúrbio do equilíbrio entre prooxidantes e antioxidantes é denominado estresse oxidativo e está relacionado ao desenvolvimento de várias condições patológicas como doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, câncer, diabetes, doenças inflamatórias e ao processo de envelhecimento natural (Valko et al., 2007; Hermes-Lima, 2004b).

#### **2.1.4 - Importância do cobre e ferro nas reações de oxi-redução *in vivo***

A capacidade do ferro e do cobre em participar de reações de oxi-redução (doando ou recebendo elétrons) faz com que estes metais se tornem peça chave na estrutura de enzimas envolvidas na CTE e demais enzimas que participam de reações

redox (veja alguns exemplos na tabela 2). No entanto, o ferro e o cobre introduzem um perigo em potencial, pois são capazes de converter  $H_2O_2$  em  $\cdot OH$  via reação de Fenton. Devido a essa característica desses metais, o organismo dispõe de um sistema composto por proteínas transportadoras e de estoque (como, por exemplo, transferrina, metalotioneína, albumina e ferritina) que ligam os íons de ferro e cobre, prevenindo a participação desses nas reações produtoras de EROs (Halliwell, 1996).

**Tabela 2:** Exemplos de enzimas que possuem ferro ou cobre como co-fatores para atividades catalíticas.

<b>Enzimas</b>	<b>Funções</b>
<b>Ferro</b>	
- Catalase <sup>(a)</sup>	Catalisa a decomposição do $H_2O_2$ em $H_2O$ e $O_2$ .
- Peroxidases <sup>(a)</sup>	Reduzem $H_2O_2$ e peróxidos orgânicos utilizando moléculas distintas como agentes redutores
- Citocromos <sup>(a)</sup>	Enzimas responsáveis pelo transporte de elétrons
- Xantina oxidoreductase <sup>(b)</sup>	Catalisa a degradação das purinas transformando Hipoxantina em xantina e, esta última, em ácido úrico
<b>Cobre</b>	
- Cobre-zinco superóxido dismutase (CuZn-SOD) <sup>(c)</sup>	Dismuta a $O_2^{\cdot -}$ em $H_2O_2$ e $O_2$
- Citocromo c oxidase <sup>(c)</sup>	Enzima da CTE que transfere elétrons para $O_2$ reduzindo-o a $H_2O$
- Ceruloplasmina <sup>(c)</sup>	Ferrooxidase que proporciona $Fe^{3+}$ para a ferritina
- Dopamina b-hidroxilase <sup>(c)</sup>	Oxigenase que converte dopamina em norepinefrina
- Lisil oxidase <sup>(c)</sup>	Catalisa a formação de aldeídos, importante para a síntese do colágeno e da elastina
- Tirosinase <sup>(c)</sup>	Síntese de melanina

<sup>a</sup> Andrews, 2002; <sup>b</sup> Nishino & Okamoto, 2000; <sup>c</sup> Kim et al, 2008

Os íons metálicos, entretanto, podem ser liberados das estruturas protéicas quando as proteínas são submetidas à oxidação por espécies reativas. A família das desidratases, da qual é exemplo a aconitase, é um grupo de proteínas que contêm em sua estrutura íons de ferro ligados ao enxofre (4Fe-4S, também denominado clusters). Essas proteínas podem ser oxidadas por  $O_2^{\cdot -}$ , acarretando na liberação de Fe(II) e na formação de radical hidroxil. De acordo com Fridovich (1995), essa reação possui papel importante na produção de  $\cdot OH$  a partir de  $O_2^{\cdot -}$  *in vivo*. A ceruloplasmina e a ferritina, quando oxidadas por espécies reativas, podem também liberar, respectivamente, cobre e ferro (Gaetke & Chow, 2003; Halliwell, 1996).

A produção de espécies reativas *in vivo*, catalisada por ferro e cobre, já foi mencionada em diversos estudos. Muitos autores sugerem que o dano em DNA é causado pelo  $H_2O_2$  via reação de Fenton (Oikawa & Kawanishi, 1998; Lloyd & Phillips, 1999; Liu et al, 1999; Meneghini, 1997). De acordo com esses autores, os íons metálicos ligados ao DNA reagem com o  $H_2O_2$  promovendo dano em sítio específico. O ferro e o cobre possuem, ainda, importante papel na peroxidação lipídica, pois podem reagir com o hidroperóxido lipídico (LOOH), gerando novamente radical lipoperoxil ( $LOO^*$ ) e alcoxil ( $LO^*$ ), propagando, desse modo, a reação de peroxidação lipídica (esquema 1) (Hermes-Lima, 2004a; Savin & Balmori, 2008).

Além disso, o acúmulo de ferro e cobre em tecidos está associado a doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, doenças hepáticas e coronarianas, câncer e diabetes (Fraga & Oteiza, 2002; Gaetke & Chow, 2003; Moreira et al, 2008; Theophanides & Anastassopoulou, 2002).

#### **2.1.4.1 - Doenças genéticas relacionadas ao aumento de ferro e cobre no organismo**

Algumas desordens genéticas podem levar ao aumento da concentração de ferro e cobre no organismo. O excesso desses metais aumenta produção de radicais livres, o que acarreta danos em tecidos e fibrose, podendo causar lesões irreversíveis a vários órgãos.

A hemocromatose é uma doença relativamente comum na população calcasiana, que afeta 1 a cada 200-400 indivíduos (Franchini, 2006). É uma disfunção genética caracterizada pelo aumento da absorção de ferro no intestino que leva ao acúmulo progressivo de ferro em diferentes órgãos, em especial, fígado, coração, pâncreas e pele (Andrews, 2002). O aumento de ferro nesses tecidos promove cirrose, carcinoma hepático, diabetes e falha crônica do coração (De Freitas & Meneghini, 2001). Existem 4 tipos de hemocromatose hereditária, no entanto a hemocromatose tipo 1 ou clássica é a mais comum e está relacionada com a mutação na proteína HFE que regula a liberação de ferro do enterócito. Em condição de alta concentração de ferro no organismo, o HFE promove a liberação de hepcidina. A hepcidina leva a internalização do transportador basolateral de ferro do enterócito (a ferroportina), impossibilitando, dessa forma, a liberação do ferro dentro do enterócito para a corrente sanguínea. A mutação do HFE



diminui a produção de hepcidina o que, conseqüentemente, acarreta no aumento inapropriado da absorção de ferro no enterócito (Graham et al., 2007).

Outras doenças genéticas mais raras como a ceruloplasminemia e a atransferrinemia também são caracterizadas pelo aumento de ferro no organismo. A aceruloplasminemia é causada pela não expressão da ceruloplasmina, que é uma proteína com atividade ferroxidase responsável pela liberação de ferro do fígado. A deficiência dessa proteína leva ao acúmulo de ferro no fígado, pâncreas e cérebro, o que pode acarretar o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, fibrose hepática e diabetes (Siah et al, 2005). A atransferrinemia é uma doença autossômica recessiva caracterizada pela deficiência de transferrina. A falta de transferrina prejudica a distribuição de ferro para os tecidos principalmente para a eritropoiese, o que resulta em anemia severa por deficiência de ferro. Por outro lado, o ferro se acumula no parênquima do fígado, coração e pâncreas (Andrews, 2002).

O aumento dos níveis de cobre é observado na doença de Wilson. A doença de Wilson é um distúrbio autossômico recessivo associado à excreção biliar de cobre prejudicada. A mutação leva a uma alteração da proteína WND presente no hepatócito responsável pela incorporação do cobre na ceruloplasmina e exportação de cobre através da bile. O cobre se acumula em vários tecidos, em especial no fígado e cérebro, causando hepatite e problemas neurológicos (Andrews, 2002).

Os agentes quelantes de cobre e ferro são utilizados no tratamento de doenças em que esses íons metálicos se encontram em excesso. O uso de agentes quelantes no tratamento dessas doenças impede os danos oxidativos causados por tais metais. Um agente quelante considerado ideal é aquele que é facilmente absorvido por via oral, possui baixo custo de produção, apresenta alta e seletiva afinidade ao íon metálico de interesse, possui baixa toxicidade, capaz de atravessar membranas e impede a formação de EROs mediado pelo metal (Hermes-Lima, 2004a).

A D-penicilamina é um quelante de cobre utilizado no tratamento da doença de Wilson, enquanto a desferroxamina é um quelante utilizado no tratamento de doenças relacionadas ao aumento da concentração de ferro no organismo como a hemocromatose (Strausak et al., Chaston & Richardson, 2003). A administração de D-penicilamina pode ocasionar alguns efeitos colaterais, como por exemplo, reação anafilática em pacientes alérgicos à penicilina e induzir lesões cutâneas severas, quando utilizado por longo prazo. Durante o tratamento realizado com essa droga, o sistema hematológico pode ser afetado gravemente. A toxicidade renal também é manifestada,

com um quadro reversível de proteinúria e hematúria capaz de progredir para uma síndrome nefrótica (Klaassen, 1996). A desferroxamina possui como desvantagem o alto custo e a baixa absorção oral, sendo, portanto, administrado por meio de infusões subcutâneas. Além disso, apresenta baixa habilidade em penetrar a membrana mitocondrial.

Em virtude dos problemas causados pela D-penicilamina e as dificuldades de se administrar a desferroxamina faz-se necessário o estudo de novos quelantes de cobre e ferro que apresentam menor toxicidade e que sejam economicamente viáveis.

### **2.1.5 – Mecanismos de Defesa Antioxidante**

Conforme foi analisado acima, os organismos aeróbios produzem constantemente EROs, principalmente via CTE. O efeito tóxico causado pelas espécies radicalares tornaria inviável a vida desses seres vivos em nosso meio natural. Portanto, para sobreviver em um ambiente aeróbico, os organismos desenvolveram um sistema de defesa antioxidante que impedisse ou que ao menos minimizasse os danos causados pelos radicais livres.

De acordo com Hermes-Lima (2004a), o sistema de defesa antioxidante pode ser dividido em:

- I. Defesa antioxidante primária enzimática e não enzimática, que envolve a reações diretas com as EROs;
- II. Defesa antioxidante auxiliar que oferece suporte ao primário;
- III. Proteínas/enzimas e compostos de baixo peso molecular que complexam metais (tópico que foi abordado acima);
- IV. Sistema enzimático de repara aos danos causados às biomoléculas.

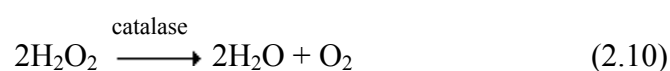
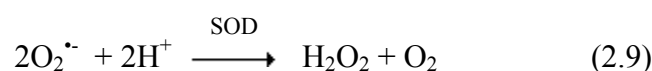
O sistema de defesa primário enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase selênio-dependente (GPx) e glutathione-S-transferase (GST).

A SOD catalisa a dismutação do  $O_2^{\cdot-}$  em  $O_2$  e  $H_2O_2$  (reação 2.9). Existem 2 formas de SOD em células de mamíferos: uma contendo manganês no sítio ativo (Mn-SOD) que está presente na mitocôndria e outra contendo cobre e zinco no sítio ativo

(CuZn-SOD) presente no citoplasma, nos lisossomos, peroxissomos, núcleo e no espaço intermembrânico da mitocôndria (Hermes-Lima, 2004a).

A catalase remove o  $\text{H}_2\text{O}_2$  convertendo-o a  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  (reação 2.10). De modo semelhante, a GPx catalisa a decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  convertendo-o a  $\text{H}_2\text{O}$ . Essa reação utiliza o tripeptídeo glutationa na forma reduzida (GSH) como doador de hidrogênio (reação 2.11). A GPx também decompõe hidroperóxidos orgânicos (como o lipoperóxido) por meio da oxidação da GSH.

Por fim, a GST catalisa a conjugação da GSH com xenobióticos durante o processo de detoxificação que ocorre principalmente no fígado (Valko et al., 2007; Fang et al., 2002).



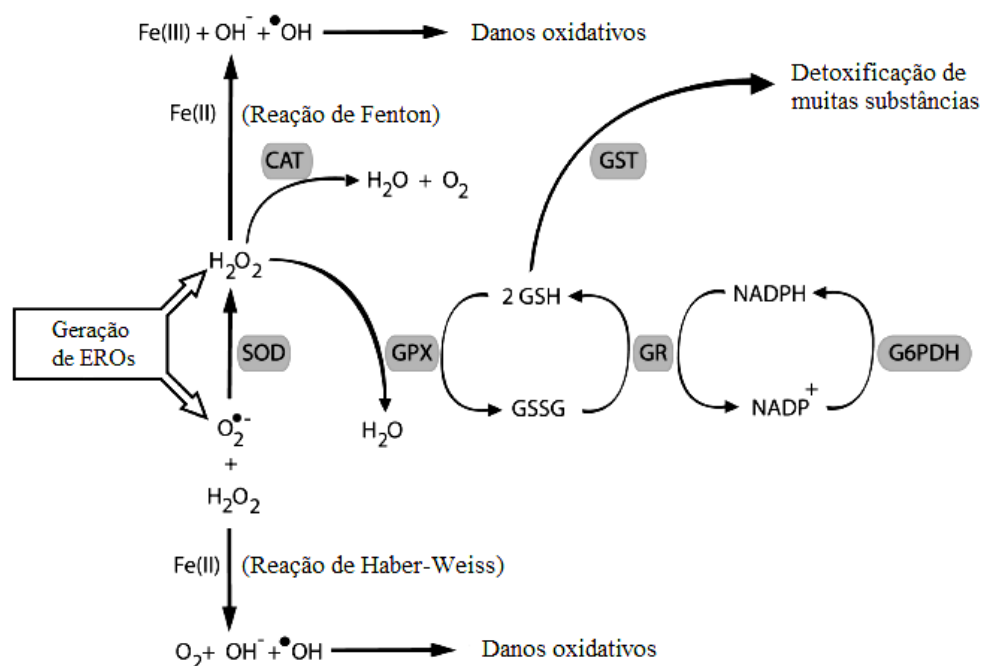
Um antioxidante primário não enzimático é uma substância capaz de seqüestrar os radicais livres, impedindo que reajam com as biomoléculas do organismo por meio de um mecanismo de competição. Esses antioxidantes são conhecidos como “seqüestradores” (do inglês, “scavengers”) e geralmente se transformam em espécies radiculares de menor reatividade, portanto, potencialmente menos danosas, após reagirem com as EROs. A capacidade de um composto em seqüestrar o radical livre está relacionada com o seu potencial redutor, por meio da doação de um elétron ou de um hidrogênio à espécie reativa (Frei & Higdon, 2003).

Esses antioxidantes podem ser encontrados naturalmente no organismo ou podem ser provenientes da dieta. Os principais seqüestradores de radicais livres produzidos no organismo são: GSH, ácido úrico, melatonina, melanina e coenzima Q (Hermes-Lima, 2004). Apesar da coenzima Q apresentar grande importância na produção de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  na CTE, esta possui atividade antioxidante relevante evitando a peroxidação lipídica da LDL e reduzindo o radical tocoferil a  $\alpha$ -tocoferol, deste modo reciclando este antioxidante proveniente da dieta. (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Dentre os antioxidantes dietéticos podemos citar a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), a vitamina C (ascorbato), os carotenóides e diversas classes de polifenóis presentes nos alimentos de origem vegetal. O  $\alpha$ -tocoferol age como um inibidor da cadeia de

propagação da peroxidação lipídica (conhecido como antioxidante do tipo “chain breaking”) por meio da transferência de um hidrogênio do grupamento fenólico ao radical peroxil. A transferência do hidrogênio leva a formação do radical tocoferil, que pode ser regenerado a  $\alpha$ -tocoferol pela vitamina C. O radical ascorbil, formado na redução do radical tocoferil pelo ascorbato, sofre desproporcionamento e transferência de próton, formando ascorbato e dehidroascorbato. A velocidade de dismutação do radical ascorbil em pH 7,4 é de aproximadamente  $2,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Buettner & Jurkiewicz, 1993). Além disso, algumas enzimas, como NADH-ascorbil redutase e a dehidroascorbato redutase dependente de GSH, também podem regenerar o ascorbato (Halliwell & Gutteridge, 1999).

O sistema antioxidante auxiliar tem como principal objetivo reciclar os substratos utilizados pelo sistema de defesa primário. A glutathiona redutase (GR) é a principal enzima desse grupo e tem a função de reduzir glutathiona oxidada (GSSG) a glutathiona reduzida (GSH), que possui papel antioxidante fundamental no organismo uma vez que é utilizada como co-substrato por diversas enzimas antioxidantes citadas anteriormente. A reciclagem da glutathiona pela GR ocorre por meio da oxidação da NADPH proveniente da via das pentoses (Hermes-Lima, 2004a). O ascorbato e as enzimas que reciclam o ascorbato também podem ser classificados como antioxidantes auxiliares.



**Esquema 2:** Mecanismo de defesa antioxidante enzimático (Adaptado de Hermes-Lima 2004a).

## 2.2 - Polifenóis

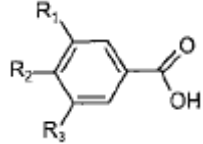
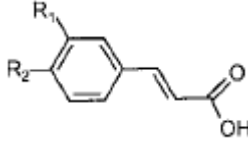
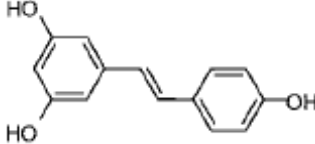
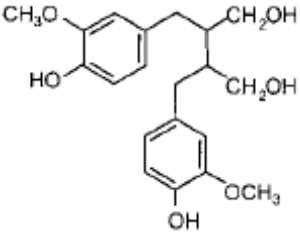
Os polifenóis são formados no metabolismo secundário de plantas e estão relacionados ao sistema de defesa. Na planta, os polifenóis estão envolvidos na proteção contra radiação ultravioleta e patógenos agressores, além de oferecerem colorações a flores e frutos que atraem insetos polinizadores e animais silvestres que dispersam as sementes (Taiz & Zeiger, 2002).

A função fisiológica dos polifenóis não se limita apenas ao mundo vegetal. Estudos epidemiológicos evidenciaram ação protetora dos polifenóis contra doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer (Kuroba & Hara, 1999; McKay & Blumberg, 2002). Por essa razão, pesquisas com polifenóis têm crescido significativamente nos últimos quinze anos. Os pesquisadores, a indústria alimentícia e a indústria farmacêutica demonstram interesse nestes compostos fenólicos principalmente devido ao reconhecimento de suas propriedades antioxidantes, sua grande abundância na dieta e sua capacidade de prevenir diversas doenças (Manach et al, 2004; Haslam, 1996; Chung et. al, 1998).

De acordo com Manach e colaboradores (2004), os polifenóis podem ser divididos em 4 grandes grupos: ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e lignanos (tabela 3). A classe dos ácidos fenólicos é formada pelos derivados do ácido benzóico (ácidos hidroxibenzóico) e pelos derivados do ácido cinâmico (ácidos hidroxicinâmicos). A classe dos flavonóides pode ser dividida em 6 subclasses: flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas e flavanóis.

Os ácidos hidroxibenzóicos podem ser encontrados na forma livre ou então esterificados, formando os chamados taninos hidrolizáveis. Os taninos hidrolizáveis são formados principalmente a partir de ácido gálico (galotaninos) e ácido hexahidrodifênico (elagitaninos) esterificados a um poliol, normalmente a D-glicose (Handique & Baruah, 2002). Os flavanóis e as antocianidinas também podem formar oligômeros (contendo dois a seis unidades) ou polímeros, que são chamados popularmente de taninos condensados (Haslan, 1996; Chung et al., 1998). Os taninos são definidos como compostos fenólicos solúveis em água que possuem peso molecular entre 500 e 3000 D e capacidade de formar complexos com alcalóides, gelatina e proteínas provocando sua precipitação (Haslan, 1996).

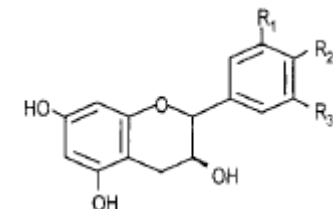
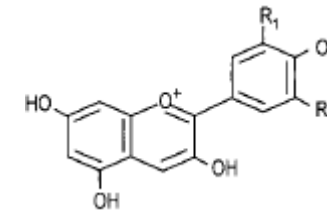
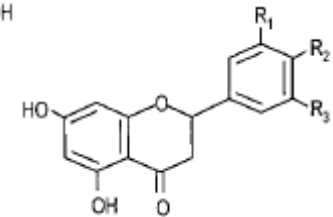
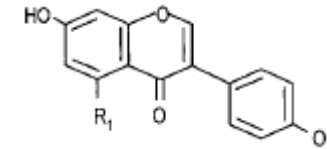
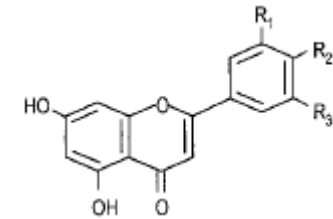
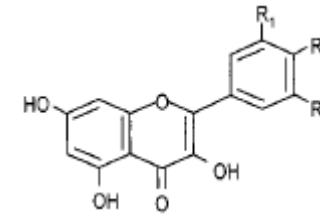
**Tabela 3:** Classes de polifenóis (Adaptado de Manach et al., 2004).

Classes/Subclasses	Exemplos	Fontes Alimentares	Estrutura química
<b>Ácidos Fenólicos</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Ácidos Hidroxibenzóico</b></li> </ul>	<p>Ácido gálico (<math>R_1 = R_2 = R_3 = OH</math>)</p> <p>Ácido vanílico (<math>R_1 = OCH_3</math>; <math>R_2 = OH</math>)</p>	Morango, amora, caqui, framboesa	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Ácidos Hidroxicinâmico</b></li> </ul>	<p>Ácido cumárico (<math>R_1 = OH</math>)</p> <p>Ácido cafêico (<math>R_1 = R_2 = OH</math>)</p> <p>Ácido Ferúlico (<math>R_1 = OCH_3</math>; <math>R_2 = OH</math>)</p>	Café, kiwi, cereja, berinjela	
<b>Estilbenos</b>	Resveratrol	Vinho tinto	
<b>Lignanos</b>	Secoisolariciresinol	Linhaça	

---

**Flavonóides**

- **Flavonóis**                   Kaempferol ( $R_2=OH$ ;  $R_1=R_3=H$ )                   Cebola, brócolis,  
Quercetina ( $R_1=R_2=OH$ ;  $R_3=H$ )                   tomate cereja, alho poró
  
- **Flavonas**                   Luteolina ( $R_1=R_2=OH$ )                   Salsa, aipo  
Apigenina ( $R_1=H$ ;  $R_2=OH$ )
  
- **Isoflavonas**               Daidzeína ( $R_1=H$ )                   Soja  
Genisteína ( $R_1=OH$ )
  
- **Flavanonas**               Naringenina ( $R_1=H$ ;  $R_2=OH$ )                   Laranja, limão,  
Hesperetina ( $R_1=OH$ ;  $R_2=OCH_3$ )                   grapefruit
  
- **Antocianidinas**           Cianidina ( $R_1=OH$ ;  $R_2=H$ )                   Amora, jabuticaba,  
Malvidina ( $R_1=R_2=OCH_3$ )                   cereja, morango
  
- **Flavanóis**               Catequina ( $R_1=R_2=OH$ ;  $R_3=H$ )                   Chocolate, chá verde,  
Galocatequina ( $R_1=R_2=R_3=OH$ )                   vinho tinto, damasco



Os polifenóis, em especial os taninos, são tradicionalmente considerados agentes anti-nutricionais, pois formam complexos com proteínas, amidos e íons metálicos reduzindo sua absorção pelo organismo. Além disso, os polifenóis inibem a atividade de diversas enzimas como hidrolases, isomerases, oxigenases, oxidoredutases, polimerases, fosfatases e amino ácido oxidase (Ferguson, 2001). No entanto, a ingestão de polifenóis não apresenta efeitos antinutricionais em pessoas que consomem uma dieta variada composta por carnes, leite, ovos, cereais e leguminosas. Os problemas nutricionais causados por polifenóis ocorrem exclusivamente em populações cuja dieta se restringe ao consumo de leguminosas e cereais (Chung et al., 1998).

Os efeitos biológicos dos polifenóis são frequentemente atribuídos a sua atividade antioxidante. Determinados polifenóis apresentam atividade antioxidante, diminuindo a peroxidação lipídica, a oxidação de proteínas e os danos oxidativos em DNA (Meyer, et al., 1998; Wei et al., 2006; Cirico & Omaye, 2006). O mecanismo antioxidante dos polifenóis está associado a sua capacidade seqüestradora de radicais livres e à atividade quelante de íons metálicos (Andrade Jr et al., 2005; Khokhar & Owusu Apenten, 2003; Hotta et al., 2002).

Além da atividade antioxidante, os polifenóis possuem outros mecanismos envolvidos na inibição da carcinogênese e mutagênese, dentre eles pode-se citar: i) interação direta do polifenol com os agentes carcinogênicos; ii) aumento da eficiência da detoxificação de carcinógenos por meio da regulação de enzimas relacionadas ao metabolismo de xenobióticos; iii) modulação da atividade de enzimas antioxidantes; iv) e indução de apoptose que impede a progressão das alterações genéticas (Ferguson, 2001; Kuroda & Hara, 1999). A atividade anticarcinogênica e antimutagênica dos polifenóis depende da sua estrutura química, do tecido e das estruturas celulares estudadas e do momento da administração do polifenol, podendo esta ocorrer antes, durante ou depois da exposição a um agente mutagênico (Ferguson, 2001).

Apesar dos estudos comprovarem que os polifenóis apresentam uma boa ação antioxidante *in vitro*, muitos pesquisadores ainda questionam a eficácia da atividade antioxidante desses polifenóis *in vivo*. Um dos motivos levantados seria a baixa absorção, a alta metabolização e a rápida eliminação dos polifenóis no organismo (Manach et al., 2004). A baixa biodisponibilidade desses compostos implica em uma baixa concentração plasmática (menor que 8  $\mu\text{M}$ ) comparado a outros antioxidantes como a vitamina C, urato e tocoferol, que possuem concentrações plasmáticas de até 150



$\mu\text{M}$ ,  $450 \mu\text{M}$  e  $40 \mu\text{M}$  respectivamente (Lotito & Frei, 2006). A maioria dos polifenóis presentes nos alimentos está na forma esterificada, glicosilada ou na forma de grandes polímeros, o que dificulta sua absorção. Portanto, esses polifenóis sofrem uma série de hidrólises pelas enzimas do intestino ou pela microbiota intestinal antes de serem absorvidos (Tapiero et al., 2002). Reações de glucuronidação, metilação e sulfatação também ocorrem na mucosa intestinal e no fígado (Scalbert et al., 2002; Manach et al., 2004; Lotito & Frei, 2006). Os efeitos fisiológicos dos metabólitos formados no trato gastrointestinal ainda não foram totalmente identificados, porém, acredita-se que estes metabólitos apresentam um potencial antioxidante menor devido a modificações nos grupamentos catecol e fenol (Lotito & Frei, 2006).

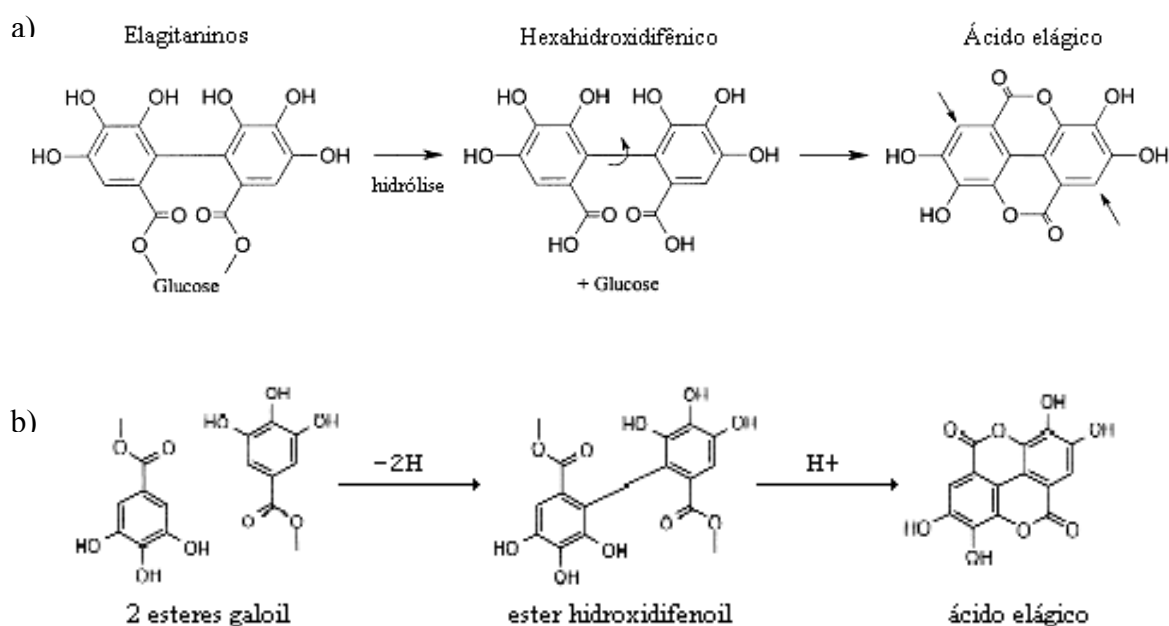
No entanto, em um artigo de revisão publicado recentemente, Halliwell declarou que a relevância da ação antioxidante dos polifenóis é verificada principalmente no trato gastrointestinal, no qual se encontram em concentrações mais elevadas (na faixa de milimolar). De acordo com ele, o trato gastrointestinal é constantemente exposto a espécies reativas, portanto, os polifenóis teriam papel antioxidante importante agindo como seqüestradores de radicais livres ou mesmo evitando sua formação (Halliwell, 2007). Halliwell ressalta também que a dieta rica em ferro, característico dos povos ocidentais, promove um aumento da excreção de ferro pelas fezes que pode ocasionar danos oxidativo no cólon e no reto. Logo, os polifenóis seriam os principais antioxidantes presentes nessa região capazes de quelar os cátions de ferro, minimizando seus efeitos oxidativos (Halliwell, 2007).

### 2.3 - Ácido Elágico

O ácido elágico, ou ácido 4,4',5,5',6,6'-hexahidroxi-difenico-2,6,2',6'-dilactona, (AE) é um bifenol pertencente ao grupo dos taninos hidrolisáveis. É uma molécula planar que contém quatro grupos hidroxila e dois grupos lactona (Barch et al., 1996). Estudos realizados com o AE indicaram que este possui atividade antimutagênica, anticarcinogênica e antioxidante *in vivo* e *in vitro* (Takagi et al., 1995; Khanduja et al., 1999; Priyadarsini et al., 2002). O ácido elágico é capaz de minimizar significativamente a indução de câncer de pulmão, fígado, pele e intestino. Além disso, possui efeito anticarcinogênico e antimutagênico contra uma variedade de carcinógenos,

incluindo nitrosaminas, micotoxinas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (tabela 4) (Szaefer et al., 2003).

O AE é formado a partir da hidrólise de elagitaninos que são ésteres de glicose com ácido hexahidroxi-difênico. Os elagitaninos, ao sofrerem hidrólise, liberam ácido hexahidroxi-difênico, que por sua vez, é lactonizado espontaneamente formando ácido elágico (figura 2a) (Bate-Smith, 1972; Handique et al., 2002; Häkkinen et al., 2000). O ácido hexahidroxi-difênico também pode ser formado a partir do acoplamento oxidativo de dois ésteres de galoil (Figura 2b) (Handique et al., 2002).



**Figura 2:** a) Formação de ácido elágico a partir da hidrólise de elagitaninos (adaptado de Häkkinen et al., 2000). b) Produção de hexahidroxi-difênico por acoplamento oxidativo de dois ésteres galoil (adaptado de Handique et al., 2002).

O AE é amplamente encontrado na dieta humana. Algumas variedades de frutas vermelhas são fontes importantes de AE, como por exemplo, morango, amora, framboesa e uva. Além disso, está presente em nozes, romã e é o principal constituinte fenólico de bebidas destiladas (Pryadarsini, 2002; Cerdá et al., 2003). O AE pode ser encontrado em plantas na forma livre ou dentro de vacúolos formando os elagitaninos, sendo esta última, a maneira mais comum (Atkinson et al., 2006; Häkkinen et al., 2000).

**Tabela 4:** Estudos realizados com o AE para a análise da atividade anticarcinogênicos, antimutagênica e antioxidante.

<b>Concentração de AE</b>	<b>Meio experimental</b>	<b>Agente Indutor<sup>a</sup></b>	<b>Célula/Tecido</b>	<b>Efeito observado<sup>b</sup></b>	<b>Referência</b>
<b>1% da dieta</b>	<i>In vivo</i> (rato)	DEN; MNU; DMH; BBN; DHPN	Intestino Delgado	↓ da incidência e do número de tumores	Akagi et al., 1995
<b>150 µM</b>	<i>In vitro</i>	DBP e anti-DBPDE	DNA do timo de bezerro	↓ de 94% e de 64% da formação do aduto DNA-DBP e anti-DBPDE-DNA, respectivamente	Smith et al., 1998
<b>0,3 – 20 µg/tubo</b>	<i>In vitro</i>	Aflotoxida-B1	Salmonela linhagem TA98 e TA100	↓ da mutagenicidade dose dependente	Loarca-Piña et al., 1998
<b>12 µg/mL de água</b>	<i>In vivo</i> (camundongo)	N-Nitrosodietilamina	Pulmão	↓ da incidência de tumores; ↑ de GSH e ↓ da peroxidação lipídica	Khanduja et al., 1999
<b>10 – 300 µM</b>	<i>In vitro</i>	nicotina	Linfócitos	↓ da peroxidação lipídica e danos em DNA; ↑ atividade da SOD, CAT e GPX; preservação maior da Vit. A, C e E e da GSH	Sudheer et al., 2007

<sup>a</sup> DEN (dietilnitrosamina); MNU (N-metilnitrosourea); DMH (1,2-dimetilhidrazina); BBN (N-butil-N-(4-hidroxi-butil)nitrosamina); DHPN (2,2'-dihidroxi-di-n-propilnitrosamina); DBP (dibenzo(a,l)pireno); anti-DBPDE (anti-DBP-11,12-diol-13,14-epóxido). <sup>b</sup> (↑) indica aumento e (↓) indica diminuição.

Além dessas fontes alimentares, o AE também é vendido na forma de cápsulas concentradas de polifenol, extraída dos mais diferentes tipos de plantas e frutas. Hoje, é possível encontrar diversos sites da internet que possuem links para a compra de suplementos a base de AE. O interesse do uso dessas cápsulas aumentou depois da divulgação de estudos que observaram as atividades antioxidante, anticarcinogênica, antimutagênica e antiinflamatória do AE.

### **2.3.1 – Biodisponibilidade do ácido elágico**

O metabolismo do AE ainda não foi totalmente esclarecido, uma vez que resultados presentes na literatura científica parecem contraditórios. A presença de AE na corrente sanguínea não foi detectada em alguns estudos o que indica que este polifenol possui baixa biodisponibilidade. Existem autores que sugerem que o AE é metabolizado pela microbiota intestinal produzindo metabólitos, como urolitina A (ou 3,8-dihidroxi-6H-dibenzo[b,d]-piran-6-one) que podem ser absorvidos pela parede intestinal ou excretados (Cerdá et al., 2005). Nesse caso a atividade fisiológica atribuída ao AE, estaria relacionada mais precisamente aos metabólitos produzidos pela microbiota e não pelo composto original que é pouco absorvido (Cerdá et al., 2004).

Entretanto, outros estudos demonstram que o AE pode ser detectado na corrente sanguínea após ingestão de alimentos fontes (Seeram et al., 2004; Lei et al., 2003). Após o consumo de 180 mL de suco de romã (contendo 25 mg de AE e 318 mg de elagitaninos), Seeram e col. (2004) detectaram uma concentração plasmática de AE de 31,9 ng/mL 1 hora após o consumo da bebida.

A distribuição do AE no organismo também já foi relatada. Após injeção intraperitoneal de  $^3\text{H}$ -ácido elágico ( $^3\text{H}$ -AE) em ratos, observa-se que a maior concentração deste polifenol se encontra no fígado e no rim. Além disso, verifica-se alta concentração de  $^3\text{H}$ -AE na bile após 60 minutos e na urina após 120 minutos da administração intraperitoneal (Teel, 1987). A baixa radioatividade presente no cérebro indica que provavelmente este polifenol não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (Teel, 1987).

### 2.3.2 – Atividade biológica do ácido elágico

Um dos mecanismos anticarcinogênico e antimutagênico proposto para o AE está relacionado com a otimização do metabolismo de xenobióticos. A maior parte das substâncias potencialmente carcinogênicas requer ativação metabólica no organismo antes de se tornarem efetivamente cancerígenas. As reações catalisadas pelas enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos são divididas basicamente em duas fases. As enzimas da família do citocromo P450 (CYP) correspondem à fase I da metabolização e estão diretamente relacionadas ao processo de ativação de grande parte dos xenobióticos. Na fase II, ocorre a transformação dos xenobióticos em produtos hidrossolúveis e de fácil excreção, principalmente pela ação da enzima glutationa-S-transferase (GST) (Wünsch Filho & Gattás, 2001). Neste contexto, o ácido elágico é capaz de inibir a mutagênese e a carcinogênese por meio: i) da inibição de enzimas responsáveis pela bioativação de carcinógenos, como as da família do citocromo P450, ii) da estimulação de enzimas envolvidas na detoxificação de intermediários reativos, como glutationa-S-transferase, e iii) através da interação direta do polifenol com os intermediários reativos formando adutos inativos (Ayrton et al., 1992; Szaefer et al., 2003; Barch et al., 1994; Barch et al., 1996; Ahn et al., 1996; Smith et al., 1998).

O ácido elágico também é capaz de se ligar ao DNA por meio de forças hidrofóbicas, o que impediria a ligação de agentes mutagênicos e carcinogênicos em alguns sítios específicos (Teel, 1986; Thulstrup et al., 1999). No estudo de Smith e colaboradores (ver tabela 4), a inibição da formação de adutos DBP-DNA pelo ácido elágico pode estar relacionada tanto com sua capacidade seqüestradora de intermediários eletrofílicos, quanto a sua ligação direta ao DNA.

A atividade antioxidante do AE também já foi demonstrada, porém os estudos sobre este assunto ainda são escassos. Pryadarsini e col. (2002), ao estudar a natureza antioxidante do ácido elágico, verificaram sua habilidade em seqüestrar espécies reativas de oxigênio (radical hidroxil –  $\text{OH}^{\bullet}$ ), de nitrogênio (dióxido de nitrogênio –  $\text{NO}_2^{\bullet}$ , peroxinitrito –  $\text{ONOO}^{\bullet}$ ) e radical peroxil -  $\text{LOO}^{\bullet}$ . Ao reagir com radical livre, o ácido elágico doa um elétron formando radical ácido elágico. Os resultados do estudo de Priyadarsini sugerem que este polifenol é facilmente oxidado na forma desprotonada do grupo hidroxila, em  $\text{pH} > 10$ . Isso indica que o ácido elágico teria uma atividade seqüestradora de radicais livres moderada em pH fisiológico, no qual se encontra

parcialmente desprotonado (Priyadarsini et al., 2002). A atividade seqüestradora de radicais livres, principalmente de radical peroxil, também foi levantada no estudo de Majid e col., no qual observou inibição de até 70% da peroxidação lipídica com 1mM de ácido elágico (Majid, et al., 1991). O efeito protetor do AE contra a peroxidação lipídica induzida pela nicotina também foi atribuído a uma atividade seqüestradora de radicais livres, uma vez que as EROs são produzidas durante a metabolização da nicotina, principalmente via citocromo CYP2A6 (Sudheer et al., 2007, ver tabela 4).

Além da atividade seqüestradora de radicais livres, estudos espectrofotométricos demonstram que o ácido elágico seria capaz de formar complexos com íons metálicos como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  (Bock et al., 1981; Jaén et al., 2003; Przewloka & Shearer, 2002). Até 2005, entretanto, não havia nenhum estudo correlacionando a ação antioxidante do AE com o mecanismo de quelação. O estudo de Ginani (2005), realizado em nosso laboratório, demonstrou que a ação antioxidante do AE em sistemas geradores de radical hidroxil mediados por  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  *in vitro* se deve principalmente a um mecanismo de quelação desses íons metálicos. De acordo com o estudo, a atuação do AE em concentrações micromolares e a diminuição do potencial antioxidante desse bifenol verificada com o aumento da concentração de  $\text{Fe}^{2+}$ , sugerem fortemente um mecanismo antioxidante de quelação (Ginani, 2005).

Poucos estudos analisaram a atividade antioxidante do AE na presença de íons  $\text{Cu}^{2+}$ . Meyer e col. (1998) verificaram que o AE não previne oxidação de LDL catalisada por cobre *in vitro*. Em um estudo recente de Labieniec & Gabryelak (2007) feito em células da glândula digestiva de mexilhões, verificou-se que o AE possui atividade antioxidante prevenindo a formação de DCF (2',7'-diclorofluoresceína), produto da oxidação do DCFH pelas EROs. No entanto, ação antioxidante diminui após incubação do bifenol com íons cúpricos. Portanto, apesar de comprovado a formação do complexo AE-cobre, pouco se sabe a respeito da possibilidade de participação desses íons complexados em reações de oxirredução formadoras de radical hidroxil.

#### **2.4 – Importância das frutas como fontes de compostos antioxidantes.**

Além de apresentar grande importância nutricional, as frutas também são ótimas fontes de compostos antioxidantes. Vários estudos já demonstraram que o aumento do

consumo de frutas e hortaliças melhora a capacidade antioxidante plasmática e reduz a oxidação de LDL (Coa et al., 1998; Prior, 2003). O consumo de frutas ricas em antioxidantes está relacionado a uma diminuição da incidência de câncer e doenças cardiovasculares (Kaur & Kapoor, 2001).

Os principais antioxidantes presentes em frutas são vitamina C, carotenóides e polifenóis. A vitamina C, ou ácido ascórbico, é amplamente encontrado em frutas cítricas e está presente em maior concentração na acerola, na laranja, no limão e no morango.

Vários carotenóides, em especial o  $\beta$ -caroteno, o licopeno, a luteína e a zeaxantina, apresentam atividade antioxidante. Além de apresentar caráter antioxidante, os carotenóides também são responsáveis pela coloração do fruto. Os carotenóides mais importantes para pigmentação dos frutos são o  $\beta$ -caroteno (amarelo), precursor da vitamina A, e o licopeno (vermelho) (Award, 1993). O licopeno, o principal carotenóide presente no tomate, está relacionado com a prevenção de diversos tipos de câncer, das quais a prevenção do câncer de próstata tem sido mais documentada (Rao & Rao, 2007).

Outro tipo de pigmento encontrado em frutas são as antocianinas, que apresentam coloração vermelha, púrpura ou violeta dependendo do pH do meio. As antocianinas são polifenóis da classe das antocianidinas, glicosiladas geralmente na posição 3 (Manach et al., 2004).

Os polifenóis também oferecem sabor à fruta. Eles são responsáveis pelo sabor amargo e adstringente (ver tabela 5). A adstringência é definida como sensação de secura e enrugamento da boca que é detectada em toda cavidade oral (Drewnowski & Gomez-Carneros, 2000). A sensação de secura deve-se a formação de complexos insolúveis de taninos com proteínas e glicoproteínas presentes na saliva que diminuem a lubrificação da superfície oral (Siebert & Chassy, 2003). Normalmente as pessoas rejeitam alimentos que são excessivamente amargos e adstringentes, por essa razão a indústria de alimentos desenvolveu uma série de processos que amenizam os sabores atribuídos aos polifenóis (Drewnowski & Gomez-Carneros, 2000). O desaparecimento natural da adstringência ou o induzido por via artificial deve-se a coagulação, condensação ou polimerização dos taninos presentes no fruto, tornando-os insolúveis e, portanto, incapazes de formar complexos (Awad, 1993).

**Tabela 5:** Sabor conferido aos polifenóis presentes em alimentos vegetais<sup>1</sup>.

<b>Classe</b>	<b>Componente</b>	<b>Sabor</b>
<b>Flavanonas</b>	Naringenina	Amargo
<b>Flavonóis</b>	Quercetina	Amargo
<b>Flavanóis</b>	Catequina e epicatequina	Amargo
	Galato de epicatequina	Amargo e adstringente
	Epigallocatequina	Amargo com sabor adocicado residual
<b>Isoflavonas</b>	Genisteína e daidzeína	Amargo ou adstringente
<b>Taninos condensados</b>	Peso molecular < 500 D	Amargo
	Peso molecular > 500 D	Adstringente
<b>Taninos hidrolizáveis</b>		Amargo e adstringente

<sup>1</sup> (Adaptado de Drewnowski & Gomez-Careros, 2000)

#### **2.4.1 – Alterações ocorridas durante a maturação do fruto.**

A maturidade fisiológica da fruta é atingida quando esta se torna adequada para o consumo humano, com suas características típicas de sabor, cor, textura, declínio na acidez e desaparecimento da adstringência, segundo cada tipo e variedade de fruta (Awad, 1993). As fases do desenvolvimento do fruto correspondem a pré-maturação, maturação (incluindo no seu processo final o amadurecimento) e senescência.

A pré-maturação, estágio de desenvolvimento que antecede a maturação, é caracterizada pelo extensivo aumento do volume da fruta, que, nessa fase, ainda não está apta para o consumo (Chitarra & Chitarra, 1990).

A maturação é o estágio de crescimento pleno em que o fruto atinge máxima qualidade comestível. Corresponde a uma seqüência de mudanças na cor, sabor, aroma e textura que torna o fruto apropriado para o consumo “in natura” e/ou para a industrialização. Já o amadurecimento, corresponde ao período final da maturação, no qual o fruto completamente desenvolvido torna-se mais palatável. Nesse estágio final da maturação, os sabores e odores específicos se desenvolvem em conjunto com o aumento da doçura da fruta (Chitarra & Chitarra, 1990).

A maturação é um processo sem volta que progride para a senescência da fruta, que se caracteriza pelo aumento da permeabilidade das membranas celulares,



desidratação, amolecimento avançado e aumento da susceptibilidade à invasão de microorganismos (Chitarra & Chitarra, 1990).

As alterações ocorridas na fase de maturação da fruta são primordiais para determinação da qualidade da fruta e, portanto, sua aceitação para o consumo. É importante ressaltar que as frutas podem amadurecer na planta ou fora dela. Quando separada da planta, após atingir a maturidade fisiológica, a fruta depende de suas próprias reservas para manter-se metabolicamente ativa, conservar sua integridade fisiológica e reparar possíveis danos a sua estrutura (Awad, 1993). A tabela 6 apresentada abaixo relaciona as principais alterações fisiológicas e bioquímicas que ocorrem no estágio de maturação.

**Tabela 6:** Alterações fisiológicas e bioquímicas observadas no estágio de maturação da fruta<sup>1</sup>.

<b>Maturação</b>	<b>Amadurecimento</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desenvolvimento das sementes;</li> <li>• Mudança na cor;</li> <li>• Mudança na taxa respiratória;</li> <li>• Produção de etileno;</li> <li>• Mudanças na permeabilidade dos tecidos;</li> <li>• Mudança na textura;</li> <li>• Mudanças químicas nos carboidratos, ácidos orgânicos, proteínas, fenóis, pigmentos e pectina;</li> <li>• Produção de substâncias voláteis;</li> <li>• Formação de ceras na casca.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento na atividade do ciclo de Krebs;</li> <li>• Formação de carotenóides e antocianinas;</li> <li>• Destruição dos cloroplastos e quebra da clorofila;</li> <li>• Hidrólise do amido e interconversão de açúcares;</li> <li>• Destruição de ácidos;</li> <li>• Inativação de fenóis;</li> <li>• Início do rompimento de membranas;</li> <li>• Amaciamento da parede celular;</li> <li>• Síntese de voláteis aromáticos.</li> </ul>

<sup>1</sup> Adaptado de Chitarra & Chitarra, 1990

A energia necessária para a maturação do fruto provém do processo de respiração celular. A conversão de amido em açúcares é a principal fonte de substratos energéticos. Portanto, a hidrólise do amido e da sacarose em açúcares solúveis, em especial glicose e frutose, é um dos principais fatores responsáveis pelo aumento da doçura do fruto verificado durante o processo de maturação (Chitarra & Chitarra, 1990).

No processo de respiração, a glicose é convertida a ácido pirúvico que, por sua vez, na presença de oxigênio, é oxidado completamente a  $\text{CO}_2$  e água produzindo energia em forma de ATP. No entanto, mesmo em condições normais de oxigênio, parte do ácido pirúvico é convertida a acetaldeído e, em seguida, a álcool etílico no processo de glicólise anaeróbica. Tanto o acetaldeído quanto o etanol, em especial o primeiro, provocam a polimerização dos taninos solúveis, o que resulta na perda da adstringência do fruto (Antoniolli et al., 2000; Muñoz, 2002).

No final do processo de maturação, determinados frutos apresentam um aumento na taxa de respiração, evento este denominado subida climatérica. Os frutos que possuem esse padrão de atividade respiratória (como por exemplo, abacate, banana, caqui, goiaba, pêra, manga e mamão) são denominados frutos climatéricos. Os frutos que apresentam pouca variação na taxa respiratória na etapa de maturação são chamados frutos não climatéricos. Os frutos não climatéricos mais conhecidos são: laranja, tangerina, limão, abacaxi, uva, morango, caju, carambola, melancia e cacau. Os frutos não climatéricos apresentam amadurecimento mais lento, sem uma súbita demanda de energia. Por outro lado, o processo de maturação dos frutos climatéricos ocorre rapidamente, com grande demanda de energia responsável pelo rápido aumento da taxa respiratória (Chitarra & Chitarra, 1990; Awad, 1993).

O aumento da taxa respiratória em frutos climatéricos ocorre pelo aumento da produção de etileno no fruto. O etileno é conhecido como “hormônio do amadurecimento”, sendo responsável por diversas respostas fisiológicas do processo de maturação do fruto, incluindo o climatério respiratório (Awad, 1993).

A perda da cor verde também é um indicador importante para determinar o estágio de maturação da fruta. Essa alteração ocorre devido à quebra da estrutura da clorofila e síntese de carotenóides e antocianinas responsáveis pela coloração do fruto maduro (Awad, 1993; Toivonen & Brummell, 2008). O escurecimento de alguns frutos como, por exemplo, a maçã ocorre devido à ação da enzima polifenol oxidase, que oxida os polifenóis a quinona. A reação subsequente da quinona leva ao acúmulo de melanina responsável pelo escurecimento do fruto (Toivonen & Brummell, 2008).

O amolecimento do fruto é outra transformação característica do processo de maturação. A perda de consistência do fruto resulta da decomposição da parede celular, em especial pela alteração da pectina e demais moléculas poliméricas como a celulose e hemicelulose. A pectina presente na parede celular encontra-se ligada ao cálcio, formando o pectato de cálcio. Com o amadurecimento, há liberação do cálcio e

solubilização da protopectina o que promove a alteração da textura do fruto (Toivonen & Brummell, 2008; Chitarra & Chitarra, 1990). Além disso, a celulase provoca a despolimerização da hemicelulose e celulose contribuindo com a desestruturação da parede celular (Awad, 1993).

## 2.5 – Caqui (*Diospyros kaki*)

O caquizeiro, ou *Diospyros kaki*, é uma planta de origem asiática, pertencente à família Ebenaceae, cultivada principalmente na China e no Japão. O caquizeiro foi introduzido no Brasil no fim do século XIX. A expansão do cultivo no país, no entanto, só ocorreu em 1920 com a chegada de imigrantes japoneses (Corsato et al., 2005).

Segundo Martins e Pereira (1989), o caqui pode ser classificado em três variedades distintas: tipo sibugaki, amagaki e variável. O tipo sibugaki possui polpa sempre taninosa, de cor amarelada podendo ou não apresentar semente. No Brasil, destacam-se neste grupo os cultivares Taubaté, Pomelo, Rubi, Trakoukaki, Hachiya e Coração-de-boi. O tipo amagaki é sempre não-taninosa e pode ou não apresentar sementes. Os cultivares Fuyu, Jiro, Hanagoshô e Fuyuhana são os principais representantes deste grupo. Já o tipo variável possui polpa taninosa quando sem semente e polpa não-taninosa quando apresentam uma ou mais sementes. No Brasil, os principais cultivares do tipo variável são Rama Forte, Giombo, Chocolate, Kaoru e Luiz de Queiroz (Martins e Pereira, 1989).

Há, porém, outros tipos de caqui que não foram citados por Martins e Pereira e são cultivados em países do Mediterrâneo e da Ásia. Nos países como Itália, Espanha e Israel, os principais cultivares de caqui encontrados são, respectivamente, “Kaki Tipo”, do tipo variável não adstringente, “Rojo Brillante”, do tipo sempre adstringente, e “Triumph”, do tipo variável adstringente (Giordani, 2002).

A maioria dos frutos do cultivar Rama Forte não possui sementes, sendo, portanto, taninosos. Os frutos apresentam tamanho médio (comparado com as outras variedades de caqui), com formato achatado, sabor adocicado e polpa consistente, com coloração amarelo-escura nos frutos sem semente e parda quando com sementes (Martins e Pereira, 1989).

Nos frutos dos cultivares do tipo variável com semente (não taninosos) a ausência de adstringência deve-se, à coagulação dos taninos pelo etanol e acetaldéido

produzidos pela semente durante o estágio intermediário de crescimento do fruto (Awad, 1993).

Os caquis do tipo “sibugaki” e os do tipo variável sem sementes apresentam polpa taninosa, mesmo quando maduros. Em razão disso, após a colheita, precisam ser tratados para que seja eliminada a adstringência desagradável ao paladar (Martins e Pereira, 1989).

Os principais processos empregados para a destanização do caqui são: i) exposição ao vapor de álcool etílico; ii) exposição a altas concentrações de CO<sub>2</sub> e iii) exposição ao etileno (Muñoz, 2002). Os dois primeiros processos têm como objetivo produzir acetaldeído no interior do fruto. A formação de acetaldeído a partir do etanol ocorre por meio da enzima álcool desidrogenase. Em atmosfera rica em CO<sub>2</sub>, o acetaldeído é produzido no processo de glicólise anaeróbica relatado anteriormente (Chitarra & Chitarra, 1990; Muñoz, 2002). Ao contrário dos dois métodos anteriores, o etileno não é um destanizador. Ele é responsável pela indução do climatério respiratório, acelerando, dessa forma, a maturação da fruta. A destanização do fruto é na realidade uma consequência do amadurecimento acelerado (Muñoz, 2002).

O estudo apresentado por Muñoz (2002), no qual avaliou os métodos de destanização do caqui “Rama Forte”, demonstrou que a exposição da fruta em atmosfera contendo 70% de CO<sub>2</sub> é o método mais eficiente para remover a adstringência, mantendo-se a firmeza da polpa. O autor verificou que os frutos tratados com etanol somente perdem a adstringência após o quinto dia de exposição e os frutos tratados com etileno amolecem rapidamente (Muñoz, 2002).

### **2.5.1 – Análise de compostos antioxidantes presentes no caqui.**

O caqui é uma fruta rica em carotenóides, em especial β-caroteno, β-criptoxantina, zeaxantina, luteína e licopeno (Ancos et al., 2000). Além disso, é uma boa fonte de polifenóis como ácido gálico e ácido cumárico (Goristein et al., 2001). Estudo realizado com caquis cultivados no Japão verificou que os caquis taninosos possuem maior concentração de polifenóis do que os não taninosos. Essa diferença se dá principalmente pela maior concentração de ácido gálico em caquis taninosos (Suzuki et al., 2005).

A presença de carotenóides e polifenóis no caqui confere-lhe uma atividade antioxidante bem expressiva. No estudo de Katsube e colaboradores (2004), apenas o extrato etanólico de caqui adstringente apresentou atividade antioxidante contra o ensaio de oxidação de LDL, enquanto que o extrato etanólico de caqui não adstringente apresentou baixa atividade antioxidante. A ação antioxidante do caqui adstringente foi atribuída a uma atividade seqüestradora de radicais livres devido à expansão do tempo da fase lag (fase inicial lenta) da cinética de peroxidação lipídica. O aumento da fase lag foi proporcional a concentração de caqui no meio reacional. Esse comportamento foi confirmado no ensaio de avaliação de atividade seqüestrante com radical DPPH (Katsube et al., 2004).

Além do que foi mencionado acima, estudos da atividade antioxidante *in vivo* com extrato de caqui também já foram realizados. Vários estudos apresentados por Gorinstein e colaboradores verificaram que uma dieta suplementada com caqui do cultivar “Triumph” diminui significativamente a concentração de lipoperóxidos em ratos alimentados com dieta rica em colesterol (Gorinstein et al., 1998a; Gorinstein et al., 1998b; Gorinstein et al., 2000). Mais ainda, a suplementação com caqui melhorou o perfil lipídico dos ratos, diminuindo os níveis de triglicerídeos e de LDL-colesterol. A suplementação feita com a casca do caqui apresentou melhores resultados quando comparado com a polpa da fruta (Gorinstein et al., 1998b). A diferença encontrada entre casca e polpa foi justificada posteriormente a uma maior concentração de polifenóis observado na casca do caqui em relação à polpa (Gorinstein et al., 2001).

### 3 – Objetivos

**Capítulo 1** - Análise do potencial antioxidante do ácido elágico (AE) em sistemas geradores de radicais livres mediados por Cu(II) e ascorbato.

O estudo desenvolvido com o AE tem como objetivo principal determinar o mecanismo antioxidante desse bifenol na presença de Cu(II). Além disso, podemos citar como objetivos específicos: **i)** determinar o potencial antioxidante do AE contra a degradação oxidativa da 2-desoxi-D-ribose e do DNA plasmidial; **ii)** quantificar a velocidade de oxidação do ascorbato e a velocidade de consumo de oxigênio na presença de diferentes concentrações de AE; **iii)** quantificar a formação de radical ascorbil em diferentes concentrações de AE; **iv)** finalmente, analisar a capacidade do AE em reduzir íons cúpricos.

**Capítulo 2** - Atividade antioxidante do extrato aquoso da polpa de caqui Rama Forte (*Diospyros kaki*).

O segundo capítulo dessa dissertação tem o objetivo de analisar o potencial antioxidante do extrato aquoso do caqui Rama Forte. Determinamos como principais objetivos específicos do trabalho: **i)** analisar o potencial antioxidante do extrato de caqui contra a degradação oxidativa da 2-desoxi-D-ribose mediada por Fe(III)-co-quelante e ascorbato; **ii)** analisar o potencial antioxidante do extrato de caqui contra a peroxidação lipídica mediada por reagentes de Fenton e pelo sistema Fe(III)-citrato e ascorbato; **iii)** verificar a formação de radical ascorbil e do aduto DMPO- $\cdot$ OH na presença de diferentes concentrações de extrato aquosos de caqui; **iv)** fornecer evidências que auxiliem na determinação do mecanismo de ação antioxidante e/ou pró-oxidante do caqui nos sistemas analisados.

## Capítulo 1

### Análise do potencial antioxidante do AE em sistemas geradores de radicais livres mediados por Cu(II) e ascorbato.

#### 4 - Materiais e Métodos:

##### 4.1 - Reagentes:

Os reagentes ácido ascórbico, ácido elágico (AE), 2-desoxi-D-ribose (2-DR), fosfato dibásico de potássio ( $K_2HPO_4$ ), fosfato monobásico de potássio ( $KH_2PO_4$ ), brometo de etídio e ácido tiobarbitúrico (TBA) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. Os demais reagentes (sulfato de cobre (Cu II), ácido fosfórico e agarose) foram adquiridos de outras empresas e possuem qualidade analítica.

A solução de ácido elágico foi preparada, diariamente, com adição de 6,6 mg de AE em 200 mL de tampão fosfato (2,5 mM, pH 7,2). O ácido elágico não solubiliza completamente em meio aquoso, sendo assim, a concentração da solução estoque foi calculada pelo coeficiente de Absortividade Molar ( $\epsilon$ ) do AE em meio aquoso ( $\epsilon_{360nm} = (1,62 \pm 0,04) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) descrito por Bock e colaboradores em 1981. A concentração da solução de AE era analisada antes do início do experimento e seu cálculo foi realizado segundo a equação abaixo. A solução estoque de AE descrita acima apresentava uma concentração de AE em torno de 40 a 50  $\mu\text{M}$  e era feita poucos minutos antes de ser adicionada ao meio reacional.

$$\text{Concentração estoque} = \frac{A_{360nm}}{\text{coeficiente de Absortividade Molar } (\epsilon)}$$

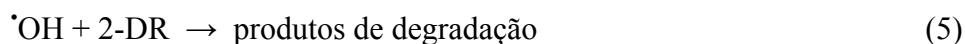
As soluções de 2-desoxi-D-ribose, ácido fosfórico e de ácido ascórbico foram preparadas em água deionizada, sendo este último preparado diariamente. A solução de Cu(II) foi preparada diariamente em 10 mM de HCl. A solução de TBA, preparada em 50 mM de NaOH, foi utilizada por um período de no máximo 2 dias.

O DNA plasmidial pUC 18 foi cedido pelo Grupo de Imunologia Molecular, chefiado pelo prof. Dr. Marcelo Brígido, do laboratório de Biologia Molecular (IB-CEL) da UnB.

#### 4.2 - Dano oxidativo à 2-desoxi-D-ribose:

Trata-se de um método espectrofotométrico que tem como princípio quantificar o dano oxidativo ao açúcar 2-desoxi-D-ribose (2-DR) causado por espécies reativas de oxigênio, em especial radical hidroxil. A reação do radical hidroxil com a 2-DR forma, além de outros produtos, um composto de 3 carbonos, malonaldeído (MDA). A quantificação de MDA foi feita com adição de ácido tiobarbitúrico por meio da formação do aduto cromogênico (TBA<sub>2</sub>-MDA) que possui pico espectrofotométrico de absorção em 532 nm (Gutteridge, 1981).

O sistema gerador de radical hidroxil foi formado por íon Cu(II) em mistura com ascorbato como agente redutor (esquema 3). Nesse sistema, o íon metálico sofre redução formando Cu(I) e o ascorbato é oxidado a radical ascorbil. A forma reduzida do íon metálico reage com o oxigênio dissolvido no meio gerando radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) e, posteriormente, radical hidroxil (<sup>•</sup>OH).



**Esquema 3:** sistema gerador de radical hidroxil mediado por Cu(II) na presença do redutor ascorbato.

O meio reacional foi composto de 20 mM de tampão fosfato (KPi) (pH 7,2), 2-DR, AE e Cu(II) pré-incubados por 5 minutos (exceto no experimento de variação do tempo de pré-incubação do AE com Cu(II)). A reação foi iniciada pela adição de ácido ascórbico (0,5 mM) ao meio reacional contendo os reagentes supracitados. A reação foi



conduzida em 0,5 mL por 15 minutos em temperatura ambiente ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), sendo então finalizada por meio da adição de 0,5 mL de ácido fosfórico 4% (v/v) seguida de 0,5 mL de TBA 1% (p/v). O meio foi aquecido em banho-maria ( $98^\circ\text{C}$ ) por 15 minutos, em seguida foi feita a quantificação espectrofotométrica do aduto  $\text{TBA}_2\text{-MDA}$  em 532 nm no espectrofotômetro Hitachi-1000.

Foi utilizado para cada condição experimental um controle negativo da metodologia denominado “tempo zero” no qual o ácido ascórbico ou o íon metálico era adicionado ao meio reacional após o ácido fosfórico e o TBA. A absorbância do controle “tempo zero” foi subtraída dos valores obtidos para cada condição experimental (Hermes-Lima et al., 2000).

Os valores de  $I_{50}$  (índice de inibição de 50% dos danos) foram calculados no software *Kinetics* para sistema operacional DOS.

#### **4.3 - Cinética de oxidação do ascorbato:**

O ascorbato, ao reagir com íons metálicos, é oxidado a radical ascorbil (reação 1, esquema 3). Dessa forma, é possível avaliar a cinética dessa reação através do desaparecimento de ascorbato no meio reacional.

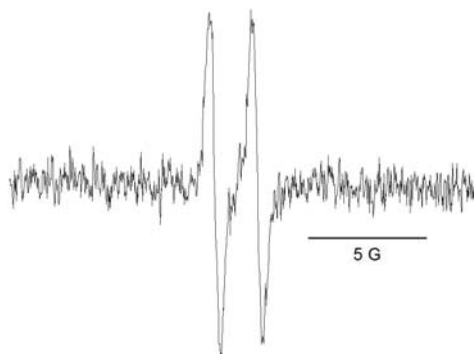
A oxidação do ascorbato foi analisada por meio do decaimento da absorbância em 265nm que corresponde ao pico espectrofotométrico de absorção do ácido ascórbico. O meio foi tamponado com 20 mM de tampão fosfato (pH 7,2) e o AE foi pré-incubado por 5 minutos com Cu(II) ( $5 \mu\text{M}$ ) para a formação do complexo AE-cobre. A reação foi então iniciada com a adição de ascorbato ( $100 \mu\text{M}$ ). Os ensaios realizados com diferentes concentrações de AE foram lidos contra seus respectivos brancos contendo 20 mM de tampão fosfato,  $5 \mu\text{M}$  de Cu(II) e AE na concentração referente ao experimental.

A cinética de oxidação do ascorbato realizada em 1 mL de volume final foi acompanhada por 3 minutos no espectrofotômetro *Genesys II – Milton-Roy*. O parâmetro de análise dos resultados foi feito por meio da velocidade média de oxidação do ascorbato, dado em A/s, determinado pela diferença entre a absorbância no início da reação e a absorbância após 3 minutos de reação, dividido pelo tempo total de reação.

#### 4.4 - Ressonância paramagnética eletrônica (RPE): Radical ascorbil

A técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE ou, do inglês, EPR) consiste em detectar, de maneira direta, substâncias que possuem elétrons desemparelhados. A técnica tem por princípio básico que qualquer substância, possuidora ou não de elétrons livres, ao ser colocada em um campo magnético externo terá seus *spins* orientados a favor e contra este campo. Os *spins* orientados a favor do campo magnético possuem menor energia e, em número quântico,  $M_s = -1/2$ . Os *spins* orientados contra o campo magnético possuem maior energia e  $M_s = +1/2$ . Dessa forma, um radical livre, que possui elétrons desemparelhados, apresentaria uma diferença de população entre *spins* com  $M_s = -1/2$  e com  $M_s = +1/2$ . Esse saldo de spins gera uma diferença de energia que, ao ser detectado em um espectrômetro, leva a formação de um espectro único para cada molécula radicalar (Augusto, 2006). Sendo assim, é possível analisar a geração do radical através do sinal observado no espectrômetro. A intensidade do sinal é proporcional a quantidade de radical formado.

O objetivo do uso da técnica de EPR foi verificar a interferência do polifenol AE e do extrato de caqui na formação do radical ascorbil. O radical ascorbil possui espectro de duas linhas conforme a apresentação na figura 3.



**Figura 3:** espectro do radical ascorbil

Os meios reacionais foram preparados em volumes de 1 mL e as leituras dos espectros foram realizadas em capilares de vidro através da retirada de alíquotas dos meios com a reação já em curso. Os experimentos foram efetuados, em temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C), no espectrômetro Bruker ESP 300 equipado com o ressonador ER 4102 ST com a colaboração do professor Antonio Alonso do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás (IF-UFG).

O experimento realizado com o AE utilizou o sistemas Cu(II) + ascorbato para gerar o radical ascorbil. O espectrômetro foi ajustado nas seguintes condições: frequência de microonda de 9,81 GHz, frequência de modulação de 100 KHz, amplitude de modulação de 0,359 G, potência de 0,2 mW e ganho de  $1 \times 10^5$ . Diferentes concentrações de AE foram pré-incubadas com 5 e 15  $\mu\text{M}$  de Cu(II) por 5 minutos em meio tamponado com tampão fosfato (20mM). A reação foi iniciada com a adição de ácido ascórbico (concentração final de 1 mM). Cada espectro do radical ascorbil foi obtido através da leitura de 2 espectros. A conclusão da leitura do espectro ocorreu após 3 minutos do início da reação.

Os espectros foram analisados com o auxílio do programa Bruker WIN-EPR versão 2.11. A quantificação do radical ascorbil foi feita através da altura do pico (representado em unidades arbitrárias) da primeira linha de ressonância. A altura do ruído presente no espectro foi subtraída da altura do pico de análise.

#### 4.5 - Cinética de consumo de oxigênio

O ensaio de consumo de oxigênio tem como objetivo calcular o decaimento da concentração de oxigênio presente no meio reacional. De acordo com a reação 2 (esquema 3), o íon Cu(I) é oxidado pelo oxigênio dissolvido no meio formando radical  $\text{O}_2^{\bullet}$ . A cinética dessa reação foi analisada por meio da velocidade de desaparecimento do oxigênio.

A cinética de consumo de oxigênio foi realizando no eletrodo de Clark, modelo YSI 5300 (*Yellow Springs Instruments Co.*), em temperatura ambiente com 3 mL de volume final. O meio reacional foi composto de 20 mM de tampão fosfato (pH 7,2), 15  $\mu\text{M}$  de Cu(II) e variadas concentrações de AE (0-15  $\mu\text{M}$ ) pré-incubados por 5 minutos. A reação foi iniciada com a adição de ascorbato (0,5 mM) e acompanhada por 30 minutos.

A concentração inicial de oxigênio dissolvido (referente a 100% de oxigênio) foi de 220  $\mu\text{M}$ , que corresponde à concentração encontrada em altitudes de 1000 metros acima do nível do mar (Hermes-Lima et al., 2001).

A velocidade de consumo de oxigênio foi analisada no software *Kinetic* para sistema operacional DOS. O coeficiente angular da reta, que indica a velocidade de

desaparecimento do oxigênio, foi calculado utilizando-se a fase linear do início do decaimento (correspondente aos 5 minutos iniciais).

#### 4.6 - Degradação Oxidativa do DNA

Os danos oxidativos em DNA plasmidial pUC 18 mediados por íons Cu(II) e ascorbato foram observados através do desaparecimento da sua forma nativa superenovelada do plasmídeo (do inglês supercoiled - DNAsc) originando as formas circular aberto (ou open circular – DNAoc) e linear (DNA<sub>L</sub>) (Hermes-Lima 1998). Após sofrer dano oxidativo, o DNA é aplicado ao gel de eletroforese para a separação das diferentes formas.

O polifenol AE e o íon Cu(II) foram pré-incubados por 5 minutos antes da adição de aproximadamente 10 ng/μL de DNA. A reação foi iniciada com adição de 1 mM de ascorbato (concentração final) sendo conduzida em 50 μL por 8 minutos a temperatura ambiente (25 ± 1°C). A reação foi finalizada com a adição de tampão de amostra 1X (glicerol 50% e azul de bromofenol). As amostras foram então aplicadas em gel de agarose (0,8% p/v) preparado em TEB 1X (tris 0,89 M, ácido bórico 0,89 M e EDTA 0,08 M) na presença de 0,5 μg/mL de brometo de etídeo. Uma corrente elétrica de 70 mA e uma DDP de 60V foi aplicada ao gel por aproximadamente 1 hora para separação das bandas de DNA e, em seguida, a imagem foi visualizada em um transiluminador de UV e gravada em mídia para a quantificação das bandas.

A quantificação dos danos oxidativos foi realizada com o auxílio do softwear *PhotoCaptMw versão 10.1* para *Windows*. Os resultados apresentados indicam o percentual de DNAsc. A quantificação do DNAsc foi feito de acordo com a equação abaixo para corrigir a diferença de luminosidade presente na fração superenovelada do pUC 18 (Hermes-Lima et al, 1998).

$$\%SC = [1,4 \times SC / (L + OC + (1,4 \times SC))] \times 100$$

Onde: SC se refere à porção superenovelada

L à porção linear

OC à porção circular aberto

#### **4.7 - Análise Espectrofotométrica do complexo AE-cobre**

O espectro do complexo AE-cobre foi realizado no espectrofotômetro Hitachi U-2001 em meio contendo 20 mM de tampão fosfato (pH 7,2), 10  $\mu$ M de AE e variadas concentrações de Cu(II) (0-30  $\mu$ M). As leituras foram iniciadas imediatamente após a adição do Cu(II) ao meio e as amostras foram feitas contra tampão fosfato (20 mM). A varredura do espectro foi realizada nos comprimentos de onda de 200 a 700 nm com velocidade de 200 nm/min e intervalo de impressão de 10 nm.

#### **4.8 - Análise da redução do Cu(II) pelo AE por meio do ensaio da neocuproína.**

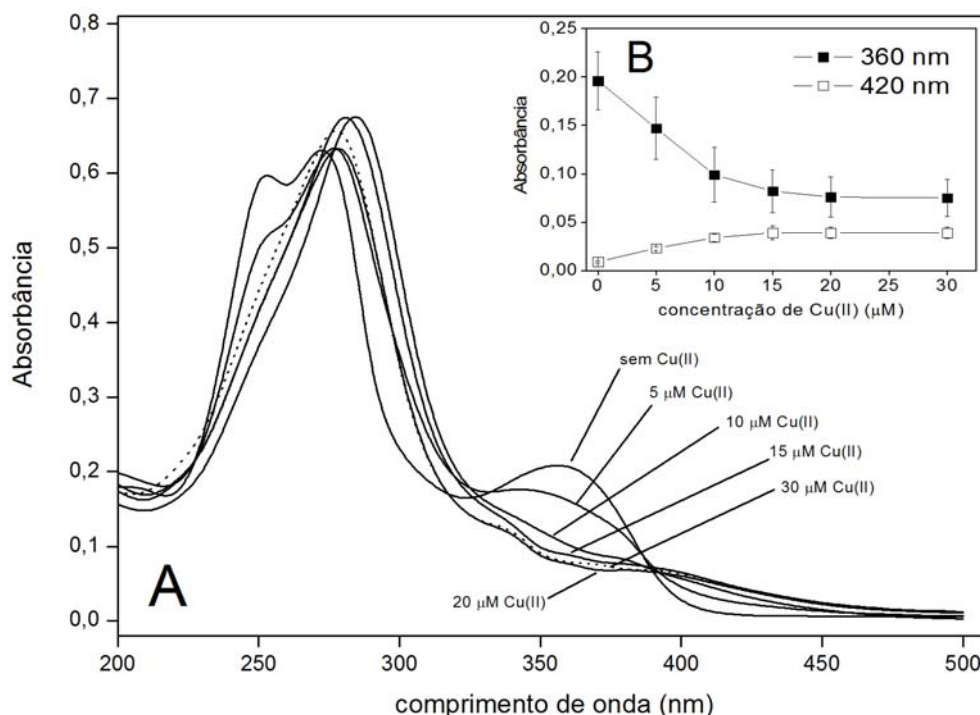
O estudo da capacidade do AE em reduzir íons Cu(II) e da cinética de remoção dos íons reduzidos do complexo AE-Cu(I), foi realizado por meio de do estudo espectrofotométrico de competição utilizando um ligante específico de Cu(I), a neocuproína (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina) (Hermes-Lima et al., 2001).

O meio reacional era composto de tampão fosfato (20 mM) pH 7,2; Cu(II) (20 $\mu$ M); AE (2 $\mu$ M) e 5mM de neocuproína. A reação foi iniciada com a adição de neocuproína no meio contendo tampão e o complexo Cu-AE pré-formado, sendo a cinética de remoção de íons Cu(I) do complexo acompanhada por 30 minutos em temperatura ambiente ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) no comprimento de onda de 450 nm, específico para o complexo neocuproína-Cu(I).

## 5. Resultados e Discussões

### 5.1 – Análise do complexo AE-cobre.

O resultado obtido na figura 4 indica que há alterações no espectro do AE com o aumento da concentração de Cu(II) no meio, o que caracteriza a formação de um complexo AE-cobre. O pico de absorvância em 360 nm, característico do AE, diminui com o aumento da concentração de Cu(II). Por outro lado, observa-se também um aumento da absorvância em torno de 420 nm proporcional a concentração de Cu(II) no meio. O aparecimento dos pontos isobésticos em 330 e 390 nm evidencia a formação do complexo AE-cobre. Ao analisar a variação da absorvância nesses dois comprimentos de onda (figura 4b), em especial em 420 nm, verifica-se que a partir de 10  $\mu\text{M}$  de Cu(II) não há diferença significativa na alteração do espectro (ANOVA/SNK). Esse resultado indica formação de complexo em solução aquosa na razão 1:1 de AE e cobre.



**Figura 4:** (A): Efeito da concentração de Cu(II) no espectro do AE (10 $\mu\text{M}$ ) contendo 20mM de tampão fosfato. A varredura dos espectros AE-Cu(II) foi realizada imediatamente após a adição do íon metálico em meio tamponado contendo AE. (B): Alterações nos picos de absorvância em 360 nm(■) e 420 nm (□) do espectro de AE em concentrações crescentes de Cu(II). Os valores representam a média  $\pm$  DP (n=3).

O estudo de Bock e colaboradores (1981) também verificou formação de complexo AE-cobre de razão aproximadamente 1:1. Os resultados apresentados pelos autores, também demonstram diminuição da absorbância em 360 nm e a formação de pontos isobésticos em 340 nm e, aproximadamente, em 390 nm. Além disso, no estudo de Bock, foi verificado um desvio do espectro na região de 280 nm que também pode ser visualizado em nosso resultado.

Alterações espectrais do AE também foram observadas na presença de Fe(II) e Fe(III). De acordo com Ginani (2005), tanto o Fe(II) quanto o Fe(III) promovem a mesma modificação do espectro do AE, que é caracterizado pela diminuição do pico de absorbância em 360 nm com concomitante aumento em 550 nm. As hipóteses levantadas para justificar os perfis idênticos dos espectros do AE-Fe(II) e AE-Fe(III) foram: i) a existência de grande semelhança entre os dois espectros; ii) redução do Fe(III) a Fe(II) com conseqüente oxidação do AE; iii) oxidação do Fe(II)-AE pelo oxigênio (Ginani, 2005).

A formação do complexo do AE com o cobre não indica necessariamente que vai haver uma inibição da geração de EROs. O complexo formado pode reduzir a velocidade da reação de oxi-redução formadoras de radical hidroxil das quais o íon metálico faz parte; disponibilizar ainda mais o íon metálico para tais reações ou mesmo, não interferir na velocidade de reação. Um exemplo clássico de quelante que disponibiliza o íon metálico para a reação é o EDTA. A produção de radical hidroxil aumenta quando o Fe(III) se encontra ligado a este quelante (Halliwell, 1978; McCord & Day Jr, 1978). Entretanto, o mesmo não é verificado com o íon Cu(II).

Como não existem trabalhos que demonstraram o efeito antioxidante da complexação do AE com íons metálicos, propomos investigar se o AE realmente apresentaria esse mecanismo quelante-antioxidante. Portanto, os próximos ensaios tiveram como objetivo avaliar o comportamento do AE em sistema gerador de radical livre mediado por Cu(II) e ascorbato.

## 5.2 – Inibição da degradação oxidativa da 2-DR pelo AE.

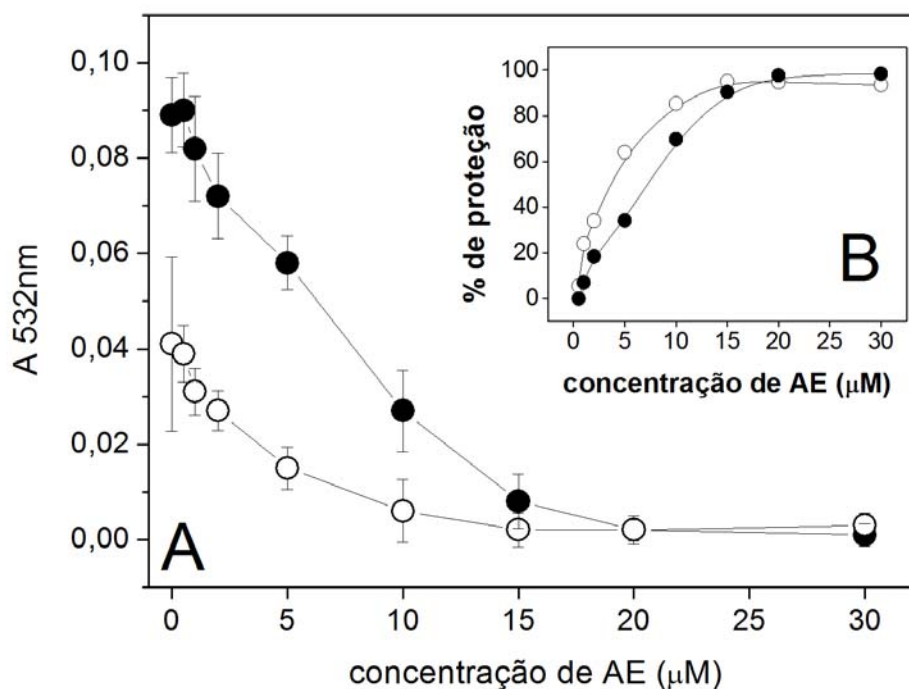
O potencial antioxidante do AE foi analisado inicialmente por meio do método de degradação oxidativa da 2-DR. A curva de variação da concentração de AE, apresentada na figura 5, foi realizada em meio contendo 5 ou 15  $\mu\text{M}$  de Cu(II) e 0,5 mM de ascorbato. Observa-se que a inibição da degradação da 2-DR é dependente da concentração de AE no meio reacional. A máxima proteção do AE (de aproximadamente 95%) é verificada em concentrações iguais ou superiores a 10  $\mu\text{M}$  e 15  $\mu\text{M}$  em meio contendo, respectivamente, 5  $\mu\text{M}$  e 15  $\mu\text{M}$  de Cu(II).

A partir da curva de variação da concentração de AE é possível determinar a concentração desse antioxidante capaz de inibir 50% o dano oxidativo a 2-DR, denominado  $I_{50}$ . Os valores de  $I_{50}$  obtidos na presença de 5 e 15  $\mu\text{M}$  de Cu(II) foram, respectivamente, iguais a  $3,02 \pm 0,4$  e  $5,2 \pm 1,04$   $\mu\text{M}$ .

Valores de  $I_{50}$  na faixa de poucos micromolares são característicos de moléculas quelantes. Antioxidantes clássicos com atividade seqüestradora de radical hidroxil como o etanol e o DMSO (dimetilsulfóxido) apresentam valores de  $I_{50}$  em torno de 19 e 38 mM, respectivamente, em meio contendo 10  $\mu\text{M}$  de Cu(II) e 3 mM de ascorbato (Hermes-Lima et al., 2001).

Observa-se que na curva de variação da concentração de AE na presença de 15  $\mu\text{M}$  de Cu(II) a máxima inibição do dano oxidativo à 2-DR (de quase 100%) apresenta razão 1:1 AE-cobre. Considerando que o mecanismo do AE se deva realmente a uma atividade quelante, este resultado confirma novamente a estequiometria 1:1 para o complexo AE-cobre que foi verificada no estudo espectral de complexação discutido anteriormente. No entanto, na presença de 5  $\mu\text{M}$  de Cu(II), a máxima inibição do dano oxidativo a 2-DR é observado com 10  $\mu\text{M}$  de AE. Essa diferença na atividade antioxidante do AE observada nos dois sistemas contendo 5 e 15  $\mu\text{M}$  de Cu(II) pode ser explicado por uma diferença na cinética de reação, que é mais lenta em concentrações mais baixas de Cu(II).

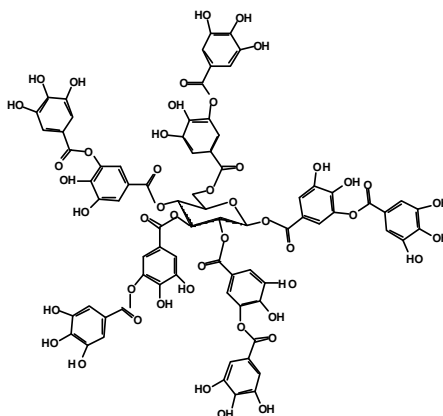




**Figura 5:** (A) Efeito da variação da concentração do AE (0-30  $\mu\text{M}$ ) sobre a degradação oxidativa da 2-DR (5 mM) em tampão fosfato (20 mM) mediada por ascorbato (0,5 mM) e Cu(II) 5  $\mu\text{M}$  (○) e 15  $\mu\text{M}$  (●). Os reagentes foram pré-incubados por 5 minutos antes da adição de ascorbato. Os pontos acima representam a média  $\pm$  DP ( $n=8$ ). (B) Análise dos resultados apresentados demonstrando o efeito de proteção do polifenol AE em meio contendo 5  $\mu\text{M}$  (○) e 15  $\mu\text{M}$  (●) de Cu(II).

O AE também apresenta efeito antioxidante contra dano oxidativo a 2-DR (5 mM) na presença de reagentes de Fenton. De acordo com Ginani (2005), o valor de  $I_{50}$  obtido pelo AE na presença de 50  $\mu\text{M}$  de Fe(II) e 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi de 66  $\mu\text{M}$  de AE. Além disso, na concentração 1:1 de AE e Fe(II) (50  $\mu\text{M}$  cada) a proteção verificada pelo AE contra o dano oxidativo a 2-DR foi de apenas 40% (Ginani, 2005). No estudo de Ginani, o mecanismo quelante do íon metálico foi apontado como principal atividade antioxidante do AE no sistema Fe(II) e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O efeito protetor do AE na reação de Fenton, no entanto, é menor do que o encontrado no sistema Cu(II) e ascorbato. Uma justificativa para esse comportamento observado seria a maior afinidade do AE pelos íons cúpricos quando comparada com a do Fe(II). No entanto, não existem dados na literatura que demonstrem o valor da afinidade do AE por íons de cobre e ferro. Portanto, seria interessante a realização de ensaios que avaliem a afinidade do AE com íons metálicos para confirmar essa hipótese.

Outras moléculas antioxidantes estudadas em nosso laboratório, como o PIH (piridoxal isonicotinoil hidrazona) e o ácido tânico (AT), também apresentaram valores de  $I_{50}$  por volta de poucos micromolares em sistemas mediados por Cu(II) e ascorbato. O PIH e o AT são antioxidantes com atividade quelante de íons ferro e cobre que impedem, de maneira bem eficiente, a degradação oxidativa da 2-DR pelo radical hidroxil (Lopes et al., 1999; Hermes-Lima et al., 1999; Hermes-Lima et al., 2000; Hermes-Lima et al., 2001; Andrade Jr et al., 2005; Andrade Jr et al., 2006). A alta eficiência do PIH em quelar íons de ferro despertou interesse para uso desse antioxidante sintético no tratamento de doenças relacionadas ao aumento sistêmico de ferro como a hemocromatose e a  $\beta$ -talasseia (Chaston & Richardson, 2003). Com relação ao efeito do PIH em sistema contendo Cu(II) e ascorbato verificou-se que o mesmo apresenta maior eficiência em inibir o dano oxidativo à 2-DR quando comparado com D-penicilamina, quelante tradicional de cobre, utilizado no tratamento da doença de Wilson. O valor de  $I_{50}$  obtido pelo PIH na presença de 10  $\mu$ M de Cu(II) e 3 mM de ascorbato foi de 6  $\mu$ M contra 10  $\mu$ M da D-penicilamina (Hermes-Lima, et al., 2001). Esse potente efeito antioxidante do PIH foi atribuído à formação do complexo PIH-cobre de razão 1:1.



**Figura 6:** Estrutura do polifenol ácido tânico.

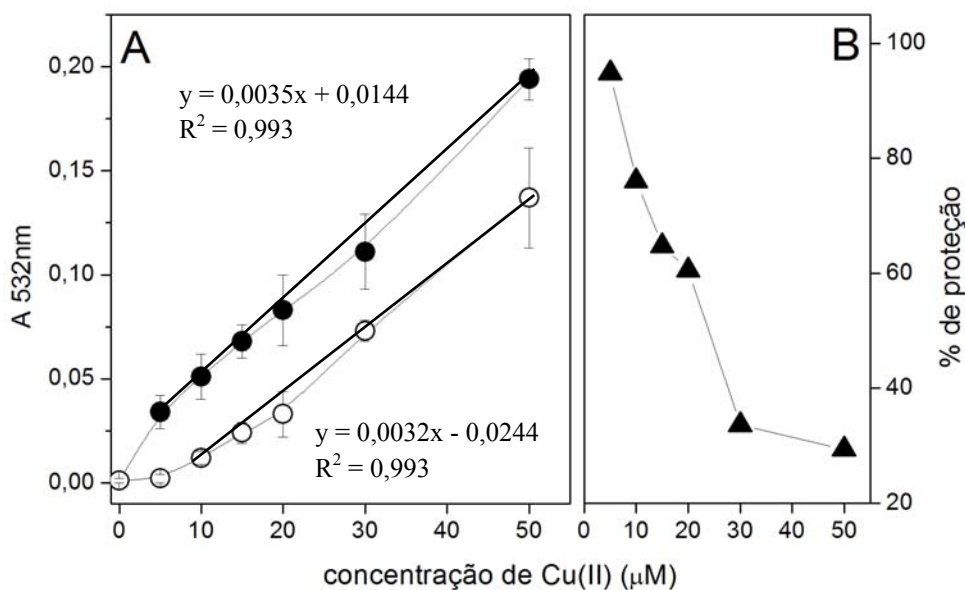
O AT é um polifenol que possui 10 grupos galoil ligados a um carboidrato central (figura 6). Estima-se que um mol de AT seria capaz de quelar 6 a 8 mols de cobre (Andrade et al., 2005). Entretanto, apesar de apresentar uma estrutura muito maior que o AE, o valor de  $I_{50}$  do AT contra o dano oxidativo à 2-DR mediado por 15  $\mu$ M de Cu(II) e 0,5 mM de ascorbato foi de  $5,3 \pm 0,8 \mu$ M. Este valor de  $I_{50}$  obtido pelo AT é

bem próximo ao encontrado com o AE. Vale ressaltar que os ensaios experimentais para o cálculo de  $I_{50}$  dos dois polifenóis (AE e AT) foram feitos em épocas distintas, o que pode interferir nos valores absolutos de  $I_{50}$ .

A proteção do AE também é dependente da concentração de Cu(II) no meio reacional. Na ausência de antioxidante, o aumento de Cu(II) provoca um aumento linear do dano oxidativo à 2-DR. A presença de 10  $\mu\text{M}$  de AE no sistema inibe completamente o dano causado por 5  $\mu\text{M}$  de Cu(II). Porém, a partir de 10  $\mu\text{M}$  de cobre, observa-se novamente aumento linear do dano oxidativo à 2-DR com coeficiente angular bem semelhante ao da curva controle sem AE (figura 7a). Esse comportamento do AE é caracterizado por uma queda de 65% do percentual de proteção do polifenol quando a concentração de Cu(II) no meio é de 50  $\mu\text{M}$  (figura 7b).

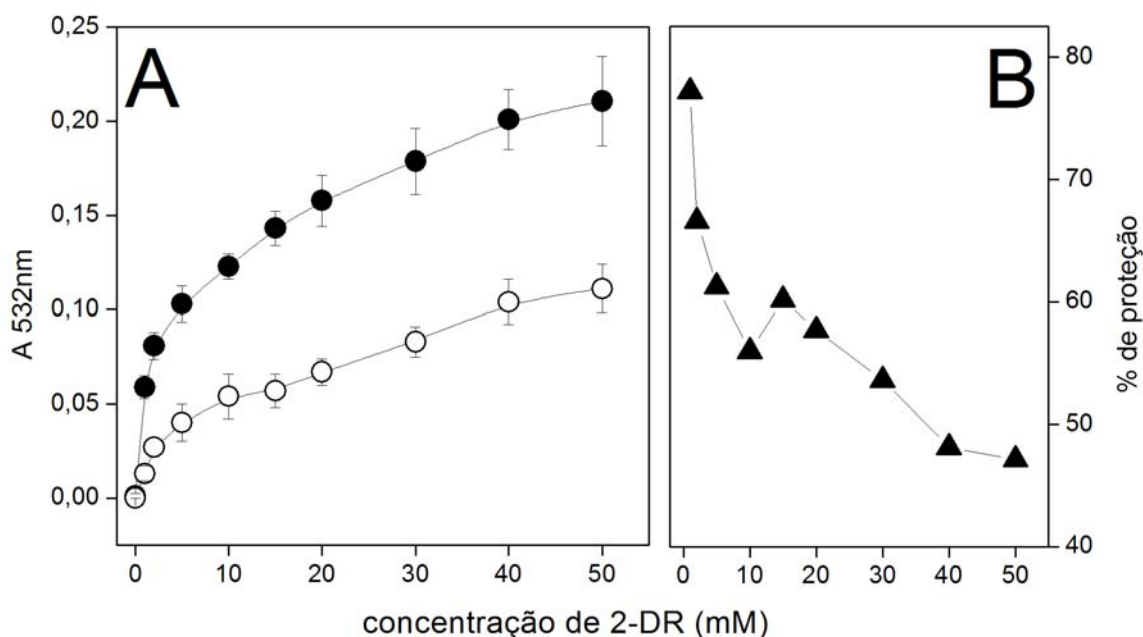
Esse comportamento é mais uma característica de moléculas com atividade quelante, uma vez que na medida em que se aumenta a concentração do íon metálico mantendo-se a concentração do antioxidante, aumenta proporcionalmente a probabilidade de haver Cu(II) livre (não complexado com o antioxidante). A razão desse comportamento observado está relacionada a uma quantidade limitada de AE para complexar os íons cúpricos presentes no meio em excesso estequiométrico. Sendo, assim, ultrapassada a relação estequiométrica entre AE e íons cúpricos, observada no estudo espectrofotométrico apresentado acima, o dano oxidativo aumenta proporcionalmente à concentração de Cu(II) presente no meio, de forma semelhante a curva sem o polifenol.

Mesmo comportamento foi observado com o PIH com o aumento de Cu(II) (0-30  $\mu\text{M}$ ) no meio reacional. A presença de 7  $\mu\text{M}$  de PIH inibe completamente o dano oxidativo à 2-DR mediado por 1-7  $\mu\text{M}$  de Cu(II). Porém, o efeito antioxidante do PIH reduz progressivamente com o aumento de cobre no meio. Concentrações superiores a 7  $\mu\text{M}$  de Cu(II) no meio reacional provocam aumento linear do dano oxidativo com coeficiente angular semelhante a curva controle sem antioxidante (Hermes-Lima, et al., 2001).



**Figura 7:** (A) Efeito da variação da concentração de Cu(II) (0-50  $\mu\text{M}$ ) nos danos oxidativos à 2-DR (5 mM) mediada por ascorbato (0,5 mM) em tampão fosfato (20 mM) em duas condições: na ausência de antioxidante (●) e na presença de 10  $\mu\text{M}$  de AE (○). Os reagentes foram pré-incubados por 5 minutos antes da adição de ascorbato. Os pontos acima representam a média  $\pm$  DP (n=9). Equações das retas das duas condições experimentais (na ausência e na presença de AE) obtidas a partir de 5 e 10  $\mu\text{M}$  de Cu(II), respectivamente. (B) Análise dos dados demonstrando a diminuição da porcentagem de proteção do AE (▲) com o aumento da concentração de Cu(II).

A concentração de 2-DR no meio reacional também interfere na atividade antioxidante oferecida pelo AE. O aumento de 2-DR no meio provoca um aumento do dano oxidativo a esta biomolécula (figura 8a). Esse fato é esperado, uma vez que o aumento da concentração da molécula alvo leva a um aumento da possibilidade desta reagir com os radicais livres formados, e conseqüentemente, a uma maior formação de MDA. Na presença de AE, verifica-se diminuição do dano oxidativo em todas as concentrações de 2-DR. Porém, o percentual de proteção do AE contra os danos oxidativos a 2-DR diminui com o aumento da molécula alvo. Moléculas com atividade sequestradora de radical livre apresentam esta característica no percentual de proteção com o aumento da molécula alvo, uma vez que há uma competição entre o antioxidante e a 2-DR pelo radical hidroxil.



**Figura 8:** (A) Efeito da variação da 2-DR (0-50 mM) na ausência de polifenóis (●) e na presença de 10 μM de AE (○). Meio reacional contendo 15 μM de Cu(II), 0,5 mM de ascorbato e 20 mM de tampão fosfato. Os reagentes foram pré-incubados por 5 minutos antes da adição de ascorbato. Os pontos acima se referem à média ± DP (n = 6 a 16). (B) Porcentagem de proteção do AE (▲) em diferentes concentrações de 2-DR.

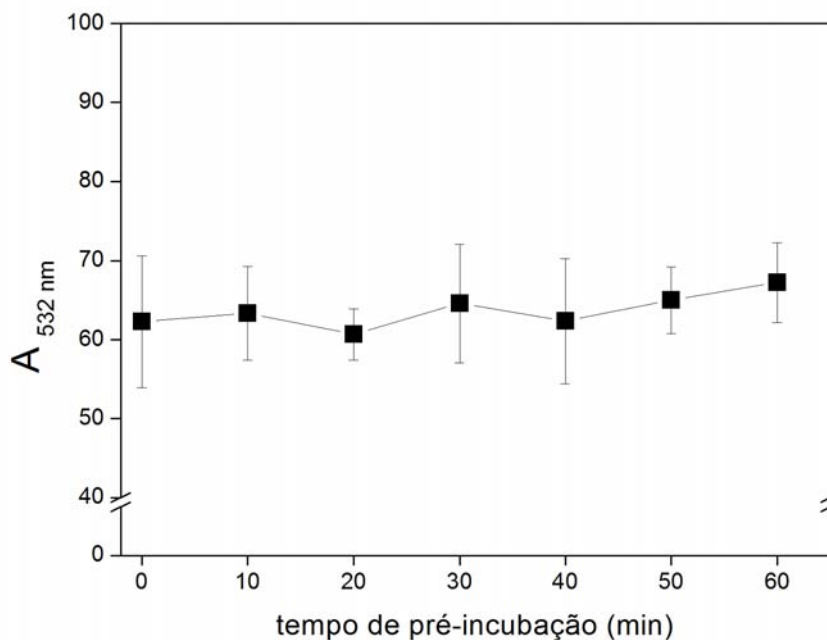
Portanto, esse resultado indica um comportamento híbrido do polifenol AE, que pode agir como quelante de íons metálicos e seqüestrador de radicais livres. A atividade seqüestradora de radicais livres pelo AE já foi demonstrada em alguns trabalhos realizados com este polifenol (Priyadarsini et al., 2002; Zafrilla et al. 2001). Zafrilla e colaboradores (2001), ao estudar a habilidade do AE em seqüestrar o radical DPPH, verificaram que o mesmo apresenta atividade seqüestradora equivalente a 2,6 mM de trolox. Acredita-se que o AE reaja com o radical hidroxil (na velocidade de  $8,9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  em pH 7) transferindo um elétron para o radical hidroxil, formando ânion hidroxila e cátion de radical fenoxil. O cátion radicalar posteriormente perde um próton formando o radical fenoxil (Priyadarsini et al., 2002).

Três mecanismos seqüestradores de radicais livres podem ser abordados no sistema estudado: i) a atividade seqüestradora seria atribuída ao AE livre (não complexado com o Cu(II)); ii) o complexo AE-cobre apresentaria esta atividade seqüestradora; iii) ou, finalmente, ambas formas livre ou complexada apresentariam atividade seqüestradora de radical hidroxil.

Já foi verificado, em outros estudos, que os complexos de polifenóis com íons metálicos apresentam atividade sequestradora de radicais livres. Estudo realizado com a rutina verificou que a atividade sequestradora de radical superóxido desse flavonóide aumenta quando o mesmo se encontra complexado com cobre. O aumento dessa atividade antioxidante pode ser explicado devido a uma atividade semelhante ao observado pela SOD (atividade SOD-like) que seria observado somente quando a rutina se encontra complexada com íons metálicos, como, por exemplo, o cobre (Afanas'ev et al., 2001). Posteriormente, esse mesmo efeito da complexação com íons metálicos foi observado com outros flavonóides como a quercetina, catequina, luteolina, kaempferol entre outros (Moridani et al., 2003).

A interferência do tempo de pré-incubação do AE com o Cu(II) também foi analisada (figura 9). De acordo com o resultado obtido, não se verifica alteração do potencial antioxidante do AE em diferentes tempos de pré-incubação do AE com os íons Cu(II). Ou seja, quando se inicia a reação com Cu(II), sem haver a formação prévia do complexo AE-cobre, ou mesmo quando se faz a incubação prévia do AE com o Cu(II), antes de iniciar a reação com o ascorbato, o efeito protetor do bifenol em ambas situações se mantém. Esse resultado pode indicar que a formação do complexo AE-cobre é instantânea. Essa proposta é confirmada por meio das alterações espectrais do AE observadas após adição do Cu(II) no sistema, uma vez que nesse ensaio as leituras foram realizadas imediatamente após a adição do Cu(II) ao meio contendo AE e tampão fosfato.

Ao contrário do que foi verificado com os íons cúpricos, o tempo de pré-incubação do AE com o complexo Fe(III)-EDTA parece exercer influência positiva no potencial antioxidante do bifenol. Os estudos espectrais do AE-Fe(III) demonstraram que a cinética de formação desse complexo é muito lenta, uma vez que, na concentração de Fe(III) 10  $\mu$ M e AE 10  $\mu$ M, alterações espectrais (decorrentes da complexação) foram observadas ao longo de 2 horas. Isso justifica o aumento do potencial antioxidante dessa molécula com aumento do tempo de pré-incubação com complexo Fe(III)-EDTA (Ginani, 2005).



**Figura 9:** Efeito do tempo de pré-incubação do AE com o Cu(II) na degradação oxidativa da 2-DR em meio contendo 20 mM de tampão fosfato, 5 mM de 2-DR, 15  $\mu$ M de Cu(II), 0,5 mM de ascorbato e 10  $\mu$ M de AE. No ponto sem pré-incubação do AE com o cobre, a reação foi iniciada com o íon metálico.

### 5.3 – Efeito do AE no dano oxidativo ao DNA plasmidial (pUC18).

A atividade antioxidante do AE verificada pelo método de dano oxidativo à 2-DR permite considerar este polifenol um antioxidante em potencial contra os danos oxidativos em sistemas biológicos. Sendo assim, a segunda etapa do trabalho, buscou avaliar o efeito do AE em um sistema *ex-vivo*. O ensaio de dano oxidativo ao DNA plasmidial mediado por Cu(II) e ascorbato foi, então, escolhido para este fim.

O DNA plasmidial (pUC18) utilizado no estudo apresenta duas bandas distintas, uma inferior que corresponde ao DNA super enovelado (DNAsc) e outra superior que corresponde ao DNA circular (DNAoc) (figura 10). A forma linear, que também pode aparecer no DNA plasmidial e que se posiciona logo acima do DNA circular, não estava presente no DNA utilizado no estudo.

A figura 10 corresponde à foto do gel de agarose contendo 6 poços. Cada poço representa uma condição específica realizada com o DNA isolado de plasmídeo pUC18. O poço 1 corresponde ao dano oxidativo ao DNA realizado com 15  $\mu$ M de Cu(II) e 1 mM de ascorbato e os demais poços demonstram o efeito de concentrações crescentes

de AE no mesmo sistema reacional do poço 1. Verifica-se, de forma qualitativa, que o percentual de DNAsc é diretamente proporcional à concentração de AE presente no meio reacional (Figura 10). Isso pode ser verificado principalmente nos poços 4 e 5 que mostram estreitamento da banda do DNAoc. Esse resultado indica que o AE seria capaz de impedir o dano oxidativo do pUC18 e que essa atividade antioxidante é dependente da sua concentração no meio reacional.



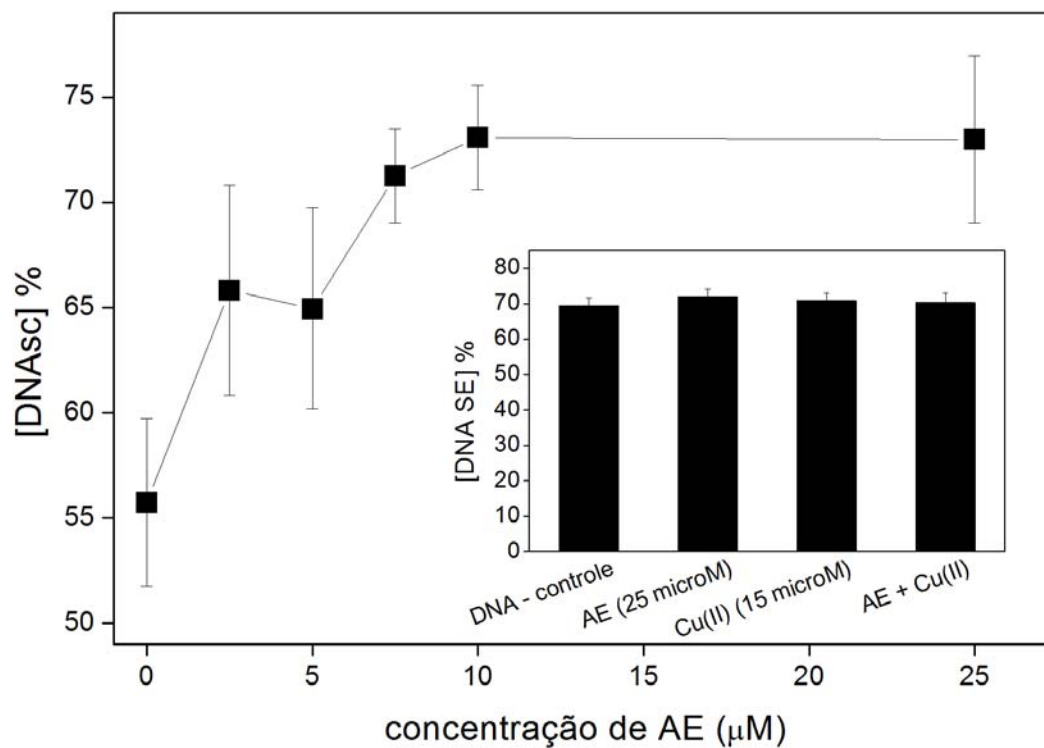
**Figura 10:** Foto do gel de agarose mostrando o efeito da variação da concentração de AE na degradação oxidativa do DNA plasmidial em meio contendo 5 mM de Kpi, 15  $\mu$ M de Cu(II) e 1 mM de ascorbato. Poço 1: sem AE; Poço 2: AE (2,5  $\mu$ M); Poço 3: AE (5  $\mu$ M); Poço 4: AE (7,5  $\mu$ M); Poço 5: AE (10  $\mu$ M); Poço 6: AE (25  $\mu$ M).

A intensidade de luz emitida pelo brometo de etídeo ligado ao DNA foi quantificada no programa *PhotoCaptMw versão 10.1* para *Windows* o que tornou-se possível quantificar o DNAsc que foi utilizado como parâmetro para a análise dos dados. O plasmídeo em sua forma nativa apresenta aproximadamente 70% de DNAsc e 30% de DNAoc (figura 11). De acordo com o resultado apresentado na figura 11, a adição de 15  $\mu$ M de Cu(II) na ausência do redutor ascorbato e/ou 25  $\mu$ M de AE não afetam a concentração de DNAsc. Na presença de 1 mM de ascorbato, igualmente mantem-se inalterada a percentagem de DNAsc (Andrade Jr, 2004). No entanto, quando são adicionados Cu(II) e ascorbato junto ao DNA, o percentual de DNAsc cai para 55%, (figura 11). Por outro lado, a presença de AE no meio reacional em concentrações crescentes, promove um aumento proporcional do percentual de DNAsc. Na presença de 7,5-10  $\mu$ M de AE o percentual de DNAsc volta a ser 70% indicando que não é verificado dano oxidativo no plasmídeo a partir dessas concentrações de AE.

O PIH, também apresentou efeito antioxidante contra dano oxidativo ao DNA. Porém, proteção quase total sobre os danos só foi verificada na concentração de 100  $\mu$ M



de PIH, concentração esta 10 vezes maior do que a utilizada com o AE (Andrade Jr et al., 2004).



**Figura 11:** Efeito da variação concentração do AE (0-25 µM) sobre o percentual de DNA super enovelado (DNAsc) em meio contendo tampão Kpi (5 mM), DNA ( $\cong$ 10 ng/mL), Cu(II) (15 µM) e ascorbato (1mM). O gráfico de barras indica o percentual de DNAsc em 4 controles distintos: contendo apenas DNA; contendo DNA e 25 µM de AE; contendo DNA e 15 µM de Cu(II); e na presença de DNA, AE (25 µM) e Cu(II) (15 µM). Os valores acima representam a média  $\pm$  DP (n=4).

O efeito protetor do AE contra danos em DNA também já foi verificado em outros estudos. De maneira geral a maioria dos estudos que analisaram o efeito do AE contra danos em DNA foram realizados por meio da administração de carcinógenos. Um estudo de Takagi e colaboradores (1995) verificou que a administração oral de 100mg/kg de peso/dia de AE por um período de 4 dias inibia significativamente a formação de 8-hidroxi-deoxiguanosina (8-OH-dG) no fígado de ratos tratados com 2-nitropropeno. Outro estudo *in vitro* feito em cultura de células de linfócitos verificou que a administração de AE diminuía os danos oxidativos em DNA (analisados por meio do teste do cometa) causados por radicais livres produzidos durante a metabolização da nicotina via citocromo P450 (Sudheer et al., 2007). Os estudos apontam que o efeito protetor do AE contra danos em DNA poderia ocorrer devido a propriedades distintas

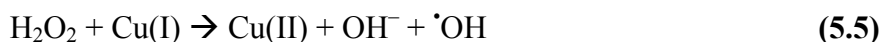
observadas para este polifenol, dentre elas pode-se citar: i) ligação direta do AE em sítios específicos do DNA que impediria a ligação de carcinógenos no DNA; ii) a interação direta do AE com o carcinógeno por meio da doação de elétron ou de hidrogênio ao último; iii) o AE ligado ao DNA agiria como seqüestrador de radicais livres, inclusive de metabólitos intermediários reativos (Sudheer et al., 2007; Huetz et al., 2005; Teel, 1986, Thulstrup et al., 1999).

Ao contrário do que é observado com o AE, estudos realizados com o AT, ou mesmo com o ácido gálico (AG), demonstraram que estes polifenóis apresentam efeito pró-oxidante no dano oxidativo ao DNA mediado por Cu(II). A presença de AG e cobre junto ao DNA leva à oxidação de bases do DNA do timo de bezerro aumentando a formação de 8-OH-dG e total degradação do DNA de plasmídeo pBR322 (Yoshino et al., 2002). O estudo de Andrade Jr (2004) verificou que um pequeno dano ao DNA plasmidial é causado pela presença de 10  $\mu\text{M}$  de AT. Além disso, observou que o AT 10  $\mu\text{M}$  apresenta efeito pró-oxidante no dano oxidativo do DNA plasmidial, aumentando em cerca de 66% os danos em pUC18 na presença de 15  $\mu\text{M}$  de Cu(II) (Andrade Jr, 2004).

Efeito pró-oxidante no dano oxidativo em DNA mediado por Cu(II) também foi verificado em alguns flavonóides, como por exemplo a quercetina e a miricetina (Yoshino et al., 1999). Especula-se que o efeito pró-oxidante desses polifenóis se deva à formação de um complexo ternário entre DNA, polifenol e Cu(II) que leva à geração de um ciclo redox de Cu(II)/Cu(I) que pode resultar na formação de radical superóxido e de peróxido de hidrogênio (Yoshino et al., 1999; Yoshino et al., 2002; Andrade Jr, 2004).

#### **5.4 – Análise da cinética de oxidação de ascorbato.**

Os próximos ensaios realizados tiveram como objetivo a investigação do mecanismo de ação antioxidante do polifenol AE no sistema gerador de radicais livres mediado por Cu(II) e ascorbato. Como foi apresentado anteriormente, a oxidação do ascorbato à radical ascorbil mediado por Cu(II) é o primeiro passo dentre uma série de reações que levará à formação de radical hidroxil (reações 5.1 a 5.5). Portanto, a análise da cinética de oxidação do ascorbato foi a primeira etapa do estudo mecanístico da ação antioxidante do AE.

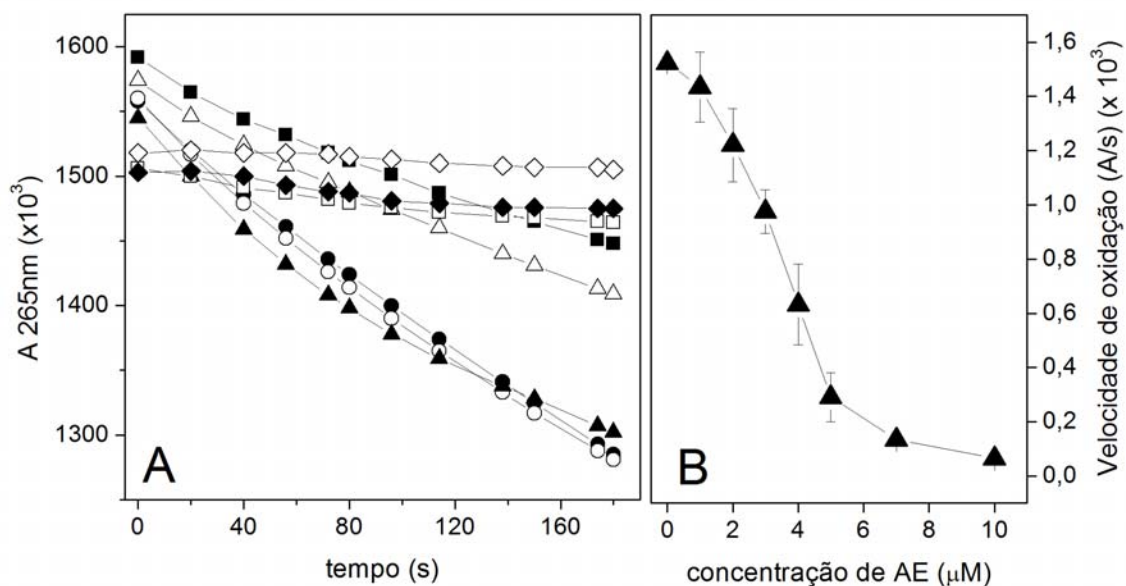


A cinética de oxidação do ascorbato foi realizada por meio do decaimento do seu pico de absorvância em 265 nm acompanhado por 3 minutos em espectrofotômetro (figura 12). A presença de 5  $\mu\text{M}$  de Cu(II) em meio tamponado (20 mM de tampão fosfato) contendo 100  $\mu\text{M}$  de ascorbato provoca uma queda da absorvância em 265 nm com velocidade média em torno de  $1,6 \times 10^{-3}$  absorvância/segundo (figura 12b) (ver nota de rodapé 1). Quando a cinética é realizada na presença de AE, previamente pré-incubado com o Cu(II) por 5 minutos, a velocidade média de oxidação do ascorbato diminui proporcionalmente à concentração do polifenol no meio. A menor velocidade de oxidação do ascorbato é verificada no ensaio contendo 7  $\mu\text{M}$  de AE. Nessa concentração de AE a oxidação de ascorbato é praticamente nula. O valor de  $I_{50}$  de AE capaz de inibir 50% a oxidação do ascorbato foi de  $3,5 \pm 0,14 \mu\text{M}$ .

---

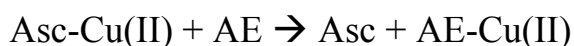
#### Nota de rodapé 1.

Normalmente a análise de curvas de cinética de uma reação é realizada na fase inicial da reação, uma vez que as concentrações dos reagentes utilizados na reação diminuem ao longo do tempo de reação provocando, com isso, uma queda da cinética. No entanto, a velocidade média foi o parâmetro escolhido no estudo para a análise de oxidação do ascorbato, uma vez que a presença de AE no meio reacional provoca uma leve flutuação (em torno de 0,02 unidades de absorvância) da absorvância em 265 nm. Essa flutuação pode ser explicada pela absorção de luz que o polifenol apresenta nesse comprimento de onda. Vale ressaltar que foram feitos os devidos controles em cada concentração de AE usada no estudo para corrigir essa interferência do polifenol. Além disso, o uso da velocidade média não prejudicou a análise da cinética, visto que o tempo de reação estudado (3 minutos) ainda se encontra na fase linear a reação de oxidação do ascorbato.



**Figura 12:** (A) Cinética de oxidação do ascorbato (0,1 mM) em tampão fosfato (20 mM) mediada por Cu(II) (5 μM), na presença de diferentes concentrações de AE (controle sem AE (●); 1 μM (○); 2 μM (▲); 3 μM (△); 4 μM (■); 5 μM (□); 7 μM (◆) e 10 μM de AE (◇)). (B) Velocidade média de oxidação do ascorbato em diferentes concentrações de AE. Os pontos acima se referem à média ± DP (n = 3 a 5).

A inibição da oxidação de ascorbato pelo AE dependente de Cu(II) indica que este polifenol compete com o ascorbato pela complexação com o Cu(II) impedindo, dessa forma, a participação do íon metálico na primeira etapa da reação (ver esquema 4). Além disso, a inibição da oxidação do ascorbato por volta de 5 μM de AE indica novamente a formação de complexo AE-cobre de razão 1:1.



**Esquema 4:** Competição entre ascorbato e AE pela complexação com o Cu(II).

Estudo anterior em sistema contendo 50 μM de Fe(III)-EDTA (1:1 e 1:10) e 100 μM de ascorbato, o AE também mostrou-se capaz de diminuir a velocidade de oxidação do ascorbato de forma bem eficiente. Segundo tal estudo, 50 μM de AE diminui em 70% a velocidade de oxidação do ascorbato (Ginani, 2005).

Comportamento semelhante ao do AE também foi observado para o antioxidante PIH. De acordo com o estudo, PIH é capaz de inibir a oxidação de 100  $\mu\text{M}$  de ascorbato induzido por 1 ou 5  $\mu\text{M}$  de Cu(II), sendo mais eficiente no sistema contendo 1  $\mu\text{M}$  de Cu(II). A completa inibição da oxidação do ascorbato pelo PIH também foi observada quando a relação de concentrações de PIH e Cu(II) era de aproximadamente 1:1 (Hermes-Lima et al., 2001). Além disso, o valor de  $I_{50}$  de 2,4  $\mu\text{M}$  de PIH obtido no sistema contendo 5  $\mu\text{M}$  de Cu(II) é bem próximo ao valor de  $I_{50}$  obtido pelo AE no mesmo sistema.

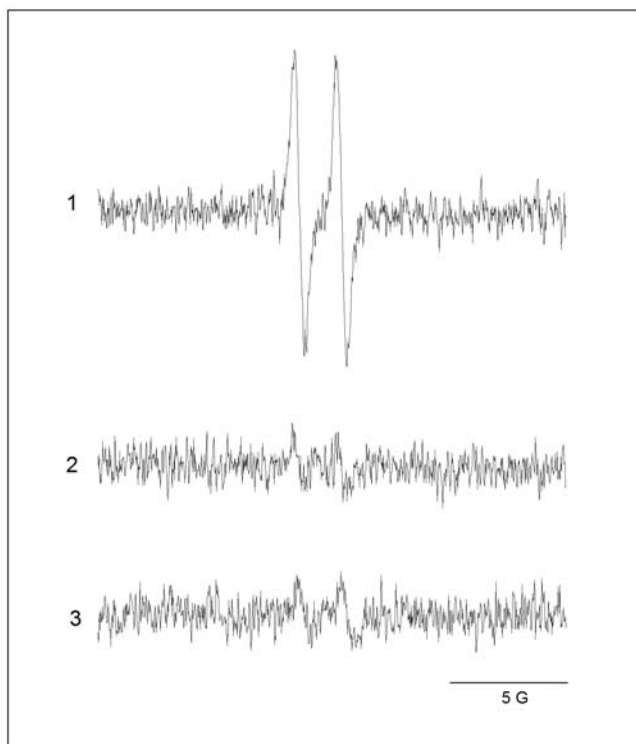
O efeito do AT na velocidade de oxidação do ascorbato também já foi estudado em sistema contendo 15  $\mu\text{M}$  de Cu(II) e 100  $\mu\text{M}$  de ascorbato (Andrade Jr et al., 2005). A velocidade de oxidação do ascorbato é também inversamente proporcional à concentração de AT no meio reacional. Entretanto, o AT, mesmo presente em maiores concentrações (acima de 15  $\mu\text{M}$ ), não é capaz de inibir essa primeira etapa que leva à formação de radical ascorbil. A velocidade de oxidação do ascorbato, nesse sistema, reduz de 2,0 para 1,0  $A_{260} \cdot \text{seg}^{-1}$  na presença de 25  $\mu\text{M}$  de AT (Andrade Jr et al., 2005).

### **5.5 – Efeito do AE na formação de radical ascorbil.**

A inibição da primeira reação, que leva à formação de radical ascorbil e redução do Cu(II) a Cu(I), pelo AE foi confirmada por meio do ensaio ressonância paramagnética eletrônica (RPE ou, do inglês, EPR). O estudo de EPR teve como objetivo verificar o tamanho do sinal característico do radical ascorbil na presença de concentrações crescentes de AE.

A adição de 15  $\mu\text{M}$  de Cu(II) em meio tamponado contendo 1 mM de ascorbato leva à formação de espectro de duas linhas característico do sinal do radical ascorbil (ver figura 13 condição 1). Quando o mesmo ensaio é realizado na presença de 30  $\mu\text{M}$  de AE (pré-incubado com o Cu(II) por 5 minutos antes adição do ascorbato ao meio reacional) observa-se uma inibição, quase que total da formação do radical ascorbil (ver figura 13 condição 2). A intensidade do sinal obtida na presença de AE é equivalente à intensidade do sinal no controle contendo apenas ascorbato e tampão fosfato (20 mM) (condição 3). Essa pequena formação de radical ascorbil observada no controle pode ser atribuída à presença de metais contaminantes, em especial Fe(III), presente no tampão. Pode-se, portanto, considerar que a presença de 30  $\mu\text{M}$  de AE nesse sistema é capaz de

inibir completamente a formação de radical ascorbil resultante da redução do Cu(II) a Cu(I).

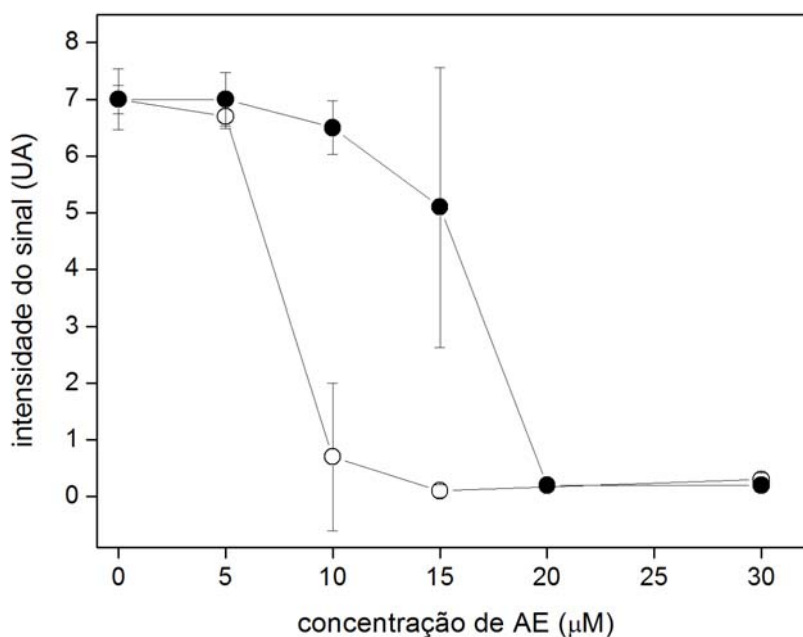


**Figura 13:** Representação gráfica do sinal do radical ascorbil obtido no aparelho de EPR. Ensaio realizado com 1 mM de ascorbato e 20 mM de tampão fosfato em três condições: **Condição 1** – na presença de 15  $\mu\text{M}$  de Cu(II). **Condição 2** – na presença de 15  $\mu\text{M}$  de Cu(II) e 30  $\mu\text{M}$  de AE pré-incubados por 5 minutos. **Condição 3** – controle sem Cu(II) e AE.

A intensidade do sinal do radical ascorbil foi mensurada por meio da altura do primeiro pico do espectro, sendo o tamanho expresso em unidades arbitrárias (UA). A figura 14, demonstra o efeito da concentração do AE na intensidade do sinal do radical ascorbil gerado pela presença de 5 ou 15  $\mu\text{M}$  de Cu(II). A intensidade do sinal do radical ascorbil é inversamente proporcional à concentração de AE, tanto no sistema contendo 5  $\mu\text{M}$  de Cu(II) quanto no sistema contendo 15  $\mu\text{M}$  de íons cúpricos. No sistema contendo 15  $\mu\text{M}$  de Cu(II), a máxima inibição da formação de radical ascorbil ocorre quando a concentração de AE atinge 20  $\mu\text{M}$ , enquanto que na presença de 5  $\mu\text{M}$  de Cu(II) a máxima inibição é observada com 10  $\mu\text{M}$  de AE. Além disso, no sistema contendo 15  $\mu\text{M}$  de Cu(II), a condição experimental que contém 15  $\mu\text{M}$  de AE (razão 1:1 de AE:Cu(II)) apresenta um erro padrão muito grande (observar a barra de erro), o que pode indicar que este seja o **ponto estequiométrico** da reação. Vale ressaltar que nesse ensaio não foi realizado a quantificação exata da concentração da solução de AE,

uma vez que o laboratório, no qual foram obtidos estes resultados, não possuía espectrofotômetro. A variação na concentração estoque da solução de AE também pode interferir no tamanho do erro padrão do ensaio.

Observa-se que nas condições em que as concentrações de AE são inferiores 15  $\mu\text{M}$  quase não se verifica diminuição do sinal, enquanto que naqueles com concentrações superiores de AE se nota a inibição máxima exercida pelo bifenol. Esse comportamento, no entanto, não é verificado na presença de 5  $\mu\text{M}$  de Cu(II). O resultado observado no sistema contendo 5  $\mu\text{M}$  de Cu(II) demonstra que a maior inibição do AE, nessa condição, ocorre quando a razão estequiométrica de AE:Cu(II) é 2:1. Esse mesmo comportamento do AE foi verificado no ensaio de dano oxidativo à 2-DR mediado por 5  $\mu\text{M}$  de Cu(II) e 0,5 mM de ascorbato (figura 5). Mais uma vez, acredita-se que essa disparidade se deva a uma diferença entre as cinéticas de reação contendo 5  $\mu\text{M}$  e 15  $\mu\text{M}$  de Cu(II).



**Figura 14:** Efeito da concentração de AE (0-30  $\mu\text{M}$ ) na intensidade do sinal do radical ascorbil, obtido por EPR, na presença de 20 mM de tampão fosfato, 5  $\mu\text{M}$  (○) e 15  $\mu\text{M}$  (●) de Cu(II) e 1 mM de ascorbato. Os reagentes foram pré-incubados por 5 minutos antes da adição de ascorbato. Os valores apresentados representam a média  $\pm$  DP (n= 3 a 5).

É importante observar que, na ausência de AE, a intensidade do sinal do radical ascorbil é semelhante nos sistemas contendo Cu(II) 5  $\mu\text{M}$  e Cu(II) 15  $\mu\text{M}$ . Esperava-se que o sinal do radical ascorbil fosse maior no sistema contendo maior concentração de

Cu(II) – ou seja, 15  $\mu\text{M}$ . A semelhança na intensidade do sinal pode ser explicada por uma limitação do aparelho que não é capaz de detectar mais radical ascorbil formado no meio. Acreditamos, portanto, que na concentração de 5  $\mu\text{M}$  de Cu(II) haja uma saturação na detecção do sinal do radical ascorbil.

Os resultados de EPR confirmam o comportamento do AE em inibir a reação de oxidação do ascorbato que forma radical ascorbil. Esse resultado também foi verificado nos ensaios da cinética de oxidação do ascorbato. Em ambos experimentos, pequenas concentrações de AE seriam capazes de inibir a reação do Cu(II) com o ascorbato. A inibição dessa primeira etapa da reação pode, por conseguinte, ocasionar a inibição das demais reações e, portanto, inibir a formação de radical hidroxil. Tendo-se observado esta ação antioxidante inicial, buscou-se saber se a segunda reação (reação 5.2, página 53), caracterizada pela oxidação do Cu(II) pelo oxigênio dissolvido no meio, estaria também inibida na presença de AE no meio racional.

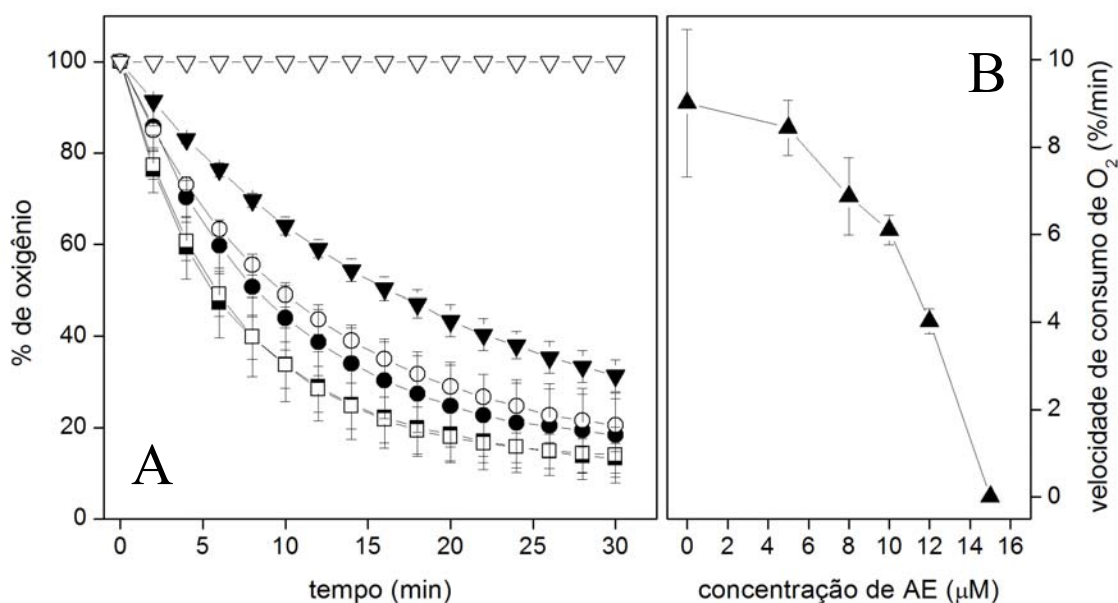
### **5.6 – Efeito do AE na cinética de consumo de oxigênio.**

A cinética da segunda reação foi analisada por meio da velocidade de consumo do oxigênio dissolvido no meio. Após a redução do Cu(II) a Cu(I) (primeira reação), este último sofre oxidação pelo oxigênio obtendo como produto íons cúpricos e radical superóxido (reação 5.2). Portanto, a utilização do oxigênio como agente oxidante provoca a redução da sua concentração no meio reacional. A velocidade de consumo do oxigênio do meio foi então avaliada na ausência e na presença de concentrações crescentes de AE. A concentração referente a 100% de oxigênio dissolvido no meio reacional é de aproximadamente 220  $\mu\text{M}$  (Hermes-Lima et al., 2001).

A figura 15 mostra o efeito da concentração de AE no consumo de oxigênio dissolvido no meio. A presença de 15  $\mu\text{M}$  de Cu(II) e 0,5 mM de ascorbato em meio tamponado com 20 mM de tampão fosfato (pH=7,2) provoca a diminuição da concentração de oxigênio indicando que a segunda reação, que leva à formação de radical superóxido, estaria ocorrendo (reação 5.2). Na ausência de AE, o oxigênio é consumido em uma velocidade de aproximadamente 9%/min. A curva da cinética de decaimento do oxigênio na ausência de antioxidante indica que o consumo de oxigênio começa a se estabilizar em torno de 25-30 minutos de reação, visto que quase não se verifica alteração da concentração de oxigênio no meio a partir desse tempo. A presença



de concentrações crescentes de AE no meio reacional leva a uma diminuição proporcional da velocidade de consumo do oxigênio. A concentração de 15  $\mu\text{M}$  de AE promove a inibição completa do consumo de oxigênio ao longo de 30 minutos de reação. Novamente, a presença de AE em razão estequiométrica 1:1 com o Cu(II) inibe completamente a reação.

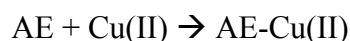


**Figura 15:** (A): Cinética de consumo do oxigênio induzido por 15  $\mu\text{M}$  de Cu(II) e 0,5 mM de ascorbato em diferentes concentrações de AE (0-15 $\mu\text{M}$ ). Meio reacional contendo 20mM de tampão fosfato (pH 7,2), (■) 0  $\mu\text{M}$ , (□) 5  $\mu\text{M}$ , (●) 8  $\mu\text{M}$ , (○) 10  $\mu\text{M}$ , (▼) 12  $\mu\text{M}$  e (▽) 15  $\mu\text{M}$  de AE. Os reagentes foram pré-incubados por 5 minutos antes da adição de ascorbato. (B): Efeito da concentração de AE na velocidade de consumo de oxigênio. Os valores acima representam a média  $\pm$  DP (n=3)

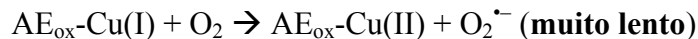
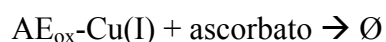
Esse resultado pode indicar que a inibição da primeira reação poderia levar à inibição da segunda que dificultaria, dessa forma, a formação de radical hidroxil. Como a redução do Cu(II) pelo ascorbato é inibida pela presença do AE por meio da formação do complexo AE-Cu(II) (verificado nos ensaios de oxidação de ascorbato e de formação do radical ascorbil), a formação de Cu(I) no meio reacional seria fortemente diminuída (**Hipótese 1**). A baixa concentração de íon metálico na sua forma reduzida formaria pouco radical superóxido via redução do oxigênio presente no meio. A baixa produção de radical superóxido leva a uma pequena formação subsequente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no meio o que, conseqüentemente, geraria uma menor quantidade de radical hidroxil e, portanto, menor dano a biomoléculas.

Outro mecanismo proposto seria que o AE ao se complexar com o Cu(II) poderia reduzir o íon metálico formando um complexo com AE oxidado e Cu(I). Portanto, o AE, dessa forma, inibiria a primeira reação por meio da formação do complexo e da redução do cobre a Cu(I), o que impede a oxidação do ascorbato a radical ascorbil. A formação do complexo  $AE_{ox}$ -Cu(I) (**Hipótese 2**) impediria a participação do Cu(I) nas reações seguintes, que envolvem a produção de superóxido e  $H_2O_2$ , reação Fenton-cobre e a reação de  $\cdot OH$  com a 2-DR (reações 5.2 a 5.5, página 57). Caso esta hipótese seja confirmada, acredita-se que os dois mecanismos (hipóteses 1 e 2) estariam ocorrendo ao mesmo tempo.

#### **Hipótese 1:**



#### **Hipótese 2:**



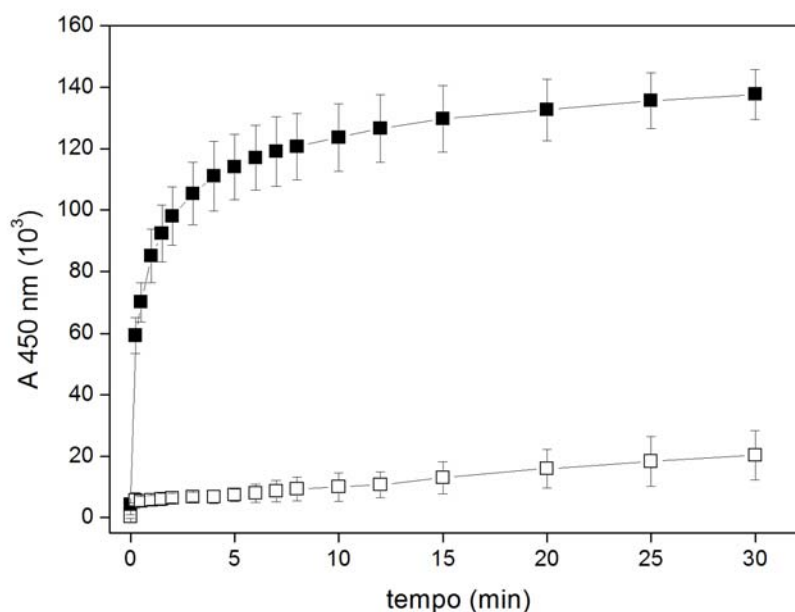
A segunda proposta requer redução do Cu(II) pelo AE formando, dessa maneira o complexo  $AE_{ox}$ -Cu(I). Estudos já demonstraram que alguns flavonóides reduzem o Cu(II) quando formam complexos com esse íon metálico (Mira et al., 2002; El Hajji et al., 2006).

Estudo realizado com o AE na presença de Fe(III) mostrou que este polifenol é capaz de reduzir o Fe(III) a Fe(II) (Ginani, 2005). Este resultado foi verificado por meio do ensaio com a ferrozina, que é um ligante específico de Fe(II) que forma complexo com este íon metálico obtendo pico de absorção em 562nm. O aumento progressivo da absorbância em 562nm no ensaio contendo AE e Fe(III) indica que a ferrozina remove gradativamente o Fe(II) ligado ao AE, indicando que houve redução do Fe(III) pelo polifenol. Na ausência de AE, o Fe(III) não é reduzido e com isso não se verifica formação do complexo ferrozina-Fe(II). O estudo mostrou que a cinética de remoção do Fe(II) do AE pela ferrozina é relativamente lenta, necessitando de pelo menos 10 minutos para a remoção do Fe(II) (Ginani, 2005).

A capacidade do AE em reduzir o íon Cu(II) foi verificada por meio do estudo espectrofotométrico da neocuproína, que é um ligante de Cu(I) que possui pico absorção em 450 nm quando este forma o complexo com este íons cuprosos.

### 5.7 – Análise da redução do Cu(II) pelo AE.

O resultado do ensaio da neocuproína foi demonstrado na figura 16. Na ausência de AE verifica-se que não há formação do complexo da neocuproína com Cu(I), indicando ausência de íons cuprosos no meio reacional. Entretanto quando são adicionados 2  $\mu$ M de AE ao sistema, observa-se um aumento gradativo da absorbância em 450 nm, o que caracteriza a formação do complexo de neocuproína com o metal em sua forma reduzida (figura 16). Neste caso, sugere-se que o AE ao se ligar com o Cu(II) seria capaz de reduzi-lo a Cu(I), resultando na oxidação do bifenol.



**Figura 16:** Cinética de formação do complexo Neocuproína-Cu(I) contendo 20 mM de tampão fosfato, 20  $\mu$ M de Cu(II) e 5 mM de neocuproína, na ausência do polifenol (□) e na presença de 2  $\mu$ M de AE (■).

No trabalho de Mira e colaboradores (2002), todos os flavonóides estudados (um total de 12 flavonóides de diferentes classes) apresentaram capacidade de redução maior de cobre do que de Fe(III). A maior eficiência dos flavonóides em reduzir o cobre pode

ser explicada pelo menor potencial redox do Cu(II)/Cu(I) comparado com o do Fe(III)/Fe(II) (Fernandez et al., 2002).

A redução de íons metálicos é dependente do pH do meio. A capacidade dos flavonóides em reduzir íons metálicos foi relacionada ao potencial redox e ao número de grupamentos hidroxila da molécula. Isso porque quanto menor o número de grupamentos hidroxila, menor a probabilidade de transferência de hidrogênio com oxidação do flavonóide e conseqüente redução do íon metálico (Mira et al., 2002; Fernandez et al., 2002).

Assim como foi observado com o ensaio da ferrozina, a remoção do Cu(I) do complexo AE-Cu(I) pela neocuproína também é relativamente lenta, necessitando de 5 a 10 minutos para máxima remoção. A dificuldade da neocuproína em retirar o Cu(I) do complexo com o AE pode está relacionada com a estrutura do complexo AE-Cu(I), que poderia apresentar barreiras físicas que dificultariam a remoção do íon metálico.

A concentração de neocuproína pode ser um fator limitante que é determinante na velocidade de remoção dos íons cobre complexados ao AE. Um novo ensaio poderia ser feito com maior concentração de neocuproína (20 mM, por exemplo) para verificar se a concentração dessa molécula estaria interferindo ou não na cinética de remoção dos íons cobre.

## 6 - Conclusões do capítulo 1

Os resultados apresentados mostraram que AE é capaz de quelar íons cúpricos e, dessa forma, inibir o dano oxidativo à 2-DR e ao DNA plasmidial pUC18. Os resultados dos ensaios de dano oxidativo à 2-DR mostram que a atividade quelante seria realmente o principal mecanismo antioxidante do AE no sistema utilizado, uma vez que este polifenol apresentou ação antioxidante em concentrações micromolares, o que é característico de moléculas quelantes. Vale lembrar que no ensaio de dano à 2-DR, a concentração da molécula alvo no meio reacional é de 5 mM, sendo assim, a presença de concentrações micromolares de antioxidante torna muito difícil a competição com a molécula alvo pelo radical hidroxil.

O mecanismo antioxidante proposto para o AE é semelhante ao observado com o PIH. De acordo com o estudo feito com este antioxidante sintético, o PIH complexa com íon Cu(II) na razão 1:1 inibindo completamente a oxidação do ascorbato e o consumo de oxigênio (Hermes-Lima et al., 2001).

Os resultados apresentados para o AE também demonstram que este polifenol inibe completamente os danos oxidativos à 2-DR razão 1:1 com íons Cu(II). Além disso, verificou-se também inibição da oxidação do ascorbato e do consumo de oxigênio na mesma razão estequiométrica do antioxidante com o íon metálico. O AE ao complexar o Cu(II) impede ou diminui drasticamente a velocidade das duas primeiras etapas de reação que leva à formação dos radicais ascorbil e superóxido, respectivamente.

Quando a reação, porém, é realizada com “baixa” concentração de Cu(II) (5  $\mu$ M - sendo 15  $\mu$ M a concentração “alta”), a razão estequiométrica ideal de AE e cobre se altera. Verifica-se que, com 5  $\mu$ M de cobre, a inibição do dano oxidativo ocorre quando a concentração de AE é aproximadamente o dobro da concentração de Cu(II). Isso foi observado em dois ensaios de variação da concentração de AE realizados com Cu(II) 5  $\mu$ M: um obtido no método da degradação oxidativa da 2-DR (figura 5) e outro utilizando EPR para a formação de ascorbil (figura 14).

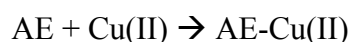
Acreditamos que, como a complexação e a redução de íons cobre são ambos processos bi-moleculares, quando há baixa concentração de cobre, a complexação se torna menos competitiva do que a redução do cobre(II) pelo ascorbato, que está mais abundante no meio (500  $\mu$ M). Isso ocorre porque a cinética de complexação do AE com

o íon metálico seria (nossa hipótese) mais lenta na presença de 5  $\mu\text{M}$  de Cu(II) quando comparado ao sistema contendo Cu(II) 15  $\mu\text{M}$ . Portanto, a inibição de danos oxidativos na razão estequiométrica 2:1 de AE:Cu(II) não significa necessariamente formação de complexo de razão 2:1, e sim a uma explicação de natureza cinética que necessita de estudos complementares.

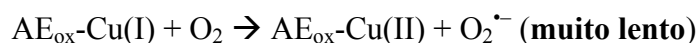
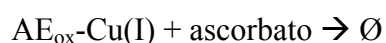
Além disso, é possível que diferentes razões estequiométricas de complexos AE-cobre também possam ser formadas. Estudo anterior de espectrometria de massa demonstrou que, quando diferentes flavonóides interagem com íons Cu(II), podem coexistir diferentes formas estequiométricas de complexos metal-flavonóide, como, por exemplo, nas razões 1:1, 1:2, 1:3, 2:2 e 2:3 (Fernandez et al., 2002).

O resultado do ensaio da neocuproína indica que após a formação do complexo AE-Cu(II), o AE é oxidado pelo íon metálico, gerando Cu(I). A redução do Cu(II) pelo AE impede que o ascorbato aja como agente redutor do metal. Isso impediria, portanto, a oxidação do ascorbato por Cu(II) e a formação de radical ascorbil. Esse comportamento do AE indica que o mecanismo de ação desse polifenol corresponde à **proposta 2** do mecanismo de ação (ver página 60 e esquema abaixo). Mais ainda, como existe uma cinética de redução dos íons cúpricos pelo AE (cinética esta que não foi estudada), é possível que as hipóteses 1 e 2 ocorram ao mesmo tempo.

#### Hipótese 1:



#### Hipótese 2:

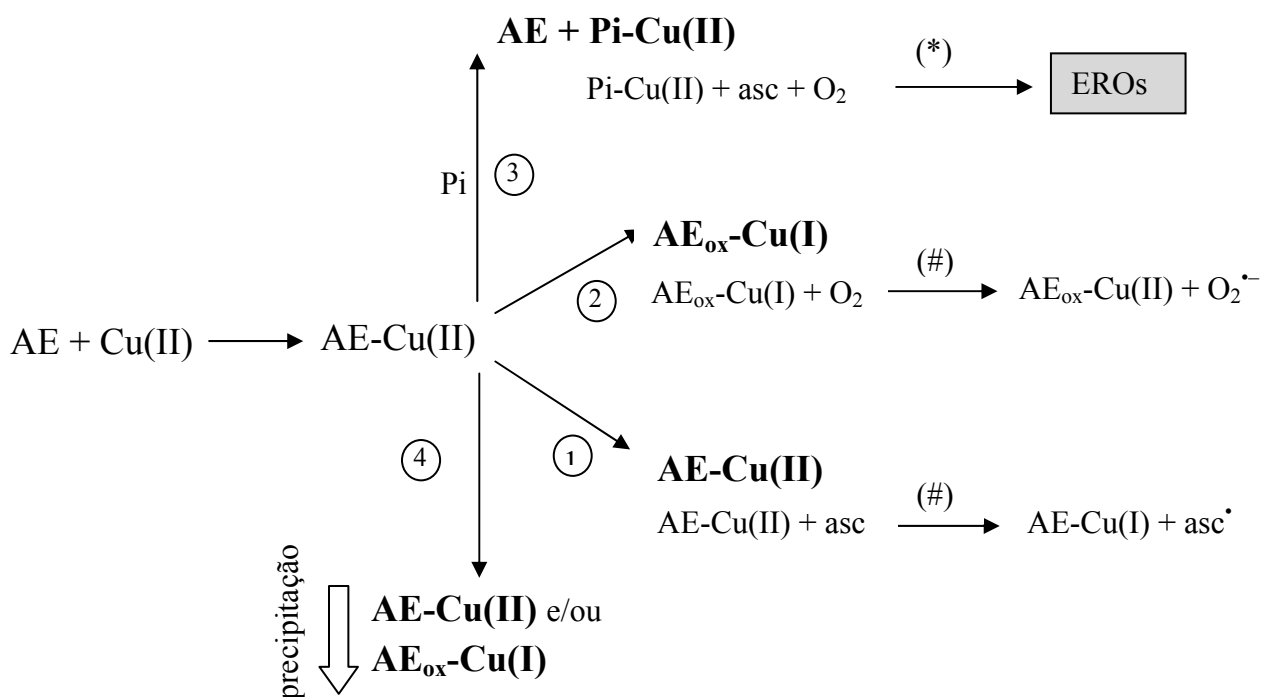


O AE oxidado formado a partir da redução do Cu(II) pode ser na realidade uma forma radicalar do AE. Foi detectada recentemente, em estudo de EPR a formação de radical AT, a partir do complexo Fe(II)<sub>n</sub>-AT e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (resultado não publicado obtido por Carolina Giongo, UNIFESP). O radical AT foi também detectado por Bors e colaboradores (2000), utilizando outras condições experimentais. Acreditamos que o

mesmo possa ocorrer com o AE, uma vez que grupamentos galoil também fazem parte da estrutura desse bifenol assim como a do AT.

Além disso, é possível também que haja uma competição entre o AE e o tampão fosfato para complexar o Cu(II). No estudo de Ginani (2005), a competição entre o AE e tampão fosfato pelos íons férricos reduz a cinética de formação do complexo AE-ferro, o que pode interferir no potencial antioxidante do bifenol na presença do referido tampão.

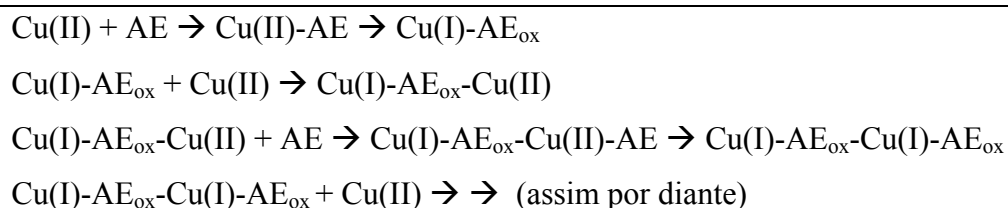
O outro mecanismo proposto seria que o AE ao interagir com os íons Cu(II) forme um complexo instável que precipita em pH 7,2. O estudo da precipitação de complexos de AE com íons metálicos foram realizados por Przewloka & Shearer (2002). Segundo os autores, o complexo do AE com o cobre começa a precipitar em pH 3 a 5, porém, a maior formação de precipitados é verificado em pH entre 7 a 8,5, no qual observa-se remoção de mais de 80% de complexo AE-cobre. A presença de precipitados também foi verificada no estudo de Bock e colaboradores (1981).



**Esquema 5:** Hipóteses que podem ocorrer após a formação do complexo AE-Cu(II): redução ou não do cobre pelo AE (hipóteses 2 e 1, respectivamente); competição do AE com o tampão fosfato pela complexação com o Cu(II) (hipótese 3); e precipitação do complexo (hipótese 4). (#) Tais reações não foram evidenciadas ao longo do tempo reacional do estudo. (\*) Não se sabe ao certo se o fosfato inorgânico seria capaz de complexar Cu(II). Entretanto, sabe-se que o fosfato complexa íons de ferro, sendo assim, acreditamos que o fosfato também possa complexar o Cu(II).

É importante ressaltar que durante a realização dos ensaios experimentais, não foi percebida precipitação de material no meio reacional (vide hipótese 4, no Esquema 5). Mesmo misturando-se altas concentrações de ambos reagentes, AE e Cu(II), não se verifica, visualmente, formação de precipitados. Entretanto, ao comparar o espectro UV-VIS do complexo AE-Cu(II) (feito com 15  $\mu$ M de ambos os reagentes, em 20 mM de tampão fosfato pH 7,2) antes e após centrifugação por 15 minutos a 10.000 g (Genaro-Mattos e Hermes-Lima, comunicação pessoal), verifica-se precipitação de grande parte do complexo. Não se determinou ainda o valor exato da precipitação, mas estudos estão em andamento em nosso laboratório. O complexo do AE-cobre deve formar um gel em suspensão no meio reacional, por isso não se verifica “precipitação propriamente dita” (i.e., corpo de chão) do complexo.

Nossa proposta é que o AE forma uma complexo com o cobre de maneira semelhante ao proposto por Ginani (2005) no sistema contendo Fe(II) e Fe(III). Segundo a autora, uma molécula de AE não preencheria todos os seis sítios de coordenação do Fe(II), assim sendo, seria plausível propor que mais moléculas desse bifenol fossem necessárias para a formação do complexo, formando uma espécie de malha composta de AE e íons ferro. Da mesma forma proposta para os íons de ferro, o AE também poderia formar uma malha com íons cobre de uma maneira tal que a razão 1:1 de AE e cobre se mantivesse conforme esquema abaixo. O trabalho de Ginani (2005) não estudou a precipitação da malha AE-ferro, entretanto acreditamos que a mesma forme um gel em suspensão, como o observado para o AE-cobre.



**Esquema 6:** Formação hipotética da “malha de AE” com íons de cobre.

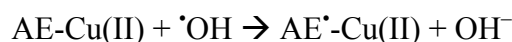
O tamanho da estrutura formada por inúmeras moléculas de AE e cobre deve favorecer a precipitação da malha (na forma de gel em suspensão). Acreditamos, portanto, que parte do efeito antioxidante do AE se deva à precipitação do cobre por meio da formação de complexos insolúveis, em suspensão, com o bifenol. Não



estudamos a formação de precipitados em suspensão em concentrações de AE e cobre que poderiam ser encontrados na célula, na faixa sub-micromolar. Caso se verifique formação de precipitados nestas concentrações, não sabemos se estes teriam efeitos tóxicos para a célula.

Mesmo presente em pequenas concentrações, a atividade sequestradora de radicais livres do AE também foi observada. A diminuição do potencial antioxidante do AE verificada com o aumento da molécula alvo (2-DR) evidencia esse comportamento dual do AE (vide figura 8). Como no ensaio houve formação prévia do complexo AE-cobre, acredita-se que a atividade sequestradora seja principalmente atribuída ao complexo e não tanto à forma livre de AE.

A atividade sequestradora de radical hidroxil do AE deve apresentar mecanismo semelhante ao que foi proposto para o AT em sistemas contendo Cu(II) e Fe(III) (Andrade Jr et al., 2005 e Andrade Jr et al., 2006). De acordo com este mecanismo, o radical hidroxil, produzido por meio da reação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com o Cu(I) ligado ao AE, seria sequestrado *in locu* pelo bifenol, produzindo OH<sup>-</sup> (íon hidróxido) e radical AE (ver reações abaixo).



**Esquema 7:** Hipótese do mecanismo sequestrador de radical hidroxil exercido pelo AE complexado ao cobre. Neste esquema, o  $\cdot\text{OH}$  formado não sai da “*solvation shell*”.

Esse mesmo mecanismo sequestrador de radical hidroxil do AE foi abordado por Ginani (2005) em sistema gerador de radical hidroxil mediado por reagentes de Fenton e por Fe(III)-EDTA + ascorbato + oxigênio.

Os resultados apresentados no estudo indicam que a eficiente ação antioxidante do AE está relacionada com a atividade quelante desse bifenol. O complexo AE-cobre diminui de forma bem eficiente o efeito da formação de EROs mediado por Cu(II) sobre biomoléculas. Isso indica que o AE poderia ser utilizado para o tratamento de doenças causadas por acúmulo de cobre no organismo como, por exemplo, a doença de Wilson (Andrews, 2002). Para tanto, é necessário que mais estudos sejam realizados, principalmente aqueles de toxicologia e de farmacocinética. Além disso, o AE

complexado ao cobre também apresenta – de acordo com nossa proposta - comportamento seqüestrador de radicais livres. Isso faz com que o radical hidroxil, formado pela reação de Fenton-Cobre (vide Esquema 7), seja suprimido pelo AE antes de sua difusão para o meio aquoso (“bulk water” – do inglês).

Mesmo que o AE apresente baixa absorção e alta metabolização no organismo, como já foi verificado em alguns estudos (ver revisão bibliográfica do AE), esse bifenoil poderia ser utilizado como coadjuvante do tratamento medicamentoso (feito normalmente pelo quelante D-penicilamina). Por ser tratar de um bifenoil presente em frutas e nozes, o consumo dessas fontes alimentares também deve ser estimulado. Não apenas para o tratamento de doenças do acúmulo de cobre, mas também para inibição de danos oxidativos causados pelos radicais livres produzidos naturalmente no organismo.

## Capítulo 2

### **Atividade antioxidante do extrato aquoso da polpa de caqui Rama Forte (*Diospyros kaki*)**

#### **4 - Materiais e Métodos:**

##### **4.1 - Extrato aquoso da polpa de caqui:**

O cultivar de caqui analisado foi do tipo Rama Forte. Os caquis foram comprados na Centrais de Abastecimento do Distrito Federal (CEASA-DF), onde todas as frutas eram provenientes do mesmo produtor e foram cultivadas em Guararema-SP. Foram realizadas três coletas no período de aproximadamente um mês. As coletas ocorreram nos dias 08/03, 21/03 e 05/04 no ano de 2007 e, para cada dia, foi comprada uma caixa de caqui. A primeira caixa continha 14 caquis, de onde foram selecionadas 7 unidades. As duas últimas caixas continham 12 caquis cada e foram selecionadas respectivamente 8 e 5 unidades. Ao todo, foram selecionados para o estudo 20 caquis de aspecto semelhante que apresentavam consistência macia e cor vermelha, o que indica que os mesmos estavam adequados para o consumo e aparentemente em estados de maturação semelhantes. Os caquis amassados, rachados ou com pontos escuros na casca foram descartados.

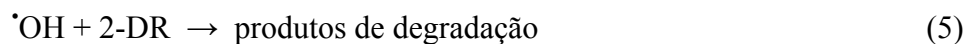
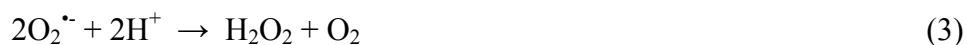
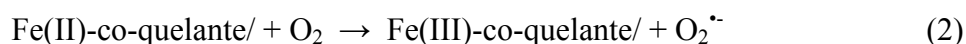
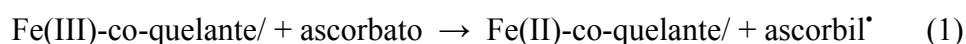
No mesmo dia da coleta, os caquis selecionados foram lavados em água destilada e, posteriormente, em água deionizada. Após serem secadas, as frutas foram pesadas separadamente. Em seguida foram retiradas as cascas e medidas as massas de polpa. Finalmente, as polpas foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas; em seguida, foram trituradas em gral e armazenadas em freezer a -20°C.

A solução estoque do extrato aquoso da polpa de caqui foi preparada de forma padrão pesando-se 10 mg de polpa liofilizada de caqui por mL de água deionizada. O extrato foi preparado utilizando-se um macerador vidro/vidro para homogeneizar a solução. O extrato do caqui foi então submetido à centrifugação de 13.000 rpm por 30 minutos em câmara refrigerada, mantida a 4 °C, para precipitação do material fibroso. A análise do potencial antioxidante da polpa de caqui foi realizada com o sobrenadante formado após a centrifugação do extrato.

A solução do extrato aquoso do caqui foi preparada diariamente, poucos minutos antes de ser utilizada no meio reacional. As concentrações de caqui indicadas nos gráficos referem-se à quantidade de extrato liofilizado.

#### 4.2 - Dano oxidativo à 2-desoxi-D-ribose:

Os sistemas geradores de radical hidroxil foi mediado por Fe(III) e ascorbato (veja as reações no esquema 8). O citrato de sódio e o EDTA foram utilizados como co-quelante para disponibilizar os íons férricos ao meio reacional, uma vez que esses íons precipitam em pH 7,2. A solução de Fe(III)-co-quelante foi preparada através da diluição da solução de Fe(III) com a solução de co-quelante na proporção de 1:1 antes de ser adicionado no meio reacional.



**Esquema 8:** sistema gerador de radical hidroxil mediado por Fe(III)-co-quelante e ascorbato.

O extrato de caqui e o complexo Fe(III)-co-quelante foram pré-incubados por 10 minutos antes da adição de ácido ascórbico que iniciou a reação. A reação foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e finalizada com a adição de ácido fosfórico e TBA.

O controle “tempo zero” também foi realizado para cada condição experimental de maneira semelhante ao obtido no estudo da atividade antioxidante do ácido elágico.

### 4.3 - Ensaio de peroxidação lipídica:

O ensaio de peroxidação lipídica é semelhante ao ensaio de degradação oxidativa da 2-DR, entretanto o alvo dos radicais livres nessa nova metodologia é o homogenato de fígado de rato que é rico em componente lipídico. Esse ensaio foi adaptado de Gondar, 2005.

Dois ratos machos jovens foram cedidos pelo biotério do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília dois dias antes de serem sacrificados por deslocamento cervical. Os mesmos foram tratados com ração padrão para ratos e água, ambos sem restrição de quantidade. O homogenato de fígado de rato foi feito em tampão de homogenato (composto por 100 mM de tampão HEPES (pH 7,2) e 125 mM de KCl) na proporção de 1:4 (p/v). O fígado de rato foi macerado em homogeneizador de vidro imerso em gelo e, em seguida, foi centrifugado a 4.000 rpm durante 15 minutos em câmara fria. O sobrenadante formado foi utilizado nos ensaios de peroxidação lipídica.

A análise do potencial antioxidante do caqui contra a peroxidação lipídica foi realizada com os reagentes de Fenton (50  $\mu$ M de Fe(II) e 100  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e com o sistema Fe(III)-citrato e ascorbato. O meio reacional foi preparado em um volume final de 200  $\mu$ L e, em ambos os sistemas geradores de EROs, o meio era composto de 10 mM de tampão HEPES, 125 mM de KCl e 5% (v/v) de homogenato de fígado de rato. O ensaio feito com antioxidante BHT (concentração final de 100  $\mu$ M) foi utilizado como controle interno do método. A reação foi iniciada com a adição dos íons Fe(II) ou Fe(III)-citrato e interrompida pela adição de 100  $\mu$ L de ácido fosfórico (7% v/v) seguida de 200  $\mu$ L de TBA (1% p/v), não havendo portanto a incubação prévia do extrato de caqui com os íons metálicos. Finalizada a reação, o meio foi fervido em banho-maria (98°C) por 15 minutos e, em seguida, fez-se a diluição do meio com 500  $\mu$ L de água deionizada. A quantificação do dano oxidativo causado à membrana lipídica foi feita no espectrofotômetro Hitachi-1000 por meio da subtração da absorbância obtida em 532nm pela a absorbância em 600nm. A subtração das leituras obtidas nos dois comprimentos de onda tem como objetivo desconsiderar a interferência do homogenato de fígado de rato (Hermes-Lima *et al.*, 1995).

Nos ensaios realizados no sistema Fe(III)-citrato e ascorbato (exceto no experimento da análise do curso temporal da peroxidação lipídica), as leituras obtidas

em cada condição experimental foram subtraídas pelo controle “tempo zero” mencionado anteriormente.

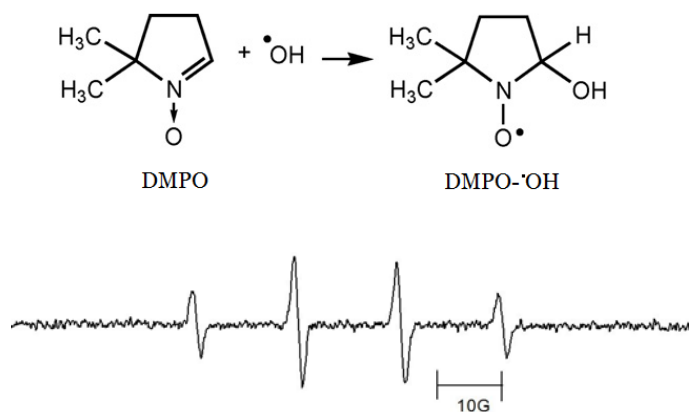
#### **4.4 - Ressonância paramagnética eletrônica (RPE): Radical ascorbil**

Os meios reacionais foram preparados em volumes de 1 mL de acordo com o que foi descrito na página 36. A geração do radical ascorbil ocorreu por meio do sistema Fe(III)-citrato e ascorbato. O extrato de caqui foi pré-incubado com o complexo Fe(III)-citrato por 10 minutos em meio tamponado com 20 mM de tampão fosfato. A reação foi iniciada com adição de ascorbato (1 mM) e a conclusão dos três espectros obtidos ocorreu após 3 minutos de reação. Um controle feito apenas com o extrato de caqui e ascorbato em meio tamponado foi adquirido para analisar a interferência do extrato na formação do radical ascorbil. As condições do aparelho foram semelhantes daquelas encontradas no ensaio com o AE, com exceção da amplitude de modulação, que nesses ensaios foi de 0,403 G.

As análises dos espectros e a quantificação do radical ascorbil também foram realizadas de maneira semelhante ao estudo do ácido elágico.

#### **4.5 - Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE): Radical DMPO- $\cdot$ OH**

O caráter altamente instável do radical hidroxil (que apresenta uma constante de reação na faixa de  $10^7$  a  $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) impossibilita sua detecção direta no espectrômetro. No entanto, sua quantificação é possível através do uso do DMPO (5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido) como captador de *spin* (*spin trapping*). De acordo com este método o radical hidroxil reage com o DMPO (com velocidade de reação de  $3,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) produzindo o aduto DMPO- $\cdot$ OH, que possui espectro de 4 linhas de proporção 1:2:2:1 (Zalomaeva et al, 2007). O DMPO- $\cdot$ OH é um radical mais estável que o radical hidroxil, sendo, portanto, capaz de atingir concentrações detectáveis.



**Figura 17:** Representação gráfica do espectro do aduto DMPO-<sup>•</sup>OH e sua formação.

A formação do radical hidroxil ocorreu pela presença de reagentes de Fenton nas concentrações de 50  $\mu\text{M}$  de Fe(II) e 100  $\mu\text{M}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A reação foi iniciada com adição de FeII em meio contendo 10 mM de tampão fosfato, 20 mM de DMPO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e concentrações variadas do extrato de caqui (0-5 mg/mL). O espectro de RPE foi realizado com a leitura de 3 espectros obtidos na frequência de microonda de 9,81 GHz, frequência de modulação de 100 KHz, amplitude de modulação de 1,011 G, potência de 0,2 mW e ganho de  $1 \times 10^5$ . O final da última leitura ocorreu após 3 minutos do início da reação.

Os espectros foram obtidos com o auxílio do programa Bruker WIN-EPR versão 2.11. A quantificação do radical DMPO-<sup>•</sup>OH foi feita através da altura do pico da primeira linha de ressonância, representado em unidades arbitrárias. A altura do ruído presente no espectro foi subtraída da altura do pico de análise.

## 5 – Resultados e Discussões

### 5.1 – Identificação dos caquis coletados.

O estudo do potencial antioxidante da polpa de caqui do cultivar Rama Forte foi realizado com 20 frutos. Segundo o que foi relatado na metodologia, os caquis foram coletados em comércio local em três dias distintos. Uma caixa contendo 12 ou 14 unidades de caqui foi comprada em cada dia, da qual foram selecionadas as frutas para o estudo. A tabela 7 apresenta a massa dos 20 caquis selecionados no estudo e o percentual de massa do material liofilizado. A partir do percentual de massa do liofilizado é possível verificar a quantidade de água presente no fruto fresco que foi eliminado durante o processo de liofilização da polpa.

Os caquis foram coletados nos dias 8 e 21 de março e no dia 5 de abril de 2007. A safra do caqui Rama Forte acontece entre os meses de março a maio (Martins & Pereira, 1989), sendo assim a coleta ocorreu principalmente no início da safra. Ao analisar as massas médias dos caquis em cada caixa, verifica-se que os mesmos apresentam diferença significativa ( $p < 0,005$ , ANOVA/SNK). Os caquis da primeira caixa possuem massa média de  $112,7 \pm 6,8$  g, enquanto que a segunda e a terceira caixa possuem massas médias iguais a  $134,13 \pm 6,70$  g e  $150,90 \pm 1,95$  g respectivamente. O aumento da massa dos caquis pode estar relacionado ao período da safra. De acordo com o estudo de fenologia do caquizeiro Rama Forte realizado em Piracicaba, São Paulo, a tendência ao aumento da massa dos frutos durante o período de safra pode estar relacionada ao aumento da umidade relativa ou de chuvas na região, observado principalmente no mês de março, que favorece o crescimento excessivo do fruto (Corsato, 2004).

Ao contrário do que foi verificado no peso dos frutos, não houve diferença significativa entre os frutos de diferentes caixas no percentual de água presente na polpa de caqui eliminado durante o processo de liofilização. Em média, a massa do caqui liofilizado representa  $52 \pm 1,8$  % da massa inicial do caqui congelado.



**Tabela 7:** Identificação dos caquis selecionados no estudo.

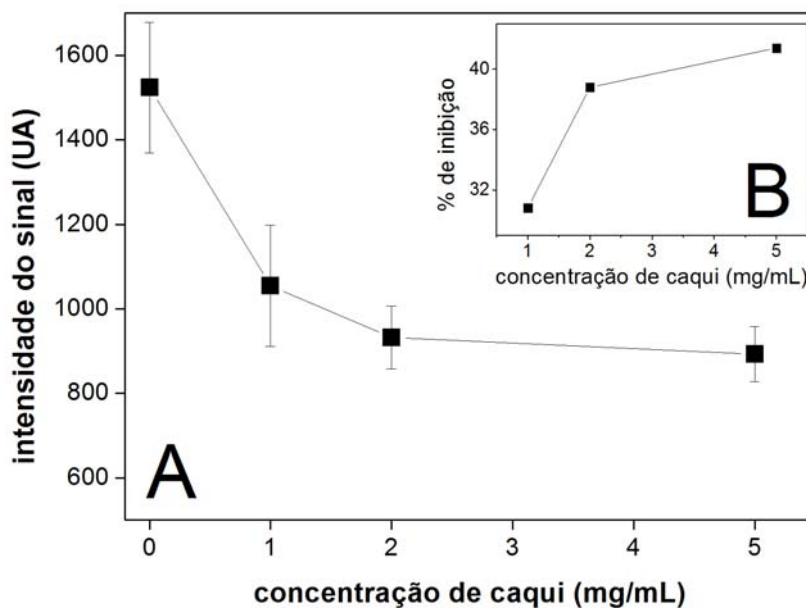
Caixa	Data da coleta	Nº do caqui	Massa do fruto fresco (g)	% de massa do liofilizado <sup>(a)</sup>
1	08/03/07	1	112,65	53,4
		2	107,10	52,7
		3	119,86	53,0
		4	106,16	53,9
		5	108,46	56,3
		6	110,70	53,7
		7	124,25	48,9
2	21/03/07	8	137,9	51,0
		9	130,69	54,3
		10	137,35	51,9
		11	135,43	50,0
		12	121,42	50,4
		13	143,75	50,8
		14	136,61	49,8
3	05/04/07	15	129,87	53,2
		16	149,97	52,4
		17	150,66	53,0
		18	154,36	50,4
		19	143,40	51,1
		20	156,27	51,2

<sup>(a)</sup> massa do liofilizado/massa do fruto congelado.

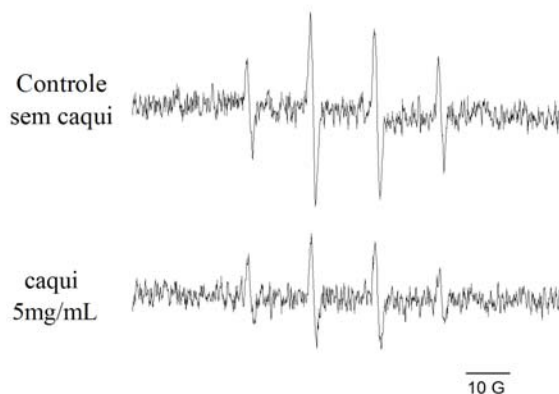
## 5.2 – Efeito da concentração do extrato de caqui na formação do aduto DMPO- $\cdot$ OH.

A atividade antioxidante do extrato de caqui foi analisada inicialmente por meio do estudo de ressonância paramagnética eletrônica do radical DMPO- $\cdot$ OH. A reação de formação do aduto DMPO- $\cdot$ OH foi mediada por 50  $\mu$ M de Fe(II) e 100  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em meio tamponado com 10 mM de tampão fosfato. O radical hidroxil, gerado via reação de Fenton, reage com o DMPO formando o aduto DMPO- $\cdot$ OH que possui espectro característico de 4 linhas de proporção 1:2:2:1 (figura 19).

A presença de concentrações crescentes do extrato de caqui promove a redução gradual da intensidade do sinal do aduto, o que indica que houve diminuição na produção de DMPO- $\cdot$ OH (figura 18). A maior inibição da intensidade sinal do DMPO- $\cdot$ OH foi verificada com 5 mg/mL de extrato de caqui, o qual promoveu inibição de pouco mais de 40% da intensidade do sinal (figura 18b).



**Figura 18:** A) Efeito da concentração do extrato aquoso de caqui na intensidade do sinal de DMPO-•OH detectado por EPR. Meio reacional contendo 10 mM de tampão fosfato, 50 $\mu$ M de FeII, 0,1mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 20mM de DMPO. A reação foi iniciada com a adição de FeII ao meio reacional. O experimento foi realizado com os caquis n° 4 e 10. Os pontos acima representam a média  $\pm$  SD (n=3). B) Análise dos dados demonstrando o percentual de inibição do sinal aduto DMPO-•OH.



**Figura 19:** Sinal do aduto DMPO-•OH detectado no espectrômetro em duas condições: sem extrato de caqui e com 5 mg/mL de extrato de caqui. Condições experimentais iguais a da figura 18.

A menor produção do aduto DMPO-•OH na presença do extrato de caqui pode ter ocorrido mediante dois mecanismos distintos: **i)** compostos presente no extrato de

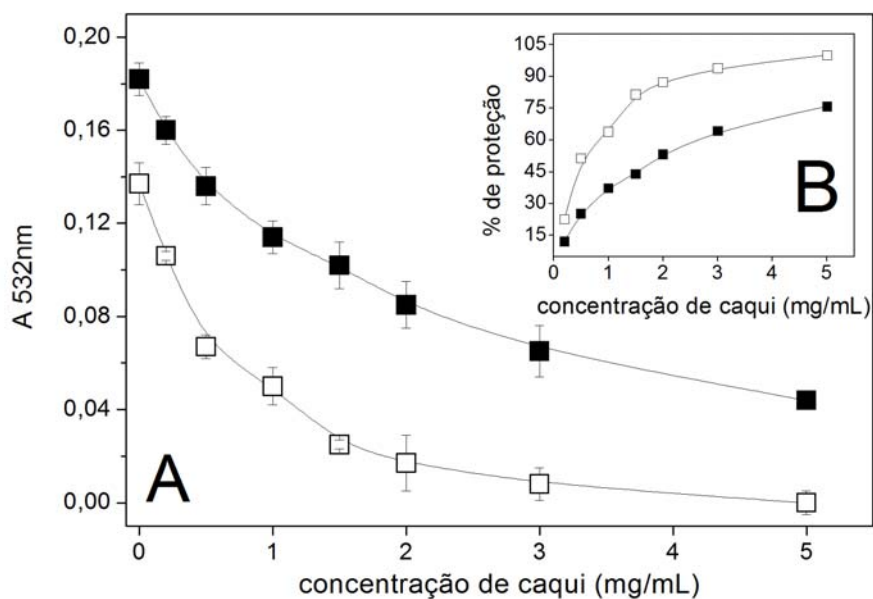
caqui poderiam quelar o Fe(II) diminuindo a produção de radical hidroxil livre (que poderia, por exemplo, reagir com o DMPO), ou **ii**) o radical hidroxil formado atacaria preferencialmente os compostos presentes no caqui diminuindo a formação do aduto DMPO- $\cdot$ OH. Além disso, ambos os mecanismos podem ocorrer ao mesmo tempo uma vez que o extrato de caqui é um material complexo que pode apresentar moléculas com atividade quelante e seqüestradora de radical hidroxil.

O mecanismo antioxidante do extrato de caqui foi analisado por meio dos ensaios de degradação oxidativa da 2-DR e de peroxidação lipídica discutidos em seguida.

### **5.3 – Efeito do extrato aquoso da polpa de caqui no dano oxidativo à 2-DR.**

O potencial antioxidante do extrato aquoso da polpa de caqui foi avaliado por meio do ensaio de dano oxidativo à 2-DR. O primeiro ensaio realizado nessa metodologia verificou o efeito da concentração do extrato de caqui na proteção da 2-DR contra danos oxidativos (figura 20). Esse ensaio foi realizado com dois caquis diferentes, o caqui número 3 (representado com quadrado vazio) e caqui número 17 (quadrado preto). A reação foi iniciada com adição de ascorbato com prévia incubação do extrato com o complexo Fe(III)-citrato por 10 minutos.

Em ambos os caquis analisados, verifica-se que o dano oxidativo à 2-DR é inversamente proporcional à concentração de extrato no meio reacional. Entretanto, o efeito protetor apresentado pelos caquis foi distinto. O caqui número 3 impede por completo a oxidação da 2-DR quando o mesmo se encontra presente no meio reacional na concentração de 5 mg/mL. O caqui número 17, por outro lado, não inibe a oxidação da 2-DR quando presente na concentração máxima de 5 mg/mL. O percentual máximo de proteção verificado para o caqui 17 foi de aproximadamente 75% (figura 20b).



**Figura 20:** (A) - Efeito da variação do extrato aquoso dos caquis nº 3 (□) e nº 17 (■) na degradação oxidativa da 2-DR. Meio reacional contendo 20 mM de tampão fosfato, 5mM de 2-DR, 50  $\mu$ M de FeIII-Citrato (1:1) e 0,5mM de ascorbato. Os reagentes foram pré-incubados por 10 minutos antes da adição de ascorbato ao meio reacional. Os pontos acima representam a média  $\pm$  SD (n=6). (B) – Análise dos dados demonstrando o efeito protetor dos caquis nº 3 (□) e nº 17 (■) na degradação oxidativa da 2-DR.

O valor de  $I_{50}$ , que corresponde à concentração do antioxidante capaz de inibir em 50% o dano oxidativo à 2-DR, também foi diferente entre esses dois caquis. O caqui 3 apresentou valor de  $I_{50}$  igual a  $0,52 \pm 0,05$  mg/mL, enquanto que o valor de  $I_{50}$  do caqui 17 foi de  $1,77 \pm 0,34$  mg/mL. Observa-se que o valor de  $I_{50}$  do caqui 17 foi mais que o triplo do valor verificado para o caqui 3. Isso indica que existe uma diferença significativa no potencial antioxidante entre os caquis coletados. Vale ressaltar que todos os caquis selecionados eram provenientes do mesmo produtor, porém, mesmo sendo cultivados na mesma região, apresentam diferença no potencial antioxidante.

Estudos realizados com outros extratos de fruta verificaram proteção semelhante à do caqui contra o dano oxidativo à 2-DR. O efeito antioxidante do extrato aquoso de tâmara contra o dano oxidativo à 2-DR (2,8 mM) mediado por Fe(III)-EDTA (0,1 mM), ascorbato (0,1 mM) e  $H_2O_2$  (1 mM) foi semelhante ao observado com o caqui. O valor de  $I_{50}$  do extrato aquoso de tâmara nas condições citadas foi de 2,2 mg/mL, sendo que a completa inibição foi verificada na concentração de 4 mg/mL (Vayalil, 2002). Um estudo realizado pela Universidade de Brasília verificou o potencial antioxidante de 6

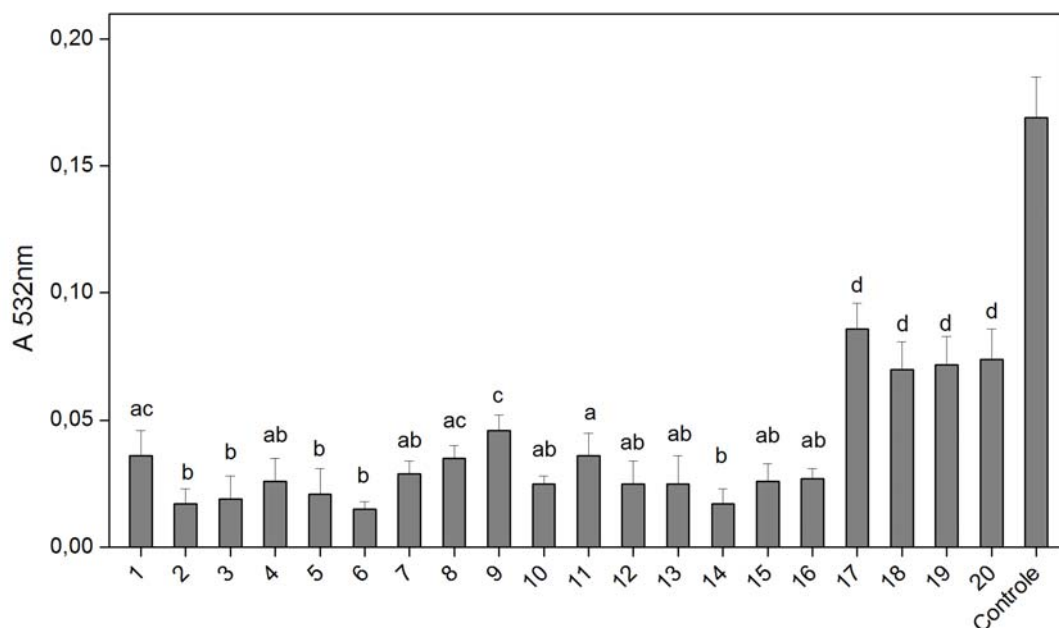
frutos do cerrado contra o dano oxidativo à 2-DR mediado por 50  $\mu$ M de Fe(II) e 100  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De acordo com o estudo, a castanha de baru apresentou maior potencial antioxidante entre os frutos analisados (valor de I<sub>50</sub> igual 0,073 mg/mL), seguido do jatobá (I<sub>50</sub> = 0,42 mg/mL) e da macaúba (I<sub>50</sub> = 0,58 mg/mL). A lobeira, a cagaita e o ingá apresentaram menores valores de I<sub>50</sub> sendo, respectivamente, iguais a 1,46 mg/mL, 4,62 mg/mL e 11,95 mg/mL (Dourado et al., 2007).

A diferença no potencial antioxidante observado entre os dois caquis analisados despertou interesse em identificar o perfil antioxidante dos 20 caquis selecionados no estudo. A análise do perfil antioxidante dos 20 caquis foi realizada por meio do ensaio oxidativo da 2-DR elaborado de forma semelhante ao estudo da variação da concentração do extrato de caqui. Porém, nesse novo ensaio, optou-se por fixar a concentração dos extratos de caqui em 2 mg/mL e verificar o percentual de proteção dos 20 caquis nessa concentração.

A figura 21 mostra o resultado apresentado pelos extratos de caqui. Os caquis 1 a 16 demonstraram uma melhor atividade antioxidante quando comparado aos caquis 17 a 20. O percentual de proteção dos caquis 1 a 16 variou entre 73 a 91%, enquanto que nos caquis 17 a 20 o percentual variou entre 52 a 59%. Não houve diferença significativa entre percentual de proteção dos caquis 17 a 20.

Os caquis 17 a 20 foram comprados no mesmo dia e correspondem aos caquis selecionados da terceira caixa. Observa-se que os caquis da caixa 3, com exceção do caqui 16, tiveram uma atividade antioxidante menor, comparada com os demais caquis, no método de oxidação da 2-DR.

Não se sabe ao certo quais os fatores que estariam envolvidos nessa diferença do potencial antioxidante dos caquis. Porém, acredita-se que a diferença no potencial antioxidante pode ocorrer devido a 3 fatores: **i)** a menor concentração de antioxidantes totais solúveis no extrato aquoso, **ii)** a presença de diferentes tipos de compostos antioxidantes que possuem atividade antioxidante também distintas, **iii)** ou mesmo, devido à ocorrência de todos os fatores supra citados.



**Figura 21:** Efeito de diferentes extratos aquoso de caqui do tipo Rama Forte na degradação oxidativa da 2-DR. Meio reacional contendo 20 mM de tampão fosfato, 5mM de 2-DR, 50  $\mu$ M de FeIII-Citrato (1:1), 0,5mM de ascorbato e 2mg/mL extrato de caqui. Os reagentes foram pré-incubados por 10 minutos antes da adição de ascorbato ao meio reacional. Os pontos acima representam a média  $\pm$  SD (n=6). Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre os extratos de caqui ( $p < 0,05$ ) (ANOVA/SNK).

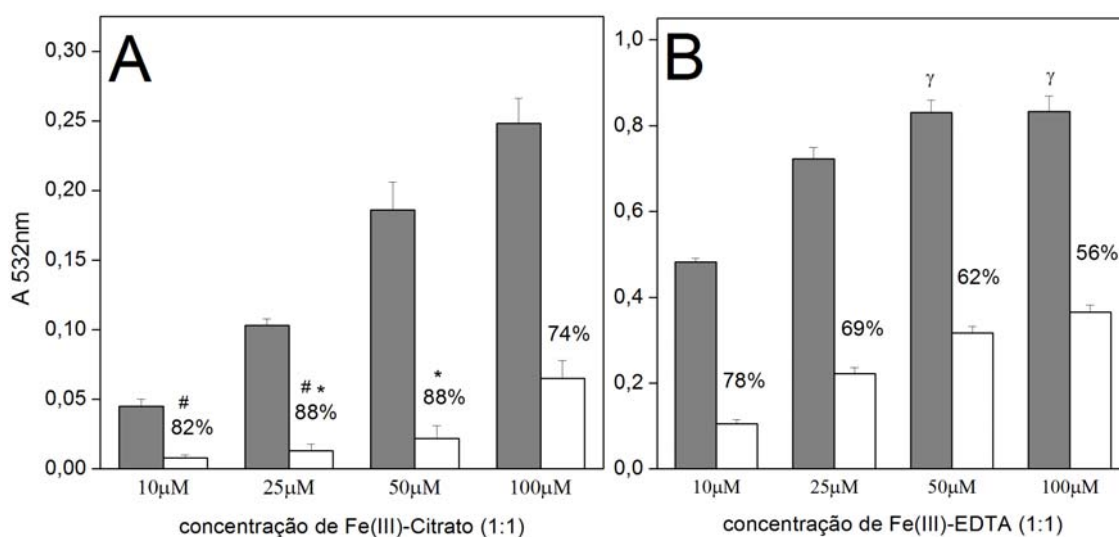
Como a coleta das frutas foi realizada em comércio local, não foi possível adquirir algumas informações importantes que poderiam auxiliar na identificação de fatores intervenientes como, por exemplo, qualidade do solo, estágio de maturação da fruta no momento da colheita, uso de inseticidas no pomar, entre outros. Além disso, outro fator importante, característico de caqui adstringente, é o processo de destanização do fruto que também pode interferir na concentração de taninos solúveis (veja como é feito o processo de destanização na página 30 da revisão bibliográfica). Sabe-se que as diferentes técnicas de destanização, assim como a quantidade de produto utilizado e o tempo de exposição a este produto são fatores que intervêm na textura, no índice de adstringência, na cor e no sabor do fruto (Muñoz, 2002).

Após a identificação dos caquis que possuem melhor atividade antioxidante contra o dano oxidativo à 2-DR, os ensaios seguintes foram realizados com aqueles que apresentaram melhores resultados, ou seja, os caquis 1 a 16. A opção em utilizar os caquis que possuem melhor atividade antioxidante tem como objetivo adquirir uma melhor homogeneidade da amostra. Não se sabe ainda se a diferença da atividade antioxidante se deve a uma menor quantidade de antioxidantes ou a uma diferença nos

compostos antioxidantes na amostra. Caso a segunda hipótese seja confirmada, é possível que o mecanismo antioxidante desses caquis também seja distinto. Nesse caso, como o presente trabalho tem como um dos objetivos sugerir um mecanismo de ação antioxidante do extrato aquoso da polpa de caqui optou-se por escolher aqueles que possuem um potencial antioxidante semelhante.

O ensaio seguinte avaliou o efeito da concentração do Fe(III) na atividade antioxidante do extrato de caqui (figura 22). Além disso, analisou-se o efeito do extrato de caqui na presença de dois co-quelantes, citrato de sódio (figura 22a) e EDTA (figura 22b). A razão de Fe(III)-co-quelante foi de 1:1.

No ensaio realizado com FeIII-citrato, o dano oxidativo à 2-DR foi proporcional à concentração do íon metálico no meio. A presença de 2 mg/mL de extrato de caqui no meio reacional minimizou a formação de MDA em todas as concentrações de FeIII-citrato presentes no meio. Observa-se que a proteção do extrato de caqui foi praticamente constante na presença de 10, 25 e 50  $\mu$ M de FeIII-citrato. Entretanto, o percentual de proteção do caqui diminuiu na concentração de 100  $\mu$ M de íons férricos.

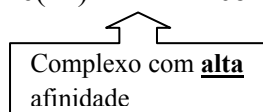


**Figura 22:** Efeito da concentração de FeIII-Citrato (1:1) (**figura A**) e FeIII-EDTA (1:1) (**figura B**) na degradação oxidativa da 2-DR na ausência de antioxidantes (cinza) e na presença de 2mg/mL do extrato aquoso de caqui (n° 2, 6 e 14) (branco) em meio reacional contendo tampão fosfato (20mM), 2-DR (5mM) e ascorbato (0,5mM). Os reagentes foram pré-incubados por 10 minutos antes da adição de ascorbato ao meio reacional. Os pontos acima representam a média  $\pm$  SD (n=6). Os números acima das colunas brancas indicam o percentual de proteção do extrato de caqui. Os símbolos iguais indicam que não há diferença significativa entre os ensaios (ANOVA/SNK).

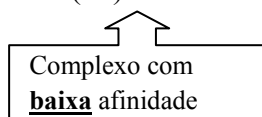
De modo semelhante, no ensaio realizado com FeIII-EDTA, o dano oxidativo à 2-DR também foi proporcional à concentração de íon metálico no meio. Porém, a formação de MDA foi constante a partir de 50 µM de FeIII-EDTA. Acredita-se que estabilização do dano oxidativo à 2-DR mediado por FeIII-EDTA pode ter ocorrido devido à concentração limitante da molécula alvo no meio reacional. A presença do extrato de caqui no meio reacional novamente provocou diminuição do dano oxidativo em todas as concentrações de FeIII-EDTA. No entanto, verifica-se claramente que o percentual de proteção oferecido pelo extrato de caqui diminuiu com o aumento da concentração do íon metálico no meio reacional.

Em todas as concentrações de ferro, o percentual de proteção do extrato de caqui foi maior no sistema contendo FeIII-citrato do que no sistema contendo FeIII-EDTA. A diferença encontrada no percentual de proteção do caqui nesses dois sistemas pode ser explicada pela diferença de afinidade que esses co-quelantes possuem. O EDTA é um quelante que possui maior afinidade com o íon férrico quando comparado com o citrato. As constantes de formação ( $\log \beta_{11}$ ) dos complexos Fe(III)-EDTA e Fe(III)-citrato são iguais a 25,5 e 11, respectivamente (Maurício et al., 2003). Portanto, caso o caqui apresente compostos com atividade quelante de íon metálico, é possível que exista uma competição entre os compostos do caqui e os quelantes EDTA e citrato em complexar com o FeIII (ver esquema abaixo). Nesse caso, como o complexo do FeIII-citrato tem menor afinidade do que o FeIII-EDTA, os compostos quelante presentes no caqui possuiriam maior facilidade em retirar o íon férrico do citrato o que resultaria em um maior efeito protetor contra o dano oxidativo à 2-DR.

Fe(III)-EDTA + compostos do caqui  $\rightarrow \rightarrow \rightarrow$  EDTA + Fe(III)-compostos do caqui



Fe(III)-citrato + compostos do caqui  $\rightarrow$  citrato + Fe(III)-compostos do caqui



**Esquema 9:** Demonstração da competição entre os co-quelantes (EDTA e citrato) e os compostos presente no extrato de caqui para formar complexo com o Fe(III).



Estudo realizado com o quelante PIH também mostrou que o percentual de proteção desse antioxidante era maior na presença de Fe(III)-NTA do que na presença de Fe(III)-EDTA. O efeito antioxidante maior do PIH em meio contendo NTA foi justificado pela constante de formação ( $\log \beta_{11}$ ) do complexo FeIII-NTA que é de apenas 8,3, valor este bem inferior às constantes de formação do FeIII-PIH e FeIII-EDTA que correspondem a 24,8 e 25,5 respectivamente (Hermes-Lima et al., 2000).

Outra interpretação possível seria que o EDTA agiria como facilitador da reação do Fe(III) com o ascorbato, produzindo assim mais radicais hidroxil durante os 30 minutos de reação. Desde os anos 70, já se sabe que o EDTA disponibiliza ainda mais o Fe(III) para a reação de Haber-Weiss quando comparado com a reação sem este co-quelante (Halliwell, 1978; McCord & Day Jr, 1978). Esse efeito pode ser verificado pela maior produção de MDA na presença de FeIII-EDTA quando comparado com o sistema contendo citrato. A produção de MDA foi 3,2 vezes maior com a utilização de Fe(III)-EDTA ( $A_{532} = 0,8$ ) do que com Fe(III)-citrato ( $A_{532} = 0,25$ ). Nesse caso, a menor proteção do extrato de caqui na presença de EDTA pode ser devido a uma maior produção de radicais livres nesse sistema quando comparado com o sistema contendo citrato. Sendo assim, a quantidade limitante de antioxidantes clássicos (com efeito sequestrador de radicais livres) presentes no extrato de caqui não seria suficiente para suprimir a quantidade de radicais livres gerado pelo sistema Fe(III)-EDTA.

Porém, é possível que, além do EDTA auxiliar na disponibilização do Fe(III) (vide **Nota de rodapé 2**), os compostos presentes no extrato de caqui poderiam também ter maior dificuldade em retirar os íons férricos do complexo Fe(III)-EDTA. Portanto, as duas explicações possíveis poderiam estar ocorrendo ao mesmo tempo dificultado ainda mais a atuação do extrato de caqui.

---

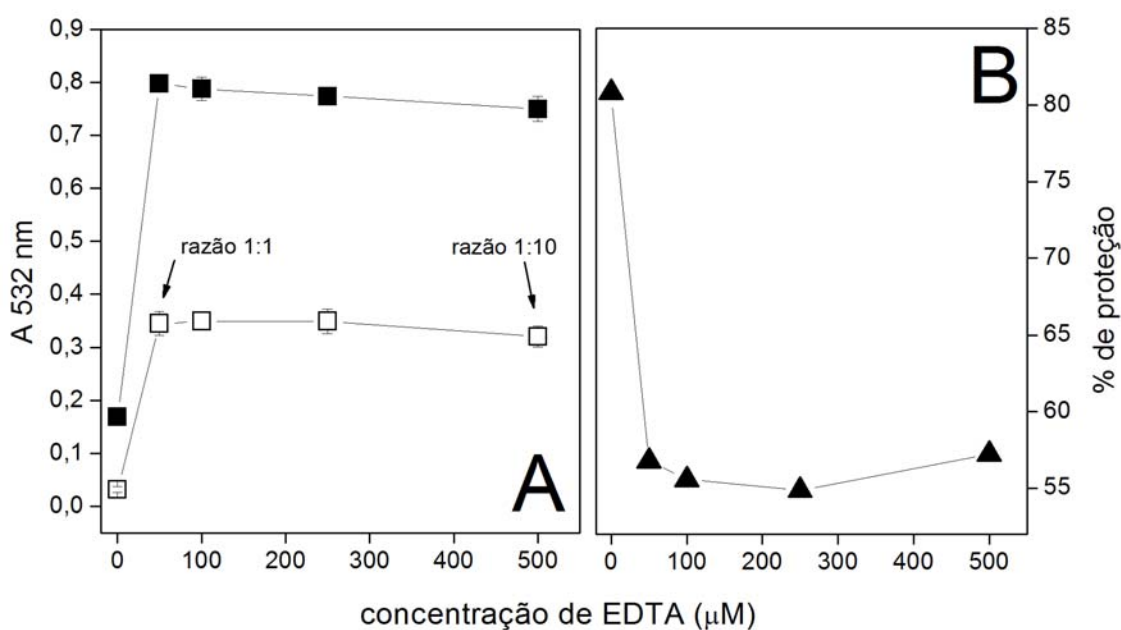
### **Nota de rodapé 2**

Quando o Fe(III) é adicionado ao meio reacional, ele pode complexar com a 2-DR, com o fosfato inorgânico do tampão ou mesmo precipitar na forma de hidróxido de Fe(III) (Aruoma et al.; 1987). Porém, quando o Fe(III) é adicionado junto com o EDTA (numa solução-mãe Fe-EDTA), a formação de complexos com estes outros componentes do sistema (supracitados) e a precipitação do ferro são fortemente inibidos, devido a grande afinidade que o EDTA tem para com o Fe(III). Dessa forma, o complexo Fe(III)-EDTA facilita a participação do íon metálico nas reações de oxidação, gerando, portanto, mais EROs.

Sendo assim, foram realizados ensaios experimentais para avaliar se o extrato de caqui teria ou não atividade antioxidante do tipo quelante de íons férricos. Inicialmente verificou-se o efeito da concentração do EDTA (com a concentração de Fe(III) fixado a 50  $\mu$ M) na atividade antioxidante do caqui contra o dano oxidativo à 2-DR. Caso o extrato de caqui tivesse um comportamento quelante, esperaria-se que o percentual de proteção do extrato diminuísse com o aumento da concentração de EDTA no meio, uma vez que o aumento da concentração do co-quelante dificultaria ainda mais a retirada dos íons Fe(III) do EDTA pelos compostos quelantes do caqui.

O resultado desse ensaio está mostrado na figura 23. Observa-se na condição sem adição de extrato, que o dano oxidativo à 2-DR foi pequeno quando não se adicionou EDTA no meio reacional (absorbância em torno de 0,2). Porém, quando o EDTA estava presente no meio a produção de MDA aumentou significativamente, independente da concentração do co-quelante, apresentando um valor de absorbância em torno de 0,8. A presença de EDTA na razão 1:1 com o Fe(III) provocou dano máximo à 2-DR e a partir dessa concentração não se observou alteração da produção de MDA. Esse resultado demonstra claramente que o Fe(III) é mais disponibilizado para as reações de Haber-Weiss na presença de EDTA.

Quando o ensaio foi realizado com extrato de caqui o dano oxidativo à 2-DR diminuiu em relação ao controle sem caqui em todas as concentrações de EDTA. No entanto, o percentual de proteção do caqui na ausência de EDTA (de aproximadamente 80% de proteção) foi maior do que na presença do co-quelante (figura 23b). O resultado obtido na presença de EDTA mostrou que o percentual de proteção do caqui se manteve constante, em torno de 55 % de proteção, em todas as concentrações de EDTA.



**Figura 23:** (A) Efeito da concentração de EDTA na degradação oxidativa da 2-DR na ausência (■) e na presença de 2mg/mL do extrato aquoso de caqui (n° 7 e 12) (□) em meio reacional contendo tampão fosfato (20 mM), 2-DR (5 mM), ascorbato (0,5 mM) e FeIII (50  $\mu\text{M}$ ). Os reagentes foram pré-incubados por 10 minutos antes da adição de ascorbato ao meio reacional. Os pontos acima representam a média  $\pm$  SD (n=6). (B) Análise dos dados demonstrando o percentual de proteção do extrato de caqui. As setas indicam a razão de Fe(III)-EDTA.

Portanto, ao contrário do que se esperava, o extrato de caqui não apresentou comportamento quelante, uma vez que não houve variação do percentual de proteção do extrato de caqui com o aumento de EDTA no meio. O conjunto de resultados obtidos até o presente momento nos levam a crer que a atividade antioxidante do extrato de caqui se deva a um mecanismo seqüestrador de radicais livres. Como na condição sem adição de extrato, não houve variação do dano oxidativo na presença de concentrações crescentes de EDTA, acredita-se que a produção de radicais livres tenha sido semelhante, independente da concentração do co-quelante no meio. Caso isso seja verdade, a capacidade seqüestradora de radicais livres do extrato de caqui também seria semelhante nas diferentes concentrações de EDTA.

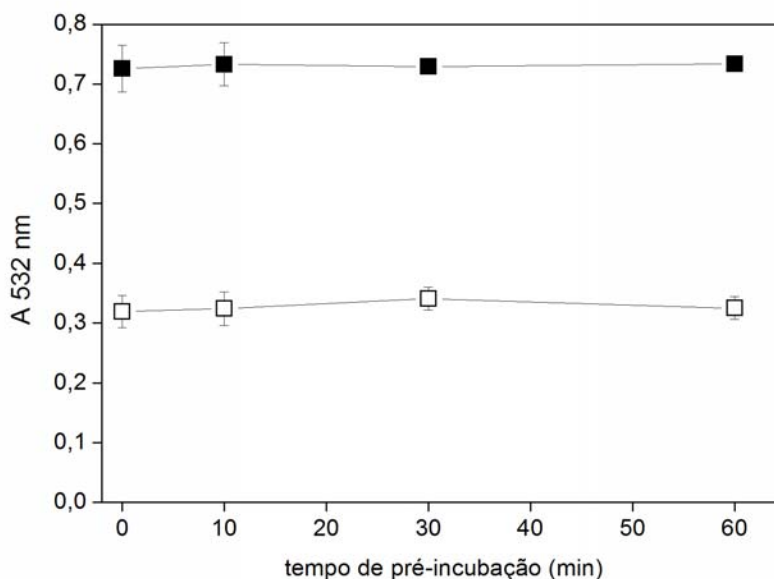
Quelantes de Fe(III) como o AT e o PIH apresentaram diminuição da atividade antioxidante com o aumento da concentração de EDTA no meio reacional. No ensaio realizado com 10  $\mu\text{M}$  de Fe(III), 15 mM de 2-DR e 2 mM de ascorbato em meio tamponado com Hepes (pH 7,2 e concentração de 20 mM), o percentual de proteção da

2-DR pelo PIH (concentração final de 400  $\mu\text{M}$ ) reduziu de 75% para 30% com o aumento da concentração de EDTA de 25  $\mu\text{M}$  para 100  $\mu\text{M}$  de EDTA (Hermes-Lima et al., 2000). O AT também apresentou redução do potencial antioxidante com o aumento da concentração de EDTA no ensaio da 2-DR mediado por 50  $\mu\text{M}$  de Fe(III) e 100  $\mu\text{M}$  de ascorbato. O valor de  $I_{50}$  do AT aumentou de 120  $\mu\text{M}$  para 200  $\mu\text{M}$  com o aumento da razão de Fe(III)-EDTA de 1:1 para 1:10 (Andrade Jr et al., 2006).

O efeito antioxidante inalterável do caqui na presença de concentrações crescentes de EDTA pode também ser explicado por uma cinética lenta de remoção dos íons férricos do complexo Fe(III)-EDTA. Talvez o tempo de pré-incubação de 10 minutos do caqui com o complexo Fe(III)-EDTA não seja suficiente para que os compostos quelantes do caqui removam os íons férricos do EDTA. Por isso, não teria sido possível verificar o efeito quelante do extrato de caqui.

Portanto, para avaliar se o extrato de caqui apresenta cinética lenta de remoção dos íons férricos foi realizado um estudo que avaliou diferentes tempos de pré-incubação do extrato de caqui com o complexo Fe(III)-EDTA no dano oxidativo à 2-DR. No período de pré-incubação, todos os reagentes, com exceção do ascorbato, estão presentes no meio e corresponde ao tempo destinado para que ocorra as possíveis complexações antes do início da reação (que ocorre por meio da adição do ascorbato ao sistema). Quando a pré-incubação não foi realizada (que corresponde ao tempo zero da curva), a reação foi iniciada com adição do complexo Fe(III)-EDTA no meio reacional. O tempo de reação de 30 minutos foi fixado em todos os pontos.

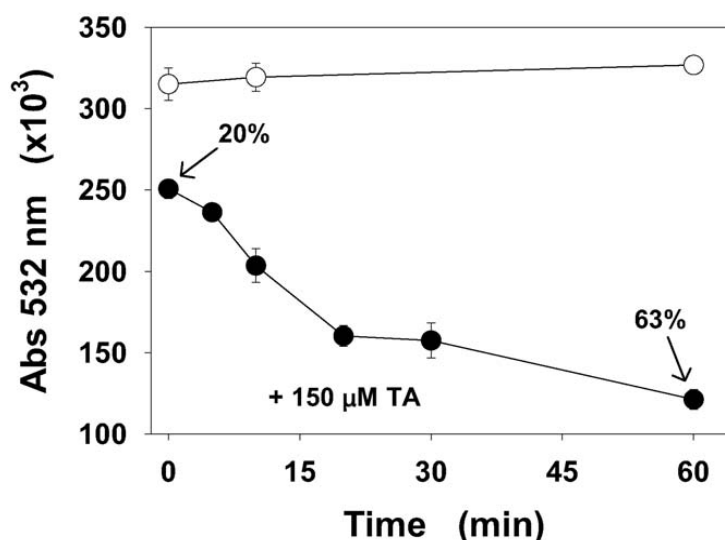
De acordo com o resultado apresentado na figura 24, observa-se que não houve alteração na atividade antioxidante do extrato aquoso de caqui com o aumento do tempo de pré-incubação (0 a 60 minutos). O percentual de proteção oferecido por 2 mg/mL de extrato de caqui foi de aproximadamente 55% independente do tempo de incubação prévia do extrato com o complexo Fe(III)-EDTA.



**Figura 24:** Efeito do tempo de pré-incubação do extrato de caqui com o Fe(III)-EDTA na degradação oxidativa da 2-DR em duas condições: na ausência (■) e na presença de 2mg/mL do extrato aquoso de caqui (n° 7, 14 e 16) (□). Meio reacional contendo tampão fosfato (20 mM), 2-DR (5 mM), ascorbato (0,5 mM) e FeIII-EDTA (1:1) (50  $\mu$ M). Os pontos acima representam a média  $\pm$  SD (n=6 a 12).

Estudos realizados com os quelantes AT e PIH demonstraram que o percentual de proteção desses antioxidantes aumenta com o prolongamento do tempo de pré-incubação (Maurício et al., 2003; Andrade Jr et al., 2006). O percentual de proteção do AT contra a degradação oxidativa da 2-DR, por exemplo, aumenta de 20% para 63% com o aumento do tempo de pré-incubação de 0 para 60 minutos (ver figura 25). O resultado demonstrado pelo AT indica que a remoção dos íons férricos do complexo Fe(III)-EDTA pelo polifenol é tempo-dependente e que esta cinética parece ser relativamente lenta.

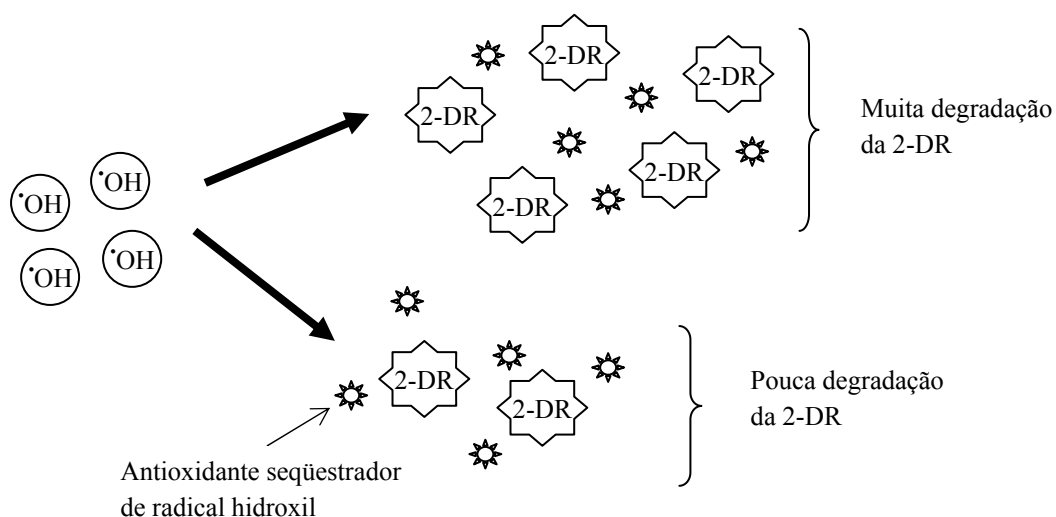
O comportamento antioxidante do extrato de caqui não se assemelha ao que é normalmente observado por moléculas quelantes. Tanto o ensaio da variação da concentração de EDTA quanto o da variação do tempo de pré-incubação indicaram que o extrato de caqui não apresenta comportamento do tipo quelante-antioxidante.



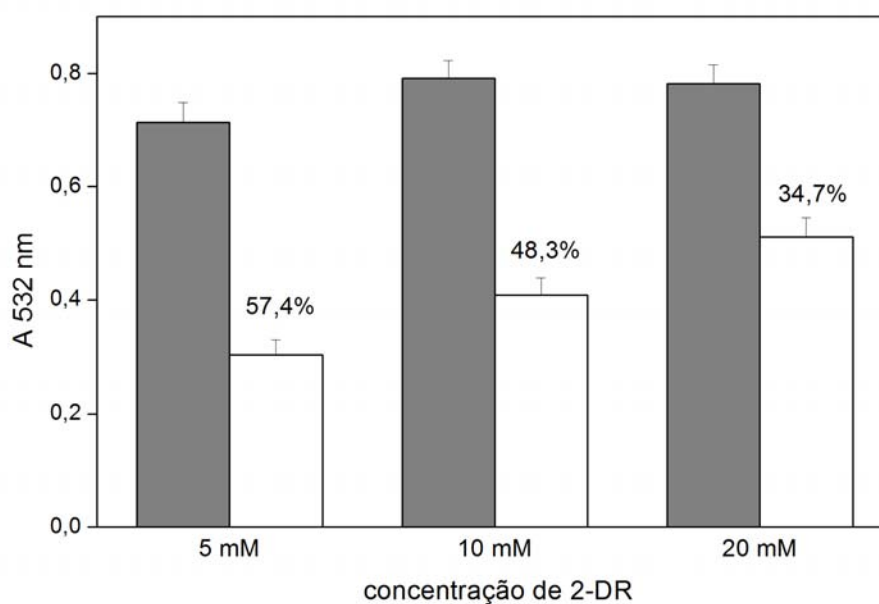
**Figura 25:** Efeito do tempo de pré-incubação do ácido tânico (TA do inglês) com Fe(III)-EDTA na degradação da 2-DR. Meio reacional contendo 20 mM de tampão fosfato (pH 7,2), 5 mM de 2-DR, 50  $\mu$ M de Fe(III)-EDTA (1:1), na ausência (○) e presença de 150  $\mu$ M de AT (●). Após o término do tempo de pré-incubação, a reação foi iniciada com adição de ascorbato (concentração final de 0,1 mM). Tempo de reação correspondeu a 10 minutos. Resultado retirado de **Andrade Jr et al., 2006**.

A atividade quelante do extrato de caqui foi também analisada por meio do ensaio da variação da concentração da 2-DR no meio reacional. A 2-DR é utilizada como molécula alvo do radical hidroxil produzido no meio. Antioxidantes com comportamento sequestrador de radicais livres apresentam uma diminuição do percentual de proteção quando se aumenta a concentração da molécula alvo. O aumento da concentração da molécula alvo favorece ainda mais a oxidação da 2-DR devido à competição entre o antioxidante e a 2-DR na reação com o radical hidroxil (Lopes et al., 1999). Os antioxidantes com atividade somente quelante, por outro lado, não apresentam diminuição do seu potencial antioxidante com o aumento da 2-DR. Como os quelantes não competem com a molécula alvo em reagir com o radical hidroxil, o percentual de dano oxidativo à 2-DR se mantém constante independente da sua concentração no meio reacional (Hermes-Lima et al., 2000).

O efeito da concentração de 2-DR no dano oxidativo mediado por 50  $\mu$ M de Fe(III)-EDTA (1:1) e 0,5 mM de ascorbato foi apresentado na figura 26. Observa-se que o percentual de proteção do caqui é inversamente proporcional à concentração de 2-DR no meio reacional. O efeito protetor do caqui diminui de 57% para 34% com o aumento da concentração de 2-DR de 5 mM para 20 mM.



**Esquema 10:** Representação do efeito da concentração da molécula alvo na degradação oxidativa da 2-DR.



**Figura 26:** Estudo do efeito da concentração de 2-DR no percentual de proteção do extrato de caqui. Coluna cinza indica que o ensaio foi realizado na ausência de extrato e a coluna branca mostra o efeito de 2 mg/mL do extrato aquoso de caqui (n° 7, 13 e 14) no ensaio. Meio reacional contendo tampão fosfato (20 mM), FeIII-EDTA (1:1, 50  $\mu$ M) e ascorbato (0,5 mM). Os reagentes foram pré-incubados por 10 minutos antes da adição de ascorbato ao meio reacional. Os pontos acima representam a média  $\pm$  SD (n=6 a 9). Os números acima das colunas brancas indicam o percentual de proteção do extrato de caqui.

Novamente o resultado encontrado nesse ensaio demonstrou que o extrato de caqui apresenta atividade seqüestradora de radicais livres. Não foi observado, pelo menos em meio aquoso, efeito quelante do extrato de caqui Rama Forte.

Um estudo desenvolvido em nosso laboratório avaliou a atividade antioxidante da folha e flor da capuchinha (*Tropaeolum majus L.*). Os resultados demonstrados no estudo indicam que tanto o extrato aquoso da folha quanto o da flor apresentam componentes com atividade quelante-antioxidante importante. No ensaio da degradação oxidativa da 2-DR mediado por Fe(II) 50  $\mu$ M e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100  $\mu$ M, ambos os extratos (flor e folha) não apresentaram variação em seu potencial de proteção com o aumento da concentração da molécula alvo (Bicalho, 2008). Portanto, ao contrário do que foi observado no nosso estudo do caqui, esse comportamento do extrato da flor e folha da capuchinha sugere efeito antioxidante do tipo quelante.

Apesar do caqui analisado ser do tipo adstringente, acredita-se que o processo de destanização sofrido pelo fruto tenha removido a maior parte dos taninos solúveis, o que afetou o comportamento quelante do extrato do caqui. Os taninos são conhecidos pela sua atividade quelante de íons metálicos (ver página 18 da revisão bibliográfica). Sendo assim, a remoção desses componentes do fruto pode ter afetado o potencial antioxidante do caqui.

Estudo realizado com o caqui do cultivar Giombo (do tipo variável igual ao caqui Rama Forte) analisou a concentração de taninos solúveis do fruto após o processo de destanização por vapor de álcool etílico. Antes da destanização, o caqui apresentava uma concentração de taninos solúveis equivalente a 0,28 g/100 g de fruto. A partir do quarto dia, após o processo de destanização, os teores de taninos solúveis reduziram para aproximadamente 0,1 g/100 g de fruto (Antoniolli et al., 2000). Segundo Kato (1984), frutos que apresentam 0,25% de taninos são ligeiramente adstringentes e se tornam comestíveis quando a concentração de taninos solúveis se encontra abaixo de 0,1%. Portanto, o processo de destanização do caqui remove, no mínimo, cerca de 60% dos taninos solúveis presentes no fruto in natura.

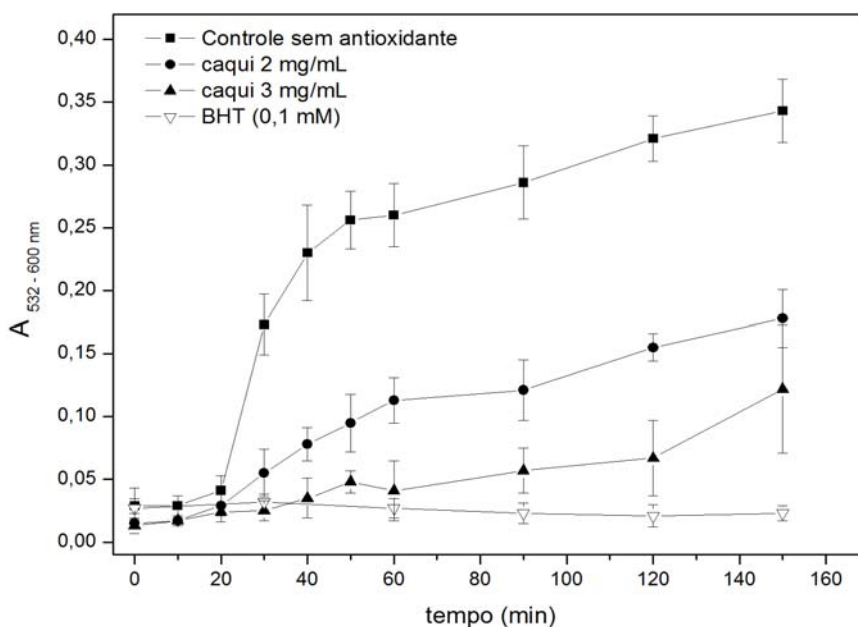
O efeito do extrato aquoso do caqui Rama Forte foi também verificado no ensaio de peroxidação lipídica em homogenato de fígado de rato. Análise do extrato nesse novo sistema permite avaliar a atividade antioxidante do caqui em meio lipofílico.



#### 5.4 – Atividade antioxidante do extrato aquoso da polpa de caqui contra peroxidação lipídica de fígado de rato.

No primeiro ensaio de peroxidação lipídica em homogenato de fígado de rato foram utilizados reagentes de Fenton para geração de radical hidroxil. O estudo do curso temporal da peroxidação lipídica foi realizado na ausência de antioxidantes e na presença de 2 mg/mL e 3 mg/mL de extrato aquoso de caqui. Os resultados foram comparados com o antioxidante clássico contra a peroxidação lipídica, o BHT (butil hidroxi tolueno) utilizado pela indústria alimentícia como conservante em alimentos ricos em gordura.

As três fases da peroxidação lipídica podem ser visualizadas no gráfico do curso temporal da peroxidação lipídica (figura 27). Na ausência de antioxidantes, a fase lag, ou fase de iniciação, se estende até pouco antes de 20 minutos de reação. A partir de 20 minutos, observa-se um aumento súbito da produção de MDA característico da fase log, ou fase de propagação. A fase de terminação é verificada a partir de 50 minutos de reação, na qual se observa uma diminuição da velocidade de produção de MDA.



**Figura 27:** Efeito do extrato de caqui (n° 3, 15 e 16) no curso temporal da peroxidação lipídica. O ensaio foi realizado em 4 condições distintas: na ausência de extrato (■), na presença de 2 mg/mL (●) e 3 mg/mL (▲) de extrato aquoso de caqui, e na presença de 0,1 mM de BHT (▽). Meio reacional contendo 10 mM de tampão hepes, 125 mM de KCl, 5% do volume reacional de homogenato de fígado de rato e 50 µM de FeII, 50 µM de citrato e 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A reação foi iniciada pela adição de Fe(II) no meio reacional.

Antioxidantes com atividade exclusivamente seqüestradora de radicais livres, como o  $\alpha$ -tocoferol e o BHT, doam um hidrogênio para o radical lipoperoxil ( $\text{LOO}^{\bullet}$ ) resultando na formação de hidroperóxido ( $\text{LOOH}$ ). O radical lipoperoxil é responsável pela propagação da peroxidação lipídica. Portanto, ao doar o hidrogênio ao  $\text{LOO}^{\bullet}$ , esses antioxidantes evitam o desencadeamento da cadeia de reação da peroxidação lipídica, o que caracteriza uma atividade “chain breaking”. A fase de propagação da peroxidação lipídica só é verificada quando todo antioxidante é depletado, o que resulta na expansão da fase lag da reação (Hermes-Lima, 2004a). Após a depleção do antioxidante a velocidade de propagação é semelhante ao sistema que não possui antioxidantes “chain breaking”.

A expansão da fase lag foi nitidamente observada na presença de 0,1 mM de BHT. Durante todo o período de reação em que a peroxidação lipídica foi acompanhada (2 horas e 30 minutos) não se verificou início da propagação da peroxidação lipídica no sistema contendo BHT.

A presença de 2 mg/mL de extrato aquoso de caqui promoveu uma diminuição da velocidade da fase log da peroxidação lipídica, porém, não se verificou expansão da fase lag. Além disso, a fase de terminação da curva contendo 2 mg/mL de caqui não atingiu os valores de absorvância verificados no controle sem antioxidante. Essas características da presença do extrato de caqui indicam um comportamento quelante importante. Sabe-se que os íons metálicos em especiais os cátions de ferro e de cobre possuem papel importante na propagação lipídica (Hermes-Lima, 2004a). A formação de complexos pouco reativos com esses íons metálicos leva à diminuição da velocidade de reação dos metais com o hidroperóxido lipídico e, conseqüentemente, à menor produção de radical lipoperoxil. Esse comportamento provoca redução da velocidade de propagação da peroxidação lipídica e diminuição dos produtos da decomposição dos radicais lipídicos.

Na presença de 3 mg/mL de extrato de caqui, observou-se um aumento da fase lag e redução, ainda maior, da velocidade de propagação da peroxidação lipídica. O aumento da fase lag caracteriza uma atividade “chain breaking” do caqui que foi verificada apenas em maiores concentrações do extrato. Na concentração de 3 mg/mL ambos comportamentos quelante e “chain breaking” participam da atividade antioxidante do extrato de caqui.

A atividade “chain breaking” do caqui já foi relatada em outros estudos. Katsube e colaboradores verificaram que o caqui do tipo adstringente aumenta o tempo da fase lag da peroxidação de 20 µg/mL de LDL de plasma humano mediado por 5 µM de CuSO<sub>4</sub>. Além disso, verificaram que o aumento do tempo da fase lag era proporcional à concentração de extrato etanólico de caqui adicionado no meio. Esse resultado demonstra que o caqui possui compostos que são capazes de doar hidrogênio ao radical peroxil inibindo, dessa forma, a propagação da peroxidação lipídica. A fase lag desse estudo foi analisada por meio do monitoramento da formação de dienos conjugados (Katsube, et al., 2004).

Ao contrário do que foi observado no ensaio da degradação oxidativa da 2-DR, o extrato de caqui apresentou importante atividade quelante na peroxidação lipídica induzido por Fe(II) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Essa diferença no comportamento antioxidante nos dois sistemas estudados (aquoso e membranar) pode estar relacionada à presença de compostos com caráter mais lipofílico que possuem atividade quelante e que, portanto, apresentam maior solubilidade em meio contendo material lipídico.

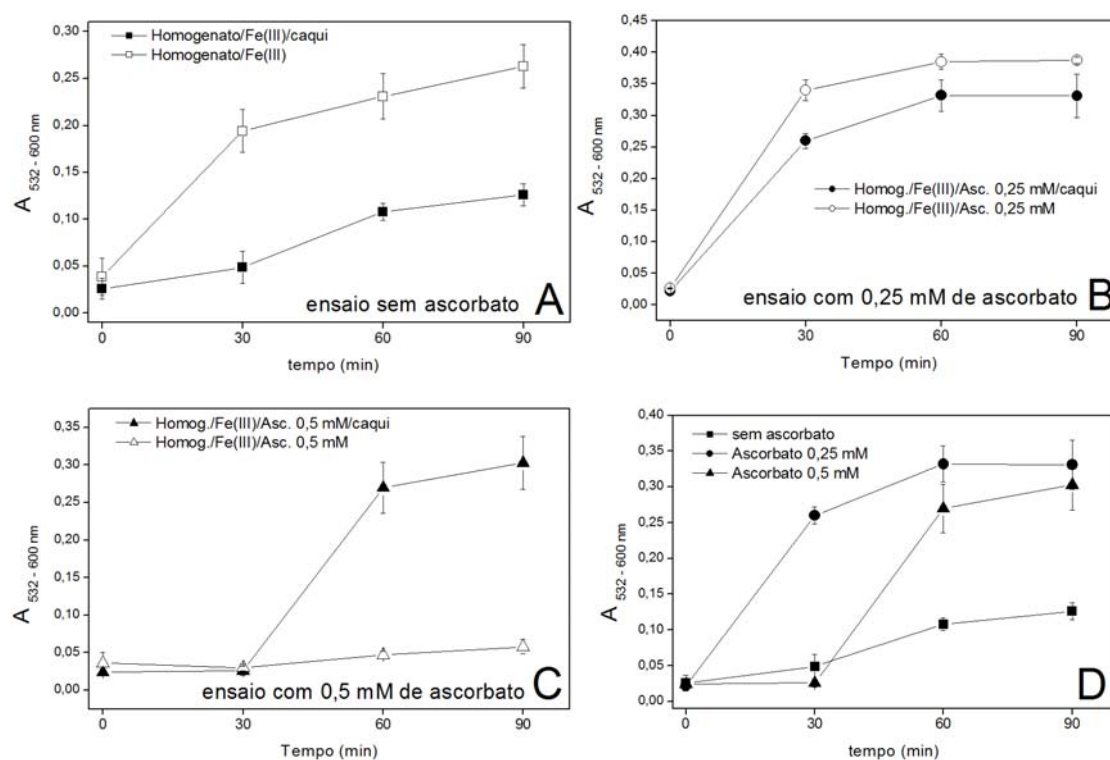
Além disso, é possível que os compostos presentes no caqui formem complexos com cátions de ferro específicos. O ensaio de degradação da 2-DR foi realizado em sistema contendo Fe(III), enquanto que o ensaio de peroxidação lipídica foi mediado por Fe(II). Não se sabe ao certo se o extrato de caqui seria capaz de quelar o íon Fe(III). Os resultados apresentados no ensaio da 2-DR indicaram que o extrato de caqui não apresentou comportamento quelante-antioxidante de íons férricos, porém é possível que o caqui se comporte de maneira distinta em meio lipofílico.

Com o intuito de estudar o efeito do caqui sobre a peroxidação lipídica induzida por outro sistema gerador de oxirradicais, foi investigado o efeito do extrato de caqui contra a peroxidação lipídica mediado por Fe(III)-citrato e ascorbato. Inicialmente, o ensaio do curso temporal da peroxidação lipídica foi realizado em condições semelhantes ao feito na degradação oxidativa da 2-DR, ou seja, com 50 µM de Fe(III)-citrato (1:1) e 0,5 mM de ascorbato.

Ao contrário do que se esperava, o extrato de caqui nessas condições apresentou efeito pró-oxidante no ensaio de peroxidação lipídica (ver figura 28, gráfico C). O efeito pró-oxidante do extrato de caqui foi observado a partir de 30 minutos de reação. Observa-se que a formação de MDA na curva sem antioxidante é pequena durante todo tempo de reação analisado (90 minutos), apresentando absorbância máxima por volta de 0,06.

Outros ensaios foram realizados para estudar o efeito pró-oxidante do caqui. O efeito do extrato de caqui (2 mg/mL) sobre curso temporal da peroxidação lipídica foi analisado em meio contendo uma menor concentração de ascorbato (0,25 mM) (figura 28, gráfico B) e em meio sem adição de ascorbato, com apenas Fe(III)-citrato (figura 28, gráfico A). Em todos os ensaios realizados a concentração de Fe(III)-citrato foi de 50  $\mu$ M (razão 1:1). No ensaio realizado sem adição de ascorbato, outros agentes redutores presentes no homogenato de fígado de rato como, por exemplo, a glutathiona reduzida, promovem a redução do Fe(III) necessária para geração de radical hidroxil.

A produção de MDA nas curvas controle (sem antioxidante) nos ensaios realizados sem adição de ascorbato e com 0,25 mM de ascorbato foi maior do que foi verificado no meio reacional contendo 0,5 mM de ascorbato. O maior dano oxidativo ocorreu no sistema contendo 0,25 mM de ascorbato. Isso indica que o perfil de formação dos produtos da peroxidação lipídica, ao longo do tempo, é dependente da concentração de ascorbato no meio.



**Figura 28:** Efeito do extrato aquoso de caqui (2 mg/mL) no curso temporal da peroxidação lipídica em diferentes concentrações de ascorbato: (A) sem ascorbato; (B) com 0,25 mM de ascorbato e (C) com 0,5 mM de ascorbato. Em todos os sistemas avaliados o meio reacional apresentava 10 mM de tampão HEPES (pH=7,2), 125 mM de KCl, 50  $\mu$ M de Fe(III)-citrato (1:1) e 5% do volume reacional de homogenato de fígado de rato. O gráfico D é um compilado dos dados dos três primeiros gráficos e demonstra o efeito do extrato de caqui nas três concentrações de ascorbato (0, 0,25 e 0,5 mM).

Na ausência de ascorbato no sistema reacional, o extrato de caqui apresentou efeito antioxidante considerável contra a peroxidação lipídica. Quando o ensaio foi realizado com 0,25 mM de ascorbato observou-se uma pequena atividade antioxidante do extrato de caqui (menor do que no sistema sem adição de ascorbato). Após 90 minutos de reação, o percentual de proteção do extrato de caqui contra peroxidação lipídica no sistema sem adição de ascorbato foi de 52%, enquanto que no sistema contendo 0,25 mM de ascorbato essa proteção foi de apenas 14%.

O efeito de 2 mg/mL de extrato de caqui nas três condições distintas foi demonstrado no gráfico D da figura 28. Os perfis do curso temporal da peroxidação lipídica em meio contendo extrato de caqui foram distintas uma das outras. Após 60 minutos de reação, a formação de MDA foi maior no ensaio realizado com 0,25 mM de ascorbato, seguida dos ensaios contendo 0,5 mM e sem ascorbato, respectivamente. Apesar do caqui apresentar efeito pró-oxidante no ensaio contendo ascorbato 0,5 mM, a produção de MDA nesse sistema é inferior do que observado na presença de 0,25 mM de ascorbato.

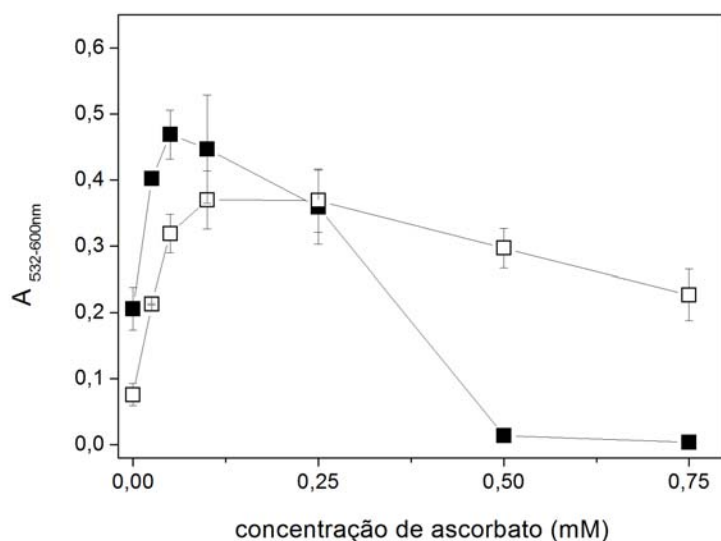
Esses resultados demonstram que o comportamento do extrato de caqui é dependente da concentração de ascorbato no meio reacional. Esse efeito bimodal (pró-oxidante e antioxidante) do extrato de caqui é bastante intrigante, uma vez que gera a dúvida se o caqui apresentaria ou não efeito benéfico importante para o organismo.

### **5.5 – Estudo do mecanismo pró-oxidante do extrato aquoso de caqui.**

O efeito do ascorbato na atividade antioxidante do extrato de caqui foi analisado posteriormente com mais detalhe em três ensaios experimentalmente distintos. Esses experimentos foram elaborados a fim de determinar o mecanismo pelo qual o caqui apresenta esse comportamento bimodal que é dependente da concentração de ascorbato no meio. O primeiro ensaio realizado avaliou a formação de MDA, após 60 minutos de reação, em concentrações crescentes de ascorbato na presença e ausência do extrato de caqui.

O resultado apresentado na figura 29 mostra que a concentração de ascorbato no ensaio da peroxidação lipídica possui curva em formato de sino. O efeito pró-oxidante do ascorbato, que se deve a redução do Fe(III) a Fe(II), foi verificado em pequenas concentrações (abaixo de 50 a 100  $\mu$ M). Porém, a partir de 100  $\mu$ M, o efeito

antioxidante do ascorbato torna-se evidente devido a sua capacidade de seqüestrar radical hidroxil e regenerar a vitamina E presente no homogenato de fígado de rato. Na concentração de 0,5 mM praticamente não se verifica início da fase log da peroxidação lipídica. Esse efeito bimodal (pró-oxidante e antioxidante) do ascorbato, que é dependente da sua concentração no meio reacional, já é conhecido na literatura e foi verificado em outros estudos (Melin et al., 1997; Hermes-Lima et al., 2001).



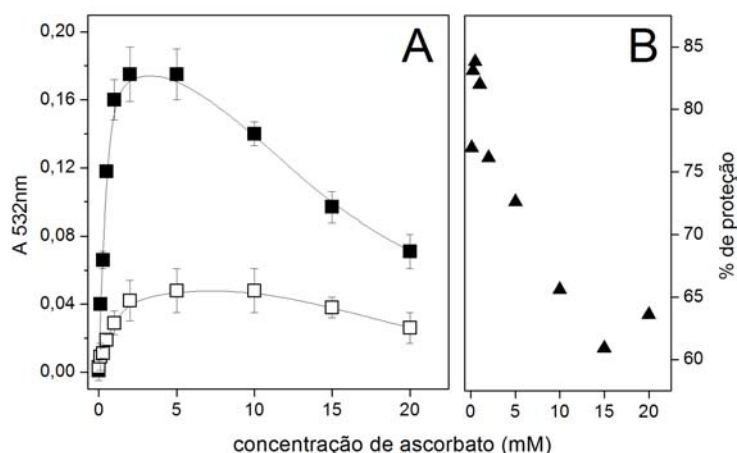
**Figura 29:** Efeito da concentração ascorbato na peroxidação lipídica em meio sem caqui (■) e com 2 mg/mL extrato de caqui (□). Meio reacional contendo 10 mM de tampão hepes, 125 mM de KCl, 5% do volume reacional de homogenato de fígado de rato e 50  $\mu$ M de FeIII-Citrato (1:1). O experimento foi realizado com os caquis nº 3, 15, 16 e 4. A reação foi iniciada com a adição de FeIII-Citrato e o tempo de reação foi de 60 minutos. Os pontos acima representam a média  $\pm$  SD (n=8 a 9).

A curva em sino também foi verificado na presença de 2 mg/mL de caqui com o aumento da concentração de ascorbato no meio. A atividade antioxidante do extrato de caqui foi observada em concentrações inferiores a 0,25 mM de ascorbato, contudo, a partir dessa concentração, o extrato de caqui apresentou efeito pró-oxidante (figura 29).

O extrato de caqui parece inibir a ação antioxidante do ascorbato quando este último se encontra presente em grandes concentrações. Acredita-se, portanto, que a atividade pró-oxidante do extrato de caqui em altas concentrações de ascorbato se deva a essa inibição.

O efeito da concentração de ascorbato também foi analisado no ensaio de degradação oxidativa da 2-DR (figura 30). O ensaio foi realizado na presença de 50  $\mu\text{M}$  de Fe(III)-citrato (1:1).

De modo semelhante ao observado no ensaio de peroxidação lipídica, concentrações crescentes de ascorbato promoveram uma curva em sino na degradação oxidativa da 2-DR tanto na ausência de caqui quanto na presença de 2 mg/mL de extrato da fruta. Porém, nestas condições, a ação inibitória do ascorbato só foi verificada em concentrações superiores a 5 mM.



**Figura 30:** (A) Estudo do efeito da concentração de ascorbato na degradação oxidativa da 2-DR na ausência de antioxidantes (■); e presença de 2 mg/mL do extrato aquoso de caqui (n° 10) (□) em meio reacional contendo tampão fosfato (20 mM), 2-DR (5 mM) e FeIII-Citrato (1:1) (50  $\mu\text{M}$ ). Os reagentes foram pré-incubados por 10 minutos antes da adição de ascorbato ao meio reacional. Os pontos acima representam a média  $\pm$  SD (n=6 a 11). (B) Análise dos dados demonstrando a diminuição do percentual de proteção do caqui.

O extrato de caqui demonstrou ser antioxidante em todas as concentrações de ascorbato no meio. Após 5 mM de ascorbato, o dano oxidativo à 2-DR realizado com caqui é minimizado pela presença dos dois antioxidantes, o extrato de caqui e o próprio ascorbato.

O comportamento pró-oxidante do caqui não foi verificado no ensaio da degradação oxidativa da 2-DR. Porém houve uma diminuição do percentual de proteção do extrato de caqui com o aumento da concentração de ascorbato do meio reacional, o que indica que a interferência do ascorbato na atividade antioxidante do caqui ocorre também em meio aquoso (figura 30b).

O quelante PIH também apresentou diminuição de sua ação antioxidante contra degradação oxidativa da 2-DR (mediado por Cu(II) e ascorbato) com o aumento da

concentração do agente redutor no meio reacional. A diminuição do potencial antioxidante foi justificada pela competição entre o PIH e o ascorbato pela formação do complexo com o Cu(II) (Hermes-Lima et al., 2001). No entanto, esse comportamento não deve ser aplicado ao extrato de caqui, uma vez que o mesmo não demonstrou importante atividade antioxidante do tipo quelante (no caso para íons Fe(III)) em meio aquoso.

Para estudar mais o mecanismo de ação do extrato de caqui em altas concentrações de ascorbato, foi realizado um ensaio de EPR que avaliou a formação de radical ascorbil na presença de diferentes concentrações de caqui. Todos os pontos experimentais foram feitos em meio tamponado com 20 mM de tampão fosfato (pH=7,2) e 1 mM de ascorbato.

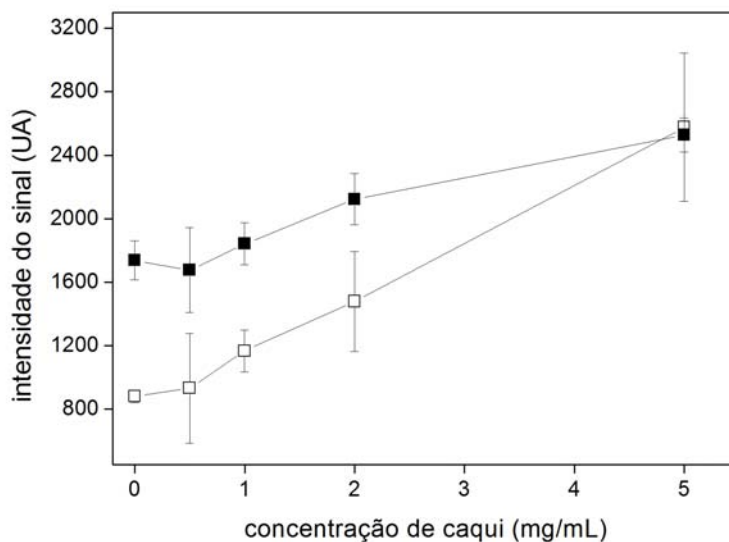
Há geração pequena de radical ascorbil na presença de 20 mM de tampão fosfato que pode ser identificada pela formação do espectro característico de duas linhas do radical ascorbil (ver figura 31 - condição experimental sem adição de caqui e Fe(III)-citrato - e figura 32). A presença de metais contaminantes no tampão fosfato pode estar interferindo na formação de radical ascorbil nesse sistema (Hermes-Lima et al, 1994).

No ensaio realizado sem adição de Fe(III)-citrato, a intensidade do sinal do ascorbil teve aumento proporcional à concentração de extrato de caqui no meio (ver figura 31). Isso indica que o extrato de caqui, por si só, oxida o ascorbato a radical ascorbil e que esta oxidação é dependente da concentração de extrato no meio.

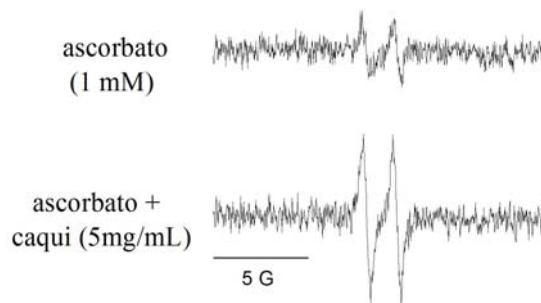
Quando o Fe(III)-citrato (50  $\mu$ M na razão 1:1) se encontra presente no meio reacional, observa-se uma maior formação de radical ascorbil devido a oxidação do ascorbato pelo íon metálico. Novamente, a presença de diferentes concentrações de extrato de caqui nesse sistema promove aumento na intensidade do sinal do radical ascorbil.

É importante ressaltar que o extrato de caqui “sozinho” (sem adição de ascorbato) não produz sinal de radical ascorbil no EPR, o que indica que o aumento oferecido pelo extrato não se deve à presença de ascorbato na fruta. Mesmo adicionando Fe(III)-citrato (50  $\mu$ M) ao meio com maior concentração de extrato de caqui (5 mg/mL) o sinal característico do radical ascorbil não é visualizado.





**Figura 31:** Efeito da concentração do extrato aquoso de caqui na intensidade do sinal do radical ascorbil (em unidades arbitrárias (UA)) detectado no EPR em duas condições: na presença FeIII-Citrato (■) e na ausência de íons férricos adicionados (□). Meio reacional contendo 20 mM de tampão fosfato, 50  $\mu$ M de FeIII-Citrato (1:1) e 1mM de ascorbato. A reação foi iniciada com a adição de ascorbato ao meio reacional e a leitura do espectro foi obtida após 3 minutos de reação. O experimento foi realizado com os caquis nº 4, 6 e 10. Os pontos acima representam a média  $\pm$  SD (n=3).



**Figura 32:** Sinal do radical ascorbil detectado no espectrômetro em duas condições: na presença de 1 mM de ascorbato e 20 mM de tampão fosfato (pH=7,2) (espectro de cima) e com adição de 5 mg/mL de extrato de caqui nesse sistema (espectro de baixo).

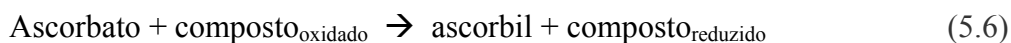
---

### Nota de rodapé 3

Na curva realizada com 50  $\mu$ M de Fe(III)-citrato da figura 31, a intensidade do sinal do radical ascorbil no ponto contendo 5 mg/mL de extrato de caqui foi idêntica ao ponto experimental com a mesma concentração de caqui, porém, sem Fe(III)-citrato. Ao contrário do que foi observado, esperava-se que houvesse maior formação de radical ascorbil no ponto contendo Fe(III)-citrato.

Acredita-se que nessa concentração de caqui não se verifique diferença na intensidade do sinal entre esses dois pontos devido a uma saturação do sinal do equipamento. Portanto, por mais que se tenha maior geração de ascorbil na presença de Fe(III)-citrato, o aparelho não seria capaz de detectar.

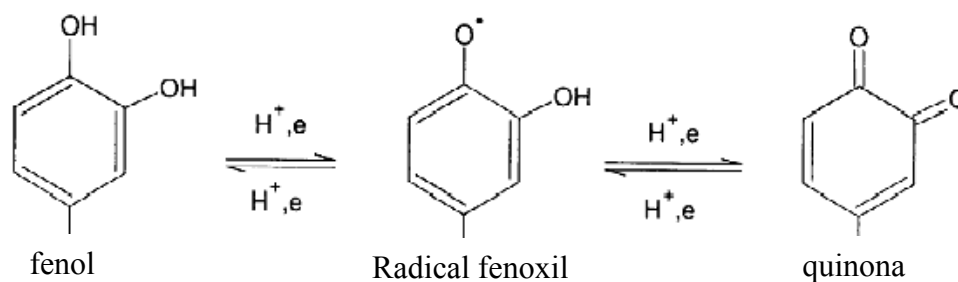
Os três ensaios realizados (figuras 29 a 31), em especial o último feito com a técnica de EPR, sugerem fortemente que compostos presente no caqui oxidem o ascorbato a radical ascorbil (reação 5.6).



Possivelmente, as quinonas presente no extrato de caqui podem está participando dessa reação com o ascorbato. As quinonas correspondem à forma oxidada de polifenóis (vide figura 33). Alguns estudos demonstraram que o ascorbato é capaz de reduzir a quinona ou mesmo o radical fenoxil (produzido por meio da abstração de um elétron do polifenol), o que auxilia na reciclagem do polifenol (Inoue et al., 2006; Dikalov et al., 1993).

Além disso, é possível que o composto reduzido pelo o ascorbato seja capaz de reduzir o Fe(III) formando novamente composto oxidado e Fe(II) (reação 5.7). O Fe(II) formado catalisaria a reação de Haber-Weiss produzindo mais EROs, o que justificaria o efeito pró-oxidante do caqui nesse sistema (reação 5.8). Azam e colaboradores (2004) evidenciaram que os metais na forma oxidada seriam capazes de oxidar polifenóis, resultando na formação de quinonas e na redução do íon metálico. Foi postulado que algumas catequinas apresentam efeito pró-oxidante no DNA devido à formação de quinonas mediado por Cu(II), gerando compostos pró-oxidantes potentes, que levam à quebra do DNA.





**Figura 33:** Formação de quinona a partir de compostos fenólicos (retirado de Fernandez et al., 2002).

Outra explicação plausível que justificaria a formação de radical ascorbil pelo extrato de caqui seria a presença natural de íons metálicos, em especial os de ferro e cobre, na polpa do fruto que oxidariam o ascorbato. Estudo anterior realizado com o caqui do cultivar Triumph mostrou que a polpa desta fruta apresenta, em média, 74  $\mu\text{g}$  de ferro e 6,5  $\mu\text{g}$  de cobre por 100 g de fruta fresca (Gorinstein et al., 2001). Portanto, é possível que quantidades semelhantes desses metais também estejam presentes no extrato de caqui Rama Forte. No entanto, a presença de íons metálicos no extrato de caqui pode ser apenas uma justificativa parcial do efeito pró-oxidante do caqui. Caso a presença de íon metálico fosse a única explicação para o mecanismo pró-oxidante do caqui, o efeito danoso do extrato de caqui deveria ser observado em todos os ensaios, independentemente da concentração de ascorbato no meio reacional.

Portanto, acredita-se que a ação desses compostos oxidados presentes no caqui descrito anteriormente justifique a atividade pró-oxidante do caqui no sistema contendo alta concentra de ascorbato. No entanto, vale ressaltar que tanto a atividade pró-oxidante quanto o mecanismo antioxidante do extrato de caqui podem ocorrer ao mesmo tempo, mas em diferentes compartimentos (aquoso e membranas).

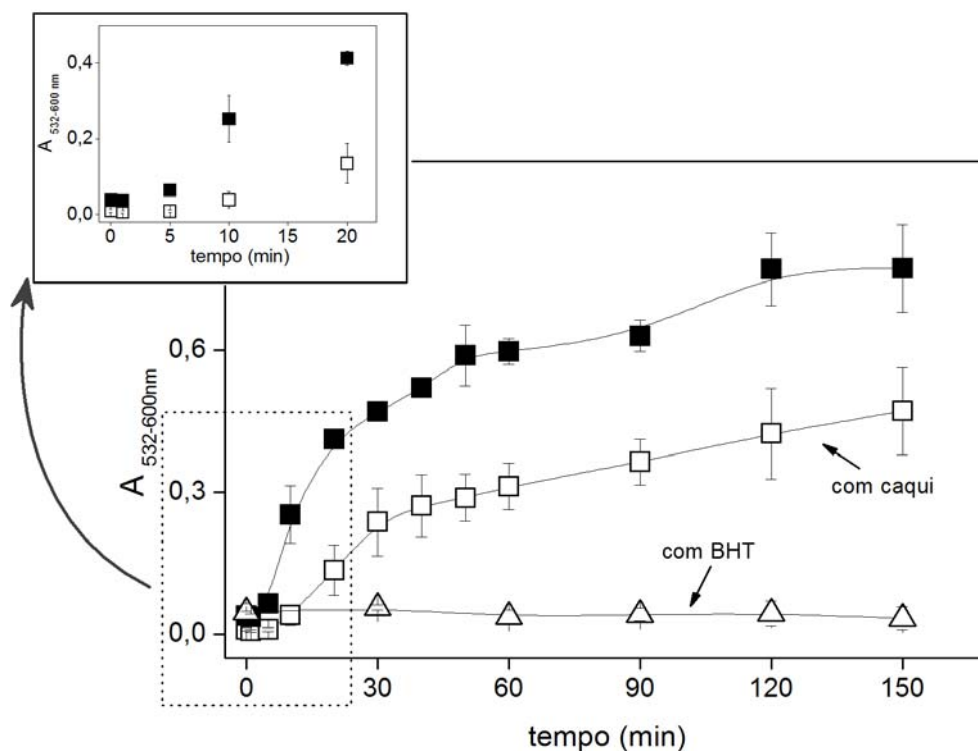
### **5.6 – Atividade antioxidante do extrato aquoso de caqui contra peroxidação lipídica mediada por Fe(III)-citrato e ascorbato.**

O estudo da atividade antioxidante do caqui contra peroxidação lipídica foi realizado com 50  $\mu\text{M}$  de ascorbato e 50  $\mu\text{M}$  de Fe(III)-citrato (razão 1:1). A concentração de 50  $\mu\text{M}$  de ascorbato corresponde ao dano máximo da peroxidação lipídica nesse sistema (ver figura 29 do tópico anterior). Portanto, a escolha dessa concentração de ascorbato favorece a atuação do mecanismo antioxidante do extrato de caqui, uma vez que o ascorbato estaria agindo como redutor do íon metálico (favorecendo a formação de radical hidroxil) e não reduziria os compostos presentes no caqui. Ou seja, essa concentração de ascorbato corresponde à ação pró-oxidante do ascorbato (Hermes-Lima, 2004a) e não à antioxidante.

O efeito da adição do extrato de caqui no curso temporal da peroxidação lipídica foi o primeiro ensaio realizado nesse novo sistema gerador de radicais livres. O resultado desse ensaio se encontra na figura 34. A atividade de 2mg/mL de extrato de caqui foi comparada com 0,1 mM do antioxidante BHT.

A presença de 2 mg/mL de extrato de caqui no meio reacional provocou pequena expansão da fase lag da peroxidação lipídica. O início da propagação da peroxidação lipídica na curva controle (sem extrato ou BHT) foi observado após 5 minutos de reação (ver Figura 34 B). A presença de extrato de caqui no meio reacional dobrou o tempo da fase lag, portanto, atrasando o início da propagação da peroxidação lipídica. Além disso, a velocidade da fase de propagação no ensaio realizado com o extrato de caqui foi mais lenta do que a do controle, sem adição de extrato.

Esse resultado foi semelhante ao encontrado no sistema realizado com Fe(II) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  mostrado anteriormente. Novamente, os dois mecanismos antioxidantes do caqui, sequestrador de radicais livres e quelante de íons metálicos, foram observados no ensaio de peroxidação lipídica mediado por Fe(III)-citrato e ascorbato. A atividade sequestradora de radical peroxil aumentou o tempo da fase lag enquanto que a atividade quelante de íons férricos desacelerou a propagação da reação.



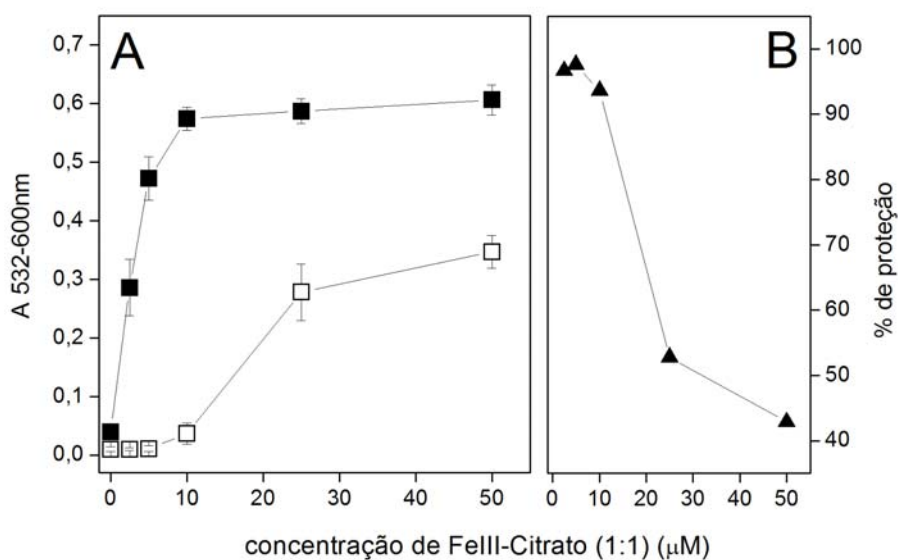
**Figura 34:** Curso temporal da peroxidação lipídica em 3 condições distintas: (■) na ausência de extrato (□), na presença de 2 mg/mL do extrato aquoso de caqui (n° 6 e 13) e (Δ) na presença de 0,1 mM de BHT. O experimento foi realizado em meio reacional contendo tampão HEPES (10 mM), KCl (125 mM), homogenato de fígado de rato (5% do volume reacional), Fe(III)-Citrato (1:1) (50 μM) e ascorbato (50 μM). A reação foi iniciada com a adição de Fe(III)-citrato ao meio reacional. Os pontos acima representam a média ± SD (n=6).

A presença de 0,1 mM de BHT mostrou-se novamente bastante eficiente contra peroxidação lipídica nesse novo sistema gerador de radical hidroxil. Durante todo período analisado não foi observado início da propagação lipídica na curva contendo BHT. A utilização de BHT no ensaio serve como controle interno do método que comprova que o aumento da produção de TBARS no homogenato ocorre devido a produção de EROs pelo sistema Fe(III)-citrato e ascorbato.

A atividade antioxidante do extrato de caqui também foi analisada na presença de diferentes concentrações de Fe(III)-citrato (a razão 1:1 de Fe(III):citrato foi mantida em todos os pontos do ensaio). O tempo de reação nesse novo ensaio foi fixado em 60 minutos.

A intensidade do dano da peroxidação lipídica foi diretamente proporcional à concentração de Fe(III)-citrato presente no meio reacional (ver figura 35a). A partir de 10 μM de Fe(III)-citrato não se verificou alteração na intensidade da peroxidação lipídica após 60 minutos de reação. A presença de 2 mg/mL de extrato aquoso de caqui inibe completamente a peroxidação lipídica mediada por até 5 μM de Fe(III)-citrato. A

partir de 10  $\mu\text{M}$  de Fe(III)-citrato o percentual de proteção do caqui reduz drasticamente atingindo aproximadamente 40% de proteção na presença de 50  $\mu\text{M}$  de íons férricos (figura 35b).

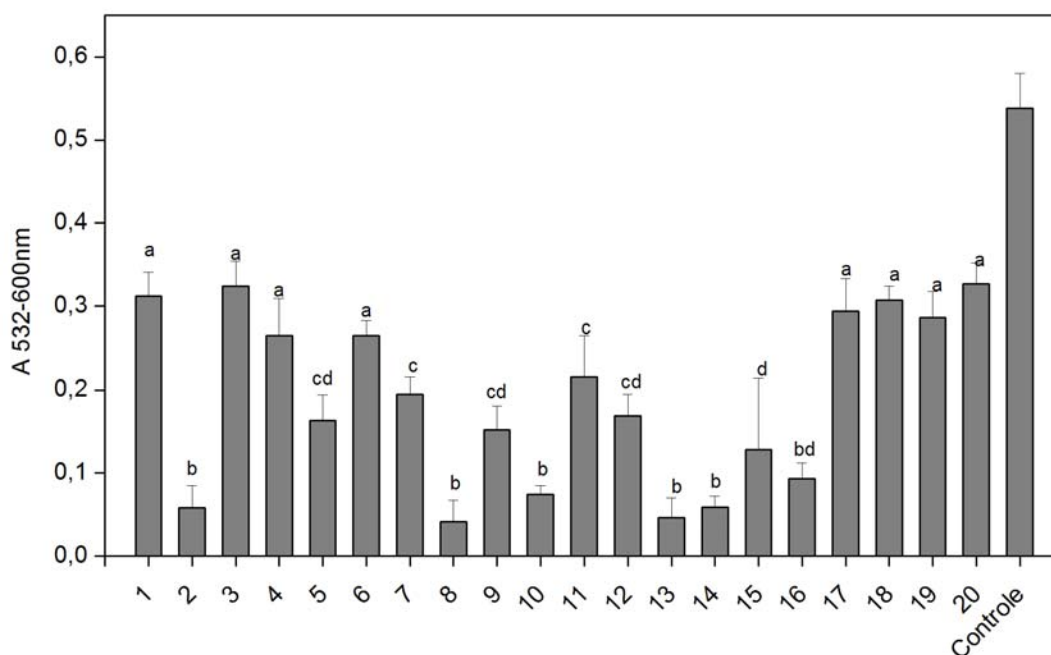


**Figura 35: A)** Efeito da concentração FeIII-Citrato (1:1) na peroxidação lipídica em duas condições distintas: na ausência (■) e na presença de 2mg/mL extrato de caqui (□). Meio reacional contendo 10 mM de tampão hepes, 125 mM de KCl, 5% do volume reacional de homogenato de fígado de rato e 50  $\mu\text{M}$  de ascorbato. A reação foi iniciada com a adição de FeIII-Citrato e o tempo de reação foi de 60 minutos. O experimento foi realizado com os caquis nº 2, 10 e 13. Os pontos acima representam a média  $\pm$  SD (n=5 a 9). **B)** Análise dos dados demonstrando a diminuição do percentual de proteção do caqui com o aumento da concentração de FeIII-Citrato.

A completa inibição da peroxidação lipídica pelo extrato de caqui em baixa concentração de Fe(III) indica a presença de componentes com atividade antioxidante do tipo quelante. A partir de 10  $\mu\text{M}$  de Fe(III), ambos comportamentos antioxidantes do tipo quelante e sequestrador de radicais livres podem estar contribuindo com a redução da peroxidação lipídica.

O próximo ensaio de peroxidação lipídica mediado por Fe(III)-citrato e ascorbato verificou o potencial antioxidante dos 20 caquis selecionados no estudo. Como no ensaio de degradação oxidativa da 2-DR verificou-se diferença entre os caquis selecionados, esse novo ensaio teve como objetivo avaliar se os caquis também apresentam diferença significativa no potencial antioxidante contra a peroxidação lipídica.

O estudo foi realizado em meio contendo 50  $\mu\text{M}$  de Fe(III)-citrato e 50  $\mu\text{M}$  de ascorbato e o tempo de reação foi fixado em 60 minutos. A intensidade da peroxidação lipídica no sistema sem antioxidante (controle) foi comparada com o dano oxidativo na presença 4 mg/mL de extrato de cada caqui individualmente. Os resultados desse estudo foram apresentados no gráfico de barras a seguir (figura 36).

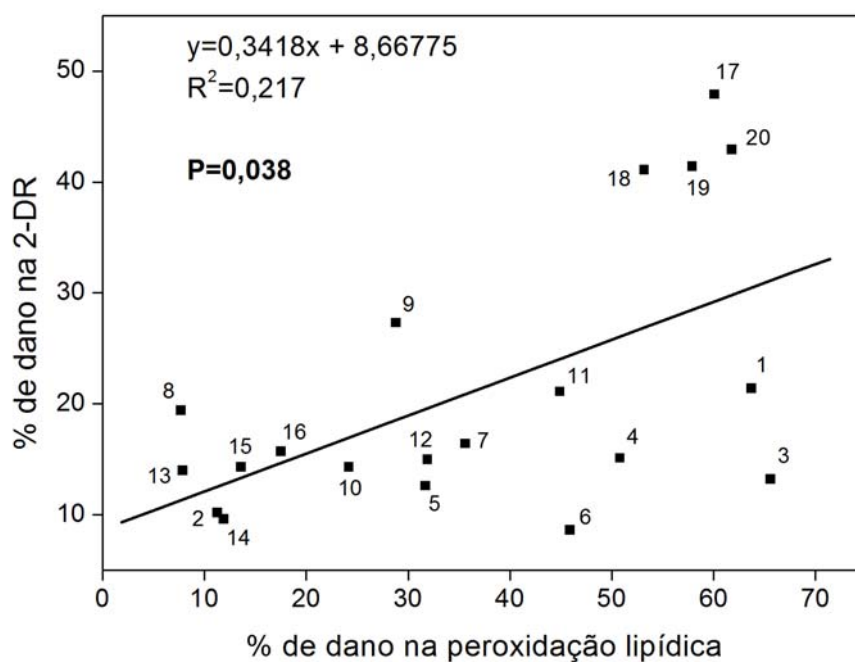


**Figura 36:** Efeito de diferentes extratos aquoso de caqui do tipo Rama Forte na peroxidação lipídica. Meio reacional contendo 10 mM de tampão hepes, 125 mM de KCl, 5% do volume reacional de homogenato de fígado de rato, 50  $\mu\text{M}$  de FeIII-Citrato (1:1), 50  $\mu\text{M}$  de ascorbato e 4 mg/mL extrato de caqui. A reação foi iniciada com a adição de FeIII-Citrato e o tempo de reação foi de 60 minutos. Os pontos acima representam a média  $\pm$  SD (n=6). Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre os extratos de caqui ( $p < 0,05$ ) (ANOVA/SNK).

Os caquis 1, 3, 4, 6 e os caquis 17 a 20 apresentaram intensidade de peroxidação lipídica semelhante e obtiveram pior atividade antioxidante, oferecendo, em média, uma proteção ao homogenato de fígado de rato de 40% contra o dano oxidativo. Os caquis 2, 8, 10, 13, 14 e 16 apresentaram maior potencial antioxidante nesse sistema, inibindo aproximadamente 88% do dano oxidativo mediado por Fe(III)-citrato e ascorbato.

De modo semelhante ao observado no ensaio de degradação oxidativa da 2-DR, os caquis 17 a 20 apresentaram percentual de proteção inferior aos demais caquis avaliados. Por outro lado, os caquis 1, 3, 4 e 6 apresentaram atividade antioxidante significativamente maior em meio hidrofílico, inibindo em média 85% o dano oxidativo

à 2-DR (ver figura 21). Porém apresentaram pequena proteção contra a peroxidação lipídica (vide figura 37). A diferença no potencial antioxidante dos caquis 1, 3, 4 e 6 nos dois sistemas pode está relacionada à oxidação dos compostos antioxidante ao longo do tempo de armazenamento em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Vale ressaltar que os ensaios de peroxidação lipídica foram realizados, aproximadamente, 10-11 meses após a realização dos ensaios de degradação oxidativa da 2-DR. Portanto, para determinar se ocorreu oxidação material liofilizado e congelado, o ensaio de degradação do 2-DR foi repetido com esses 4 caquis. Verificamos que a inibição da degradação da 2-DR pelos extratos dos caquis 1, 3, 4 e 6 foi praticamente idêntica à observada 10-11 meses atrás (dados não mostrados). Isso confirmou que não houve alteração do potencial antioxidante do material durante quase 1 ano de armazenamento. Acredita-se que a diferença no potencial antioxidante desses 4 caquis possa estar está relacionado a uma diferença na quantidade e/ou composição de compostos antioxidantes com caráter lipofílico e hidrofílico presentes no extrato aquoso.



**Figura 37:** Análise da correlação do percentual de dano na 2-DR com o dano à membrana lipídica de fígado de rato de cada extrato de caqui. O gráfico apresenta a regressão linear dos pontos, a equação da reta e o valor de P que indica que há correlação entre o percentual de proteção obtido no dano a 2-DR com o percentual de proteção obtido no ensaio de peroxidação lipídica. A análise de correlação utilizou o teste Kolmogorov-Smirnov para determinar se os resultados obtidos nos ensaios de degradação oxidativa da 2-DR e de peroxidação apresentavam ou não distribuição normal. O teste de Spearman (medida de correlação não-paramétrica) foi escolhido para a análise da correlação, uma vez que o resultado do teste da degradação da 2-DR não possui distribuição normal.



De acordo com a figura 37, observa-se que existe uma correlação positiva e significativa ( $p=0,038$ ) entre os resultados obtidos pelos extratos nos ensaios da degradação oxidativa da 2-DR e da peroxidação lipídica. Isso significa que, de modo geral, quanto maior o efeito antioxidante do caqui no ensaio de degradação da 2-DR, maior será seu efeito na peroxidação lipídica. Essa correlação positiva pode também estar relacionada com a quantidade de antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos que os caquis apresentam. Ou seja, os espécimes de caqui que ofereceram maior atividade antioxidante nos dois sistemas estudados podem apresentar maior quantidade e/ou diferença na composição de ambos antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos.

## 6 - Conclusões capítulo 2

O extrato aquoso de caqui apresentou atividade antioxidante satisfatória, sendo capaz de diminuir a formação do aduto DMPO- $\cdot$ OH e de diminuir significativamente o dano oxidativo à 2-DR mediado por Fe(III)-co-quelante e ascorbato.

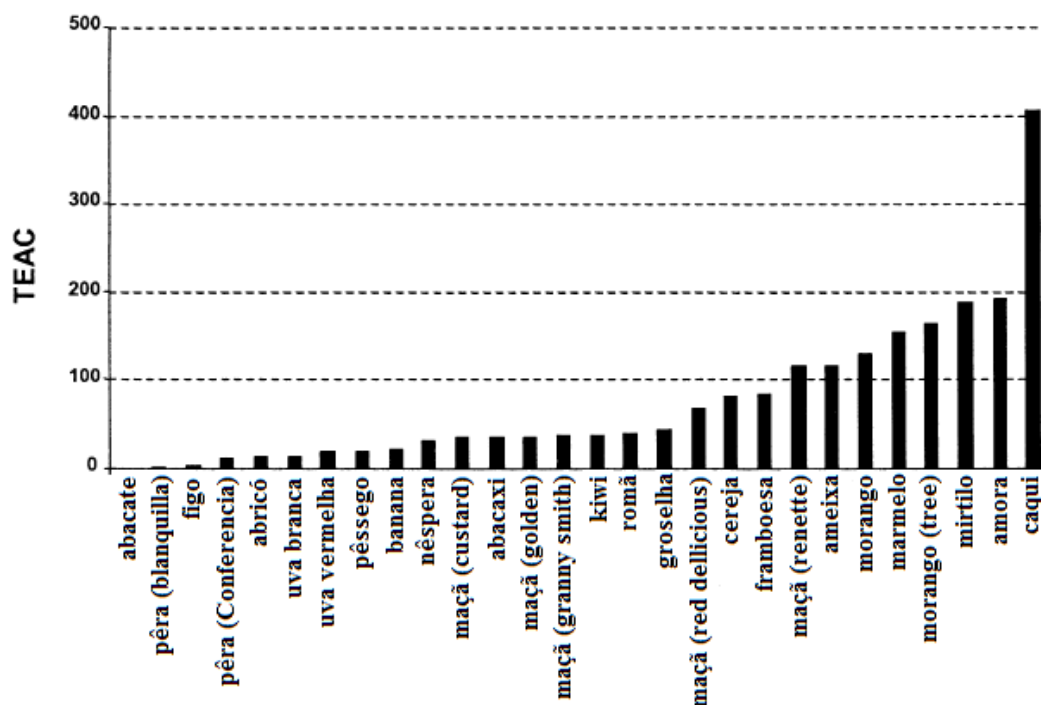
A análise individual dos 20 caquis coletados revelou que existe diferença significativa no potencial antioxidante de cada fruto (vide figuras 21 e 36). Possivelmente a diferença no potencial antioxidante pode estar relacionada com a diferença quantitativa de antioxidantes totais em cada fruto ou com a diferença do tipo de compostos antioxidantes presentes em cada fruto. Estudos de identificação e quantificação desses compostos antioxidantes deverão ser realizados no futuro para melhor esclarecer os comportamentos distintos de cada fruta.

Não se sabe ainda o que estaria provocando esta diferença no potencial antioxidante dos caquis analisados. Sabe-se que o conteúdo de antioxidantes presentes na fruta está relacionado a fatores genéticos e ambientais. Cada vez mais, estudos buscam o desenvolvimento de frutos com qualidade nutricional superior. Já se propõe que aqueles genótipos que apresentarem maiores concentrações de antioxidantes deveriam ser indexados como portadores de qualidade antioxidante (denominado, do inglês, I-QUAN), o que poderia servir como um instrumento de identificação dos melhores genótipos (Frusciante et al., 2007). Além disso, muitos estudos investigam a utilização de novas técnicas agrônômicas que podem aumentar a concentração de antioxidantes em frutos e vegetais. Já foi descrito que o uso de refletores de luz, assim como a salinidade do solo e uso de agrotóxicos, interfere no conteúdo de antioxidantes importantes como vitamina C, carotenóides e polifenóis (Atkinson et al., 2006; Navarro et al., 2006; Carbonaro et al., 2002).

A atividade seqüestradora de radicais livres mostrou ser fundamental para o mecanismo antioxidante do extrato de caqui. Os resultados obtidos nos ensaios de variação da concentração do EDTA e da concentração de 2-DR e no ensaio da variação do tempo de pré-incubação (todos esses realizados na metodologia da degradação oxidativa da 2-DR) indicam que o extrato de caqui não apresenta comportamento quelante em meio completamente aquoso. Portanto, o efeito antioxidante do caqui nesse sistema parece estar associado somente a sua capacidade de seqüestrar radical hidroxil.

Acreditamos que os polifenóis, que correspondem ao principal grupo de compostos com atividade quelante-antioxidante presentes no caqui adstringente, sofreram coagulação durante o processo de destanização e se tornaram insolúveis em meio aquoso. Portanto, a atividade quelante-antioxidante não foi verificada devido à remoção desses polifenóis no extrato aquoso de caqui. Estudos da atividade antioxidante do caqui Rama Forte *in natura*, que não foi submetido ao processo de destanização, deverá ser realizado para confirmar esta hipótese.

A atividade seqüestradora de radicais livres do extrato de caqui já foi demonstrada em diversos estudos (Garsía-Alonso et al., 2004; Katsube et al., 2004; Park et al., 2006). Em um estudo realizado com 28 tipos de frutos (incluindo, além do caqui, maçã, abacaxi, amora, morango, romã, pêra, e outras), o extrato aquoso de caqui demonstrou capacidade antioxidante em suprimir o radical ABTS<sup>+</sup>, sendo mais eficiente do que todos os frutos analisados. De acordo com este estudo, o extrato de caqui apresentou uma capacidade antioxidante no ensaio do ABTS (também chamado de TEAC) equivalente a 406  $\mu\text{mol}$  de Trolox por grama de fruta seca (ver figura 38, retirado de Garsía-Alonso et al., 2004).



**Figura 38:** Capacidade antioxidante de diferentes frutas obtida pelo método de TEAC. Os dados indicam a capacidade antioxidante das frutas em equivalente  $\mu\text{mol}$  de Trolox por grama de peso seco de fruta. Resultado retirado de Garsía-Alonso et al., 2004.

A atividade seqüestradora de radicais livres do caqui também foi verificada no ensaio de peroxidação lipídica. O aumento do tempo da fase lag do curso temporal da peroxidação lipídica causada pela presença de 2 mg/mL (no sistema Fe(III)-citrato e ascorbato) ou 3 mg/mL (na presença de reagentes de Fenton) de extrato aquosos de caqui indica que esta fruta apresenta compostos que possuem mecanismo “*chain breaking*” (Hermes-Lima, 2004a) contra a peroxidação lipídica.

A alta concentração de açúcares, em especial glicose e frutose, presentes no caqui pode interferir na atividade antioxidante dessa fruta. Sabe-se que tanto a glicose quanto a frutose apresentam atividade seqüestradora de radicais livres (Halliwell & Gutteridge, 1999). A constante de reação da glicose, por exemplo, se compara ao do manitol e equivale a  $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Halliwell & Gutteridge, 1999). Além disso, tem sido demonstrado que a frutose teria atividade antioxidante do tipo quelante de íons Fe(III) (Tonkovié, 1994; Valeri et al., 1997). Entretanto não foi verificado em nosso estudo atividade do tipo quelante-antioxidante (do extrato de caqui) em meio totalmente aquoso (nos ensaios de 2-DR). Provavelmente, a ação quelante não foi verificada devido à baixa afinidade da frutose em complexar íon Fe(III) ou mesmo devido à participação do Fe(III) complexado com a frutose em reações de oxi-redução. Além disso, é possível que o próprio complexo frutose-Fe(III) apresente ação seqüestradora de radicais livres.

Não foram encontrados na literatura dados quantitativos de concentração de açúcares presentes no caqui do cultivar Rama Forte. Por isso, os dados presentes nos estudos realizados com os caquis Fuyu e outro da espécie *Diospyros lotus* serão utilizados como parâmetro de comparação (Clark & MacFall, 2003; Glew et al., 2005). De acordo com o estudo de Clark & MacFall (2003), o caqui Fuyu maduro apresenta 600 mg de açúcar por grama de **peso seco**, dividido, aproximadamente, em 55% de glicose (ou 330 mg/g), 40% de frutose (240 mg/g) e 5% de sacarose (30 mg/g). O caqui maduro da espécie *Diospyros lotus* apresenta em média 30 g de glicose e 33 g de frutose por 100 g de **fruta fresca** – ou seja 300 mg/g e 333 mg/g, respectivamente. (Glew et al., 2005).

Considerando que foram utilizados na maioria dos ensaios 2 mg/mL de extrato de liofilizado de caqui (com perda de aproximadamente 50% de água) em 0,5 mL de meio reacional, as concentrações de glicose e frutose em nosso sistema reacional se encontrariam na faixa de 7-13 mM e 5-15 mM, respectivamente. Possivelmente parte da atividade seqüestradora de radicais livres do extrato de caqui se deva à presença desses açúcares em concentrações milimolares no meio reacional.

Por outro lado, quando a glicose e a frutose reagem com EROs (na presença de metais de transição), compostos como aldeídos, são formados podendo exercer ação tóxica em sistemas biológicos (Hermes-Lima, 2004a). Além disso, Lawrence (2008) observou recentemente que o complexo Fe(III)-frutose sofre autooxidação (produz EROs), induzindo peroxidação lipídica em um processo lento (de alguns dias).

Ao contrário do que foi verificado no ensaio da degradação oxidativa da 2-DR, o extrato de caqui apresentou um forte componente de atividade antioxidante do tipo quelante contra a peroxidação lipídica. A atividade quelante foi evidenciada pela diminuição na velocidade de propagação da peroxidação de promovida pelo extrato de caqui.

O estudo da atividade antioxidante da folha e flor da capuchinha (*Tropaeolum majus L.*) verificou que os extratos aquosos dessas partes da planta apresentam uma atividade antioxidante principalmente do tipo quelante, tanto no ensaio da degradação oxidativa da 2-DR (sistema completamente aquoso) quanto na peroxidação lipídica (Bicalho, 2008). A atividade seqüestradora de radicais livres do extrato aquosos da flor e folha foi evidenciada no ensaio da peroxidação lipídica por meio no aumento da fase lag da cadeia de reação.

Como a atividade quelante do extrato de caqui foi observada apenas no ensaio de peroxidação lipídica, acredita-se que os compostos quelantes presentes na polpa do caqui apresentem caráter mais apolar (lipofílicos). Tais compostos lipofílicos (incluindo vários tipos de flavonoides) estariam presentes no extrato de caqui na forma de micelas e seriam capazes de se fundir na bicamada lipídica das membranas do homogenato de fígado de rato (utilizado no ensaio de peroxidação). Estes compostos formariam complexos com os íons ferro, diminuindo a velocidade de formação de hidroperóxidos formados na fase de propagação da peroxidação lipídica (um mecanismo similar foi proposto por Santos e colaboradores, 2001, para o caso do PIH, que tem ação anti-oxidativa em mitocôndrias isoladas). A baixa solubilidade desses compostos quelantes em meio completamente aquoso dificultaria a formação de complexos com íons ferro (com ação antioxidante – vide **Nota de rodapé 4**) o que justificaria a inobservância de atividade quelante no ensaio da degradação da 2-DR.

---

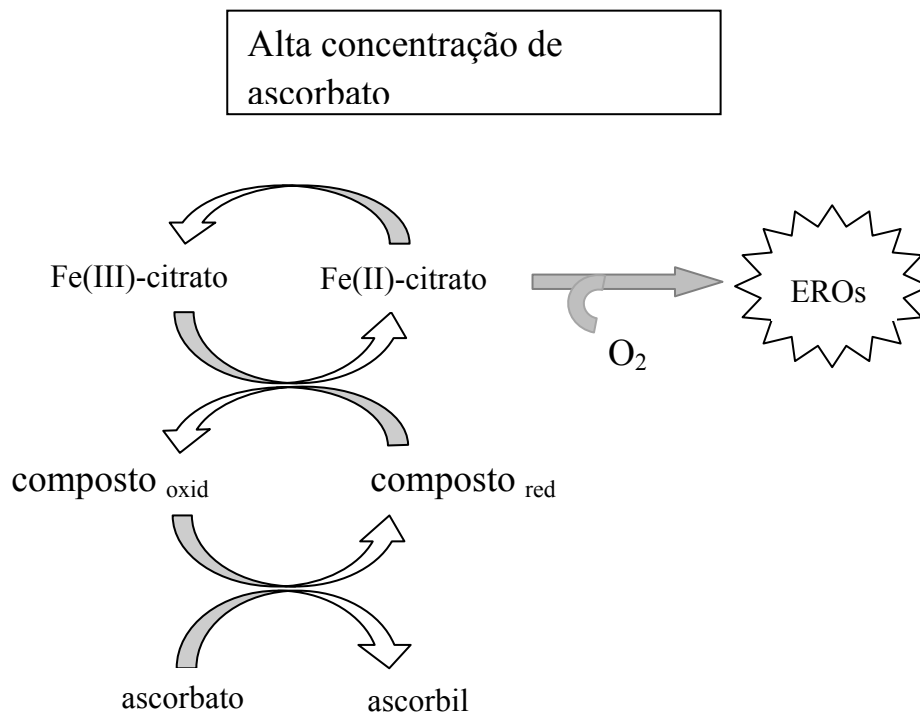
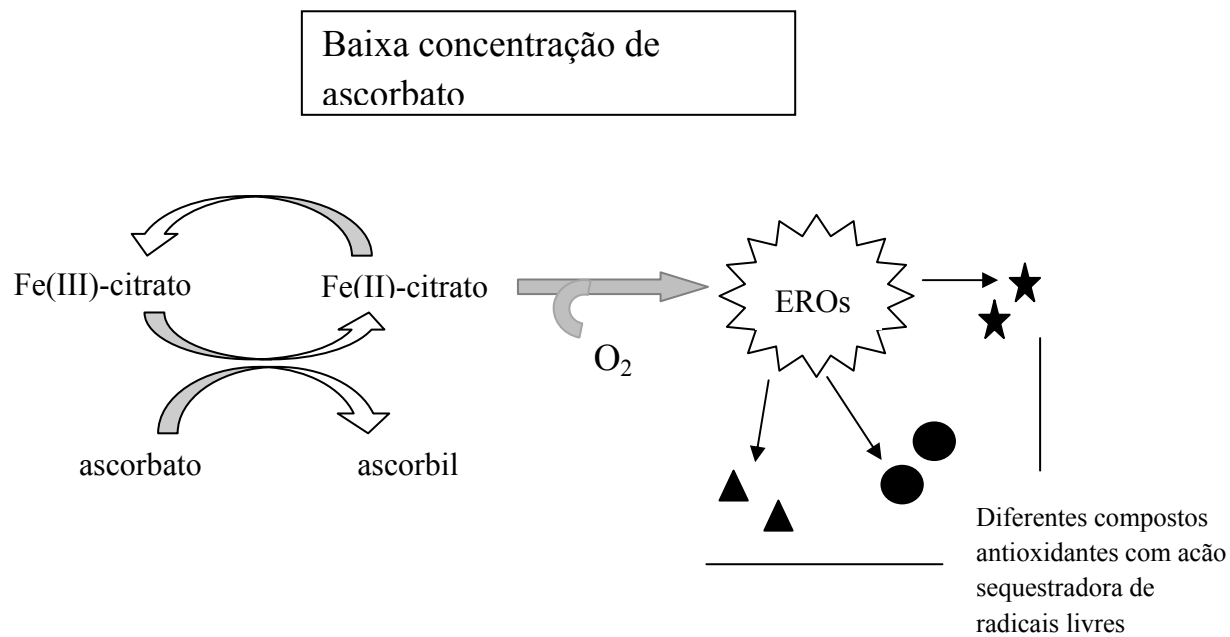
#### **Nota de rodapé 4**

Vários complexos de ferro com flavonoides têm sido mostrados como possuidores de ação anti-oxidativa do tipo quelante (Oshino & Murakami, 1998).

A presença de compostos apolares em extratos aquosos também foi verificada por Bicalho (2008) em seu estudo sobre a atividade antioxidante da flor e folha da capuchinha. De acordo com o estudo, a presença de compostos antioxidantes mais apolares na folha da capuchinha justifica a maior proteção da folha contra peroxidação lipídica quando comparado com a flor, que não apresenta antioxidantes apolares (Bicalho, 2008).

A concentração de ascorbato no meio reacional apresenta interferência primordial na ação do extrato de caqui em processos oxidativos mediado por Fe(III) e ascorbato. Sabe-se que o ascorbato apresenta atividade antioxidante quando se encontra presente no meio reacional em concentrações elevadas. Porém, quando o mesmo é adicionado em concentrações elevadas na presença de extrato de caqui, a atividade antioxidante do ascorbato diminui devido a sua oxidação à radical ascorbil pelos compostos presentes no extrato do caqui. A oxidação do ascorbato por esses compostos presentes no caqui implica na redução dos mesmos.

Estamos propondo que esses compostos - na forma oxidada - seriam capazes de reduzir o Fe(III), disponibilizando Fe(II) para reações produtoras de EROs (ver a seguir).



**Esquema 11:** Proposta do mecanismo pró-oxidante do extrato de caqui em sistema contendo elevadas concentrações de ascorbato.

## 7 - Considerações finais

O estudo do mecanismo antioxidante do ácido elágico *in vitro* auxilia na compreensão das possíveis atividades que este bifenol poderia exercer em sistemas biológicos.

Estudos demonstraram que o AE apresenta ação anticarcinogênica e antimutagênica contra diversos tipos de compostos tóxicos (Akagi et al., 1995; Khanduja et al., 1999; Sudherr et al., 2007). O efeito benéfico do AE *in vivo* é normalmente atribuído a uma modulação de enzimas, em especial citocromo P450 e a GST, relacionadas ao processo de detoxificação de xenobióticos (Ahn et al., 1996; Barch et al., 1994). Além disso, acredita-se que o AE também seja capaz de interagir com os intermediários reativos, gerados durante o processo de detoxificação de xenobióticos, formando adutos inativos (Smith et al., 1998; Szafer et al., 2003).

No entanto, poucos trabalhos estudaram a ação antioxidante do AE na presença de íons metálicos. De acordo com o que foi verificado em nosso estudo, o AE forma um complexo com o cobre diminuindo, dessa forma, os danos oxidativos a biomoléculas.

O AE presente em fontes alimentares é pouco absorvido pelo organismo humano. Trabalhos demonstraram que apenas 0,1  $\mu\text{M}$  de AE foi detectado na corrente sanguínea 1 hora após a ingestão de alimentos fontes contendo 25 mg de AE e 318 mg de elagitaninos (Seeram et al., 2004). A baixa concentração de AE encontrada na corrente sanguínea pode ser explicada devido à metabolização deste bifenol pela microbiota intestinal (Cerdá et al., 2004). Entretanto, nenhum estudo demonstrou a concentração de AE dentro das células. De qualquer forma, a baixa concentração de cobre dentro da célula faz com que concentrações pequenas de AE tenham efeito positivo contra a produção de EROs. Estudos futuros sobre a atividade antioxidante do AE em meio de cultura celular poderão esclarecer melhor a ação do AE em sistema biológico.

Polifenóis com atividade antioxidante semelhante ao do AE podem estar presentes no extrato aquoso de caqui. Além dos polifenóis, o caqui é rico em carotenóides - tais como  $\beta$ -caroteno, criptoxantina, luteína e licopeno - e vitamina C que também possuem atividade antioxidante (Ancos et al., 2000).

O estudo sobre a ação antioxidante do caqui Rama Forte mostrou que o extrato aquoso dessa fruta apresenta componentes com relevante capacidade antioxidante. Entretanto, não se sabe ao certo quais substâncias presentes no extrato estariam



envolvidos nessa ação benéfica contra processos oxidativos. No futuro, a caracterização desses compostos auxiliará na determinação de moléculas antioxidantes presentes nessa fruta.

É importante ressaltar que o caqui apresenta grande quantidade de açúcar, em especial glicose e frutose. Estudos já demonstraram que a quantidade de açúcar presente no caqui corresponde a 60% do peso seco da fruta (Clark & MacFall, 2003). Sendo assim, o consumo de caqui deve ser limitado. Levando em consideração que uma alimentação saudável deve conter 4 a 5 porções diárias de frutas e que o ideal é que haja uma grande variabilidade entre as frutas ingeridas, recomenda-se a ingestão de uma porção de caqui por dia, o que corresponde a uma unidade (com massa equivalente a 110 a 130 g).

## 8 – Referências Bibliográficas

Afanas'ev, I.B.; Ostrakhovitchb, E.A.; Mikhal'chikb, E.V.; Ibragimovab, G.A.; Korkinab, L.G. **Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals.** *Biochem. Pharmacol.* 61: 677-684, 2001.

Ahn, D.; Putt, D.; Kresty, L.; Stoner, G.D.; Fromm, D.; Hollenberg, P.F. **The effects of dietary ellagic acid on rat hepatic and esophageal mucosal cytochromes P450 and phase II enzymes.** *Carcinogenesis* 17 (4): 821-828, 1996.

Andrade Jr, R.G. **Mecanismos de ação antioxidante e pró-oxidante do polifenol ácido tânico na presença de íons cobre.** (2004), Dissertação de Mestrado em Nutrição Humana, UnB, Brasil.

Andrade Jr, R.G.; Dalvi, L.T.; Silva Jr, J.M.C.; Lopes, G.K.B.; Alonso, A; Hermes-Lima, M. **The antioxidant effect of tannic acid on the in vitro copper-mediated formation of free radicals.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 437: 1-9, 2005.

Andrade Jr, R.G.; Ginani, J.S.; Lopes, G.K.B.; Dutra, F.; Alonso, A.; Hermes-Lima, M. **Tannic acid inhibits in vitro iron-dependent free radical formation.** *Biochimie* 88: 1287-1296, 2006.

Andrews, N.C. **Metal transporters and disease.** *Current Opinion in Chemical Biology*, 6:181-186, 2002

Antoniolli, L.R.; Castro, P.R.C; Kluge, R.A.; Scarpate Filho, J.A. **Remoção da adstringência de frutos de caqui “giombo” sob diferentes períodos de exposição ao vapor de álcool etílico.** *Pesq. agropec. bras.*, 35 (10): 2083-2091, 2000.

Aruoma, O.I; Grootveld, M.; Halliwell, B. **The role of iron in ascorbate-dependent deoxyribose degradation. Evidence consistent with a site-specific hydroxyl radical generation caused by iron ions bound to the deoxyribose molecule.** *Journal of Inorganic Biochemistry* 29: 289-299, 1987.

Atkinson, C.J.; Dodds, P.A.A.; Ford, Y.Y.; Le Miére, J.; Taylor, J.M.; Blake, P.S.; Paul, N. **Effects of cultivar, fruit number and reflected photosynthetically active radiation on *Fragaria x ananassa* productivity and fruit ellagic acid and ascorbic acid concentration.** *Annals of Botany* 97: 429-441, 2006.

Augusto, O. **Radicais Livres: Bons, Maus e Naturais.** Oficina de Textos, 2006, 120p.

Awad, M. **Fisiologia pós-colheita de frutos.** São Paulo: Nobel, 1993. 114p.

Ayrton, A.D.; Lewis, D.F.V.; Walker, R.; Ioannides, C. **Antimutagenicity of ellagic acid towards the food mutagen IQ: investigation into possible mechanisms of action.** *Fd Chem. Toxic.*, 30 (4) 289-295, 1992.

Azam, S.; Hadi, N.; Khan, N.U.; Hadi, S.M. **Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties.** *Toxicology in Vitro*, 18: 555–561, 2004.

Barch, D.H.; Rundhaugen, L.M.; Pillay, N.S. **Ellagic acid induces transcription of the rat Glutathione S-Transferase-YA gene.** *Carcinogenesis* 16 (3): 665-668, 1995.

Barch, D.H.; Rundhaugen, L.M.; Stoner, G.D.; Pillay, N.S.; Rosche, W.A. **Structure-function relationships of the dietary anticarcinogen ellagic acid.** *Carcinogenesis* 17 (2): 265-269, 1996.

Barch, D.H.; Rundhaugen, L.M.; Thomas, P.E.; Kardos, P. **Dietary ellagic acid inhibits the enzymatic activity of CYP1A1 without altering hepatic concentrations of CYP1A1 or CYP1A1 mRNA.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* . 201 (3): 1477-82, 1994.

Bate-Smith, E.C. **Detection and determination of ellagitannins.** *Phytochemistry*, 11: 1153-1156, 1972.

Berry, C.E.; Hare, J.M. **Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: Molecular mechanisms and pathophysiological implications.** *J Physiol.*, 555 (3): 589-606, 2004.

Bicalho, J.M. **Estudo da Ação Antioxidante *in Vitro* dos Extratos Alcoólicos das Folhas e das Flores da Capuchinha (*Tropaeolum majus* L.).** 2008. Dissertação de Mestrado em Nutrição Humana, Universidade de Brasília, Brasil.

Bock, P.E.; Srinivasan, K.R.; Shore, J.D. **Activation of intrinsic blood coagulation by ellagic acid: Insoluble ellagic acid-metal ion complexes are the activating species.** *Biochemistry*, 20: 7258-7266, 1981.

Bors, W.; Michel, C.; Stettmaier, K. **Electron paramagnetic resonance studies of radical species of proanthocyanidins and gallate esters.** *Arch. Biochem. Biophys.* 374: 347–355, 2000.

Breen, A.P.; Murphy, J.A. **Reactions of oxyl radicals with DNA.** *Free Radical Biology & Medicine*, 18 (6): 1033-1077, 1995.

Buettner, G.R. & Jurkiewicz, B.A. **The ascorbate free radical as a marker of oxidative stress: an EPR study.** *Free Radic. Biol. Med.*, 14: 49-55, 1993.

Cadenas, E.; Davies, K.J.A. **Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging.** *Free Radical Biology & Medicine*, 29 (3-4): 222–230, 2000.

Cao, G.; Booth, S.L.; Sadowski, J.A.; Prior, R.L. **Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables.** *Am J Clin Nutr*, 68:1081–7, 1998.

Carbonaro, M.; Mattera, M.; Nicoli, S.; Bergamo, P.; Cappelloni, M. **Modulation of Antioxidant Compounds in Organic vs Conventional Fruit (Peach, *Prunus persica* L., and Pear, *Pyrus communis* L.).** *J. Agric. Food Chem.*, 50: 5458-5462, 2002.

Cerdá B, Periago P, Espín JC, Tomás-Barberán FA. **Identification of urolithin A as a metabolite produced by human colon microflora from ellagic acid and related compounds.** *J. Agric. Food Chem.* 53: 5571-5576, 2005.

Cerdá, B.; Espín, J.C.; Parra, S.; Martínez, P.; Tomás-Barberán, F.A. **The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans.** *Eur J Nutr*, 43 : 205–220, 2004.

Cerdá, B.; Llorach, R.; Cerón, J.J.; Espín, J.C.; Tomás-Barberán, F.A. **Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice.** *Eur J Nutr*, 42 : 18–28, 2003.

Chaston, T.B.; Richardson, D.R. **Iron Chelators for the Treatment of Iron Overload Disease: Relationship Between Structure, Redox Activity, and Toxicity.** *Am. J. Hematol.* 73: 200–210, 2003.

Chitarra, M.I.F.; Chitarra, A.B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio.** Lavras: ESAL/FAEPE, 1990. 320 p.

Chung, K.T.; Wong, T.Y.; Wei, C.; Huang, Y.W.; Lin, Y. **Tannins and Human Health: A Review.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(6): 421–464, 1998.

Cirico, T.L.; Omaye, S.T. **Additive or synergetic effects of phenolic compounds on human low density lipoprotein oxidation.** *Food and Chemical Toxicology* 44: 510–516, 2006.

Clark, C.J.; MacFall, J.S. **Quantitative magnetic resonance imaging of ‘Fuyu’ persimmon fruit during development and ripening.** *Magnetic Resonance Imaging*, 21: 679–685, 2003.

Corsato, C.E.; Scarpore Filho, J.A.; Verdial, M.F. **Fenologia do Caquizeiro “Rama Forte” em Clima Tropical.** *Bragantia*, Campinas, 64 (3): 323-329, 2005.

De Freitas, J.M.; Meneghini, R. **Iron and its sensitive balance in the cell.** *Mutation Research* 475: 153–159, 2001.

Dikalov, S.; Alov, P.; Rangelova, D. **Role of iron ion chelation by quinines in their reduction, OH-radical generation and lipid peroxidation.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 195 (1): 113-119, 1993.

Dourado, L.P.S. ; Marin, A.M.F. ; Siqueira, E.M.A.; Arruda, S.F. **Potencial Antioxidante de Frutos do Cerrado in vitro.** In: Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos, 2007, Campinas.

Drewnowski, A.; Gomez-Carneros, C. **Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review.** *Am J Clin Nutr*, 72: 1421-35, 2000.

El Hajji, H.; Nkhili, E.; Tomao, V.; Dangles, O. **Interactions of quercetin with iron and copper ions: Complexation and autoxidation.** *Free Radical Research*. 40 (3): 303-320, 2006.

Fang, Y.Z.; Yang, S.; Wu, G. **Free radicals, antioxidants, and nutrition.** *Nutrition*, 18: 872– 879, 2002.

Fenton HJH. **The oxidation of tartaric acid in presence of iron.** *J Chem Soc Proc* 10: 157–158, 1894.

Ferguson, L.R. **Role of plant polyphenols in genomic stability.** *Mutation Research* 475: 89–111, 2001.

Fernandez, M.T.; Mira, M.L.; Florêncio, M.H.; Jennings, K.R. **Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study.** *Journal of Inorganic Biochemistry* 92: 105–111, 2002.

Fraga, C.G.; Oteiza, P.I. **Iron toxicity and antioxidant nutrients.** *Toxicology* 180: 23-32, 2002.

Franchini M. **Hereditary Iron Overload: Update on Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment.** *American Journal of Hematology* 81: 202–209, 2006.

Frei, B.; Higdon, J.V. **Antioxidant Activity of Tea Polyphenols In Vivo: Evidence from Animal Studies.** *J. Nutr.*, 133: 3275S–3284S, 2003.

Fridovich, I. **Mitochondria: are they the seat of senescence?** *Aging Cell*, 3: 13–16, 2004.

Fridovich, I. **Superoxide radical and superoxide dismutases.** *Annu. Rev. Biochem.* 64: 97-112, 1995.

Frusciante, L.; Carli, P.; Ercolano, M.R.; Pernice, R.; Di Matteo, A.; Fogliano, V.; Pellegrini, N. **Antioxidant nutritional quality of tomato.** *Mol Nutr Food Res.*, 51(5): 609-17, 2007.

Gaetke, L.M.; Chow, C.K. **Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients.** *Toxicology* 189: 147-163, 2003.

García-Alonso, M.; de Pascual-Teresa, S.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.C. **Evaluation of the antioxidant properties of fruits.** *Food Chemistry* 84: 13–18, 2004.

Glew, R.H.; Ayaz, F.A.; Millson, M.; Huang, H.S.; Chuang, L.T.; Sanz, C.; Golding, J.B. **Changes in sugars, acids and fatty acids in naturally parthenocarpic date plum persimmon (*Diospyros lotus* L.) fruit during maturation and ripening.** *Eur Food Res Technol* 221: 113–118, 2005.

Ginani, J. **Estudo da ação antioxidante *in vitro* do polifenol ácido elágico.** 2005. Dissertação de Mestrado em Nutrição Humana, Universidade de Brasília, Brasil.

Giordani, E. **Varietal assortment of persimmon in the countries of the Mediterranean area and genetic improvement.** *First Mediterranean symposium on persimmon.* Zaragoza: CIHEAM-IAMZ, 23-37, 2002.

Gomes, C.S. **Estudos da oxidação de íons ferro e estanho na produção de radicais livres: Efeitos de antioxidantes.** (2005), Dissertação de Mestrado em Química Analítica, UnB, Brasil.

Gondar T.R. **Íon cobalto e estresse oxidativo *in vitro*.** 2005. Dissertação de Mestrado em Nutrição Humana, Universidade de Brasília, Brasil.

Gorinstein, S; Bartnikowska, E; Kulasek, G.W.; Zemser M; Trakhtenberg, S. **Dietary Persimmon Improves Lipid Metabolism in Rats Fed Diets Containing Cholesterol.** *J. Nutr.* 128: 2023-2027, 1998a.

Gorinstein, S.; Kulasek, G.W.; Bartnikowska, E.; Leontowicz, M.; Zemser, M.; Morawiec, M.; Trakhtenberg, S. **The influence of persimmon peel and persimmon pulp on the lipid metabolism and antioxidant activity of rats fed cholesterol.** *J. Nutr. Biochem.* 9: 223–227, 1998b.

Gorinstein, S.; Kulasek, G.W.; Bartnikowska, E.; Leontowicz, M.; Zemser, M.; Morawiec, M.; Trakhtenberg, S. **The effects of diets, supplemented with either whole persimmon or phenol-free persimmon, on rats fed cholesterol.** *Food Chemistry* 70: 303-308, 2000.

Gorinstein, S.; Zachwieja, Z.; Folta, M.; Barton, H.; Piotrowicz, J.; Zemser, M.; Weisz, M.; Trakhtenberg, S.; Martín-Belloso, O. **Comparative Contents of Dietary Fiber, Total Phenolics, and Minerals in Persimmons and Apples.** *J. Agric. Food Chem.*, 49: 952-957, 2001.

Graham, R.M.; Chua, A.C.G.; Herbison, C.E.; Olynyk, J.K.; Trinder, D. **Liver iron transport.** *World J Gastroenterol*, 13(35): 4725-4736, 2007.

Gutteridge, J.M.C. **Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free-radical damage to amino acids and carbohydrates.** *FEBS Letters*, 128 (2): 343-346, 1981.

Häkkinen, S.H.; Kärenlampi, S.O.; Mykkänen, H.M.; Heinonen, I.M.; Törrönen, A.R. **Ellagic acid content in berries: influence of domestic processing and storage.** *Eur Food Res Technol* 212: 75-80, 2000.

Häkkinen, S.H.; Riitta Törrönen A. **Content of flavonols and selected phenolics acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique.** *Food Research International* 33: 517-524, 2000.

Halliwell, B & Gutteridge, JMC. **Free radicals in biology and medicine.** 3.ed. Londres: Oxford Press, 1999.

Halliwell, B. **Antioxidants in Human Health and disease.** *Annu. Rev. Nutr.* 16: 33-50, 1996.

Halliwell, B. **Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health?** *Cardiovascular Research* 73: 341–347, 2007.

Halliwell, B. **Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life.** *Plant Physiology*, 141: 312–322, 2006.

Halliwell, B. **Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates.** *FEBS Letters*. 92 (2): 321-6, 1978.

Handique, J.G.; Baruah, J.B. **Polyphenolic compounds: an overview.** *Reactive & Functional Polymers* 52: 163–188, 2002.

Haslam, E. **Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action.** *J. Nat. Prod.* 59: 205-215, 1996.

Hermes-Lima, M. **Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals.** In: Functional Metabolism: Regulation and adaptation. Cap. 12, pp.319-368, Nova Iorque: John Wiley & Sons, 2004a.

Hermes-Lima, M. **Oxidative stress and medical sciences.** In: Functional Metabolism: Regulation and adaptation. Cap. 13, pp.369-382, Nova Iorque: John Wiley & Sons, 2004b.

Hermes-Lima, M.; Gonçalves, M.S.; Andrade Jr, R.G. **Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) prevents copper-mediated free radical formation.** *Mol. Cell. Biochem.* 228: 73-82, 2001.

Hermes-Lima, M.; Nagy, E.; Ponka, P.; Schulman, H.M. **The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) protects plasmid pUC-18 DNA against  $\cdot\text{OH}$ -mediated strand breaks.** *Free Radical Biology & Medicine*, 25 (8): 875–880, 1998.

Hermes-Lima, M.; Ponka, P.; Schulman, H.M. **The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) and its analogues prevent damage to 2-deoxyribose mediated by ferric iron plus ascorbate.** *Biochim Biophys Acta.* 1523(2-3): 154-160, 2000.

Hermes-Lima, M.; Santos, N.C.; Yan, J.; Andrews, M.; Schulman, H.M.; Ponka, P. **EPR spin trapping and 2-deoxyribose degradation studies of the effect of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) on  $\cdot\text{OH}$  formation by the Fenton reaction.** *Biochim Biophys Acta.* 1426(3): 475-482, 1999.

Hermes-Lima, M.; Willmore, W.; Storey, K.B. **Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on fe(III)xylene orange complex formation.** *Free Radical Biology & Medicine*, 19 (3) 271-280, 1995.

Hertog, M.G.L; Feskens, E.J.M.; Hollman, P.C.H.; Katan, M.B.; Kromhout, D. **Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen elderly study.** *Lancet* 342: 1007-1011, 1993.

Hotta, H.; Nagano, S.; Ueda, M.; Tsujino, Y.; Koyama, J.; Osakai, T. **Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1572: 123–132, 2002.

Huetz, P.; Mavaddat,N.; Mavri, J. **Reaction between Ellagic Acid and an Ultimate Carcinogen.** *J. Chem. Inf. Model.*, 45 (6): 1564-1570, 2005.



Inoue, N.; Akasaka, K.; Arimoto, H.; Ohru H. **Effect of ascorbic acid on the chemiluminescence of polyphenols.** *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70 (6): 1517-1520, 2006.

Jaén, J.A.; González, L.; Vargas, A.; Olave, G. **Gallic acid, ellagic acid and pyrogallol reaction with metallic iron.** *Hyperfine Interactions* 148/149: 227-235, 2003.

Kato, K. **Conditions for tanning and sugar extraction, the relationship of tannin concentration to astringency and the behaviour of ethanol during the removal of astringency by ethanol in persimmon fruits.** *Japanese Society for Horticultural Science Journal*, Tokyo, 53 (2): 127-134, 1984.

Katsube, T.; Tabata, H.; Ohta Y.; Yamasaki, Y.; Anuurad, E.; Shiwaku, K.; Yamane, Y. **Screening for antioxidant activity in edible plant products: Comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and folin-ciocalteu assay.** *J. Agric. Food Chem.*, 52: 2391-2396, 2004.

Kaur, C.; Kapoor, H.C. **Antioxidants in fruits and vegetables.** *International Journal of Food Science and Technology*, 36: 703-725, 2001

Khanduja, K.L.; Gandhi, R.K.; Pathania, V.; Syal, N. **Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice.** *Food and Chemical Toxicology* 37: 313-318, 1999.

Khokhar, S.; Owusu Apenten, R.K. **Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure–activity relations.** *Food Chemistry* 81: 133–140, 2003.

Kim, B.E.; Nevitt, T.; Thiele, D.J. **Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation.** *Nature Chemical Biology*, 4 (3): 176-185, 2008.

Klaassen C. D. **Heavy Metals and Heavy-metals Antagonists.** In. Hardman. J. G.; Limbird L. E.; Molinoff P. B.; Ruddon R. W. (Eds) GOODMAN & GILMAN'S. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9<sup>a</sup> ed. pp. 1649-1672, 1996.

Kuroda, Y.; Hara, Y. **Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols.** *Mutation Research* 436: 69–97, 1999.

Lawrence, G.D.; Mavi, A.; Meral K. **Promotion by phosphate of Fe(III)- and Cu(II)-catalyzed autoxidation of fructose.** *Carbohydrate Research* 343: 626–635, 2008.

Lei, F.; Xing, D.M.; Xiang, L.; Zhao, Y.N.; Wang, W.; Zhang, L.J.; Du, L.J. **Pharmacokinetic study of ellagic acid in rat after oral administration of pomegranate leaf extract.** *Journal of Chromatography B*, 796: 189–194, 2003.

Liochev, S.I.; Fridovich, I. **The Haber-Weiss cycle – 70 years later: an alternative view.** *Redox Report*, 7(1): 55-57, 2002.

Liu, C.; Zhou, J.; Li, Q.; Wang, L.; Liao, Z.; Xu, H. **DNA damage by copper(II) complexes: coordination-structural dependence of reactivities.** *Journal of Inorganic Biochemistry*, 75: 233–240, 1999.

Lloyd, D.R.; Phillips, D.H. **Oxidative DNA damage mediated by copper(II), iron(II) and nickel(II) Fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links.** *Mutation Research*, 424: 23–36, 1999.

Loarca-Pina, G.; Kuzmicky, P.A.; De Mejia, E.G.; Kado, N.Y. **Inhibitory effects of ellagic acid on the direct-acting mutagenicity of aflatoxin B1 in the Salmonella microsuspension assay.** *Mutat. Res.* 398(1–2), 183–187, 1998.

Lopes, G.K.B.; Schulman, H.M.; Hermes-Lima, M. **Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions.** *Biochem.and Biophys Acta.* 1472: 142-152, 1999.

Lotito, S.B.; Frei, B. **Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon?** *Free Radical Biology & Medicine* 41: 1727-1746, 2006.

Majid, S.; Khanduja, K.L.; Gandhi, R.K.; Kapur, S.; Sharma, R.R. **Influence of ellagic acid on antioxidant defense system and lipid peroxidation in mice.** *Biochemical Pharmacology*, 42(7): 1441-1445, 1991.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. **Polyphenols: food sources and bioavailability.** *Am J Nutr.*79: 727-47, 2004.

Marnett, L.J. **Oxyradicals and DNA damage.** *Carcinogenesis*, 21 (3): 361-370, 2000.

Martins, F.P.; Pereira, F.M. **Cultura do Caquizeiro.** Jaboticabal, FUNEP, 1989.

Maurício, A.Q.; Lopes, G.K.B.; Gomes, C.S.; Oliveira, R.G.; Alonso, A.; Hermes-Lima, M. **Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone inhibits iron-induced ascorbate oxidation and ascorbyl radical formation.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1620: 15–24, 2003.

McCord, J.M.; Day, E.D.J. **Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex.** *FEBS Letters*, 86 (1): 139-142, 1978.

McKay, L.D.; Blumberg, J.B. **The Role of Tea in Human Health: An Update.** *Journal of the American College of Nutrition*, 21(1): 1-13, 2002.

Melin, A.M.; Peuchant, E.; Perromat, A.; Clerc, M. **In vitro influence of ascorbate on lipid peroxidation in rat testis and heart microsomes.** *Mol Cell Biochem* 169: 171-176, 1997.

Meneghini, R. **Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage.** *Free Radical Biology & Medicine*, 23 (5): 783-792, 1997.

Meyer, A.S.; Heinonen, M.; Frankel E.N. **Antioxidant interactions of catechin, cyaniding, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation.** *Food Chemistry*, 61 (1-2): 71-75, 1998.

Michels, K.B.; Giovannucci, E.; Chan, A.T.; Singhanian, R.; Fuchs, C.S.; Willett, W.C. **Fruit and vegetable consumption and colorectal adenomas in the Nurses' Health Study.** *Cancer Res.* 1; 66(7): 3942-53, 2006.

Mira, L. Fernandez, M.T.; Santos, M.; Rocha, R.; Florêncio, M.H.; Jennings, K.R. **Interactions of flavonoids with iron and copper ions: A mechanism for their antioxidant activity.** *Free Radical Research.* 36 (11) 1199-1208, 2002.

Moreira P.I. et al. **Nucleic acid oxidation in Alzheimer disease.** *Free Radical Biology & Medicine* 44: 1493-1505, 2008.

Moridani, M.Y.; Pourahmad, J.; Siraki, H.B.A., O'Brien, P.J. **Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers.** *Free Radic. Biol. Med.* 34: 243-253, 2003.

Muñoz, V.R.S. **Destanização do caqui (*Diospyrus kaki* L.) 'Rama Forte'.** 2002. Tese de doutorado em Engenharia Agrícola. Universidade Estadual de Campinas. Brasil.

Navarro, J.M.; Flores, P.; Garrido, C.; Martinez, V. **Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity.** *Food Chemistry*, 96: 66-73, 2006.

Nishino, T.; Okamoto, K. **The role of the [2Fe-2S] cluster centers in xanthine oxidoreductase.** *Journal of Inorganic Biochemistry*, 82: 43-49, 2000.

Oikawa, S.; Kawanishi, S. **Distinct mechanisms of site-specific DNA damage induced by endogenous reductants in the presence of iron(III) and copper(II).** *Biochimica et Biophysica Acta* 1399: 19-30, 1998.

Park, Y.-S.; Jung, S.-T.; Kang, S.-G.; Delgado-Licon, E.; Ayala, A.L.M.; Tapia, M.S.; Martín-Belloso, O.; Trakhtenberg, S.; Gorinstein, S. **Drying of persimmons (*Diospyros kaki* L.) and the following changes in the studied bioactive compounds and the total radical scavenging activities.** *LWT*, 39: 748–755, 2006.

Prior, R.L. **Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage.** *Am J Clin Nutr* 78(suppl):570S–8S, 2003.

Priyadarsini, K.I.; Khopde, S.M.; Kumar, S.S.; Mohan, H. **Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant.** *J Agric. Food Chem.*, 50: 2200-2206, 2002.

Przewloka, S.R.; Shearer, B.J. **The further chemistry of ellagic acid II. Ellagic acid and water-soluble ellagates as metal precipitants.** *Holzforchung*, 56: 13-19, 2002.

Rao, A.V.; Rao, L.G. **Carotenoids and human health.** *Pharmacological Research* 55: 207–216, 2007.

Roberto G. Andrade Jr ; Luana T. Dalvi ; Marcelo Hermes-Lima. **Effects of Tannic Acid in copper-mediated free radical reactions.** In: XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2004, Caxambú. Programa e Resumos da XXXIII Reunião Anual, 2004, p83, pôster T.24

Savin, T.Z.; Balmori, Y.S. **Daño a Lípidos.** In: Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. México: Editorial El Manual Moderno, 2008. pp135-146.

Scalbert, A.; Morand, C.; Manach, C.; Rémésy, C. **Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health.** *Biomed Pharmacother* 56: 276–282, 2002.

Seeram, N.P.; Lee, R.; Heber, D. **Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice.** *Clinica Chimica Acta* 348: 63–68, 2004.

Siah C.W.; Trinder, D.; Olynyk, J.K. **Iron overload.** *Clinica Chimica Acta* 358: 24–36, 2005.

Siebert, K.J.; Chassy, A.W. **An alternate mechanism for the astringent sensation of acids.** *Food Quality and Preference* 15: 13–18, 2003.

Smith WA, Arif JM, Gupta RC. **Effect of cancer chemopreventive agents on microsome-mediated DNA adduction of the breast carcinogen dibenzo[a,l]pyrene.** *Mutation Research* 412: 307-314, 1998.

Stohs, S.J.; Bagchi, D. **Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions.** *Free Radical Biology & Medicine*, 18 (2): 321-336, 1995.

Strausak, D.; Mercer, J.F.B.; Dieter, H.H.; Stremmel, W.; Multhaup, G. **Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases.** *Brain Research Bulletin*, 55 (2): 175–185, 2001.

Sudheer, A.R.; Muthukumar, S.; Devipriya, N.; Menon, V.P. **Ellagic acid, a natural polyphenol protects rat peripheral blood lymphocytes against nicotine-induced cellular and DNA damage in vitro: With the comparison of N-acetylcysteine.** *Toxicology* 230: 11–21, 2007.

Suzuki, T.; Someya, S.; Hu, F.; Tanokura, M. **Comparative study of catechin compositions in five Japanese persimmons (*Diospyros kaki*).** *Food Chemistry*. 93: 149–152, 2005.

Szaefer, H.; Jodynys-Liebert, J.; Cichocki, M.; Matuszewska, A.; Baer-Dubowska, W. **Effect of naturally occurring plant phenolics on the induction of drug metabolizing enzymes by o-toluidine.** *Toxicology* 186: 67-77, 2003.

Taiz, L.; Zeiger, E. **Secondary Metabolites and Plant Defense.** In: *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc. 3<sup>rd</sup> ed, 2002, pp 283-308.

Takagi, A.; Sai, K.; Umemura, T.; Hasegawa, R.; Kurokawa, Y. **Inhibitory effects of vitamin E and ellagic acid on 8-hydroxy-deoxyguanosine formation in liver nuclear DNA of rats treated with 2-nitropropane.** *Cancer Letters* 91: 139-144, 1995.

Tapiero, H.; Tew, K.D.; Nguyen, B.G.; Mathé, G. **Polyphenols: do they a role in the prevention of human pathologies?** *Biomed. Pharmacother.* 56: 200-207, 2002.

Teel, R.W. **Distribution and metabolism of ellagic acid in the mouse following intraperitoneal administration.** *Cancer Letters*, 34: 165-171, 1987.

Teel, R.W. **Ellagic acid binding to DNA as a possible mechanism for its antimutagenic and anticarcinogenic action.** *Cancer Letters*, 30: 329-336, 1986.

Theophanides, T.; Anastassopoulou, J. **Copper and carcinogenesis.** *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 42: 57–64, 2002.

Thulstrup, P. W.; Thormann, T.; Spanget Larson, J.; Bisgaard, H. C. **Interaction between ellagic acid and calf thymus DNA studied with flow linear dichroism UV-VIS spectroscopy.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265: 416-421, 1999.

Tobias, M.; Turley, M.; Stefanogiannis, N.; Vander Hoorn, S.; Lawes, C.; Mhurchu, C.N.; Rodgers, A. **Vegetable and fruit intake and mortality from chronic disease in New Zealand.** *Aust N Z J Public Health.* 30(1): 26-31, 2006.

Toivonen, P.M.A.; Brummell, D.A. **Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables.** *Postharvest Biology and Technology* 48: 1–14, 2008.

Tonković, M. **New approach to the complexation of iron(III) with fructose.** *Carbohydrate Research*, 254: 277-280, 1994.

Toyokuni, S.; Sagripanti, J.L. **Association between 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation and DNA strand breaks mediated by copper and iron.** *Free Radical Biology & Medicine*, 20 (6): 859-864, 1996.

Valeri, F.; Boess, F.; Wolf, A.; Goldlin, C.; Boelsterli, U.A. **Fructose and tagatose protect against oxidative cell injury by iron chelation.** *Free Radical Biology & Medicine*, 22(1/2): 257-268, 1997.

Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, A.; Cronin, M.T.D.; Mazur, M.; Telser, J. **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39: 44–84, 2007.

Vattem, D.A.; Shetty, K. **Biological functionality of ellagic acid: A review.** *Journal of Food Biochemistry* 29 (3): 234-266, 2005.

Vayalil, P.K. **Antioxidant and Antimutagenic Properties of Aqueous Extract of Date Fruit (*Phoenix dactylifera* L. Arecaceae).** *J. Agric. Food Chem.*, 50: 610-617, 2002.

Wei, Q.Y.; Zhou, B.; Cai, Y.J.; Yang, L.; Liu, Z.L. **Synergistic effect of green tea polyphenols with trolox on free radical-induced oxidative DNA damage.** *Food Chemistry* 96: 90–95, 2006.

WHO/FAO. **Diet, Nutrition and the prevention of chronic diseases.** Geneva.2003.

Wünsch Filho, V.; Gattás, G.J.F. **Biomarcadores moleculares em câncer: implicações para a pesquisa epidemiológica e a saúde pública.** *Cad. Saúde Pública*, 17(3): 467-480, 2001.

Yoshino, M.; Haneda, M.; Naruse, M.; Murakami, K. **Prooxidant Activity of Flavonoids: Copper-Dependent Strand Breaks and the Formation of 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine in DNA.** *Mol Genet Metab.* 68: 468-472, 1999.

Yoshino, M.; Hanedaa, M.; Naruseb, M.; Htaya, H.H.; Iwataa, S.; Tsubouchia, R.; Murakamia, K. **Prooxidant action of gallic acid compounds: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-20-deoxyguanosine in DNA.** *Toxicol In Vitro.* 16: 705-709, 2002.

Zafrilla, P.; Ferreres, F.; Tomas-Barberan, F. A. **Effect of processing and storage on antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of raspberry (*Rubus idaeus*) jams.** *J. Agric. Food Chem.*, 49: 3651-3655, 2001.

Zalomaeva, O.V.; Trukhan, N.N.; Ivanchikova, I.D.; Panchenko, A.A.; Roduner, E.; Talsi, E.P. Sorokin, A.B.; Rogov, V.A.; Kholdeeva, O.A. **EPR study on the mechanism of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-based oxidation of alkylphenols over titanium single-site catalysts.** *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 277: 185–192, 2007.

Zangar, R.C.; Davydov, D.R.; Verma, S. **Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450.** *Toxicology and Applied Pharmacology* 199: 316–331, 2004.