

Universidade de Brasília – UnB
Departamento de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Estudo comparativo da ação antioxidante dos ácidos cafeico e
clorogênico em sistemas modelo *in vitro*

Aluno: Marcos Bürger de Mendonça
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Hermes-Lima

Brasília – DF
Fevereiro - 2012

Universidade de Brasília – UnB
Departamento de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Estudo comparativo da ação antioxidante dos ácidos cafeico e
clorogênico em sistemas modelo *in vitro*

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

Aluno: Marcos Bürger de Mendonça
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Hermes-Lima

Brasília – DF
Fevereiro - 2012

Folha de aprovação

Aos meus pais Fátima e Moacir, que me ajudaram e apoiaram ao longo dessa jornada, aos meus irmãos e a tia Marilene.

Agradecimentos:

A meus pais, por sempre terem acreditado em meus ideais e proporcionado à realização deste trabalho;

Ao professor Dr. Marcelo Hermes, pelo tempo dedicado à orientação, por todos os ensinamentos científicos e morais além da confiança despendida quando necessário;

Aos demais amigos do Grupo de Pesquisa em Radicais Livres (GPRO): Alexis, André, Carol, Daniel, Isis, Luana, Marcus Aurélio, Marlize, Rafaella, Roberto, Rodolfo, Tais, Yasmim, que fazem do laboratório um ambiente de trabalho único e especial;

Ao Roberto e Leonardo pelas várias discussões sobre ciência que muito acrescentaram a este trabalho;

Aos dois dos integrantes do “trio maravilha”, Marlize Cravo e Rafaella Franco, nem sei o que dizer para agradecer a diversão e a confusão;

Aos amigos Izabel, Adriane, Leonardo e Caliandra pelas conversas, idas ao cinema, pelos sushis e hot roll e pelas pizzas;

A meus familiares, em especial aos meus irmãos e a tia Marilene, que mesmo com dificuldades em compreender o verdadeiro significado deste trabalho, sempre me incentivaram a seguir em frente;

Ao professor Dr. Antônio Alonso por me receber em seu laboratório e pela colaboração nos experimentos de EPR; Agradeço também a sua equipe, em especial ao Sebastião por todo o suporte fornecido durante minha estada em Goiânia;

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

Ao professor Dr. Edivaldo e a sua equipe em especial a Paula e ao Gilvan pelo todo apoio no uso do espectramax;

Aos professores da banca por terem aceitado o convite, espero aprender e melhorar com as suas críticas;

A todos os amigos que criei nesses últimos anos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

A todos os #Tweetersrunners, meu muito obrigado;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado;

A CAPES, CNPq, FAP-DF, INCT-Redoxoma por viabilizar os projetos de pesquisa desenvolvidos pelo Grupo de Pesquisa em Radicais Livres (GPRO).

"Se quiser triunfar na vida, faça da perseverança, a sua melhor amiga; da experiência, o seu sábio conselheiro; da prudência, o seu irmão mais velho; e da esperança, o seu anjo guardião".
(Joseph Addison)

Resumo

Estudo comparativo da ação antioxidante dos ácidos cafeico e clorogênico em sistemas modelo

A principal fonte de ácidos clorogênicos na dieta ocidental é o café. No entanto, algumas outras bebidas de consumo regional, como o chimarrão constituem as principais fontes dietéticas desses compostos na dieta. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade antioxidante dos ácidos cafeico (CAF) e clorogênico (CLA - ácido 5-O-cafeoilquínico) em sistemas modelo in vitro, sendo este dividido em três capítulos. No primeiro, investigamos o mecanismo antioxidante do CAF contra formação de oxirradicais (utilizando 2-desoxirribose como detector) em sistemas contendo Fe^{III} -EDTA (ou Fe^{III} -citrato) e ascorbato. No segundo capítulo foi examinado o mecanismo antioxidante do CAF e CLA contra formação de oxirradicais em sistemas contendo íons Cu^{2+} e ascorbato. No terceiro capítulo de resultados, foi avaliado – por meio de ressonância paramagnética eletrônica - o potencial anti-peroxidante do CAF e CLA em sistema lipofílico na presença de um azo composto hidrossolúvel 2'-2'-azobis 2-amidino propano hidrocloreto (AAPH). No primeiro capítulo, verificou-se que o CAF apresentou uma reduzida capacidade antioxidante em todos os métodos e condições testadas. Os resultados – analisados de uma forma global - também sugeriram que a atividade antioxidante do CAF se deve a sua habilidade de remover íons Fe^{2+} do EDTA ou citrato, formando um complexo com o CAF que inibe a sequência de reações que leva a formação de oxirradicais. No segundo capítulo, os resultados mostraram que em sistemas aquosos, no qual se tem a 2-desoxirribose e o ácido tereftálico como alvo radicalar, tanto o CAF como o CLA apresentam comportamento híbrido de ação antioxidante, atuando tanto como complexantes de Cu^{2+} como sequestradores de radicais hidroxil. Analisamos também a ação do CAF e CLA por meio experimentos de ressonância paramagnética eletrônica para verificar a formação de radical ascorbila mediados por Fe^{III} -EDTA e Cu^{2+} . Os resultados obtidos demonstraram que tanto o CAF e CLA não interferem na formação de radicais ascorbila. No terceiro capítulo os ensaios de peroxidação lipídica em membranas de eritrócitos demonstraram que tanto o CAF como o CLA apresentaram atividade antioxidante equiparando-se a antioxidantes apolares como o butil-hidroxi-anisol (BHA) e o butil-hidroxi-tolueno (BHT). Os resultados expostos neste trabalho demonstram que o CAF e CLA possuem pequena capacidade antioxidante em sistemas aquosos. Além disso, dependendo do metal utilizado para catalisar a formação de oxirradicais, os compostos apresentaram diferentes mecanismos antioxidantes – seja quelante e/ou seqüestrador de hidroxil. Em sistemas lipofílicos, o CFA e CLA se equiparam a potentes antioxidantes lipofílicos (BHT e BHA). Os resultados desse trabalho ajudaram a entender mais os mecanismos antioxidantes do CAF e CLA em sistemas modelo. Tais resultados não podem ser ainda aplicados para condições in vivo e não servem de recomendação (ou não) para o uso do café como fonte de antioxidantes funcionais para o ser humano.

Palavras-chave: Compostos fenólicos, metais de transição, antioxidantes, radicais livres, peroxidação lipídica.

Abstract

Comparative study of the antioxidant mechanisms of caffeic and chlorogenic acids in model systems.

The main source of chlorogenic acids in occidental diet is coffee. Although, others beverages of regional consume, as the mate (chimarrão), are also main dietetic sources of these diet compounds. The objective of this research is to evaluate the antioxidant capacity of caffeic acid (CAF) and chlorogenic acid (5-O-caffeoylquinic acid - CLA) in "in vitro" systems models, which was divided in three chapters. Firstly, we investigated the CAF antioxidant mechanism against oxyradical formation (using 2-deoxyribose as detector) mediated by Fe^{III}-EDTA (or Fe^{III} -citrate) and ascorbate. In the second chapter, it was examined the antioxidant mechanism of CFA and CLA and CFA against the oxyradical formation in systems containing Cu²⁺ ions and ascorbate. And finally, in the last chapter of results, it was studied – by electronic paramagnetic resonance (EPR) – the anti-peroxidation potential of CLA and CFA in a lipophilic system under the action of a free radical generator, the hydrosoluble compound 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH). In the first chapter, it was verified that CAF showed a reduced antioxidant capacity in all conditions. The results – analyzed in a global form – also suggested that the antioxidant activity of CAF is related to its ability of removing Fe²⁺ from EDTA or citrate (and not ferric ions), forming a complex with CAF that inhibits the sequence of reaction leading to hydroxyl radical formation. In the second chapter the results showed that in aqueous media having 2-deoxyribose and terephthalic acid as radical targets, both CAF and CLA have a hybrid antioxidant behavior, acting both as Cu²⁺ chelators and hydroxyl scavengers. We also analyzed (in chapters 1 and 2) the effect of CAF and CLA (by EPR) on the formation of ascorbyl radical mediated by Fe^{III}-EDTA and Cu²⁺. Both compounds had no effect on the rate of ascorbyl formation. In the lipid peroxidation assay in erythrocyte membranes (chapter 3) we observed that both CAF and CLA presented potent antioxidant activity, similar to hydrophobic antioxidants butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT). In conclusion, our results indicated that CAF and CLA have limited antioxidant capacity in aqueous systems. Moreover, depending on the metal utilized to catalyze oxyradical formation, the compounds presented distinct antioxidant mechanisms: metal chelating activity and/or hydroxyl scavengers. In opposition to aqueous systems, in lipophilic systems CLA and CFA showed high antioxidant potentials. The results from this research have contributed to understand more about the antioxidant mechanisms of CAF and CLA in "in vitro" systems. These results, however, cannot be applied for "in vivo" conditions and also cannot be used as recommendation for coffee use as source of potentially functional antioxidants for humans.

Key-words: Phenolic compounds, transition metals, antioxidants, free radicals, lipid peroxidation.

Lista de abreviaturas e símbolos

2-DR: 2-Desoxi-D-ribose

5-DSA: 5-Doxil estearato

AAPH: 2'-2'-azobis 2-amidino propano hidrocloreto

ALT: Alanina Aminotransferase

AST: Aspartato Aminotransferase

BHA: butil-hidroxi-anisol

BHT: butil-hidroxi-tolueno

BSA: Albumina bovina sérica

CAF: Ácido cafeico

CDTA: ácido 1,2-ciclohexdiaminotetraacético

CL: Colesterol livre

CLA: Ácido clorogênico

Cu⁺: Íon cuproso

Cu²⁺: Íon cúprico

DCTA: Ácido trans-1,2-diaminociclohexano-N,N,N',N'- tetraacético monohidrato

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

EGTA: Ácido etileno glico-bis(b-amino éter) N, N, N', N'-tetracético

EPR: Ressonância paramagnética eletrônica

EROs: Espécies reativas de oxigênio

Fe³⁺: Íon férrico

G: Gaus

HEDTA: Ácido hidroxietilenodiaminotetracético

KPi: tampão fosfato

L-PC: lisofosfatidilcolina

LDH: lactato desidrogenase

MDA: Malonaldeído

NTA: ácido nitrilotriacético

O₂ : Oxigênio molecular / Dioxigênio

O₂⁻ : Radical superóxido

OH·: Radical hidroxila

PBS: Tampão fosfato-salino

PC: fosfatidilcolina

PE: Fosfatidil-etinonamida

PI: fosfatidil inositol

PIH: piridoxal isonicotinoil hidrazona

PS: Fosfatidilserina

PVDF: Fluoreto de polivinilideno

RL: Radicais livres

SM: Esfingomielina

SSA: Sulfosalicilato de amônio

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TF: Total fosfolipídio

TPA: Ácido tereftálico

TROLOX[®]: 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico

TRP: Triptofano

U.R.F.: Unidade relativa de fluorescência

α-TOC: alfa-tocoferol

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 1.1: Distribuição eletrônica do oxigênio molecular e do radical superóxido | 22 |
| Figura 1.2: Redução do oxigênio molecular | 24 |
| Figura 1.3: Mecanismos de homeostase redox. Equilíbrio entre produção de EROs e vários compostos antioxidantes. | 29 |
| Figura 1.4: Processo de peroxidação lipídica..... | 31 |
| Figura 1.5: Ciclo catalítico da Glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione redutase (GR)..... | 33 |
| Figura 1.6: Estrutura química tocoferol e tocotrienol. | 34 |
| Figura 1.7: Estrutura química da glutathione | 36 |
| Figura 1.8: Síntese dos ácidos hidroxinâmicos | 48 |
| Figura 1.9: Estrutura química dos precursores do ácido clorogênico e do ácido cafeico | 49 |
| Figura 3.1: Degradação oxidativa da 2-DR mediada pelo radical hidroxil | 57 |
| Figura 3.2: Formação do cromóforo a partir da reação do TBA com MDA..... | 57 |
| Figura 3.3: Representação do espectro do radical ascorbil..... | 60 |
| Figura 3.4: Hidroxilação do ácido tereftálico | 62 |
| Figura 4.1: Reação de Fenton..... | 64 |
| Figura 4.2: Cinética da degradação oxidativa da 2-DR (5 mM) mediada por íons Fe³⁺ (10 µM) e diferentes quelantes (NTA, citrato, EDTA em estequiometria 1:1) na presença de ascorbato (0,5 mM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 7,2. | 67 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 4.3: Painel A Estudo da ação antioxidante do ácido cafeico (CAF) mediada por diferentes concentrações de FeIII-EDTA e FeIII-Citrato e ascorbato (0,5 mM) na degradação oxidativa da 2-DR..... | 68 |
| Figura 4.4: Efeito da pré-incubação sobre a sobre a degradação mediada por FeIII-EDTA (10 µM) e ascorbato..... | 72 |
| Figura 4.5: Efeito da variação do tempo de pré-incubação sobre a intensidade do sinal de EPR do radical ascorbil mediado por FeIII-EDTA | 73 |
| Figura 4.6: Perfil espectral do CAF (500 µM) e em presença de Fe³⁺-EDTA (50 µM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 6,0 | 75 |
| Figura 4.7: Perfil espectral do CAF (500 µM) e em presença de Fe³⁺-EDTA (50 µM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 6,5. | 76 |
| Figura 4.8: Perfil espectral do CAF (500 µM) e em presença de Fe³⁺-EDTA (50 µM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 7,0..... | 77 |
| Figura 4.9: (Painel A) Perfil espectral do CAF (500 µM) e em presença de Fe³⁺-EDTA (50 µM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 7,2..... | 78 |
| Figura 4.10: Perfil espectral do CAF (500 µM) e em presença de Fe³⁺-EDTA (50 µM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 7,5..... | 79 |
| Figura 5.1: Curso temporal da degradação oxidativa da 2-DR (5 mM) mediada por íons Cu²⁺ (5 e 15 µM) e ascorbato | 83 |
| Figura 5.2: Efeito da variação da concentração do CAF e CLA sobre a degradação oxidativa da 2-DR | 85 |
| Figura 5.3: Efeito da variação da 2-DR (0 - 50 mM) sobre sua degradação mediada por íons por Cu²⁺ e ascorbato..... | 88 |
| Figura 5.4: Estudo da ação antioxidante do CLA e CAF mediada por diferentes concentrações de Cu²⁺ e ascorbato | 89 |

| | |
|--|------------|
| Figura 5.5: Estudo da ação antioxidante do ácido cafeico (CAF) no curso temporal da degradação oxidativa da 2-DR | 90 |
| Figura 5.6: Perfil espectral do CAF (500 μM) e em presença de Cu^{2+} (50 μM) em tampão fosfato de potássio | 92 |
| Figura 5.7: Esquema da formação do complexo CAF-Cu^{2+} | 93 |
| Figura 5.8: Intensidade do sinal de EPR do radical ascorbila em tampão fosfato de potássio..... | 95 |
| Figura 5.9: Efeito da variação da concentração de Cu^{2+} sobre a intensidade do sinal de EPR do radical ascorbila em tampão fosfato de potássio..... | 96 |
| Figura 5.10: Curso temporal da hidroxilação do TPA (125 μM) mediada por diferentes concentrações de Cu^{2+} e ascorbato | 98 |
| Figura 5.11: Estudo da ação antioxidante do CAF e CLA mediada por diferentes concentrações de Cu^{2+} e ascorbato | 99 |
| Figura 5.12: Perfil espectral da hidroxilação do TPA (125 μM) na presença de CAF e CLA (50 e 100 μM) em diversas concentrações Cu^{2+}..... | 100 |
| Figura 6.1: Marcador de spin 5-doxil estearato (5-DSA) | 107 |
| Figura 6.2: Estrutura química 2'-2'-azobis 2-amidino propano hidrocloreto (AAPH) | 109 |
| Figura 6.3: Parâmetro espectral $2A//$ (G), do marcador 5-DSA em membranas de eritrócitos e concentração de MDA formado pela peroxidação dos lipídios em função da concentração de AAPH | 113 |
| Figura 6.4: Espectro de RPE do marcador de spin 5-DSA obtido em temperatura ambiente com a indicação do parâmetro $2A$ | 115 |
| Figura 6.5: Efeito de diversas moléculas (500 μM) sobre o parâmetro espectral $2A//$ (G)..... | 119 |

| | |
|---|------------|
| Figura 6.6: Efeito da concentração de diversas moléculas sobre o parâmetro espectral 2A// (G) do marcador 5-Doxil estearato (5-DSE) em membranas de eritrócitos..... | 120 |
| Figura 6.7: (Reapresentação da figura 6.6) Efeito de diversas moléculas (concentrações: 10, 100 e 500 µM) sobre o parâmetro espectral 2A// | 122 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|------------|
| Tabela 1.1: Espécies reativas radicalares e não radicalares..... | 21 |
| Tabela 1.2: Tempo de meia-vida de diferentes espécies reativas. | 27 |
| Tabela 1.3: Efeitos do óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) como mensageiro ou toxina no mesmo tecido, conforme a concentração tissular. | 28 |
| Tabela 4.1: Constante de estabilidade de compostos de coordenação com ferro(III) | 66 |
| Tabela 5.1: Constante de estabilidade do Cu^{2+} com diversas moléculas:..... | 94 |
| Tabela 6.1: Composição de lipídios da membrana do eritrócito..... | 104 |
| Tabela 6.1: Fator de apolaridade de alguns compostos | 121 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 20 |
| 1.1 OXIGÊNIO E RADICAIS LIVRES | 21 |
| 1.1.1 Espécies reativas de oxigênio (EROs) | 23 |
| 1.1.1.1 Radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$)..... | 25 |
| 1.1.1.2 Radical hidroxila (HO^{\bullet}) | 25 |
| 1.1.1.3 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)..... | 26 |
| 1.1.1.4 Óxido Nítrico ($^{\bullet}NO$) | 27 |
| 1.1.2 Efeitos biológicos das EROs | 28 |
| 1.1.3 Defesas antioxidantes | 31 |
| 1.1.3.1 Antioxidantes enzimáticos | 32 |
| 1.1.3.1.1 Superóxido dismutase (SOD)..... | 32 |
| 1.1.3.1.2 Catalase (CAT) | 32 |
| 1.1.3.1.3 Glutaciona peroxidase (GPx) e a glutaciona redutase (GR)..... | 33 |
| 1.1.3.2 Antioxidantes não-enzimáticos, ou de baixo peso molecular..... | 34 |
| 1.1.3.2.1 Vitamina E - α - tocoferol | 34 |
| 1.1.3.2.2 vitamina C | 35 |
| 1.1.3.2.2 Glutaciona..... | 35 |
| 1.2 METAIS DE TRANSIÇÃO | 36 |
| 1.2.1 Cobre | 36 |

| | |
|--|----|
| 1.2.1.1 Doenças relacionadas ao cobre | 38 |
| 1.2.1.1.1 Doença de Wilson | 38 |
| 1.2.1.1.2 Doença de Menkes | 38 |
| 1.2.2 Ferro | 39 |
| 1.2.2.1 Hemocromatose | 40 |
| 1.3. OS POLIFENÓIS | 41 |
| 1.3.1 Ácidos hidroxicinâmicos: ácido caféico e 5-cafeolquinico | 46 |
| 1.3.2 Metabolismo dos ácidos fenólicos..... | 50 |
| 1.3.3 Propriedades antioxidantes dos ácidos clorogênicos | 51 |
| 2. OBJETIVOS | 53 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 54 |
| 3.1 MATERIAL | 54 |
| 3.1.1 Reagentes e soluções | 54 |
| 3.1.1.1 Reagentes | 54 |
| 3.1.1.2 Soluções | 54 |
| 3.1.1.2.1. 2-Desoxi-D-ribose | 55 |
| 3.1.1.2.2 Cobre(II)..... | 55 |
| 3.1.1.2.3 Ácido cafeico e ácido clorogênico | 55 |
| 3.1.1.2.4 Ascorbato..... | 56 |
| 3.1.1.2.5 Ácido tereftálico | 56 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2 MÉTODOS | 56 |
| 3.2.1 Degradação da 2-Desoxi-D-ribose | 56 |
| 3.2.2 Espectroscopia ultravioleta (UV) visível (Vis) | 58 |
| 3.2.3 Ressonância paramagnética eletrônica do radical ascorbila | 59 |
| 3.2.3.1 Mensuração do sinal do radical ascorbil | 60 |
| 3.2.3.2 Condições operacionais do espectrômetro de RPE | 61 |
| 3.2.4 Hidroxilação do ácido tereftálico | 61 |
| 3.2.8 Análise estatística..... | 63 |
| | |
| 4 ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO CAFEICO (CAF) EM SISTEMAS GERADORES DE OXI-RADICAIS MEDIADOS POR Fe^{III} -EDTA | 64 |
| 4.1 INTRODUÇÃO..... | 64 |
| 4.2 METODOLOGIAS UTILIZADAS..... | 65 |
| 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 65 |
| 4.4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS..... | 80 |
| | |
| 5 ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO CAFEICO (CAF) E DO ÁCIDO 5-O-CAFEOILQUÍNICO (ÁCIDO CLOROGÊNICO) EM SISTEMAS GERADORES DE RADICAIS LIVRES MEDIADO POR Cu^{2+} NA PRESENÇA DE ASCORBATO | 82 |
| 5.1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS | 82 |
| 5.2 METODOLOGIAS UTILIZADAS..... | 83 |
| 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 83 |
| 5.4 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS..... | 101 |

| | |
|--|------------|
| 6. ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO CAFEICO (CAF) E DO ÁCIDO 5-O-CAFEOILQUÍNICO (ÁCIDO CLOROGÊNICO) EM SISTEMA LIPOFÍLICO NA PRESENÇA DE AZO COMPOSTO HIDROSSOLÚVEL 2'-2'-AZOBIS 2-AMIDINO PROPANO HIDROCLORETO (AAPH) | 102 |
| 6.1 MEMBRANAS BIOLÓGICAS | 102 |
| 6.1.1 Estrutura e função das membranas biológicas | 102 |
| 6.1.2 Membrana plasmática de eritrócito..... | 103 |
| 6.1.3 Marcadores de spin | 105 |
| 6.2 OBJETIVOS | 107 |
| 6.3. MATERIAL E MÉTODOS | 108 |
| 6.3.1 Material | 108 |
| 6.3.1.1 Reagentes..... | 108 |
| 6.3.1.1 Soluções | 108 |
| 6.3.1.1.1 Ácido cafeico e ácido clorogênico | 108 |
| 6.3.1.1.2 2'-2'-azobis 2-amidino propano hidrocloreto (AAPH) | 109 |
| 6.3.2 MÉTODOS..... | 110 |
| 6.3.2.1 Peroxidação lipídica em membranas de eritrocitos | 110 |
| 6.3.2.1.1 Preparação das membranas de eritrócitos (<i>Ghosts</i> de eritrócitos) | 110 |
| 6.3.2.1.2 Oxidação das membranas de eritrócitos | 111 |
| 6.3.2.1.3 Compostos utilizados..... | 112 |
| 6.3.2.1.4 Marcação das amostras..... | 113 |

| | |
|---|------------|
| 6.3.2.1.5 Mensuração do parâmetro espectral $2A_{ }$ | 114 |
| 6.3.2.1.6 Condições operacionais do espectrômetro de RPE | 115 |
| 6.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 116 |
| 6.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 117 |
| 6.6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS | 123 |
| 7 CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS..... | 124 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 127 |

1. Introdução

As frutas desempenham um papel muito importante em nossa alimentação como fontes de nutrientes e de compostos fenólicos. A Organização Mundial da Saúde recomenda o consumo de uma dieta rica em frutas e hortaliças (WHO-FAO, 2003), uma vez que diversos estudos epidemiológicos mostraram uma relação inversa entre o consumo desses alimentos e a incidência de doenças crônicas não transmissíveis, incluindo a hipertensão, a aterosclerose e a síndrome metabólica (VOUTILAINEN *et al.*, 2006; LEIFERT e ABEYWARDENA, 2008). Tais doenças têm sido relacionadas ao desequilíbrio redox no organismo. A intensidade e patogenicidade destes desequilíbrios vão depender, naturalmente, das concentrações locais de espécies pró e antioxidantes e das constantes de velocidade de reação com moléculas-alvo (BANERJEE *et al.*, 2007; RICHARD J, 2008; JACOB e PAUL G. WINYARD, 2009).

Os radicais livres podem ser definidos como qualquer espécie capaz de existência independente que contenha em sua estrutura eletrônica um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). A presença de elétrons desemparelhados atribui propriedades paramagnéticas aos radicais, que além disso podem ter carga positiva, neutra ou negativa. O termo “espécies reativas” se refere às espécies que podem ou não apresentar elétrons desemparelhados em orbital de maior energia, podendo, ser ou não radicalares. A tabela 1.1 mostra exemplos dessas espécies. Entretanto, as espécies reativas não radicalares podem intermediar a geração de radicais no organismo. Dessas, as espécies reativas de oxigênio (EROs) ganham destaque devido à sua abundância, alta reatividade e aos danos que podem causar no organismo (HERMES-LIMA, 2004), tais como oxidação de carboidratos, proteínas, ácido 2'-desoxirribonucleico (DNA) nuclear e mitocondrial, ácido ribonucleico (RNA) e de componentes de membranas biológicas, particularmente lipídeos (processo denominado peroxidação lipídica)(HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; JACOB e PAUL G. WINYARD, 2009). O quadro de estresse oxidativo é gerado quando se tem uma elevada

produção de espécies reativas e estas superam a capacidade das defesas antioxidantes do organismo (SIES, 1985).

Tabela 1.1: Espécies reativas radicalares e não radicalares

| Radicalares | Não radicalares |
|-----------------------------------|---|
| Alcoxila (RO [•]) | Ácido hipocloroso (HOCl) |
| Hidroperoxila (HOO [•]) | Ozônio (O ₃) |
| Hidroxila (HO [•]) | Peroxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) |
| Peroxila (ROO [•]) | Peroxinitrito (ONOO ⁻) |
| Óxido nítrico ([•] NO) | Oxigênio singleto (O ₂) |

Adaptado de HALLIWELL e GUTTERIDGE (2007)

Para proteger contra os efeitos das EROs em excesso, o organismo apresenta defesas antioxidantes, que podem ser divididas em duas grandes classes: as enzimáticas (p.ex., catalase e superóxido-dismutase) e as não-enzimáticas (p.ex., urato, glutathiona e vitamina C e E) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Os antioxidantes enzimáticos são frequentemente estudados usando modelos animais, já os não enzimáticos podem ser estudados mais facilmente em modelos *in vitro*, como é o método proposto neste trabalho.

1.1 OXIGÊNIO E RADICAIS LIVRES

O oxigênio (O₂) é uma molécula que apresenta dois elétrons desemparelhados em seus dois orbitais π antiligantes de maior energia com *spins* paralelos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007) (Figura 1.1).

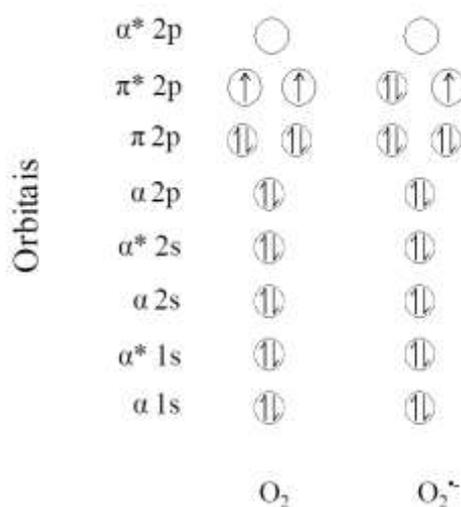


Figura 1.1: Distribuição eletrônica do oxigênio molecular e do radical superóxido. (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007)

O principal processo metabólico que utiliza O_2 é a respiração celular, que possibilita às células vivas obter energia biologicamente disponível na forma de ATP a partir da reação enzimaticamente catalisada entre íons H^+ da matriz mitocondrial com o O_2 para formar água (RICHARD J, 2008; JACOB e PAUL G. WINYARD, 2009). Segundo Halliwell e Gutteridge (2007), aproximadamente 85 a 90% do O_2 que respiramos é utilizado pela mitocôndria através da cadeia de transporte de elétrons. Aproximadamente 10 a 15% restantes são utilizados por diversas enzimas, como as oxidases e oxigenases, além de reações de oxidação não-enzimáticas. No complexo IV da cadeia de transporte de elétrons, a enzima citocromo-oxidase (Reação 1.1) remove um elétron de cada uma das quatro moléculas reduzidas de citocromo c, oxidando-as, e transfere esses quatro elétrons ao O_2 para formar H_2O (aproximadamente 98% dos 85 a 90% citados acima). Os 2% restantes de O_2 são reduzidos por transferência de apenas um elétron (*single electron transfer* – SET) e produzem radicais superóxido nas células ($O_2^{\bullet -}$)(Reação 1.2) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; RICHARD J, 2008; JACOB e PAUL G. WINYARD, 2009).



Em 1878, Paul Bert fisiologista francês, postulou que o oxigênio poderia causar danos ao homem (GILBERT e COLTON, 2002). Posteriormente em 1956, Harman, médico gerontologista norte americano, propôs a teoria radicalar do envelhecimento, segundo a qual defeitos persistentes e cumulativos na proteção contra radicais livres produzem danos progressivos aos tecidos, que levam à senescência (HARMAN, 1981). Em meados da década de 80, Helmut Sies, bioquímico alemão, propôs o conceito de estresse oxidativo como um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes a favor dos oxidantes, o que potencializa o aumento de danos ao organismo (SIES, 1985). No organismo humano são produzidos radicais centrados em carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio, sendo os radicais centrados em oxigênio (oxirradicais) os que recebem mais destaque (HERMES-LIMA, 2004).

Há muitas evidências científicas sólidas mostrando que o dano celular induzido pelos radicais está envolvido (ao menos em parte) no desenvolvimento do processo natural de envelhecimento, na etiologia e no agravamento de um grande número de processos patogênicos, como as doenças cardiovasculares (infarto do miocárdio e aterosclerose), as doenças inflamatórias (artrite reumatoide) e as doenças do sistema nervoso central (SNC) como as de Parkinson, de Alzheimer e a esclerose amiotrófica lateral (GILBERT e COLTON, 2002; HERMES-LIMA, 2004; BANERJEE *et al.*, 2007; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; SOTO-OTERO *et al.*, 2008; JACOB e PAUL G. WINYARD, 2009).

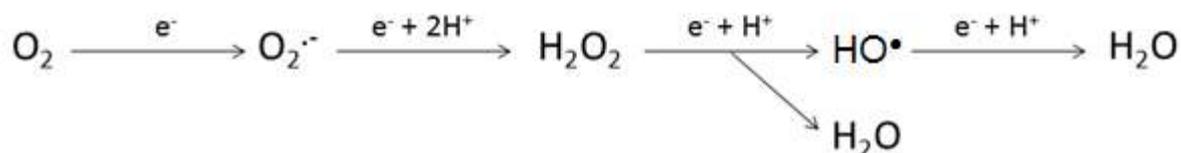
1.1.1 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são espécies químicas contendo oxigênio que, em geral, são mais reativas que o próprio O_2 . Podem ser formadas a partir de diferentes reações de redução da molécula de O_2 .

As EROs são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas, o O_2 sofre redução completa, com transferência de

quatro elétrons, resultando na formação de H₂O (Figura 1.2). Quando há redução parcial, são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido (O₂^{•-}) e hidroxila (HO[•]), e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), , descritos a seguir, juntamente com uma espécie reativa de nitrogênio, o óxido nítrico (NO) (HERMES-LIMA, 2004; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Figura 1.2: Redução do oxigênio molecular

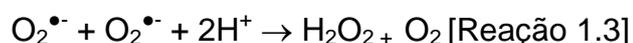


Além da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, outros processos que geram EROs a partir de O₂ podem ser citados: 1) o catabolismo de ácidos graxos pelo processo de β-oxidação nos peroxissomas; 2) a conversão da hipoxantina a xantina pela ação da xantina-oxidase; 3) a auto-oxidação de pequenas moléculas (adrenalina, noradrenalina, cisteína, dopamina, entre outras); 4) a oxidação de NADPH pelo complexo enzimático NADPH-oxidase, que ocorre em células fagocíticas (*respiratory burst* – “explosão respiratória”); e 6) a ação de enzimas do sistema citocromo P450. Outras fontes de EROs incluem, ainda, agentes oxidantes exógenos inalados durante a respiração, como o ozônio (O₃) e o dióxido de nitrogênio (NO₂) (DROGE, 2002; HERMES-LIMA, 2004; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; JACOB e PAUL G. WINYARD, 2009).

1.1.1.1 Radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

O radical $O_2^{\bullet-}$ é formado a partir da redução do O_2 com transferência de apenas um elétron (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Em condições fisiológicas, o $O_2^{\bullet-}$ é gerado principalmente na membrana mitocondrial através de componentes da cadeia respiratória e nos peroxissomas (DROGE, 2002). A sua formação ocorre em quase todas as células aeróbicas, além de ser produzido durante a ativação máxima dos neutrófilos e macrófagos (explosão respiratória).

O superóxido é um radical pouco reativo e não tem a habilidade de se difundir através de membranas lipídicas biológicas (por causa da carga negativa e pela ausência de canais). Apresenta meia-vida de milissegundos, muito maior que a do radical HO^{\bullet} , estando disponível por mais tempo para reagir com as biomoléculas, mas apenas no compartimento onde é produzido (HERMES-LIMA, 2004; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). É capaz de sofrer dismutação (reação redox de desproporcionamento, na linguagem química) espontânea ou enzimática para produzir peróxido de hidrogênio e oxigênio.



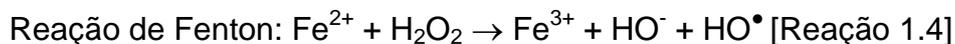
O superóxido também está envolvido em processos de transdução de sinal, como discutido abaixo.

1.1.1.2 Radical hidroxila (HO^{\bullet})

O radical hidroxila é o radical mais reativo que se conhece nos sistemas biológicos. Possui meia-vida muito curta, de aproximadamente 10^{-9} segundos (tabela 1.2). Assim, quando produzido *in vivo*, o HO^{\bullet} causa danos em região muito próxima ao local onde foi gerado. Reage amplamente com resíduos de aminoácidos, DNA e RNA. Além disso, pode iniciar a oxidação de componentes das membranas celulares (peroxidação lipídica).

O radical hidroxila pode ser formado por ruptura homolítica da ligação O–O da molécula de H_2O_2 , da reação do H_2O_2 com íons Fe^{2+} (denominada

reação de Fenton), sendo esta reação a principal fonte de EROs em sistemas biológicos, ou através da reação do H_2O_2 com o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), reação de Haber-Weiss:



1.1.1.3 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Apesar de não possuir elétrons desemparelhados no orbital de maior energia, não sendo, um radical, o H_2O_2 é uma espécie reativa de oxigênio extremamente deletéria, pois participa de reações que produzem HO^\bullet , como por exemplo, a reação de Fenton (HERMES-LIMA, 2004; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Possui meia-vida longa quando comparada a outras espécies radicalares (pode durar muitos dias em solução), e é capaz de difundir-se por membranas biológicas. Reage com íons metálicos de elementos de transição e algumas proteínas contendo o grupo heme, e pode induzir danos ao DNA. De acordo com Pryor (1986), o tempo de meia-vida do H_2O_2 em sistemas biológicos só pode ser calculado se as concentrações de todas as espécies reativas e enzimas antioxidantes presentes no ambiente são conhecidas. Uma vez produzido, o H_2O_2 é parcialmente decomposto pelas enzimas antioxidantes catalase, glutationa-peroxidases e peroxiredoxinas (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

Tabela 1.2: Tempo de meia-vida de diferentes espécies reativas.

| Espécies reativas | Tempo de vida (segundos) |
|--|--------------------------|
| Radical alcoxila (RO [•]) | 10 ⁻⁶ |
| Radical hidroxila (HO [•]) | 10 ⁻⁹ |
| Radical peroxila (ROO [•]) | 7 |
| Óxido nítrico ([•] NO) | 1-10 |
| Ìon peroxinitrito (ONOO ⁻) | 0,05-1 |
| Oxigênio singleto O ₂ | 10 ⁻⁵ |
| Semi-quinona radicalar | dias |

Adaptado de Halliwell e Gutteridge (2007), Pryor (1986) e Sies (1993).

1.1.1.4 Óxido Nítrico ([•]NO)

O óxido nítrico ([•]NO) é uma espécie química radicalar, pois possui um elétron desemparelhado com densidade de spin concentrada em torno do núcleo de nitrogênio (FLORA FILHO e ZILBERSTEIN, 2000; FAASSEN e VANIN, 2007). Encontra-se no estado gasoso à temperatura ambiente e também à temperatura fisiológica. Quando diluído, o [•]NO tem um tempo de vida de aproximadamente 10 segundos devido à sua rápida conversão a nitrito e nitrato (PRYOR, 1986; SIES, 1993; FAASSEN e VANIN, 2007). Um aspecto marcante desta molécula é a sua capacidade de ser benéfica ou potencialmente tóxica conforme a concentração ou depuração tecidual (FLORA FILHO e ZILBERSTEIN, 2000; FAASSEN e VANIN, 2007).

O [•]NO é um importante mensageiro intercelular nos mamíferos, e pode atuar como neurotransmissor, na imuno-regulação e no mecanismo de sinalização celular (FAASSEN e VANIN, 2007). Devido as suas características químicas de alta difusibilidade, a sinalização do [•]NO é exercida diretamente em nível intracelular, sem receptores transmembranosos, sendo utilizado no organismo em funções fisiológicas no qual é necessária uma resposta rápida (FLORA FILHO e ZILBERSTEIN, 2000; FAASSEN e VANIN, 2007). Na tabela 1.3 são apresentados alguns efeitos do [•]NO como mensageiro ou agente tóxico no mesmo tecido, conforme a concentração tissular.

Muitos dos potenciais efeitos tóxicos do óxido nítrico, provavelmente são mediados por seus produtos de oxidação e não por ele próprio. Dentre os produtos dele derivado, um dos principais é o peroxinitrito, produto da reação do óxido nítrico com o radical superóxido (Reação 1.6)(FAASSEN e VANIN, 2007; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). O peróxido nítrico é um forte oxidante e pode reagir com grupos heme, centros ferro-enxofre. Entre os alvos do peroxinitrito ou de seus radicais estão os lipídios, ácidos nucleicos e aminoácidos (FAASSEN e VANIN, 2007).



Tabela 1.3: Efeitos do óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) como mensageiro ou toxina no mesmo tecido, conforme a concentração tissular.

| Tecido | $\bullet\text{NO}$ como mensageiro | $\bullet\text{NO}$ como agente tóxico |
|---------------------------|--|---|
| SNC | Memória tardia, fluxo sanguíneo e isquemia, secreção neuroendócrina. | Neurotoxicidade, aumento da irritabilidade (pró-convulsivo), enxaqueca, hiperalgesia. |
| Coração | Perfusão coronariana, inotrópico negativo. | Choque séptico, síndrome de reperfusão após isquemia. |
| Vasos sanguíneos | Antitrombótico, proteção à isquemia, anti-aterosclerótico, inibição de proliferação do músculo liso. | Choque séptico, inflamação, extravasamento microvascular. |
| Tecido imunológico | Antimicrobiano, antiparasitário, antitumor | Inflamação, choque-séptico, dano tissular. |

Adaptado de Flora Filho e Zilberstein (2000)

1.1.2 Efeitos biológicos das EROs

Atualmente sabe-se que em concentrações “adequadas” de alguns radicais livres são essenciais na manutenção da homeostase celular, podendo estes atuar como sinalizadores celulares (Figura 1.3). Entretanto o excesso dessas espécies radicalares pode levar a disfunções fisiológicas, como o comprometimento da defesa contra patógenos e o dano oxidativo a biomoléculas.

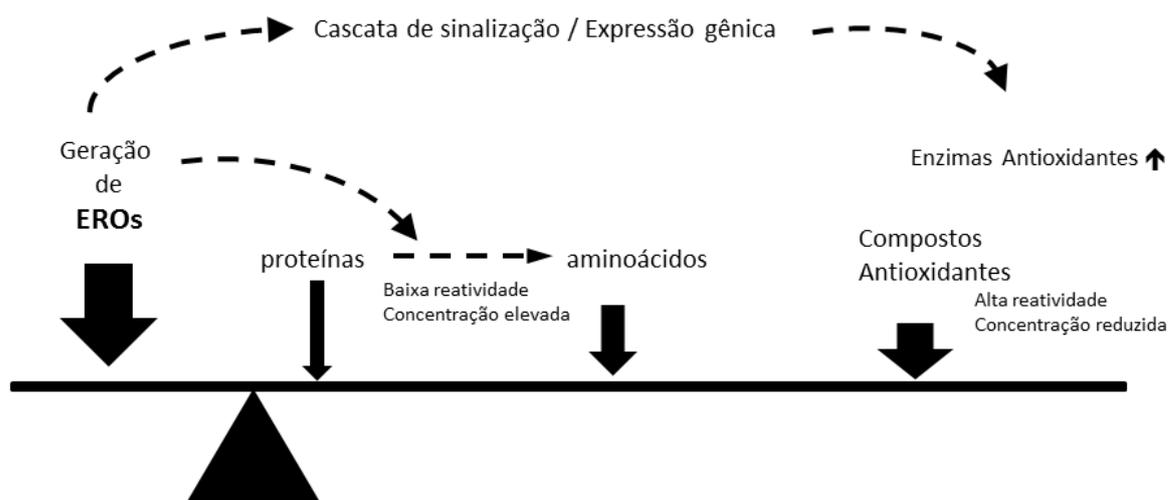


Figura 1.3: Mecanismos de homeostase redox. Equilíbrio entre produção de EROs e vários compostos antioxidantes. Adaptado de Droge (2002)

A oxidação de proteínas (estruturais ou funcionais) e de carboidratos pelas EROs pode provocar mudanças químicas e físicas nesses compostos, levando a uma série de alterações em suas funções nas células. O transporte de substâncias nas membranas plasmáticas e intracelulares, o controle de vias metabólicas e o reconhecimento de substâncias nos receptores de membrana podem ficar comprometidos pela ação das EROs (NORDBERG e ARNÉR, 2001; DROGE, 2002; GILBERT e COLTON, 2002; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; JACOB e PAUL G. WINYARD, 2009).

Além disso, as EROs podem danificar o DNA, causando modificações químicas nas bases purínicas e pirimídicas e também no resíduo de 2'-desoxirribose, que podem levar a alterações na expressão gênica, mutação e apoptose (BANERJEE *et al.*, 2007; VALKO *et al.*, 2007).

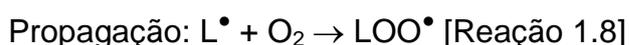
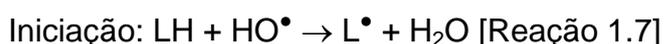
De todas as ações deletérias associadas ao aumento da formação de EROs e estresse oxidativo, a oxidação de componentes das membranas celulares, particularmente o processo de peroxidação lipídica, talvez seja a que tenha maior impacto em sistemas biológicos (e em sistemas não-biológicos, como óleos industriais) (NIKI *et al.*, 1988; NIKI *et al.*, 2005; NIKI, 2009).

A peroxidação lipídica é reação entre os radicais e os resíduos de ácidos graxos insaturados (grupo acila) dos lipídios da membrana. Ocorre em cadeia e dá-se em três etapas (Figura 1.4):

1. Iniciação: ocorre o sequestro de um hidrogênio (H^\bullet) do resíduo de ácido graxo polinsaturado (LH) pelo radical HO^\bullet , com consequente formação de um radical lipídico (L^\bullet) e H_2O ;
2. Propagação: o radical lipídico reage rapidamente com o O_2 ($^\bullet O-O^\bullet$), resultando no radical peroxila (LOO^\bullet), que sequestra H^\bullet de outro resíduo de ácido graxo insaturado, formando novamente a espécie L^\bullet ;
3. Término: ocorre quando as espécies radicalares (L^\bullet e LOO^\bullet) produzidas reagem entre si, formando um composto estável

Essa reação em cadeia pode ser ainda interrompida pela ação de antioxidantes, que reagem com um dos radicais, formando um radical estável derivado da molécula de antioxidante. Essa estabilização geralmente se dá por deslocalização do elétron desemparelhado desta, que geralmente possui ligações π conjugadas (NIKI *et al.*, 1988; HERMES-LIMA, 2004; NIKI *et al.*, 2005).

A peroxidação lipídica leva ao aumento da rigidez da membrana, mudanças na morfologia, ligação cruzada e fragmentação de proteínas, alterações no metabolismo intracelular, perda da seletividade no transporte por membranas, liberação do conteúdo de organelas (como enzimas lisossômicas), além da formação de produtos citotóxicos, induzindo dano e morte celular (BEGUM; TERAQ, 2002; SATO *et al.*, 1995; SADHU; WARE; GRISHAN, 1992).



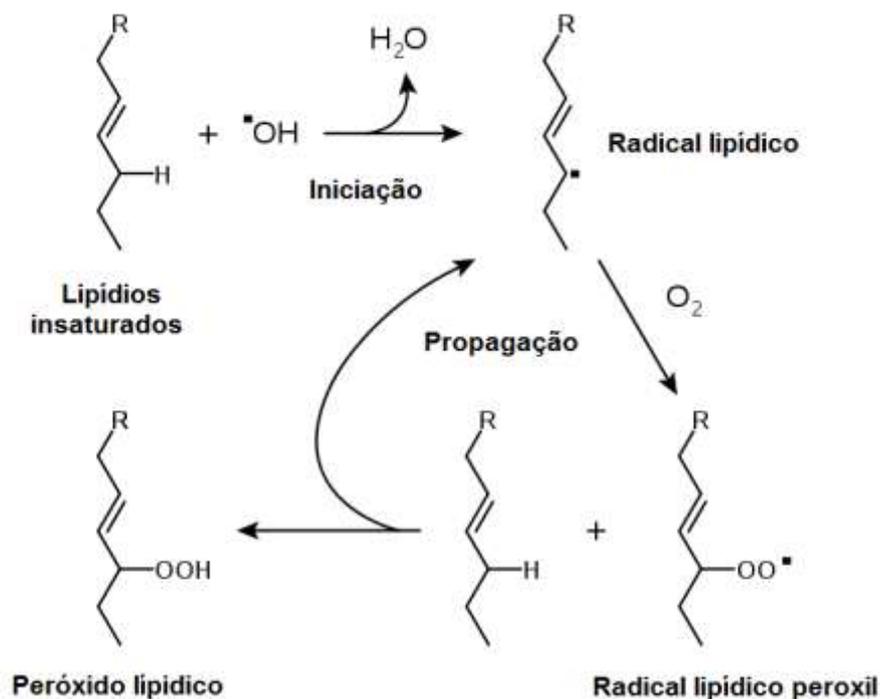


Figura 1.4: Processo de peroxidação lipídica. Adaptado de Niki (2009)

1.1.3 Defesas antioxidantes

De modo geral, os agentes antioxidantes podem ser divididos em duas classes: enzimáticos e não-enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos de maior importância são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione redutase (GR) sendo estas duas últimas enzimas responsáveis pelo ciclo redutor da glutathione (Figura 1.5). Entre os antioxidantes não-enzimáticos, ou de baixo peso molecular, há aqueles que podem ser origem endógena ou exógena (provenientes da alimentação). Dentre os antioxidantes não-enzimáticos destacam-se um vasto número de compostos, sintetizados endogenamente como algumas proteínas ligantes de metais de transição (ferro e cobre), glutathione reduzida (GSH), tioredoxinas,

ácido úrico, bilirrubina ou obtidos exogenamente, como as vitaminas E e C e os compostos fenólicos.

1.1.3.1 Antioxidantes enzimáticos

1.1.3.1.1 Superóxido dismutase (SOD)

A SOD faz parte de um grupo de metaloenzimas que tem a função de proteger as células aeróbicas contra a ação do $O_2^{\bullet-}$ (HERMES-LIMA, 2004; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Em meio aquoso, a SOD catalisa a reação de dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 com extrema rapidez, aproximadamente 10 milhões de vezes mais rápida que a dismutação espontânea não enzimática ($O_2^{\bullet-} + 2H^+ - SOD \rightarrow H_2O_2 + O_2$) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Nos mamíferos, são conhecidos três isoformas da SOD: a cobre-zinco SOD (CuZnSOD), a manganês SOD (MnSOD) e a SOD extracelular (HERMES-LIMA, 2004; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

1.1.3.1.2 Catalase (CAT)

A catalase é uma metaloproteína que catalisa a decomposição do H_2O_2 , formado pela ação da SOD, em H_2O e O_2 ($2 H_2O_2 + CAT \rightarrow 2 H_2O + O_2$). Tem afinidade apenas por moléculas de baixo peso molecular, tais como o H_2O_2 , não metabolizando moléculas grandes como os peróxidos lipídicos, produtos da peroxidação lipídica (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Atua de forma complementar ao sistema antioxidante da glutathione, sendo mais eficiente que este em altas concentrações de H_2O_2 . É encontrada predominantemente no interior das células nos peroxissomas, mas pode também ser encontrada livre no citoplasma (NORDBERG e ARNÉR, 2001; DROGE, 2002; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

1.1.3.1.3 Glutathiona peroxidase (GPx) e a glutathiona redutase (GR)

O ciclo redutor da glutathiona é o principal mecanismo de remoção de hidroperóxidos, lipoperóxidos, assim como a catalase, do H_2O_2 (INOUE *et al.*, 1999; HERMES-LIMA, 2004). A GPx é um grupo de enzimas que contém selênio em seu sítio ativo e é responsável pela redução dos peróxidos, utilizando glutathiona reduzida (GSH) como substrato doador de elétron, transformando-a em glutathiona oxidada (GSSG) ($H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow 2 H_2O + GSSG$). Uma vez oxidada, a GSSG é convertida em GSH pela GR ($GSSG + 2 H^+ \rightarrow 2 GSH$) (Figura 1.5) (INOUE *et al.*, 1999; HERMES-LIMA, 2004; KINNULA, 2005). A GPx e a GR estão presentes no citoplasma e nas mitocôndrias das células.

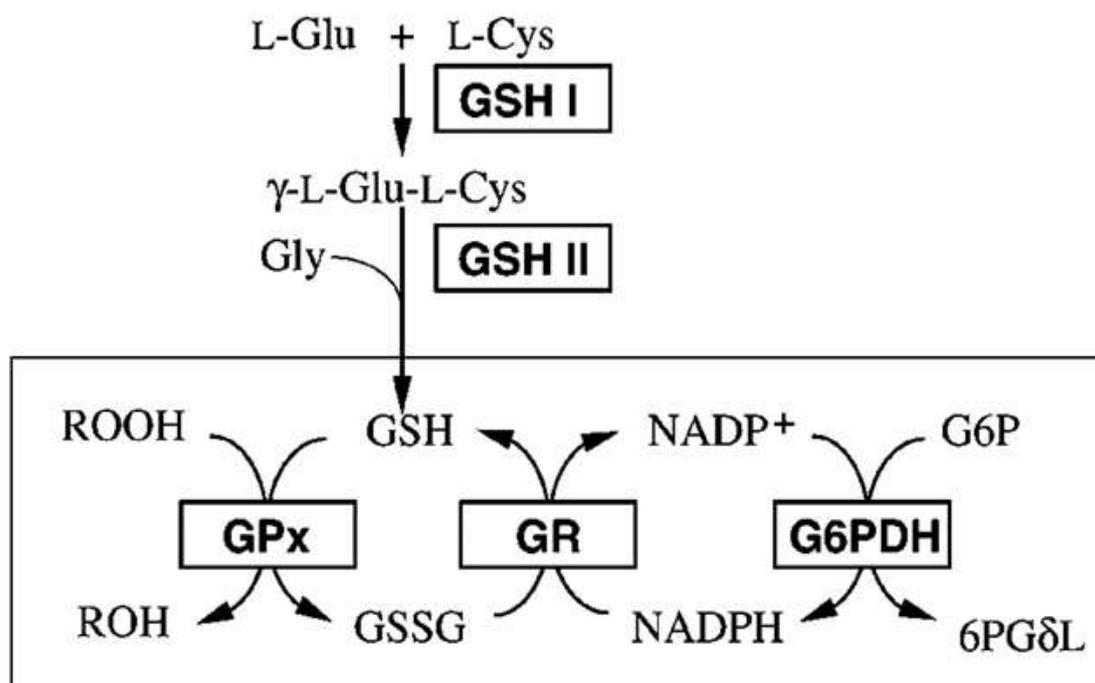


Figura 1.5: Ciclo catalítico da Glutathiona peroxidase (GPx) e a glutathiona redutase (GR)
Adaptado de Inoue *et al.*(1999)

1.1.3.2 Antioxidantes não-enzimáticos, ou de baixo peso molecular

1.1.3.2.1 Vitamina E - α - tocoferol

Vitamina E é um termo genérico que se refere aos tocóis e aos tocotrienóis. Estes compostos são encontrados na natureza em quatro formas diferentes α , β , δ , γ (Figura 1.6), sendo o α - tocoferol a forma antioxidante amplamente distribuída nos tecidos e no plasma.

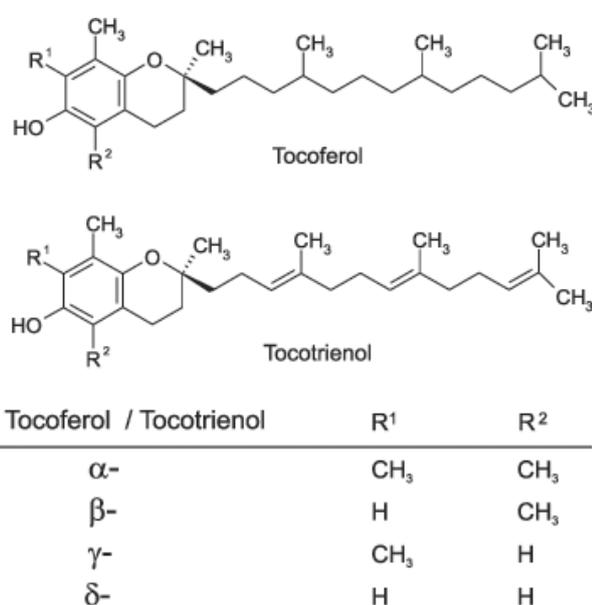


Figura 1.6: Estrutura química tocoferol e tocotrienol. Adaptado de Cerqueira, Medeiros e Augusto (2007)

O α - tocoferol é um antioxidante lipofílico e por isso encontra-se presente no interior das membranas celulares. Estruturas com cadeias fosfolipídicas, como a mitocôndria, o retículo endoplasmático e a membrana citoplasmática, possuem vitamina E associada a sua estrutura (HERMES-LIMA, 2004; SHILS *et al.*, 2005; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; BENDER, 2009). Tem propriedades citoprotetoras, pois fornece átomos de hidrogênio do seu grupo hidroxila ao radical lipídico, impedindo a propagação da peroxidação lipídica. Durante a reação, a vitamina E torna-se um radical livre chamado

tocoferila, menos reativo que o radical lipídico, que migra para a superfície da membrana para ser novamente transformado em tocoferol, por ação do ácido ascórbico (HERMES-LIMA, 2004; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007)

1.1.3.2.2 vitamina C

A vitamina C, por sua vez, é um antioxidante hidrossolúvel, o que permite sua ampla difusão pelos meios intra e extracelular. Seu potencial antioxidante está relacionado à remoção direta de $O_2^{\bullet-}$ e $\bullet OH$ mediante a formação de um radical denominado ascorbila (BUETTNER e JURKIEWICZ, 1993). Além disso, contribui para a regeneração da forma oxidada da vitamina E. Entretanto, a vitamina C é um potente agente redutor ($E^0 = -170$ mV) capaz de reduzir metais de transição e a maioria das espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio fisiologicamente relevantes (HEFFNER & REPINE, 1989; COMHAIR & ERZURUM, 2002; SOFFLER, 2007).

1.1.3.2.2 Glutathiona

A glutathiona (GSH) é um tri-peptídeo (formado por glutamato, cisteína e glicina) (Figura 1.7) presente no citosol, na mitocôndria e no núcleo da maioria das células (BANERJEE *et al.*, 2007; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; RICHARD J, 2008). Exerce funções essenciais à célula, destacando-se sua ação no “ciclo da glutathiona”, por meio da doação de átomos de hidrogênio durante a redução de peróxidos pela GPx, transformando-se em glutathiona oxidada (GSSG) (HERMES-LIMA, 2004; BANERJEE *et al.*, 2007; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; HUBER, ALMEIDA e FÁTIMA, 2008; RICHARD J, 2008). A GSH também possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos catalisado pela glutathiona S transferases (GST) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; HUBER, ALMEIDA e FÁTIMA, 2008).

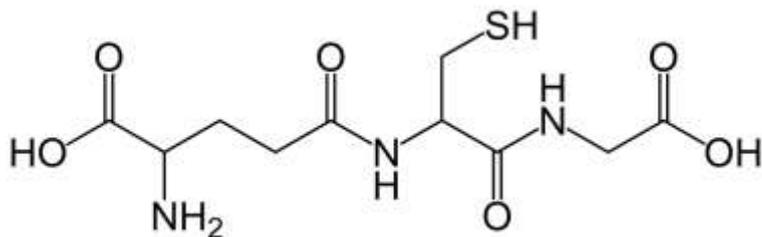


Figura 1.7: Estrutura química da glutathiona. Adaptado de (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007)

1.2 METAIS DE TRANSIÇÃO

1.2.1 Cobre

O cobre é um elemento químico de símbolo Cu (do latim *cuprum*), número atômico 29 e de massa atômica 63,546 que apresenta normalmente dois estados de oxidação Cu^+ e Cu^{2+} . Nos sistemas biológicos o cobre é encontrado normalmente no estado de oxidação Cu^{2+} . O cobre participa de diversos processos no organismo, tais como a metabolização do ferro, defesa antioxidante e a atividade de enzimas cobre-dependentes (citocromo C-oxidase, superóxido-dismutase,). Além disto, este elemento tem papel na produção de elastina, colágeno e melanina, afetando a fisiologia de vasos sanguíneos, ossos e sistema nervoso central.

As fontes mais ricas de cobre são crustáceos e moluscos, carnes vermelhas tal como fígado de boi, nozes, legumes, farelo de trigo, girassol, vinho seco, chocolate, cogumelos, caju e frutas secas (tabela 1.4) (ANDRADE JR, 2004; SHILS *et al.*, 2005).

Tabela 1.4. Concentração total de cobre encontrado em alimentos

| Alimento | [cobre] (mg por 100g) | Alimento | [cobre] (mg por 100g) |
|---------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Açúcar mascavo | 2,41 | Castanha do para | 0,66 |
| Alcachofra | 0,50 | Cevada | 0,50 |
| Amêndoa | 1,00 | Chocolate | 1,21 |
| Amendoim cru | 0,62 | Cogumelos | 0,65 |
| Amendoim torrado | 1,10 | Ervilha verde | 0,57 |
| Arroz | 0,58 | Farinha de soja | 2,88 |
| Aveia | 1,00 | Favas | 0,50 |
| Brócolis | 0,84 | Lentilha | 1,31 |
| Cacau em pó | 4,40 | Ovo de galinha (gema) | 0,57 |
| Caranguejo | 0,57 | Pão de centeio | 0,61 |
| Carne de boi média | 0,65 | Rabanete | 0,50 |

Adaptado de Andrade JR (2004).

A absorção do cobre ocorre por transporte ativo e por difusão a nível duodenal. Em média, 40 a 50% do total ingerido são absorvidos. Uma vez absorvido o cobre é transportado para o fígado ligado à albumina, transcupreína ou a alguns aminoácidos, especialmente cistina e histidina, incorporando-se então a ceruloplasmina e várias metaloenzimas, que permite o transporte do cobre para os tecidos extra-hepáticos. A excreção do cobre se dá por via fecal e em maior teor, pela bile, assim como a urina e suor. O cobre quando em excesso no organismo favorece a formação de EROs no organismo estando relacionadas a diferentes doenças (Doença de Wilson e a doença de Menkes, vide 1.2.1.1.) e ao desequilíbrio redox no organismo.

1.2.1.1 Doenças relacionadas ao cobre

1.2.1.1.1 Doença de Wilson

A doença de Wilson é uma patologia que provoca alterações no metabolismo do cobre e foi descrita em 1912 por Kinnier Wilson (PFEIFFER, 2011). Sua herança é genética com transmissão autossômica recessiva não ligada ao sexo. O gene envolvido é o ATP7B, situado no braço longo do cromossomo 12 (DE BIE *et al.*, 2007; HUSTER, 2010; BURKHEAD, GRAY e LUTSENKO, 2011; PFEIFFER, 2011). Aparentemente, o produto do gene ATP7B está presente no aparato de Golgi e é fundamental para o transporte do cobre através das membranas das organelas intracelulares (HUSTER, 2010; PFEIFFER, 2011). A ausência ou função diminuída do ATP7B reduz a excreção hepática do cobre e compromete a síntese de ceruloplasmina, causando a deposição de cobre em vários locais do organismo, principalmente, fígado, cérebro, córnea e rins (BURKHEAD, GRAY e LUTSENKO, 2011; PFEIFFER, 2011).

Os principais sintomas da doença de Wilson são: doença hepática aguda ou crônica, irritabilidade, agressividade, declínio intelectual, alterações de consciência e sintomas semelhantes à doença de Parkinson (HUSTER, 2010; LORINCZ, 2010; PFEIFFER, 2011).

1.2.1.1.2 Doença de Menkes

A doença de Menkes é uma patologia associada a uma desordem no transporte do cobre, descrita em 1962 por Menkes. Caracteriza-se por ser um distúrbio genético recessivo ligado ao cromossomo X (DE BIE *et al.*, 2007; TUMER e MOLLER, 2010). A mutação genética responsável pela doença foi identificada no gene ATP7A, localizado no braço longo do cromossomo X (Xq13.3) e que codifica a enzima transportadora de cobre ATPase 1, essencial

ao metabolismo e transporte do cobre intracelular (TUMER e MOLLER, 2010; KALER, 2011).

Os principais sintomas da doença de Menkes são: anormalidades na estrutura do cabelo, hipopigmentação, alterações no tecido conjuntivo, sendo estes sintomas consequência direta da disfunção das várias enzimas que utilizam o cobre como cofator (DE BIE *et al.*, 2007; TUMER e MOLLER, 2010; KALER, 2011).

1.2.2 Ferro

O ferro é um elemento vital para múltiplos processos metabólicos na maioria dos organismos. Atua como cofator de enzimas da cadeia respiratória mitocondrial, na fixação do nitrogênio, na síntese do DNA e é elemento essencial para o transporte de oxigênio (FONTECAVE e PIERRE, 1993; FLEMING e PONKA, 2012).

Nos mamíferos, o ferro é utilizado principalmente na síntese da hemoglobina e da mioglobina e dos citocromos no fígado. O organismo humano adulto contém de 3 a 5 g de ferro, aproximadamente 2 g como hemoglobina e 8 mg como enzimas (GROTTO, 2008; LYNCH, 2011). O ferro é bem conservado pelo organismo, onde 90% são recuperados e reutilizados intensivamente. A absorção desse mineral depende de vários fatores como dos estoques corporais, do conteúdo fornecido pela dieta e da fonte alimentar, além de receber influência dos outros compostos ingeridos na mesma refeição como os fitatos e os polifenóis. Contudo, alguns fatores favorecem a absorção intestinal, como a acidez e a presença de agentes solubilizantes, como açúcares (SHILS *et al.*, 2005).

O ferro utilizado pelo organismo é adquirido através de duas fontes principais: da dieta e da reciclagem de hemácias senescentes (FERREIRA, MOURA e FRANCO, 1999). O ferro da dieta existe em duas formas: como ferro heme, encontrado na hemoglobina e na mioglobina e como ferro não

heme (SHILS *et al.*, 2005). A absorção do ferro heme corresponde a aproximadamente 5 a 10% do ferro da dieta é absorvido nas células do epitélio duodenal, como um complexo de porfirina intacto (FERREIRA, MOURA e FRANCO, 1999). Contudo, sua absorção pode ser de até 25%, maior quando comparada ao ferro não-heme (GROTTO, 2008). A absorção do ferro não-heme ocorre no duodeno e no jejuno superior sob forma solúvel para que seja absorvido. Com esse propósito, é ionizado pelo suco gástrico, reduzido ao estado ferroso ficando disponível para a absorção (SHILS *et al.*, 2005).

A deficiência de ferro tem consequências para todo o organismo, sendo a anemia a manifestação mais relevante (SHILS *et al.*, 2005; GROTTO, 2008). Por outro lado, o acúmulo ou excesso de ferro é extremamente nocivo para os tecidos, uma vez que o ferro livre promove a produção de espécies reativas de oxigênio (FONTECAVE e PIERRE, 1993). Em termos de toxicidade, o depósito crônico de ferro geralmente está associado à hemocromatose, e frequentes transfusões sanguíneas, requeridas para o tratamento de alguns tipos de anemias (FLEMING e PONKA, 2012).

1.2.2.1 Hemocromatose

A hemocromatose é uma doença do metabolismo do ferro que leva à absorção excessiva deste mineral (BONINI-DOMINGOS, 2007; FLEMING e PONKA, 2012). Em 1935, Joseph Sheldon, médico britânico, demonstrou que a hemocromatose se tratava de um distúrbio do metabolismo do ferro e que todas as manifestações da doença eram devidas à sobrecarga de depósito desse metal nos diversos órgãos (SOUZA, CARVALHO-FILHO e CHEBLI, 2001). A origem da disfunção é uma mutação no gene HFE (gene que codifica uma proteína de 343 aminoácidos), localizado no braço curto do cromossomo 6 na posição 21,3 (BONINI-DOMINGOS, 2007; FLEMING e PONKA, 2012). Isso resulta em inadequada absorção de ferro mediada pelo receptor de transferrina no intestino (SOUZA, CARVALHO-FILHO e CHEBLI, 2001; BONINI-DOMINGOS, 2007; FLEMING e PONKA, 2012)

Os principais sintomas iniciais da hemocromatose são: cansaço, eritema palmar e dor abdominal. Numa fase mais avançada da doença pode ocorrer icterícia, hepatomegalia, esplenomegalia, aumento da pigmentação da pele, artropatias, fibrose hepática e cirrose hepática (FONTECAVE e PIERRE, 1993; SOUZA, CARVALHO-FILHO e CHEBLI, 2001; BONINI-DOMINGOS, 2007; GROTTTO, 2008; FLEMING e PONKA, 2012). O tratamento da hemocromatose é feito pela doação de sangue, o que reduz os níveis tissulares de ferro, ou por uso de quelantes de ferro, no caso de pacientes que com complicações cardíacas (SOUZA, CARVALHO-FILHO e CHEBLI, 2001).

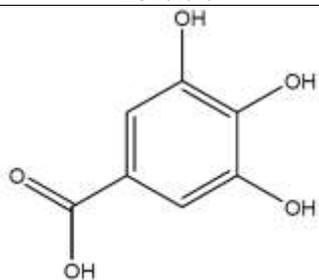
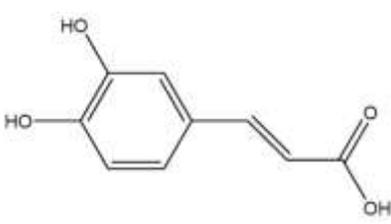
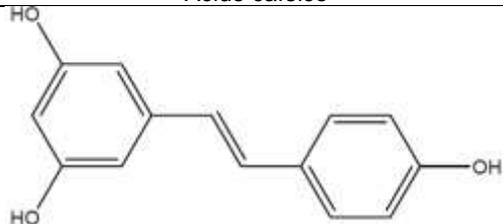
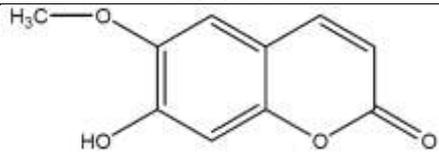
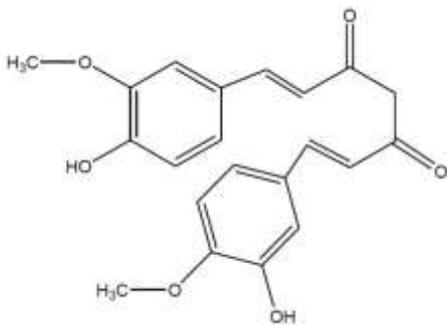
1.3. OS POLIFENÓIS

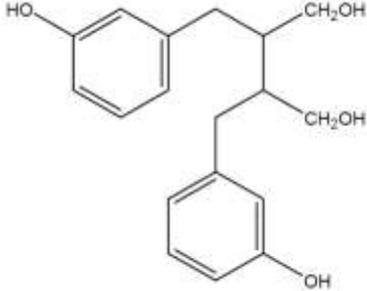
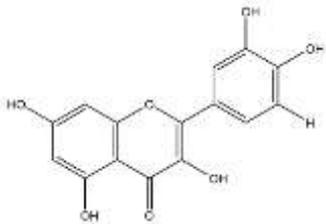
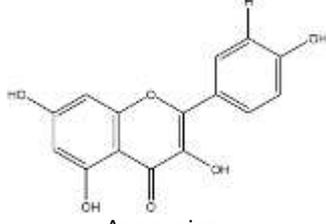
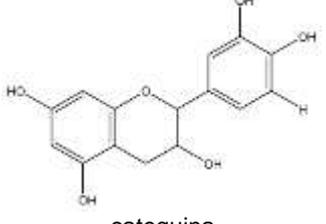
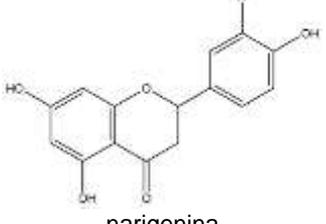
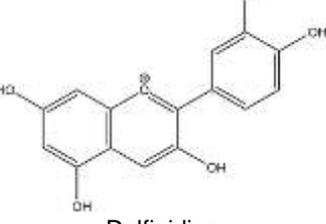
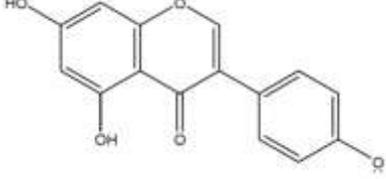
Os compostos polifenólicos, ou simplesmente polifenóis, são metabólitos secundários das plantas e constituem um dos grupos mais comuns e de ampla variedade (DAAYF e LATTANZIO, 2008). Nas plantas estes compostos agem na pigmentação, reprodução, resistências aos patógenos e na proteção contra a radiação ultravioleta e os agentes oxidantes (KING e YOUNG, 1999; FLEURIET e MACHEIX, 2003; DAAYF e LATTANZIO, 2008).

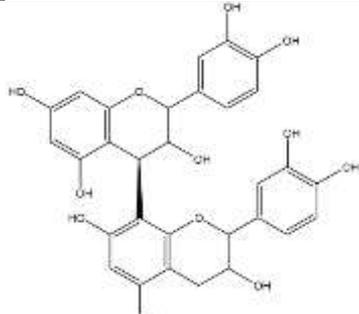
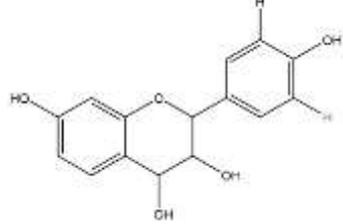
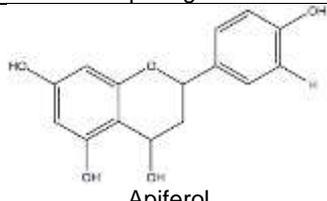
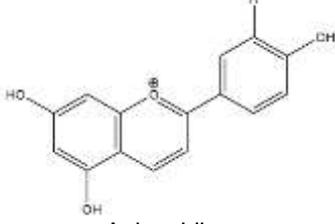
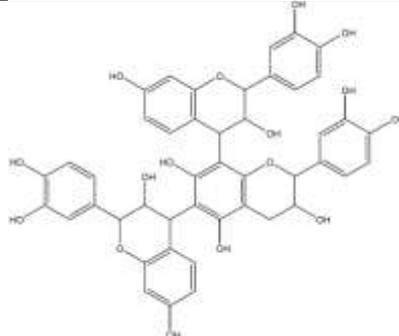
Os polifenóis são derivados cíclicos do benzeno que contêm um ou mais grupos hidroxila associados ao anel aromático (TCKMANTEL, KOZIKOWSKI e ROMANCZYK, 1999). Podem ser divididos em pelo menos dez classes, onde as principais são: os flavonóides, os taninos, os ácidos fenólicos e seus derivados. Na tabela 1.5, são apresentadas as principais classes de polifenóis e suas respectivas estruturas. Estes compostos podem atuar como antioxidantes, hormônios, neurotransmissores e podem também apresentar atividade antiinflamatória, anticarcinogênica, antimutagênica, cardioproteção, antimicrobiana, bactericida, antiviral, antiaterosclerótica, antiproliferativa, imunoestimuladora, além de apresentar propriedades neuroprotetivas e atuar na modulação da função de algumas enzimas (FLEURIET e MACHEIX, 2003; HERMES-LIMA, 2004; DAAYF e LATTANZIO, 2008). Os polifenóis podem ser encontrados principalmente em alimentos de origem vegetal, como frutas,

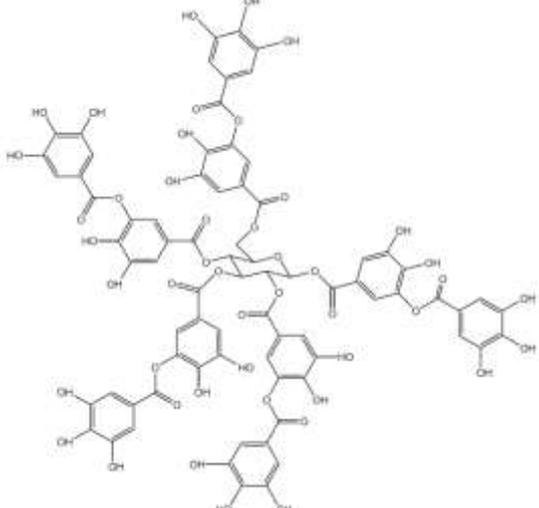
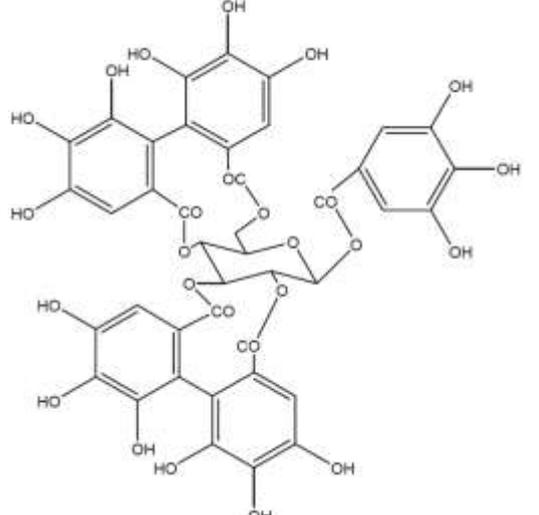
hortaliças, sementes, vinho, cogumelos e café (FLEURIET e MACHEIX, 2003; HERMES-LIMA, 2004; SHILS *et al.*, 2005; DAAFY e LATTANZIO, 2008).

Tabela 1.5: Principais classes de polifenóis e suas respectivas estruturas.

| Classe | Subclasse | Exemplos | Estrutura |
|------------------------------|------------------|---|--|
| Ácidos fenólicos | Hidroxibenzóicos | Ácido gálico, vanílico |  <p>Ácido gálico</p> |
| | Hidroxicinâmicos | Ácido cafeico, ferúlico, sináptico, clorogênico, p-cumárico |  <p>Ácido cafeico</p> |
| Estilbenos/ Antraquinonas | — | Resveratrol |  <p>Resveratrol</p> |
| Cumarinas / isocumarinas | — | Escopoletina |  <p>Escopoletina</p> |
| Diarylheptanos | — | Curcumina |  <p>Curcumina</p> |

| | | | |
|--------------------------|----------------|--------------------------------------|--|
| Lignanas/ Neolignanas | — | Mararesinol, enterodiol |  <p>enterodiol</p> |
| Flavonoides | Flavonois | Quercetina, kaempferol, rutina |  <p>Quercetina</p> |
| | Flavonas | Apegenina |  <p>Apegenina</p> |
| | Catequinas | Epicatequina galato, catequina |  <p>catequina</p> |
| | Flavononas | Hesperetina, narigenina |  <p>narigenina</p> |
| | Antocianidinas | Cianidina, delfinidina |  <p>Delfinidina</p> |
| | Isoflavonas | Genisteína, daidzeína |  <p>Genisteína</p> |

| | | | |
|---------------------|------------------------|----------------------------------|--|
| Taninos condensados | Flavan-3-ols | Epicatequina-(4b>8 catequina) |  <p>Epicatequina-(4b>8 catequina)</p> |
| | Flavan-3,4-ols | Leucopelargonidina, leucianidina |  <p>Leucopelargonidina</p> |
| | Flavan-4-ols | Apiferol, luteoferol |  <p>Apiferol</p> |
| | 3-deoxi-antocianidinas | Apigenidina, luteolinidina |  <p>Apigenidina</p> |
| | 5-deoxi-flavan-3-ols | Profisetinidina |  <p>Profisetinidina</p> |

| | | | |
|-----------------------|--------------|---|--|
| Taninos hidrolisáveis | Galataninos | Pentagaloliglicose, ácido tânico |  <p>ácido tânico</p> |
| | Elagitaninos | Ácido elágico, eugenina, casuarictina |  <p>Ácido elágico</p> |

Adaptado de Ginani (2005)

As principais classes de polifenóis também podem ser definidas de acordo com a natureza do esqueleto de carbono ou através de seu peso molecular (ESCARPA e GONZALEZ, 2001). Através desta classificação pode se observar que os ácidos fenólicos são aqueles que apresentam uma estrutura simples e podem ser divididos em ácidos hidroxicinâmicos e ácidos hidrobenczoicos, ambos classificados como de baixo peso molecular. Flavonóides e taninos, por apresentarem uma estrutura mais complexa, podem ser classificados como de peso molecular intermediário e de alto peso molecular, respectivamente. (ESCARPA e GONZALEZ, 2001; FLEURIET e MACHEIX, 2003)

Tabela 1.6: Classificação dos polifenóis em função do peso molecular

| Peso molecular | Estrutura | Classe |
|----------------------|-------------------|----------------------------|
| Baixo | C_6-C_3 | Ácidos hidroxicinâmicos |
| | C_6-C_1 | Ácidos hidroxibenzoicos |
| Intermediário | $C_6-C_3-C_6$ | Flavonóides |
| | $(C_6-C_1)_n$ | Taninos hidrolisáveis |
| Alto | $(C_6-C_3-C_6)_n$ | Taninos condensados |

Adaptado de Fleuriet e Macheix (2003)

C_6 = Anel aromático

1.3.1 Ácidos hidroxicinâmicos: ácido caféico e 5-cafeolquinico

A maior classe dos compostos fenólicos são os ácidos fenólicos divididos em ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos. Os ácidos hidroxicinâmicos são a maior sub-classe dos compostos fenólicos (MANACH, MAZUR e SCALBERT, 2005; MARQUES e FARAH, 2009), e estes presentes em uma grande variedade de frutas e vegetais, incluindo tomate, espinafre, brócolis, aspargos, uvas brancas, peras e pêssegos (MAURICIO, 2006; MARQUES e FARAH, 2009; SHAHIDI e CHANDRASEKARA, 2010).

Os ácidos fenólicos compreendem cerca de um terço dos compostos fenólicos da dieta humana, e os outros dois terços correspondem aos flavonóides (CLIFFORD, 2000). Porém, essa proporção depende fortemente do consumo de café, uma vez que pessoas que consomem frequentemente esta bebida ingerem mais ácidos fenólicos (no caso, ácidos clorogênicos presentes no café) do que flavonóides (CLIFFORD, 2000). O consumo de café pode acarretar a ingestão de 0,3 a 1,0 g de ácidos clorogênicos, dependendo do tipo e do grau de torrefação do café (CLIFFORD, 2000).

O termo ácido clorogênico foi proposto por Payn em 1846 para designar um composto fenólico com função ácida. Este mesmo composto foi isolado em

1907 e denominado clorogenato de cafeína. Em 1932, Fischer estabeleceu sua estrutura química, denominando-o de ácido 3-cafeoilquínico, hodiernamente conhecido como 5-cafeoilquínico (DE MARIA e MOREIRA, 2004).

Os ácidos clorogênicos são uma família de ésteres formados por determinados ácidos hidroxinâmicos (ácido cafeico, ferúlico, p-cumarico) a partir dos aminoácidos fenilalanina ou tirosina (Figura 1.8) com o ácido quínico, originando uma diversidade de isômeros que se diferem pela posição do grupo hidroxila (FLEURIET e MACHEIX, 2003; DE MARIA e MOREIRA, 2004; MARQUES e FARAH, 2009). As estruturas químicas das moléculas precursoras dos ácidos clorogênicos bem como do ácido cafeico e do ácido 5-*o*-cafeoilquínico (que neste trabalho iremos denominar simplesmente de “ácido clorogênico” – CLA – que é o único tipo de ácido clorogênico disponível comercialmente) estão apresentadas na figura 1.9.

Dentre os ácidos clorogênicos, o CLA é um éster formado a partir do ácido quínico e o ácido cafeico, sendo um dos compostos mais abundantes e encontrados nos alimentos de origem vegetal. Tanto o ácido cafeico o CLA são estáveis em temperaturas moderadas, sendo facilmente oxidado em pH superior a 8,0 (CILLIERS e SINGLETON, 1989).

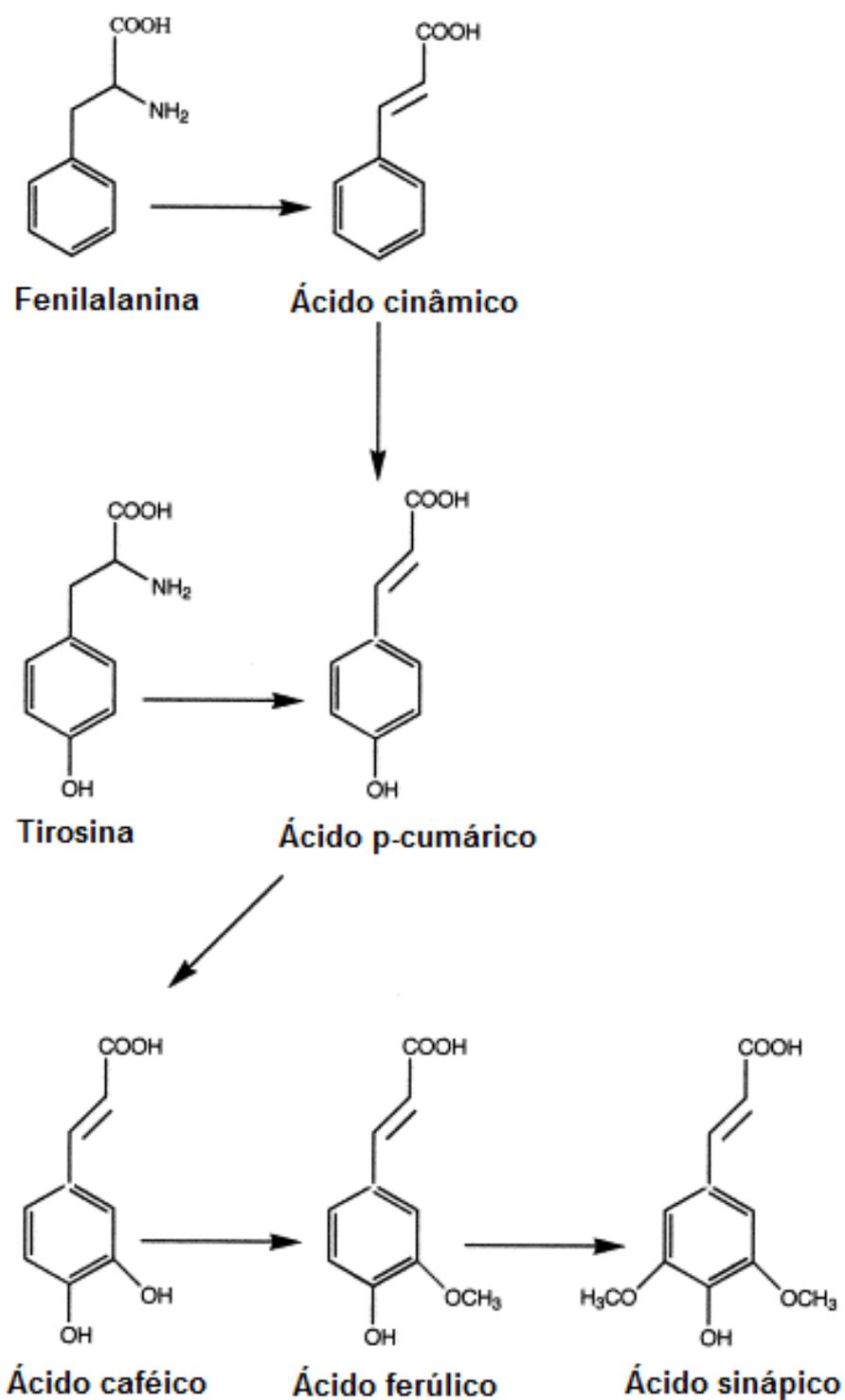
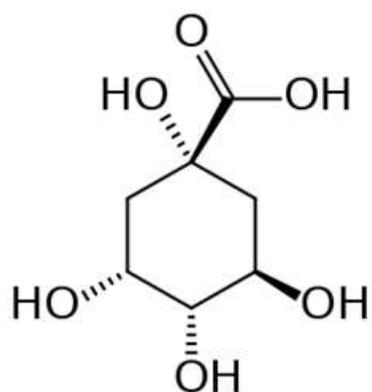
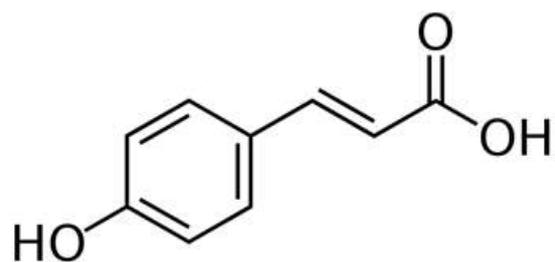


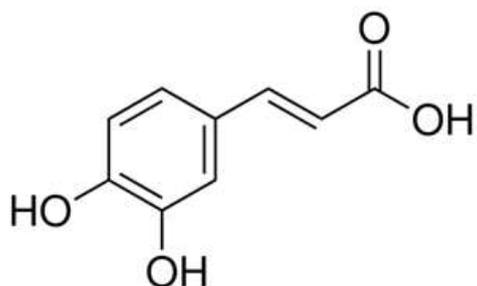
Figura 1.8: Síntese dos ácidos hidroxinâmicos



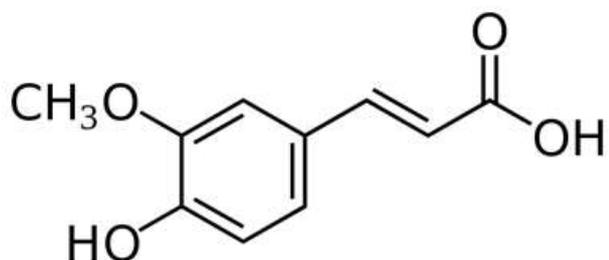
Ácido quínico



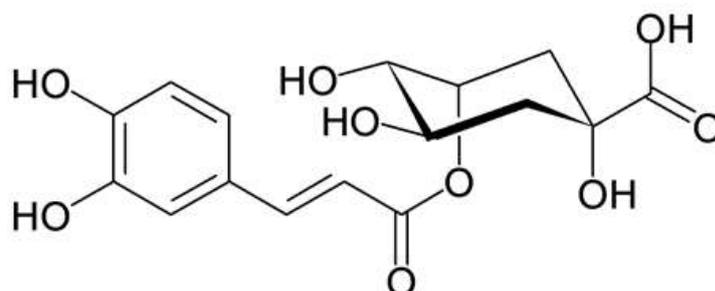
Ácido p-cumárico



Ácido cafeico (CAF)



Ácido ferrúlico



**Ácido 5-O-cafeoilquínico
(Ácido clorogênico - CLA)**

Figura 1.9: Estrutura química dos precursores do ácido clorogênico e do ácido cafeico

1.3.2 Metabolismo dos ácidos fenólicos

A principal fonte de ácidos clorogênicos na dieta ocidental é o café (DOREA e DA COSTA, 2005; DUTRA, HOFFMANN-RIBANI e RIBANI, 2010). No entanto, outras bebidas de consumo regional, como o chimarrão, preparado com a erva mate, (*Ilex paraguariensis*), também é fonte desses compostos na dieta (DUTRA, HOFFMANN-RIBANI e RIBANI, 2010)

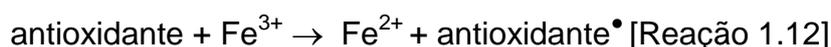
Ensaio em animais com infusão gástrica de ácido clorogênico e dos ácidos ferúlico, *p*-cumárico e cafeico isoladamente mostram que a absorção destes ácidos fenólicos se inicia no estômago, onde uma pequena parcela é absorvida de forma intacta. Os compostos não absorvidos no estômago seguem para o intestino delgado, onde os ácidos hidroxicinâmicos livres (ácidos ferúlico, *p*-cumárico e cafeico), provenientes dos alimentos, são rapidamente absorvidos (MANACH *et al.*, 2005). De acordo com Olthof *et al.*, (2003) os ácidos clorogênicos não são bem absorvidos pelo intestino delgado e se tornam disponíveis para serem metabolizados na microflora do colón.

No colón, cerca de dois terços dos ácidos clorogênicos ingeridos que alcançaram a microflora do colón, são degradados em seus metabolitos (ácido cafeico e ácido quínico) (OLTHOF, HOLLMAN e KATAN, 2001; OLTHOF *et al.*, 2003). Após a clivagem, os ácidos fenólicos livres podem seguir por duas rotas: absorção pela mucosa intestinal e passagem para a corrente sanguínea na forma livre ou após conjugação com outros compostos, sendo esta catalisada enzimaticamente ou podem permanecer no cólon, sofrendo metabolização adicional pela microflora (OLTHOF, HOLLMAN e KATAN, 2001; OLTHOF *et al.*, 2003; MANACH, MAZUR e SCALBERT, 2005; MANACH *et al.*, 2005). De acordo com Oliveira e Bastos (2011), os ácidos clorogênicos são absorvidos apenas por transporte paracelular, enquanto os ácidos hidroxicinâmicos livres são absorvidos também por transporte ativo mediado por transportadores de ácidos monocarboxílicos (MCT). Estes transportadores estão presentes na mucosa gastrointestinal e em diversos tecidos.

1.3.3 Propriedades antioxidantes dos ácidos clorogênicos

Na literatura há diversos estudos (FLEURIET e MACHEIX, 2003; OLTHOF *et al.*, 2003; KAHLE, KRAUS e RICHLING, 2005; MANACH, MAZUR e SCALBERT, 2005; SCALBERT *et al.*, 2005) relatando os efeitos antioxidantes dos compostos fenólicos.

A habilidade dos compostos fenólicos dietéticos atuarem como antioxidantes ou prooxidantes em sistemas *in vitro* ou *in vivo* é dependente de diversos fatores como: concentração da molécula a ser estudada, estrutura do composto, o sistema gerador de oxirradicais utilizado e o tipo de substrato (alvo radicalar) que irá ser protegido. Entretanto, alguns compostos antioxidantes podem exercer efeitos prooxidantes devido à interação entre o composto e metais de transição – um exemplo é o efeito do ácido tânico sobre a oxidação de DNA. Neste caso é antioxidante na presença de íons ferro e prooxidante na presença de íons cobre (ANDRADE *et al.*, 2005; ANDRADE *et al.*, 2006). Em determinadas condições, por exemplo, o composto (originalmente “antioxidante”) pode reduzir o íons férricos e com isso estimular o dano oxidativo por meio de reação de Fenton.



A literatura demonstra que os ácidos clorogênicos possuem efeitos benéficos sobre diferentes fisiopatologias, sendo a sua ação antioxidante a mais estudada. O mecanismo antioxidante está relacionado à sua capacidade interromper reações dos radicais livres pela doação de hidrogênio, seqüestro de EROs, ação anti-peroxidativa (MATTOS, 2009) e a redução ou a formação de complexos de coordenação com íons metálicos, indisponibilizando-os para reações radicalares. O estudo desenvolvido por Mattos (2009), demonstrou a formação de complexo de coordenação entre o CAF e o Fe^{2+} , indisponibilizando o íon metálico para a reação de Fenton, conseqüentemente, a formação de radicais HO^{\bullet} . Além das propriedades citadas anteriormente, os

ácidos clorogênicos podem modular a ação de diversas enzimas, assim como a expressão de diversos genes. (KITTS e WIJEWICKREME, 1994; JOHNSTON, CLIFFORD e MORGAN, 2003; FENG *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2012).

Diversos estudos na literatura reportam que o ácido clorogênico e o ácido caféico apresentam propriedades antioxidantes (DAAYF e LATTANZIO, 2008; MARQUES e FARAH, 2009) em temperatura ambiente (25°C). Nardini *et al* (1995) e Laranjinha (1994) demonstraram em seus trabalhos que o CAF pode aumentar a resistência da lipoproteína de baixa densidade (LDL) à peroxidação lipídica, sendo esta relacionada à sua capacidade de sequestrar os radicais livres gerados na fase aquosa.

o estudo realizado por Maurya (2010), demonstrou que o CAF inibiu de forma dependente da concentração os danos oxidativos em linfócitos de ratos causado por 2'-2'-azobis 2-amidino propano hidrocloreto (AAPH) . Além disso, verificou-se que tanto o ácido cafeico como o ácido ferrulico inibem de forma concentração dependente a formação de óxido nítrico utilizando o gerador nitroprussiato de sódio (SNP). De acordo com esses autores, o ácido cafeico apresenta atividade antioxidante em diversos sistemas *in vitro*, contra EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs).

2. Objetivos

A literatura apresenta diversos trabalhos que demonstram que o ácido cafeico e ácido clorogênico apresentam atividade antioxidante *in vivo* e *in vitro*. Tem o interesse em esclarecer melhor o mecanismo de ação do ácido cafeico (CAF) e do ácido 5-O-cafeoilquínico (ácido clorogênico - CLA) em processos oxidativos envolvendo sistemas geradores de radical livres com e sem dependência de metal. Neste sentido, essa dissertação foi dividida em 3 capítulos:

Capítulo 1: Análise do potencial antioxidante do ácido cafeico (CAF) em sistemas geradores de oxi-radicais mediados por Fe^{III} -EDTA

Objetivos específicos: I- determinar a capacidade antioxidante do CAF na degradação oxidativa da 2-Desoxi-D-ribose mediado por radicais hidroxila; II- determinar o efeito da adição de Fe^{III} -EDTA ao perfil espectral do CAF e do CLA; III- Cinética de formação do radical ascorbil.

Capítulo 2: Análise do potencial antioxidante do ácido cafeico (CAF) e do ácido 5-O-cafeoilquínico (ácido clorogênico - CLA) em sistemas geradores de radicais livres mediado por Cu^{2+} na presença de ascorbato

Objetivos específicos: I- determinar a capacidade antioxidante do CAF e do CLA na degradação oxidativa da 2-Desoxi-D-ribose mediado por radicais hidroxila; II- determinar o efeito da adição de Cu^{2+} ao perfil espectral; III- Cinética de formação do radical ascorbil, IV- na hidroxilação do ácido tereftálico

Capítulo 3: Análise do potencial antioxidante do ácido cafeico (CAF) e do ácido 5-O-cafeoilquínico (ácido clorogênico - CLA) em sistema lipofílico na presença de azo composto hidrossolúvel 2'-2'-azobis 2-amidino propano hidrocloreto (AAPH)

Objetivos específicos: I- Estudar através da técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) a variação do grau de organização das membranas de eritrócitos comparando o efeito de diversos agentes antioxidantes entre eles o CAF e o CLA.

3. Material e métodos

3.1 MATERIAL

3.1.1 Reagentes e soluções

3.1.1.1 Reagentes

Foram utilizados reagentes de qualidade analítica adquiridos da Sigma Chemical Co.: 2'-2'-azobis 2-amidino propano hidrocloreto (AAPH), 2-amino-2-(hidroximetil) 1,3-propanodiol (Tris), 2-Desoxi-D-ribose (2-DR), 2-β-mercaptoetanol, 5-Doxil estearato (5-DSA), 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico (Trolox®), ácido acético, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido etileno diamino tetracético (EDTA), ácido nitrilotriacético (NTA), ácido tereftálico (TPA), ácido tiobarbitúrico (TBA), acrilamida, albumina bovina sérica (BSA), alfa-tocoferol, ascorbato, azul de bromofenol, bis-acrilamida, butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), glicerol, glicina, *lauril sulfato de sódio (SDS)*, *N,N,N,N'-Tetrametiletilenodiamina (Temed)*, persulfato de amônia, sulfato de cobre (CuSO₄), triptofano, β-lactoglobulina; Vetec: cloreto férrico (FeCl₃·6H₂O), etanol, ácido fosfórico; Merck Inc.: hidróxido de sódio J.T. Baker: metanol ; Fisher: citrato de sódio.

3.1.1.2 Soluções

O preparo das principais soluções usados na elaboração dessa dissertação encontra-se descrito a seguir.

3.1.1.2.1. 2-Desoxi-D-ribose

As soluções de 2-desoxi-D-ribose foram preparadas em água deionizada apresentando resistividade maior que 18,2 M Ω , utilizando o sistema Pall (Pall Corporation - USA), em seguida as soluções eram esterilizadas em filtros Millex GV (Millipore Corporation - USA) com membrana em fluoreto de polivinilideno (PVDF), com área de filtração de 4,5 cm² e poros de 0,22 μ m. Posteriormente, foram armazenadas a 6°C para futuras utilizações. As soluções estoque apresentavam concentração de 50 mM para os experimentos de rotina e de 250 mM para os experimentos no qual se tinha como objetivo de variar a concentração do alvo.

3.1.1.2.2 Cobre(II)

As soluções contendo cobre, foram preparadas diariamente em HCl 10 mM. As soluções estoque apresentavam concentração de 0,5 mM.

3.1.1.2.3 Ácido cafeico e ácido clorogênico

As soluções de CAF e CLA foram preparadas diariamente em água deionizada apresentando resistividade de 18,2 M Ω ·cm, utilizando o sistema Pall (Pall Corporation - USA), em seguidas submetidas à sonicação no banho ultrassônico Branson modelo 2510 (Branson Ultrasonics Corporation - USA) com frequência de 40 kHz, durante dois minutos com temperatura de 30°C \pm 5°C, para os dois compostos. As soluções estoques apresentavam concentrações de 2 mM e eram preparadas minutos antes de serem realizados os experimentos.

3.1.1.2.4 Ascorbato

Para preparação das soluções de ascorbato foi utilizado *ácido L-ascórbico* com partículas com tamanho aproximado de *325 mesh solubilizado* em água deionizada apresentando resistividade de 18,2 M Ω ·cm, utilizando o sistema Pall (Pall Corporation - USA), sendo preparadas diariamente minutos antes de serem feitos os experimentos. As soluções estoques apresentavam concentrações de 5 mM para os experimentos.

3.1.1.2.5 Ácido tereftálico

As soluções de ácido tereftálico (TPA) foram solubilizadas em tampão fosfato 2 mM pH 7,2, sendo preparadas a cada dois dias. As soluções estoque apresentavam concentrações de 125 μ M. De acordo com Linxiang e colaboradores (2004) o TPA pode ser armazenado durante alguns dias na geladeira sem a perda de suas propriedades

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Degradação da 2-Desoxi-D-ribose

Método espectrofotométrico tem como objetivo determinar a degradação oxidativa da 2-DR mediada por espécies reativas de oxigênio, em especial o radical hidroxil, de forma indireta. A reação do radical hidroxil com a 2-DR

forma diversos compostos dentre estes o malonildialdeído (MDA), um composto de três carbonos (Figura 3.1).

A quantificação do MDA foi feita utilizando o ácido tiobarbitúrico (TBA) que em meio ácido, após aquecimento durante 15 min a 98 °C forma um cromóforo (MDA-TBA₂) com pico de absorção em λ 532 nm e coeficiente de absorvidade molar (ϵ) 14.900 M/cm (GUTTERIDGE, 1981; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007) (Figura 3.2). Após retornar a temperatura ambiente, foi feita a quantificação espectrofotométrica do aduto MDA-TBA₂ no espectrofotômetro Hitachi-U 2000 (*Hitachi Corporation, Japão*) ou no espectrofotômetro multifuncional EspectramaxM2e[®] (Molecular Devices, USA).

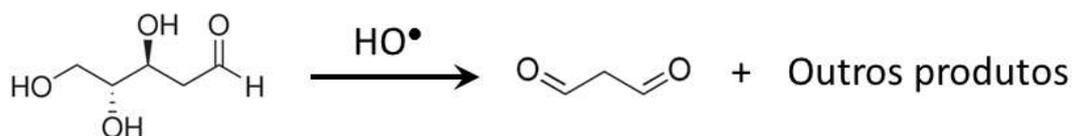


Figura 3.1: Degradação oxidativa da 2-DR mediada pelo radical hidroxil.

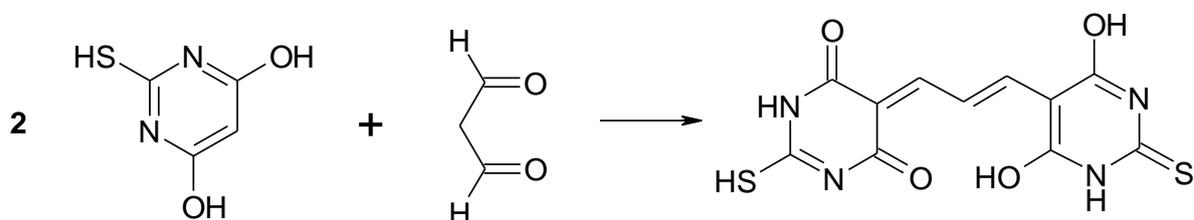


Figura 3.2: Formação do cromóforo a partir da reação do TBA com MDA.

Os meios reacionais eram compostos por tampão fosfato 20 mM pH 7,2, 2-DR 50 mM, Fe^{III}-EDTA (estequiometria 1:1) ou Cu²⁺ em concentrações variadas (0 – 50 μ M) e ácido cafeico, ácido clorogênico em concentrações variadas (0 - 500 μ M) com volume final de 0,5 mL. A reação foi iniciada pela adição de ácido ascórbico 0,5 mM ao meio reacional. Para cada ensaio era utilizado branco ou tempo zero no qual o TBA 1% solubilizado em NaOH 50 mM e o H₃PO₄ 4% eram acrescentados ao meio antes do ascorbato, impedindo o início da reação. Os valores de absorbância obtidos nos ensaios

eram descontados dos valores dos respectivos brancos, a fim de que apenas o efeito da reação no experimento proposto fosse estudado (GENARO-MATTOS *et al.*, 2009).

A porcentagem de proteção das moléculas analisadas foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de proteção} = \left[1 - \frac{\textit{ensaio teste} - \textit{branco do ensaio teste}}{\textit{controle positivo} - \textit{branco do controle positivo}} \right] \times 100$$

3.2.2 Espectroscopia ultravioleta (UV) visível (Vis)

Espectroscopia ultravioleta (UV) visível (Vis), também chamada de espectroscopia eletrônica, é uma técnica largamente utilizada para identificação e determinação de diversas espécies orgânicas e inorgânicas e suas reações (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2009). Consiste na observação da radiação eletromagnética nas regiões visível (Vis) e do ultravioleta (UV). Onde as alterações espectrais demonstram as modificações sofridas pelo composto estudado, sendo possível determinar o mecanismo de ação antioxidante da molécula.

Os meios reacionais eram compostos por tampão fosfato 20 mM pH 7,2, 2-DR 50 mM, Fe^{III}-EDTA (estequiometria 1:1) ou Cu²⁺ em concentrações variadas (0 – 50 µM) e ácido cafeico, ácido clorogênico (500 µM) com volume final de 0,2 mL. A obtenção dos espectros era realizada dez minutos após a adição da solução de Cu²⁺ ou Fe^{III}-EDTA no meio reacional e os espectros obtidos no leitor de microplaca multifuncional SpectramaxM2e[®] (Molecular Devices, USA). O intervalo de varredura foi de 2nm.

3.2.3 Ressonância paramagnética eletrônica do radical ascorbila

O radical ascorbila foi obtido neste trabalho a partir da reação [3.1], sendo este um radical que apresenta uma meia vida relativamente longa quando comparados a outros radicais como hidroxila, peroxila, radicais centrados de carbono. Podendo ser detectado facilmente com o uso da ressonância paramagnética eletrônica (RPE) (BUETTNER e JURKIEWICZ, 1993).

Segundo Buettner e Jurkiewicz (1993) o radical ascorbila pode ser utilizado em estudos envolvendo sistemas biológicos como indicativo de estresse oxidativo (Ex.: em tecidos liofilizados, no metabolismo de xenobióticos pelo fígado e em estudos de isquemia e reperfusão) (BUETTNER e JURKIEWICZ, 1993; SHARMA *et al.*, 1994; BUETTNER e JURKIEWICZ, 1996). E em sistemas químicos como no caso dos trabalhos já desenvolvidos anteriormente em nosso laboratório no qual foi verificada a interferência de compostos polifenólicos na formação do radical ascorbila em sistemas geradores de radical dependente de metal (Ex.: Cobre²⁺ ou Fe³⁺ + ascorbato) (ANDRADE JR, 2004; GINANI, 2005; MAURICIO, 2006).



A reação [3.2] de dismutação do ascorbil gerando deidroascorbato (DHA) em pH 7,4 é uma cinética de segunda ordem de aproximadamente $2,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, sendo possível a determinação da meia-vida para o radical em 50 segundos, considerando-se uma concentração inicial de 10^{-7}M (BUETTNER e JURKIEWICZ, 1993).



Os meios reacionais eram compostos por tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,2, Cu^{2+} em concentrações variadas (0 – 50 μM) ou Fe^{III} -EDTA (50 μM) (estequiometria 1:1), CAF e CLA em concentrações variadas (0 - 500 μM) com volume final de 0,5 mL. A reação foi iniciada pela adição de ácido ascórbico 0,5 mM ao meio reacional. Em seguida, foram transferidos 0,2 mL para um capilar, que foi colocado no espectrômetro para o início da análise. A obtenção dos espectros era realizada três minutos após adição da solução de ascorbato no meio reacional. Na figura 3.3 pode-se observar a representação gráfica do espectro do radical ascorbil, obtido neste trabalho.

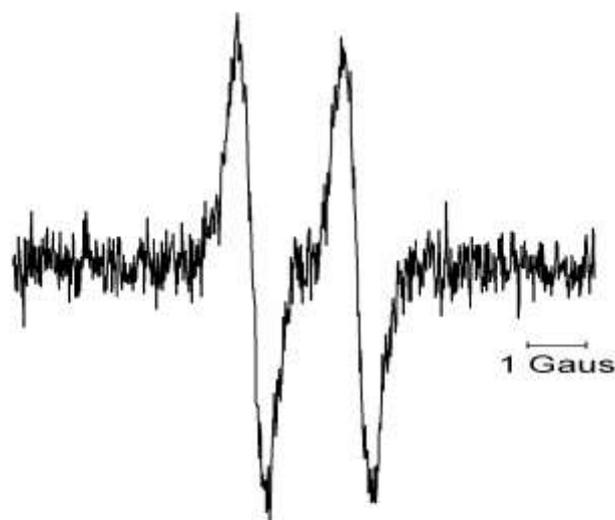


Figura 3.3: Representação do espectro do radical ascorbil

3.2.3.1 Mensuração do sinal do radical ascorbil

Os valores dos sinais de RPE foram obtidos através da primeira linha de ressonância do radical ascorbil após a obtenção de dois espectros e posteriormente convertidas para unidades relativas, sendo descontado o ruído de 0,5 unidades arbitrárias.

3.2.3.2 Condições operacionais do espectrômetro de RPE

As medidas de RPE foram realizadas utilizando um espectrômetro de ressonância paramagnética eletrônica marca Bruker modelo ESP 300 equipado com a cavidade de ressonância padrão, ER4102 ST, localizado no laboratório de ressonância paramagnética no Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás (IF-UFG) em colaboração com o Prof. Dr. Antonio Alonso. As condições experimentais foram: temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), frequência das microondas de 9,8 GHz (Banda-X), modulação de frequência de 100 kHz, potência de 2 mW, amplitude da modulação de 0,638 G e ganho de 1×10^5 .

3.2.4 Hidroxilação do ácido tereftálico

Trata-se de um método fluorométrico que tem como princípio quantificar a formação de radicais OH. Podendo este método ser utilizado tanto em experimentos *in vivo* como *in vitro* (MISHIN e THOMAS, 2004; YAN *et al.*, 2005). Devido ao seu curto tempo de vida e sua alta reatividade a direta mensuração do OH é praticamente inviável. Por isso se usa agentes seqüestradores de radical nesse caso o ácido tereftálico (TPA) que é uma molécula que apresenta em sua estrutura dois grupos carboxila na cadeia lateral ligados ao anel de seis carbonos, nas posições 1 e 4 formando composto estruturalmente simétrico, que não apresenta fluorescência. Quando hidroxilado o TPA forma apenas um estereoisômero hidroxilado, o composto 2-hidroxi-tereftálico (2-OH-TPA) que é altamente fluorescente e facilmente distinguível da molécula precedente (Figura 3.4) (BARRETO *et al.*, 1995; SARAN e SUMMER, 1999; LINXIANG *et al.*, 2004; YAN *et al.*, 2005). Sendo esta proporcional à quantidade de OH formado no meio (LINXIANG *et al.*,

2004), além de ser um detector muito específico de radicais hidroxil (BARRETO *et al.*, 1995).

De acordo com Yan e colaboradores (2005) o TPA é muito reativo com OH com uma taxa de hidroxilação mais rápida do que os outros agentes trapeadores (Ex.: ácido salicílico, fenilalanina). Apresenta uma eficiência, ou seja, o aumento relativo de fluorescência por hidroxilação é cerca de três vezes maior do que o método de hidroxilação do ácido salicílico e cerca de cem vezes maior do que a do hidroxilação de fenilalanina (SARAN e SUMMER, 1999). Além do mais o TPA normalmente não está presente nos tecidos e muito menos envolvido em processos bioquímicos (YAN *et al.*, 2005).

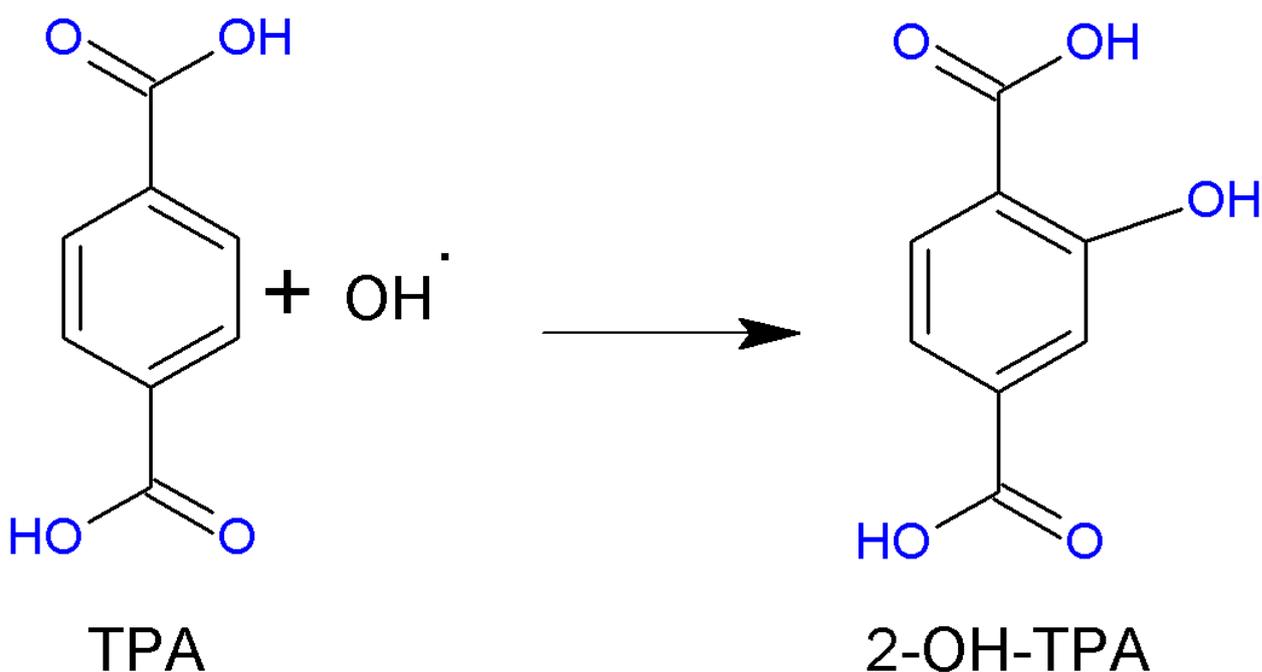


Figura 3.4: Hidroxilação do ácido tereftálico

O sistema gerador de radical hidroxil foi formado por íons Cu^{2+} tendo como agente redutor o ascorbato. A cinética de hidroxilação do ácido tereftálico foi observada por intermédio do aparecimento do pico de emissão do 2-hidroxi tereftálico em λ_{ex} : 315 nm e emissão em λ_{em} : 420 nm (MISHIN e THOMAS, 2004), sendo obtido com auxílio do leitor de microplaca

multifuncional EspectramaxM2e[®] (Molecular Devices, USA). A leitura foi feita trinta minutos após o início da reação, sendo esta realizada dentro da fase linear da reação de acordo com resultados preliminares. Também foi realizado o espectro de excitação do TPA no qual se variava o comprimento de onda da excitação de λ_{ex} : 250 nm até λ_{ex} : 395 nm e a emissão fixada em λ_{em} : 420 nm. A temperatura dentro do espectro em todos os experimentos foi de $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

Os meios reacionais eram compostos por tampão fosfato 20 mM pH 7,2, ácido tereftálico 125 μM , Cu^{2+} em concentrações variadas (0 – 50 μM), CAF e CLA em concentrações variadas (0 - 500 μM) com volume final de 0,2 mL. A reação foi iniciada pela adição de ácido ascórbico 0,5 mM ao meio reacional

3.2.8 Análise estatística

As análises estatísticas, quando necessárias, foram realizadas com o auxílio do software SPSS (Statistical Package for Social Sciences), versão 17.0 (Chicago, IL, USA, 2008). Foram realizadas tais análises somente nos pontos onde a diferença estatística era importante para a interpretação dos resultados. Nestes pontos foram aplicados os testes t-student ou ANOVA com o pos-teste de Student Newman Keuls (SNK).

4 Análise do potencial antioxidante do ácido cafeico (CAF) em sistemas geradores de oxi-radicais mediados por Fe^{III}-EDTA

4.1 INTRODUÇÃO

As pesquisas demonstram que os compostos fenólicos podem atuar como seqüestradores de radicais livres (*scavengers*), protegendo as moléculas do organismo por meio de um mecanismo de competição pelo alvo (HERMES-LIMA, 2004; DAAYF e LATTANZIO, 2008), ou atuando como quelantes, coordenando íons metálicos de elementos de transição (HERMES-LIMA, 2004; DAAYF e LATTANZIO, 2008). O estudo acerca dos mecanismos de atividade antioxidante de diversos compostos como por exemplo o ácido cafeico foi iniciado em nosso grupo de pesquisa há alguns anos. Lopes, Schulman e Hermes-Lima (1999) demonstraram a atividade antioxidante do ácido tânico em sistemas geradores de radicais mediados por reação de Fenton (FIGURA 4.1). Maurício (2006) relatou a atividade antioxidante do CAF em sistemas contendo Fe²⁺ e H₂O₂, além de ter realizado um estudo detalhado da quelato formado entre o íon ferro(II) e o CAF em diferentes condições de pH. Mattos (2009) descreveu que a atividade antioxidante do CAF é devida, principalmente, ao mecanismo quelante desse composto. Ainda nesse estudo, Mattos verificou que o CAF possui uma atividade antioxidante significativamente maior no ensaio da peroxidação lipídica quando comparado ao ensaio da 2-DR. Nesses estudos foi destacada a propriedade quelante deste polifenól ao inibir a degradação oxidativa da 2-DR. Frente a esses estudos anteriores, o presente trabalho propõe analisar o potencial antioxidante do CAF em sistemas geradores de espécies reativas de oxigênio mediados por Fe^{III}-EDTA e ascorbato.

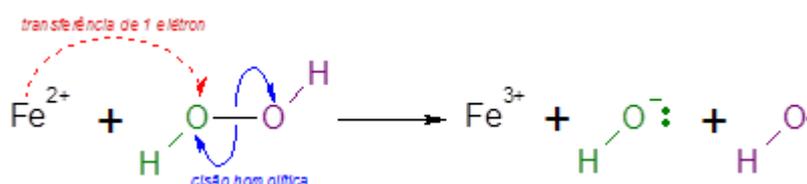


Figura 4.1: Reação de Fenton: É a decomposição do peróxido de di-hidrogênio (H₂O₂) dependente de íons ferro(II) que gera o radical altamente reativo hidroxila (HO•), possivelmente via um intermediário de oxo-ferro(IV) (FeIV=O) .

4.2 METODOLOGIAS UTILIZADAS

- Degradação oxidativa da 2-desoxirribose (2-DR) (vide seção 3.2.1)
- Espectroscopia ultravioleta (UV) e visível (Vis) (vide seção 3.2.2)
- Ressonância paramagnética eletrônica (RPE) do radical ascorbila (vide seção 3.2.3)

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Primeiramente foi estudada a cinética da reação de degradação oxidativa da 2-DR mediada por íon Fe^{3+} livre e na presença de quelantes com diferentes constantes de estabilidade (EDTA, NTA e citrato em estequiometria 1:1 com Fe^{III}). As constantes de estabilidade dos compostos de coordenação com o Fe^{3+} e diferentes ligantes, incluindo os quelantes utilizados, são apresentados na tabela 4.1.

Os resultados obtidos na figura 4.2 indicam que a reação de degradação oxidativa da 2-DR mediada por Fe^{III} -EDTA e ascorbato apresentou acentuado dano oxidativo em relação às reações mediadas por Fe^{III} -NTA e Fe^{III} -citrato. De acordo com a literatura, apesar de o EDTA quelar íons Fe^{3+} ele não consegue bloquear a degradação da 2-DR. Isso se deve a uma reação sítio-específica, permitindo que o ferro(III) seja reduzido por ascorbato (ARUOMA, 1994). Ainda na figura 4.2 verifica-se que a reação de degradação oxidativa da 2-DR mediada por Fe^{3+} -EDTA apresentou-se linear até os 40 minutos, sendo então estipulado o tempo de 30 minutos para os demais experimentos por este se encontrar dentro da fase linear da reação.

Observa-se ainda na figura 4.2 um pequeno dano oxidativo à 2-DR na presença de Fe^{3+} livre. De acordo com Halliwell (1995) e Mattos (2009), isso ocorre devido à coordenação do íon Fe^{3+} à 2-DR. Mattos (2009) relata em seu estudo que ao se utilizar Fe^{3+} no método da degradação oxidativa da 2-DR,

devem ser realizados os controles apropriados devido a essa interferência direta, o que pode acarretar interpretação incorreta dos mecanismos de atividade antioxidante dos compostos estudados.

Tabela 4.1: Constante de estabilidade de compostos de coordenação com ferro(III)

| Ligante | log <i>K</i> | Ligante | log <i>K</i> |
|-------------------------|--------------|-------------------------|--------------|
| Ácido fórmico | 3,1 | EGTA | 20,5 |
| Histamina | 3,72 | Transferrina | 20,9 |
| Fosfato | 9,35 | Pirofosfato | 22,2 |
| Glicína | 10 | Ferricromo | 24,6 |
| Citrato | 11,47 | EDTA | 25,14 |
| Ácido cítrico | 11,85 | Desferricromo | 29,0 |
| NTA | 15,87 | DCTA | 29,3 |
| SSA | 16,3 | TTAH | 29,4 |
| Ácido salicílico | 16,35 | CDTA | 30,1 |
| Ácido gálico | 19,21 | Desferroxamina E | 32,5 |
| HEDTA | 19,7 | Enterobactina | 52 |

CDTA: ácido 1,2-ciclohexdiaminotetraacético; SSA: sulfossalicilato de amônio; DCTA: ácido *trans*-1,2-diaminociclohexano-*N,N,N',N'*-tetracético monohidratado; NTA: ácido nitrilotriacético; HEDTA: ácido *hidroxietilenodiaminotetracético*; EDTA: ácido etilenodiaminotetracético; EGTA: ácido etilenoglico-bis(β -amino éter) *N,N,N',N'*-tetracético; TTAH: ácido trietilenotetramino-hexaacético. (FURIA, 1980; FRANCIS e DODGE, 1993; KATSUÓKA, 1996; EL-AYAAN, F. JAMESON e LINERT, 1998; WIDMER, 2001; HYNES e O'COINCEANAINN, 2004; PATTON, 2011)

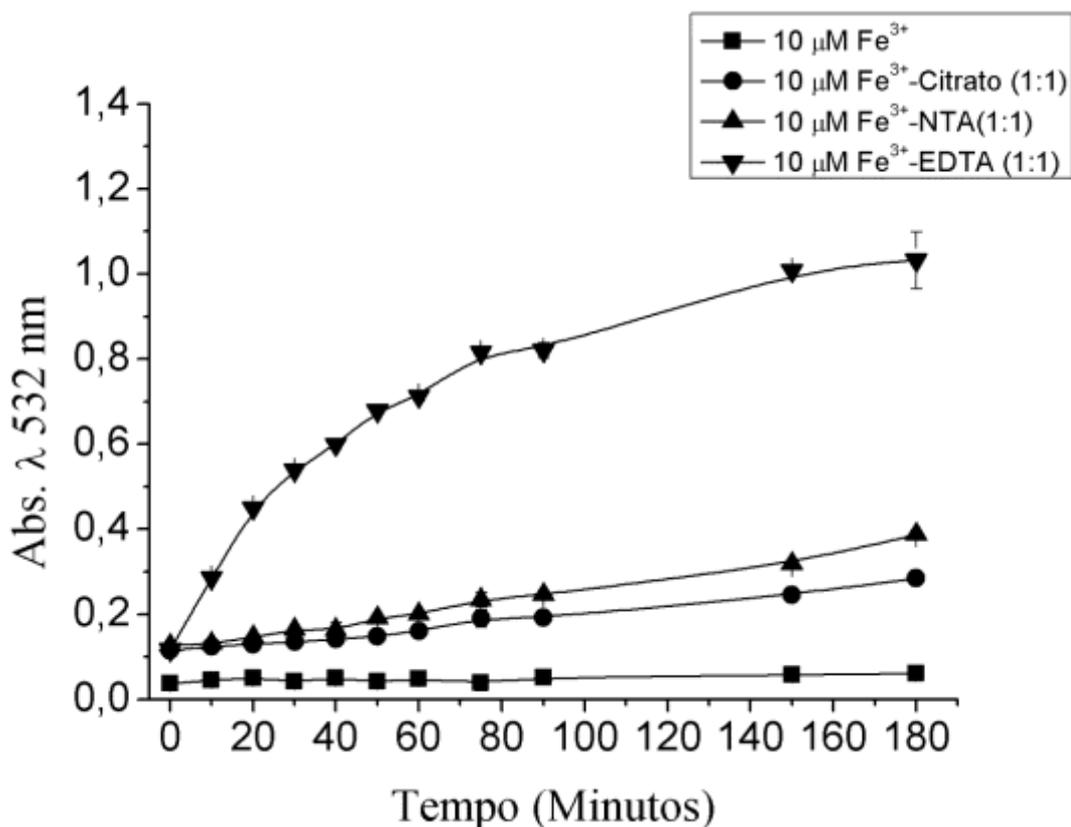


Figura 4.2: Cinética da degradação oxidativa da 2-DR (5 mM) mediada por íons Fe³⁺ (10 μM) e diferentes quelantes (NTA, citrato, EDTA em estequiometria 1:1) na presença de ascorbato (0,5 mM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 7,2. Legenda: ■ Fe³⁺; ● Fe^{III}-NTA; ▲ Fe^{III}-citrato; ▼ Fe^{III}-EDTA. Os reagentes foram pré-incubados por 30 minutos antes da adição de ascorbato. Os valores acima representam a média ± DP (n = 3).

Após estabelecido o tempo de reação de 30 minutos, foram realizados os ensaios para verificar o mecanismo de ação do CAF em sistemas envolvendo íons Fe³⁺ na presença EDTA e citrato. Primeiramente foi realizado o ensaio com Fe^{III}-EDTA e Fe^{III}-citrato (estequiometria 1:1), variando-se a concentração de 0 a 50 μM e mantendo-se constante a concentração do CAF (200 μM). Esse ensaio é de fundamental importância para a caracterização do mecanismo de ação de compostos antioxidantes como o ácido cafeico, pois permite distinguir o mecanismo antioxidante quelante de íon metálico do mecanismo sequestrador de radicais OH.

Para a caracterização do mecanismo de ação do CAF como antioxidante foram utilizados dois quelantes com diferentes constantes de estabilidade com

Fe^{III} . Ao se utilizar um quelante que apresenta elevada constante de estabilidade como o EDTA, espera-se observar reduzido percentual de proteção ao dano oxidativo. Para quelatos com constantes de estabilidade menores, como o Fe^{III} -citrato, o percentual de proteção deveria ser mais elevado. Quanto maior a constante de estabilidade, mais difícil e demorada seria a dissociação do íon metálico do quelato. Os resultados obtidos indicam que o CAF apresenta um possível mecanismo antioxidante do tipo quelante de íons metálicos. No caso de substâncias com características sequestradoras de radicais HO^\bullet não haveria diferença no percentual de proteção entre os co-quelantes utilizados (EDTA e citrato).

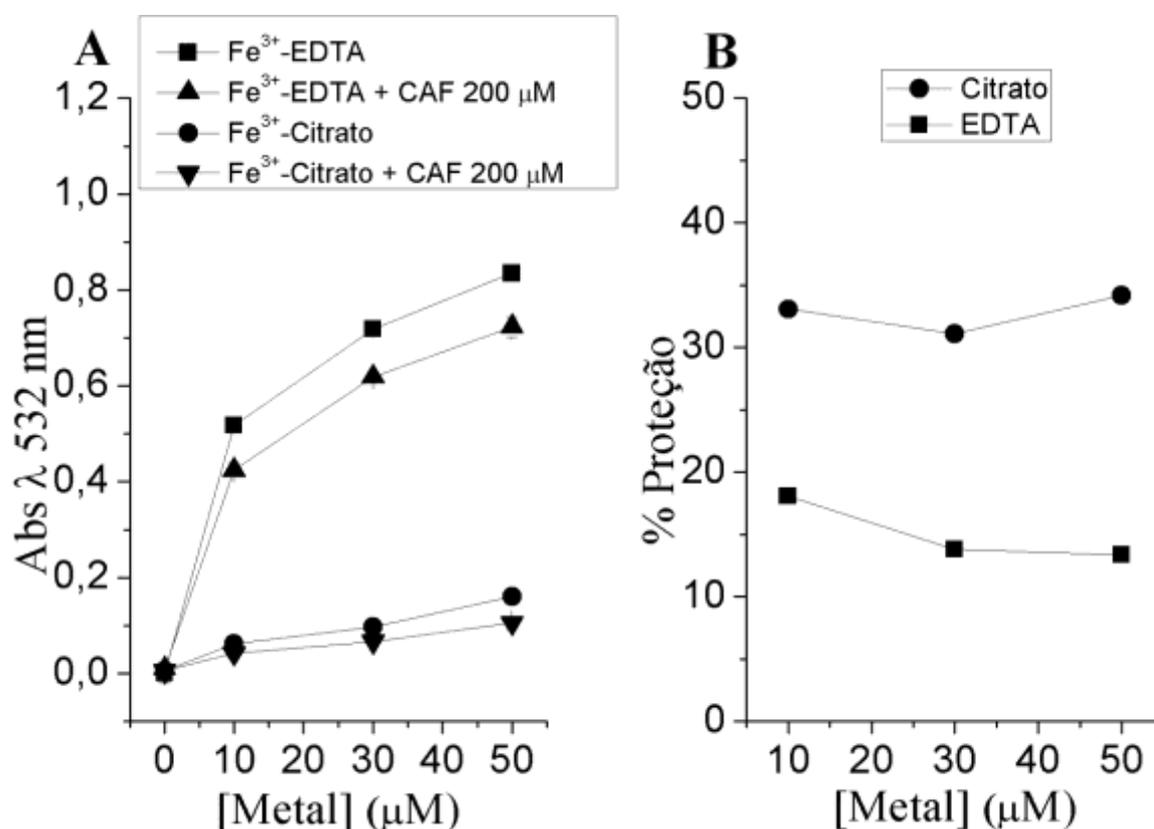


Figura 4.3: Painel A Estudo da ação antioxidante do ácido cafeico (CAF) mediada por diferentes concentrações de Fe^{III} -EDTA e Fe^{III} -Citrato e ascorbato (0,5 mM) na degradação oxidativa da 2-DR (5 mM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 7,2. Legenda: ■ Fe^{III} -EDTA (controle); ▲ Fe^{III} -EDTA na presença de CAF 200 μM ; ● Fe^{III} -Citrato (controle); ▼ Fe^{III} -Citrato na presença de CAF 200 μM . Os reagentes foram pré-incubados por 30 minutos antes da adição de ascorbato e o tempo de reação foi de 30 minutos. Painel B: Análise dos dados apresentados no painel A demonstrando o efeito protetor do ácido cafeico (CAF) 200 μM sobre a degradação oxidativa da 2-DR mediada por Fe^{III} -EDTA (■) e Fe^{III} -Citrato (●). Os valores acima representam a média \pm DP (n = 3).

Os resultados obtidos (Figura 4.3) demonstram que o CAF em reações mediadas por Fe^{III} -citrato apresentam o percentual de proteção superior em relação às reações mediadas por Fe^{III} -EDTA sugerindo um mecanismo quelante de íons ferro(III). Essa maior proteção do CAF nas reações mediadas por Fe^{III} -citrato se deve à maior capacidade de dissociação dos íons ferro(III) do quelato Fe^{III} -citrato em relação a outros quelantes como o NTA e o EDTA (Tabela 4.2).

Alem disso, observa-se na figura 4.3 observa-se que o percentual de proteção não foi alterada à medida que a concentração de Fe^{III} -citrato foia aumentada no meio reacional. Na presença de Fe^{III} -EDTA ocorre uma redução de aproximadamente 5% no efeito de proteção a medida que se aumenta a concentração de Fe^{III} -EDTA (Figura 4.3) .

Hemes-Lima, Ponla e Schulman (2000) estudaram a cinética de dissociação dos quelantes Fe^{III} -EDTA e Fe^{III} -NTA na presença de PIH com concomitante formação do quelato Fe^{III} -PIH (1:2). A formação desse composto foi monitorada espectrofotometricamente a 476 nm. Neste caso, foi observado no quelato Fe^{III} -NTA que a reação ocorre em poucos segundos. Diferentemente do que ocorre a partir do Fe^{III} -EDTA, onde somente foi observado a formação do composto de coordenação com aproximadamente 30 a 40 minutos. Isso demonstra que quanto maior a constante de estabilidade do quelante pelo íon metálico, mais “difícil” e demorada é a dissociação do quelato.

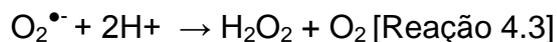
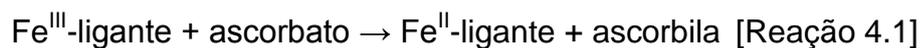
Tabela 4.2: Constantes de estabilidade de quelatos de ferro com citrato, NTA e EDTA:

| | Fe ²⁺ (Log K) | Fe ³⁺ (Log K) |
|----------------|--------------------------|--------------------------|
| Citrato | 4,4 | 11,47 |
| NTA | 8,84 | 15,9 |
| EDTA | 14,4 | 25,7 |

NTA: ácido nitrilotriacético; HEDTA: ácido *hidroxietilenodiaminotetracético*; EDTA: Ácido etileno diamino tetracético. (FURIA, 1980; FRANCIS e DODGE, 1993; KATSUÓKA, 1996; EL-AYAAN, F. JAMESON e LINERT, 1998; WIDMER, 2001; PATTON, 2011)

Esses resultados sugerem que, uma vez formado um quelato de Fe^{III} com EDTA ou com citrato, o ácido cafeico é capaz de remover o íon Fe³⁺ desse composto de coordenação, formando um novo quelato, possivelmente Fe^{II}-CAF (reação 4.1). De acordo com os estudos de Andjelković (2006), Mauricio (2006) e Hynes e O'coinceanainn (2004), tanto o CAF como o CLA são capazes de formar compostos de coordenação com o íon Fe²⁺. Segundo Mauricio (2006), o CAF é capaz de se coordenar eficientemente ao ferro(II), impedindo-o de catalisar a formação de espécies reativas de oxigênio (reações 4.1 a 4.4). Em relação ao CLA, são necessários mais estudos para elucidar o seu mecanismo de ação.

O estudo realizado por Maurya e Devasagayam (2010) demonstrou que tanto o CAF como o ácido ferúlico apresentam propriedades sequestradoras de radicais HO•, diferindo dos achados do presente estudo, em que o CAF atua como quelante de íons Fe²⁺, sendo capaz de dissociá-los do quelato Fe^{II}-citrato. Os autores também relatam em seu estudo que compostos antioxidantes como ácido gálico, galato de 3-O-epigallocatequina e ácido cafeico em concentrações superiores a 100 µM apresentam atividade pró-oxidante no ensaio da 2-DR



Ligante: EDTA ou citrato

A fim de investigar a cinética do CAF nas reações descritas pelas reações (4.1 a 4.4), foi analisado o efeito da pré-incubação sobre a degradação oxidativa da 2-DR via formação de radical ascorbila mediado por $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-EDTA}$. O tempo de pré-incubação corresponde ao intervalo entre adição do ascorbato no meio reacional contendo o íon metálico e o composto antioxidante em estudo. Nesse caso o CAF, aumentando o tempo de pré-incubação de 2 até 90 minutos, observou-se que não houve alteração na inibição do dano oxidativo, indicando que o CAF apresenta a formação de complexo com Fe^{3+} nas condições utilizadas neste estudo. Para confirmação destes resultados, foi empregada a técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE). O uso desta técnica possibilitou a visualização do sinal característico do radical de forma direta. Neste estudo, foi utilizado o sinal do radical ascorbila gerado na primeira reação de oxirredução [Reação 4.1].

A aferição do sinal do radical ascorbila foi feita medindo-se a primeira linha desse sinal, composto por duas linhas bem definidas que podem ser observadas na figura 3.3 (vide material e métodos). A altura dessa primeira linha é diretamente proporcional à quantidade de radical ascorbila no meio reacional. Como pode ser verificado na figura 4.5, foram utilizados 500 μM de CAF e 50 μM de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-EDTA}$ e diferentes tempos de pré-incubação, não havendo diferença estatística entre os pontos analisados (ANOVA-SNK).

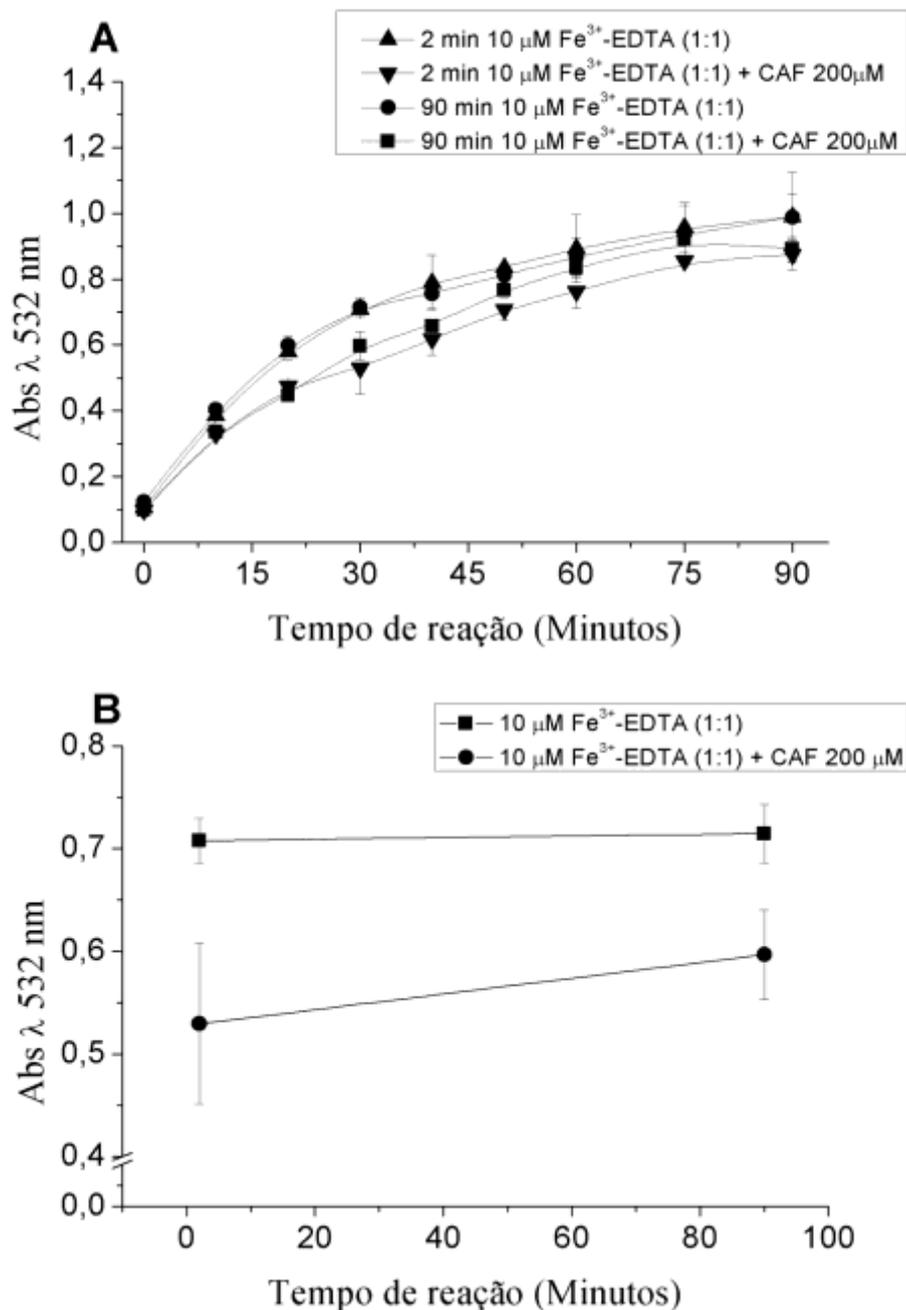


Figura 4.4: Pannel A: Efeito da pré-incubação sobre a degradação mediada por Fe^{III}-EDTA (10 μM) e ascorbato (0,5 mM) na ausência ou presença de CAF (200 μM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 7,2. Os reagentes foram pré-incubados por 2 ou 90 minutos antes da adição de ascorbato e o tempo de reação foi de 30 minutos. Legenda: ▲ 2 minutos de pré-incubação – controle Fe^{III}-EDTA; ▼ 2 minutos de pré-incubação – Fe^{III}-EDTA na presença de CAF 200 μM; ● 90 minutos de pré-incubação – controle Fe^{III}-EDTA; ■ 90 minutos de pré-incubação – Fe^{III}-EDTA na presença de CAF 200 μM. Os valores acima representam a média ± DP (n = 3). Pannel B: Efeito da pré-incubação sobre a sobre a degradação mediada por Fe^{III}-EDTA (10 μM) e ascorbato (0,5 mM) na ausência ou presença de CAF (200 μM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 7,2 e tempo de reação de 30 minutos

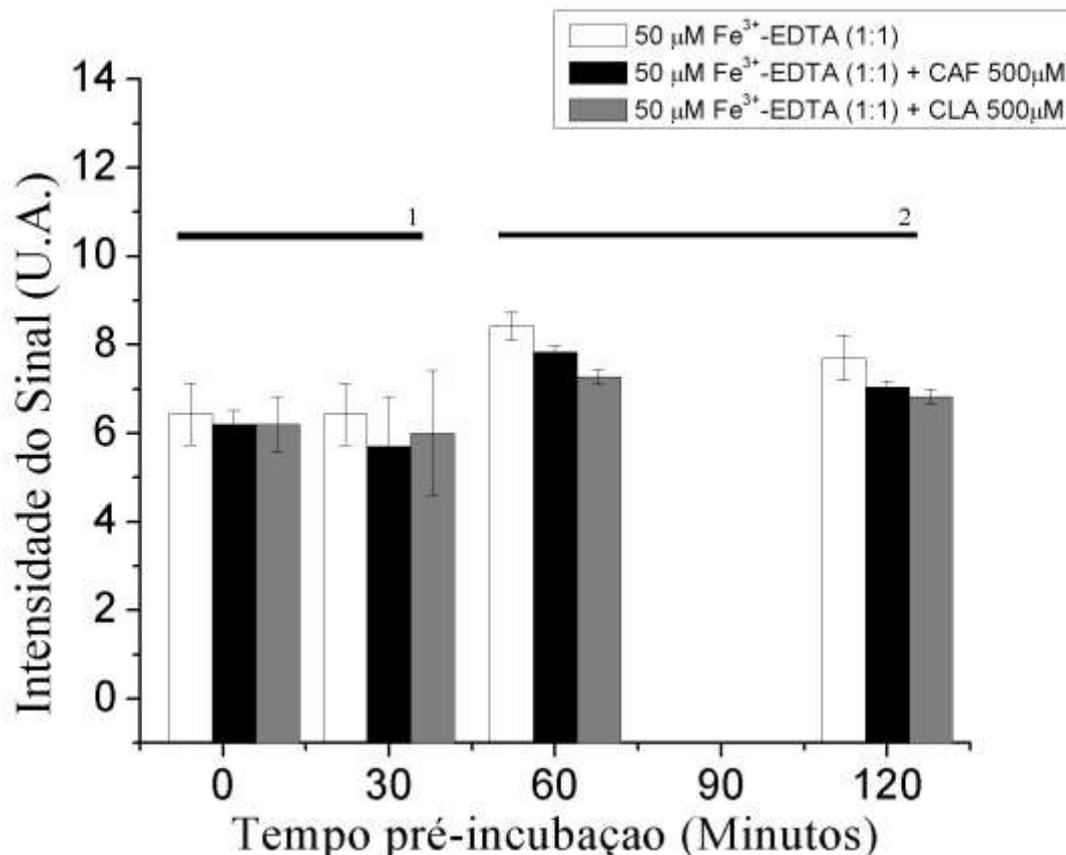


Figura 4.5: Efeito da variação do tempo de pré-incubação sobre a intensidade do sinal de EPR do radical ascorbil mediado por Fe^{III}-EDTA (50 μM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 7,2. Legenda: □ Controle - Fe^{III}-EDTA; ■ Fe^{III}-EDTA na presença de CAF 500 μM; ▒ Fe^{III}-EDTA na presença de CLA 500 μM.^{1,2} Experimentos realizados em dias diferentes. Os valores representam a média ± DP no mínimo de três pontos.

Tanto o CAF quanto o CLA apresentaram um comportamento similar ao não inibirem a formação de radical ascorbila (**Reação 4.1**) (**Figura 4.5**) mediado por Fe^{III}-EDTA e nas condições utilizadas neste estudo. Verificou-se assim que na presença de CLA e de CAF não há alteração do sinal de RPE, indicando que este possivelmente não atue na primeira etapa da reação que leva a formação de radicais hidroxila [Reação 4.1]. Essa é mais uma evidência da reduzida capacidade do CAF de quelar íons Fe³⁺. Uma hipótese plausível é que o CAF atue na segunda etapa [Reação 4.2], pois impediria a formação de íon superóxido (O₂^{·-}) ao coordenar-se ao íon Fe²⁺ dissociando-o do quelato inicial.

Foram realizados experimentos de espectroscopia ultravioleta-visível a fim de se verificar se há coordenação do ferro(III) contido no quelato Fe^{III}-EDTA

pelos polifenóis CAF e CLA em diferentes condições de pH. Estes experimentos foram realizados na presença de CAF e CLA (500 μM) variando-se a concentração de Fe^{III} -EDTA (0 - 50 μM).

As Figuras 4.6 a 4.10 mostram dois picos de absorção do CAF e do CLA, em 226 e 310 nm e em 220 e 318 nm respectivamente (painéis **A e C**). Nos painéis **A e C** verificam-se alterações nos comprimentos de onda de 252 nm (CAF) e 262 nm (CLA), ocorrendo aumentos na absorbância aproximadamente lineares com a concentração de Fe^{III} -EDTA no meio reacional (painéis **B e D**). De acordo com Oess *et al* (1999), o comprimento de onda de aproximadamente 260 nm é típico do grupo catecol não coordenado, o que indica haver algum grau de interação entre o grupo catecol desses compostos fenólicos e o íon Fe^{3+} .

A partir dos resultados obtidos nas Figura 4.6 a 4.10, verifica-se que o espectro das soluções contendo CAF e CAF+ Fe^{III} -EDTA não apresentam diferença significativa, de onde se conclui não haver formação de complexo entre CAF e o CLA com o Fe^{III} -EDTA. Entretanto, o estudo realizado por Mauricio (2006) demonstra a formação de quelato entre Fe^{III} com o ácido cafeico, sendo que ao se adicionar EDTA no meio reacional, este é capaz de remover íons férrico^{III} coordenados, corroborando os achados do presente estudo. De acordo com Mauricio (2006), o ácido cafeico apresenta maior afinidade ao íon Fe^{2+} do que ao Fe^{3+} , resultados semelhantes aos de Kono *et al.*, (1997), Hynes e O'coinceanainn (2004), enquanto que Andjelković *et al.* (2006), demonstrou a formação do complexo entre o Fe^{2+} e o CAF e com o CLA.

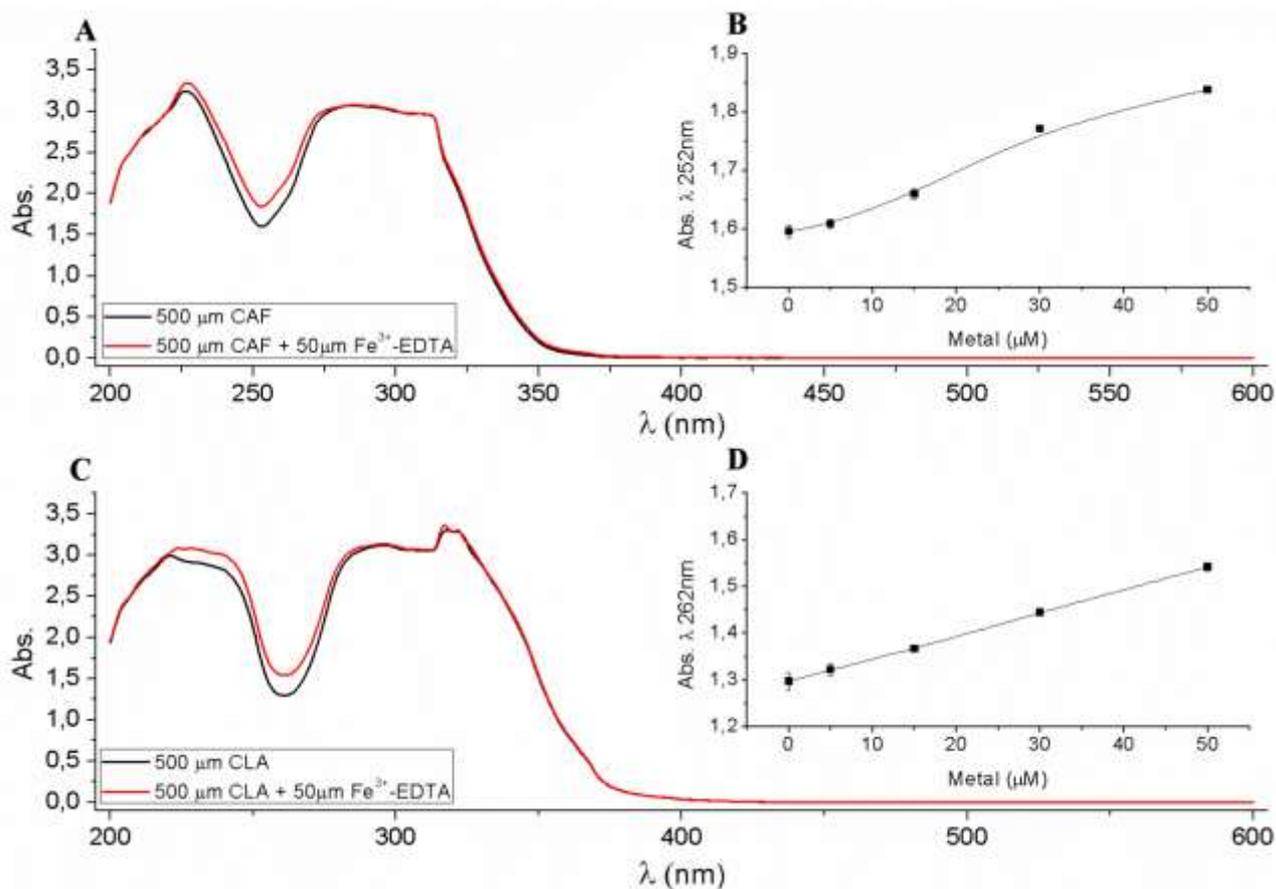


Figura 4.6: (Painel A) Perfil espectral do CAF (500 μM) e em presença de Fe³⁺-EDTA (50 μM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 6,0. Os reagentes foram pré-incubados por 10 minutos (não houve adição de ascorbato). (Painel B) Aumento da absorvância em λ 252nm com crescentes concentrações de Fe³⁺-EDTA. (Painel C) Perfil espectral do CLA (500 μM) e em presença de Fe³⁺-EDTA (50 μM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 6,0. Os reagentes foram pré-incubados por 10 minutos (não houve adição de ascorbato). (Painel D) Aumento da absorvância em λ 262nm com crescentes concentrações de Fe³⁺-EDTA. Painel A e Painel C Os resultados representam respectivamente a curva mais representativa Painel B e Painel D Os valores representam a média ± DP (n = 3).

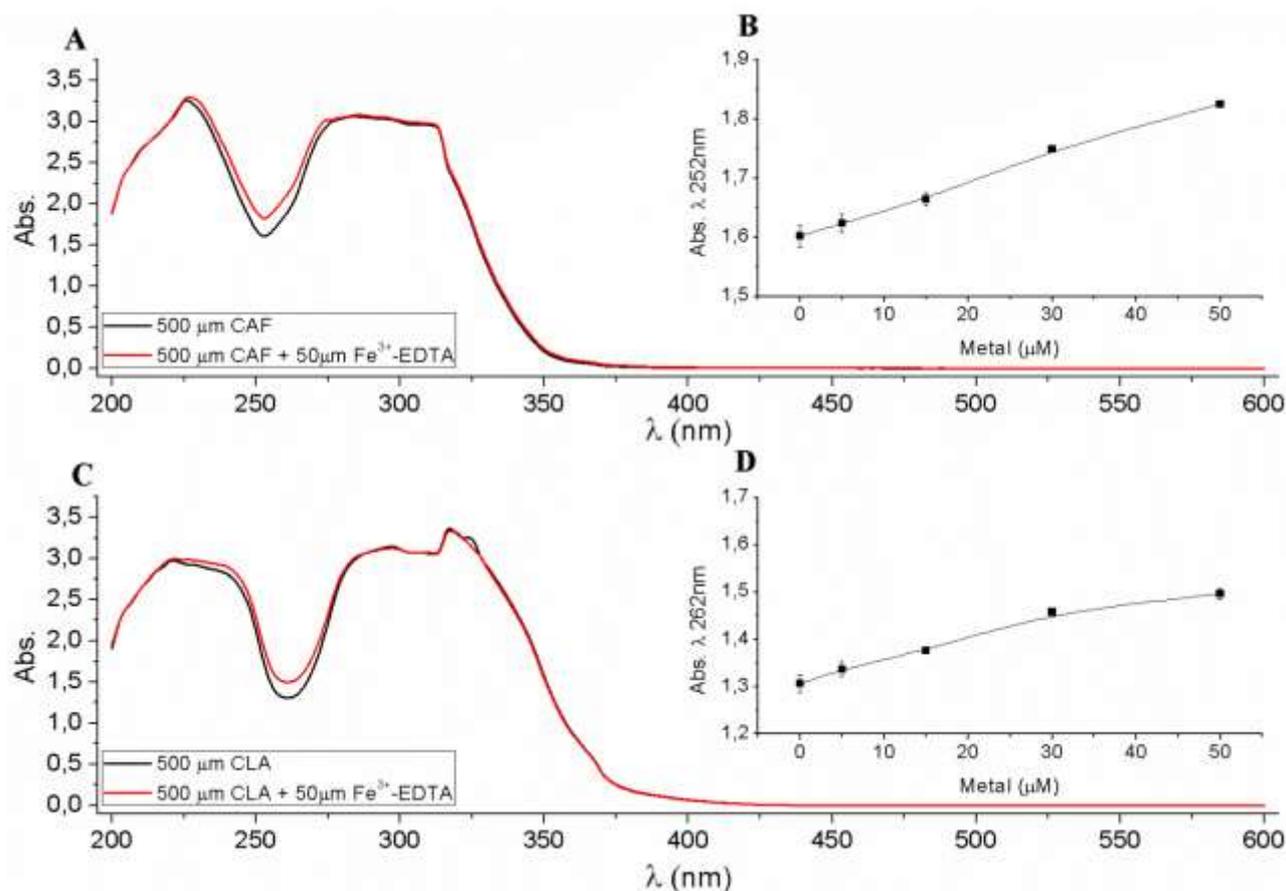


Figura 4.7: (Painel A) Perfil espectral do CAF (500 μM) e em presença de Fe³⁺-EDTA (50 μM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 6,5. Os reagentes foram pré-incubados por 10 minutos (não houve adição de ascorbato). (Painel B) Aumento da absorbância em λ 252nm com crescentes concentrações de Fe³⁺-EDTA. (Painel C) Perfil espectral do CLA (500 μM) e em presença de Fe³⁺-EDTA (50 μM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 6,5. Os reagentes foram pré-incubados por 10 minutos (não houve adição de ascorbato). (Painel D) Aumento da absorbância em λ 262nm com crescentes concentrações de Fe³⁺-EDTA. Painel A e Painel C Os resultados representam respectivamente a curva mais representativa Painel B e Painel D Os valores representam a média ± DP (n = 3).

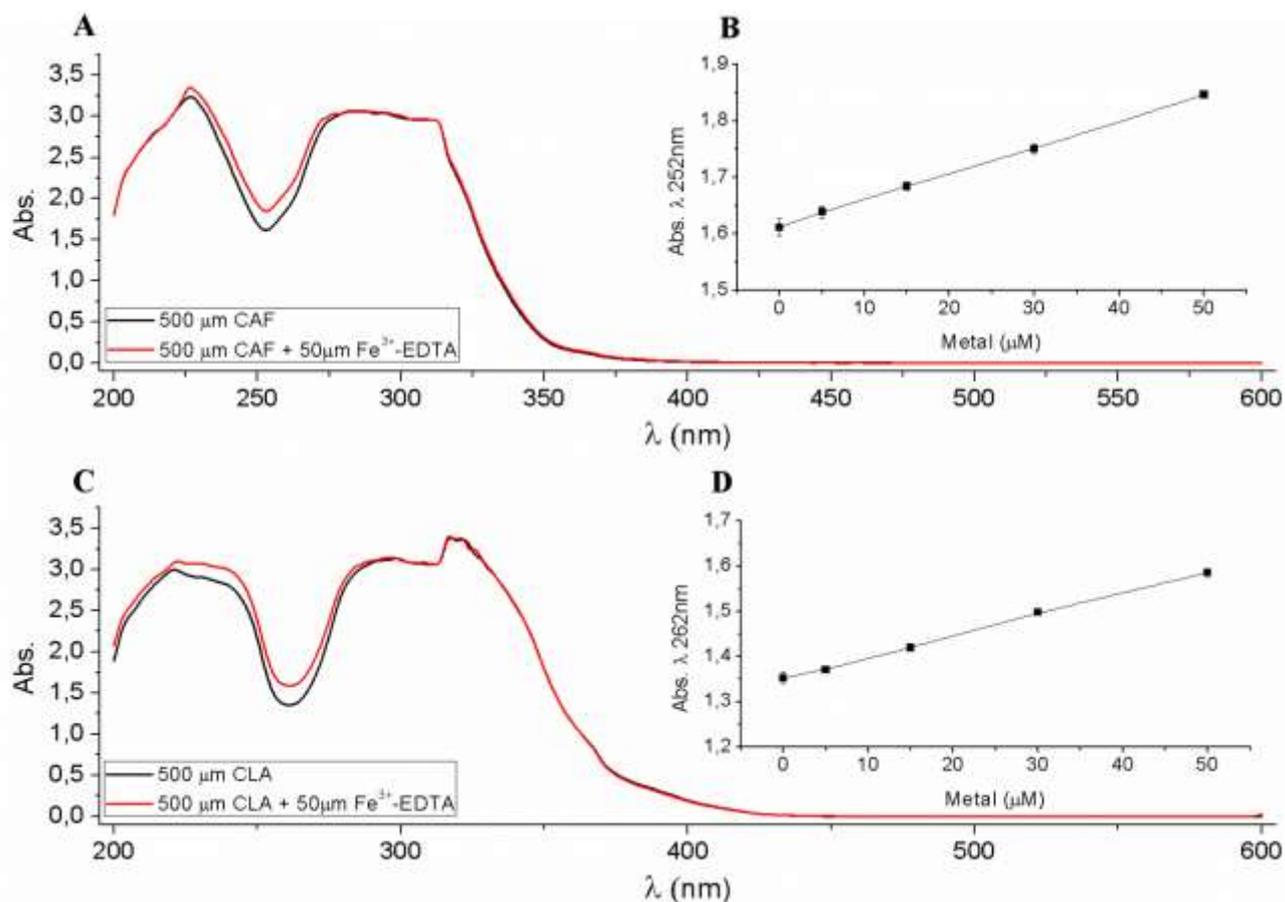


Figura 4.8: (Painel A) Perfil espectral do CAF (500 μM) e em presença de Fe³⁺-EDTA (50 μM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 7,0. Os reagentes foram pré-incubados por 10 minutos (não houve adição de ascorbato). (Painel B) Aumento da absorvância em λ 252nm com crescentes concentrações de Fe³⁺-EDTA. (Painel C) Perfil espectral do CLA (500 μM) e em presença de Fe³⁺-EDTA (50 μM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 7,0. Os reagentes foram pré-incubados por 10 minutos (não houve adição de ascorbato). (Painel D) Aumento da absorvância em λ 262nm com crescentes concentrações de Fe³⁺-EDTA. Painel A e Painel C Os resultados representam respectivamente a curva mais representativa Painel B e Painel D Os valores representam a média ± DP (n = 3).

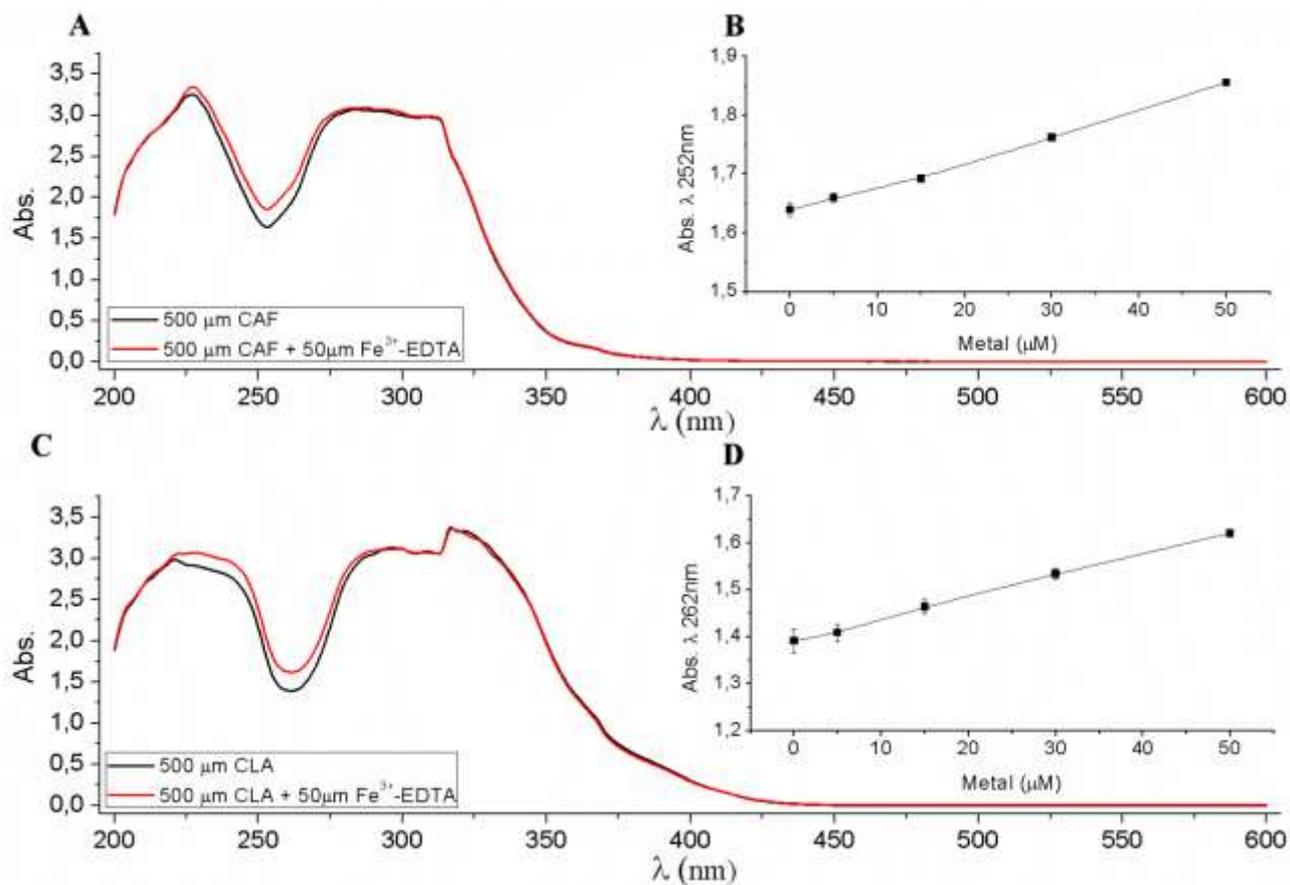


Figura 4.9: (Painel A) Perfil espectral do CAF (500 μM) e em presença de Fe³⁺-EDTA (50 μM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 7,2. Os reagentes foram pré-incubados por 10 minutos (não houve adição de ascorbato). (Painel B) Aumento da absorvância em λ 252nm com crescentes concentrações de Fe³⁺-EDTA. (Painel C) Perfil espectral do CLA (500 μM) e em presença de Fe³⁺-EDTA (50 μM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 7,2. Os reagentes foram pré-incubados por 10 minutos (não houve adição de ascorbato). (Painel D) Aumento da absorvância em λ 262nm com crescentes concentrações de Fe³⁺-EDTA. Painel A e Painel C Os resultados representam respectivamente a curva mais representativa Painel B e Painel D Os valores representam a média ± DP (n = 3).

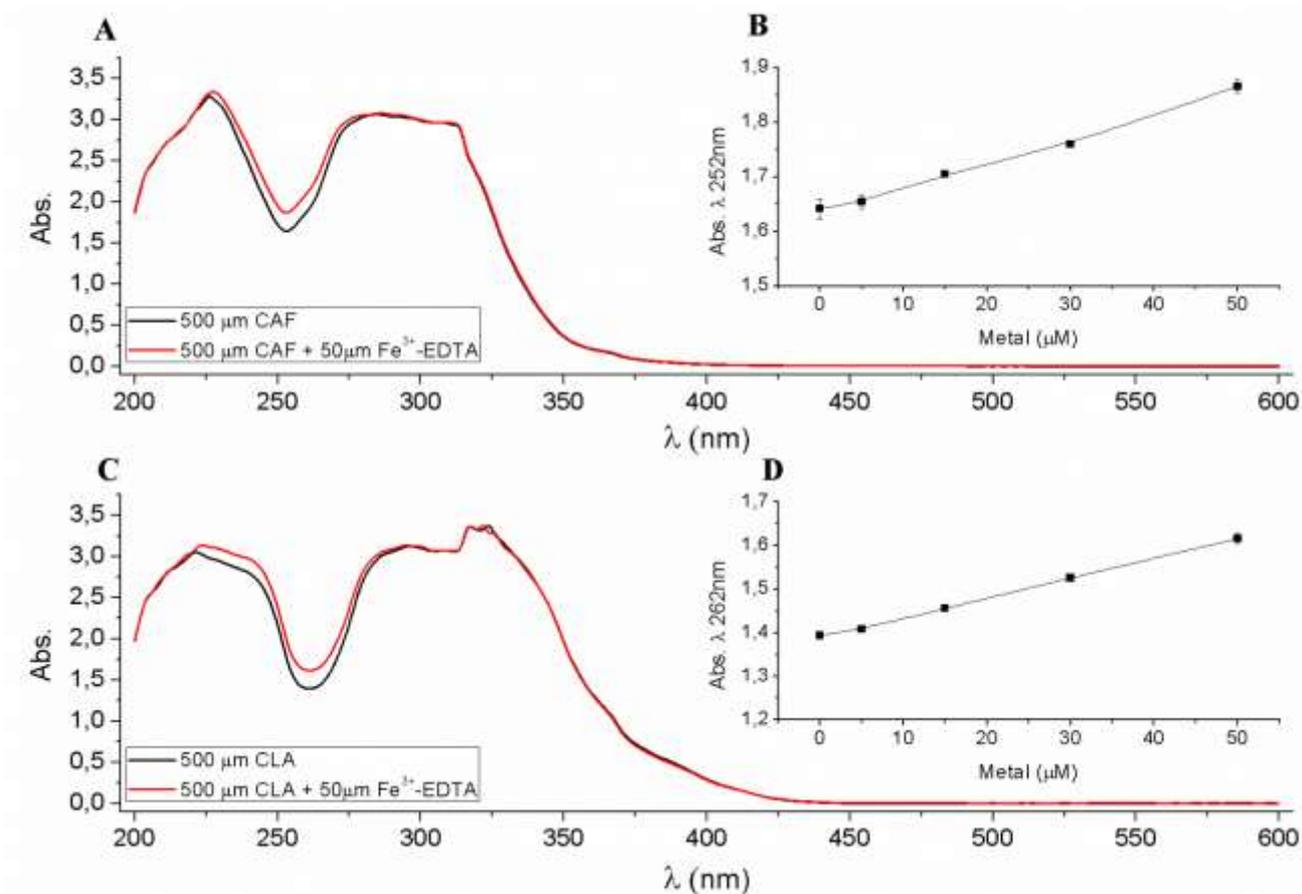
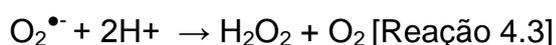
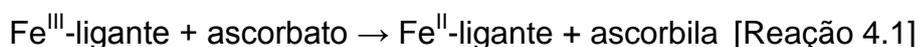


Figura 4.10: (Painel A) Perfil espectral do CAF (500 μM) e em presença de Fe³⁺-EDTA (50 μM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 7,5. Os reagentes foram pré-incubados por 10 minutos (não houve adição de ascorbato). (Painel B) Aumento da absorbância em λ 252nm com crescentes concentrações de Fe³⁺-EDTA. (Painel C) Perfil espectral do CLA (500 μM) e em presença de Fe³⁺-EDTA (50 μM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 7,5. Os reagentes foram pré-incubados por 10 minutos (não houve adição de ascorbato). (Painel D) Aumento da absorbância em λ 262nm com crescentes concentrações de Fe³⁺-EDTA. Painel A e Painel C Os resultados representam respectivamente a curva mais representativa Painel B e Painel D Os valores representam a média ± DP (n = 3).

4.4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados expostos neste capítulo mostram que ácido cafeico possui reduzida capacidade antioxidante em todos métodos e situações testados. Os resultados também sugerem que a atividade antioxidante do ácido cafeico em reações mediadas por íons Fe^{3+} na presença de diferentes quelantes possui relação inversa a constante de estabilidade do quelato de Fe^{III} . Verificou-se que quanto maior a constante de estabilidade do quelato de Fe^{III} inicial menor é a capacidade de proteção. De acordo com Mauricio, o CAF é capaz de coordenar-se eficientemente ao Fe^{2+} , tornando-o indisponível para formação de espécies reativas de oxigênio ($\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e OH)

Com base nestas observações experimentais demonstrou-se que o mecanismo de ação antioxidante do CAF em sistemas aquosos na faixa de pH 7,2, se deve a sua habilidade de se ligar a íons Fe^{2+} formados na segunda etapa da primeira reação de geração de radicais livres [Reação 4.1]. De acordo com Hynes e O'coinceanainn (2004) a constante de estabilidade do ácido cafeico ao Fe^{2+} é de 18,9 corroborando os resultados do presente estudo.



Ligante: EDTA ou citrato

Diante dos resultados obtidos, faz-se necessário a realização de outros estudos para melhor elucidação do mecanismo de ação do CAF e do CLA em diferentes sistemas envolvendo Fe^{3+} e diferentes quelantes, uma vez que foi apenas avaliada a capacidade antioxidante do CAF em sistema aquoso utilizando citrato e EDTA como co-quelante. Devendo no futuro, desenvolver-se

experimentos para avaliar o comportamento tanto do ácido cafeico como do ácido clorogenico em difentes condições de pHs, bem como o uso de diferentes tampões. Segundo Andjelkovic et al. (2006) o tipo de solvente utilizado pode interferir nos resultados espectrofotométricos e na capacidade de complexação das moléculas. Além da realização de experimentos em cultura de células com o intuito de entender os mecanismos antioxidantes destas moléculas *in vivo*.

5 Análise do potencial antioxidante do ácido cafeico (CAF) e do ácido 5-o-cafeoilquínico (ácido clorogênico) em sistemas geradores de radicais livres mediado por Cu^{2+} na presença de ascorbato

5.1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O estudo acerca dos mecanismos de atividade antioxidante de diversos compostos como o ácido tânico e o piridoxal isonicotinoil hidrazona (*PIH*) em sistemas geradores de radicais livres mediados por íons Cu^{2+} e ascorbato foi iniciado em nosso grupo de pesquisa há alguns anos. Gonçalves (1999) relatou a atividade antioxidante do PIH em complexar íons Cu^{2+} , sendo este capaz de inibir a degradação oxidativa da 2-desoxirribose (2-DR) induzida por radicais hidroxil. Andrade JR (2004) e Dalvi (2008) descreveram que os compostos ácido tânico e ácido elágico, em reações mediadas por íons Cu^{2+} e ascorbato, apresentam um comportamento híbrido de ação antioxidante, atuando tanto como quelantes de íons metálicos como sequestradores de radicais hidroxil (ANDRADE JR, 2004; DALVI, 2008). Frente a esses estudos anteriores e a necessidade de avaliar a ação antioxidante do CAF (e CLA) na presença de outro metal (a ação antioxidante do CAF na presença de íons ferro foi estudada no capítulo 4 desta dissertação), o presente trabalho propõe analisar os mecanismos de ação antioxidante do CAF e CLA em sistemas *in vitro* geradores de EROs mediados por Cu^{2+} e ascorbato. Neste trabalho utilizamos dois detectores de radicais hidroxil (2-DR e ácido teraftálico). Analisamos também a ação do CAF e CLA na formação de radicais ascorbil por meio de ressonância paramagnética eletrônica (RPE), assim como formação de complexos de cobre com os compostos estudados (por meio de espectros de UV e visível).

5.2 METODOLOGIAS UTILIZADAS

- Degradação oxidativa da 2-Desoxirribose (vide seção 3.2.1)
- Espectroscopia ultravioleta (UV) visível (Vis) (vide seção 3.2.2)
- Ressonância paramagnética eletrônica do radical ascorbila (vide seção 3.2.3)
- Hidroxilação do ácido tereftálico (vide seção 3.2.4)

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Primeiramente, foi feita a cinética da reação da degradação oxidativa da 2-DR mediada por íons Cu^{2+} e ascorbato, demonstrando ser uma reação linear até o tempo de reação analisado (Figura 5.1). Foi estipulado o tempo de 30 minutos de reação para todos os experimentos, pois esse se encontra dentro da fase linear da reação, como pode ser observado no Figura 5.1.

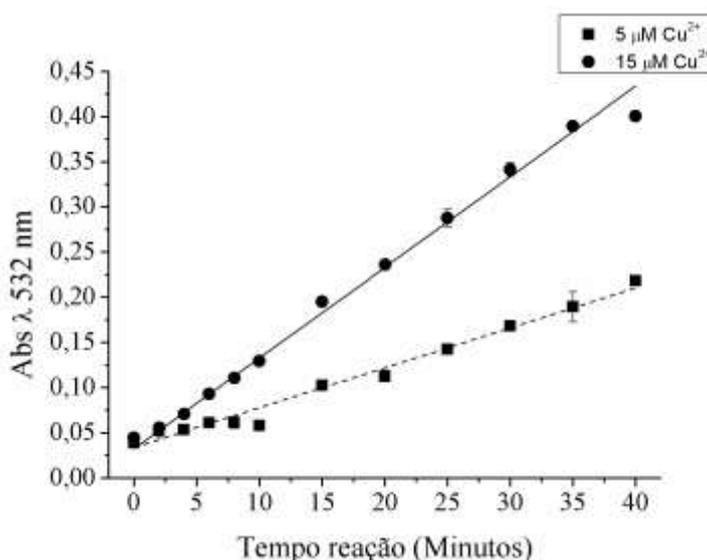


Figura 5.1: Curso temporal da degradação oxidativa da 2-DR (5 mM) mediada por íons Cu^{2+} (5 e 15 μM) e ascorbato (0,5 mM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 7,2 e duas situações: (●)15 μM Cu^{2+} ; (■)5 μM Cu^{2+} . Os reagentes foram pré-incubados por 10 minutos antes da adição de ascorbato. Os valores acima representam a média \pm DP (n = 3).

Após os ensaios iniciais de cinética da reação de degradação oxidativa da 2-DR, foram realizados ensaios para verificar o efeito de diferentes concentrações das moléculas estudadas (CAF e CLA) na oxidação da 2-DR na presença de Cu^{2+} e ascorbato. Verificou-se que a capacidade dos dois compostos está relacionada de forma direta com a concentração, como pode ser observado na Figura 5.2. O CLA apresentou melhor percentual de proteção em relação ao CAF (Figura 5.2, painel B), apesar de ambos os compostos possuírem pequena atividade antioxidante.

Maurya e Devasagayam (2010) relatam em seu estudo que os ácidos hidroxicinâmicos têm um ótimo potencial antioxidante em baixas concentrações e começam a exibir comportamento pró-oxidante em altas concentrações. De acordo com esses autores, isso se deve possivelmente à capacidade desses compostos de reduzirem metais de transição, sendo esses resultados divergentes do presente estudo, no qual é possível se observar que os ácidos hidroxicinâmicos (CAF e CLA) apresentaram aumento da capacidade antioxidante de maneira dependente da concentração e de inibir reações de degradação oxidativa causada por espécies reativas de oxigênio.

Nesse mesmo experimento também foi determinada a concentração necessária de cada molécula em inibir 50% a degradação oxidativa da 2-DR (Ic_{50}). O Ic_{50} apresentou um valor de 395 μM para o CLA e de 927 μM para o CAF. Sendo, então, estabelecidas as concentrações de trabalho para os demais experimentos. Foi estabelecida a concentração de 500 μM para o CAF, aproximadamente a metade do Ic_{50} dessa molécula e de 300 μM para o CLA valor próximo ao Ic_{50} .

Após a escolha das concentrações para os experimentos a seguir, foram realizados os ensaios para verificar o mecanismo de ação antioxidante das moléculas. A literatura relata que antioxidantes de baixo peso molecular podem apresentar dois mecanismos: quelante de metal ou sequestrador de radicais OH. Essa caracterização pode ser avaliada por meio dos ensaios em que se tem a variação da concentração da molécula-alvo, nesse caso a 2-DR (0 - 50 mM), (Figura 5.3). Moléculas com características de sequestradoras de radicais OH apresentam notável redução do percentual de proteção, como é o caso do

trolox®, análogo da vitamina E de natureza hidrossolúvel que apresenta apenas um grupo hidroxil (SON e LEWIS, 2001). Por outro lado, moléculas com potencial quelante de íons metálicos, como é o caso do piridoxal isonicotinoil hidrazona (PIH), que apresenta elevada capacidade de ligação a metais (HERMES-LIMA *et al.*, 1998; HERMES-LIMA, GONÇALVES e ANDRADE, 2001; MAURICIO, 2006), não haveria alteração do percentual de proteção no ensaio da variação da concentração da 2-DR. Isso se explica pelo fato de que a geração radicalar estaria restrita aos íons metálicos não complexados. Porém, alguns compostos fenólicos como o ácido tânico e ácido elágico apresentam comportamento híbrido, atuando tanto como quelante de íons metálicos como sequestradores de radicais OH (ANDRADE JR, 2004; DALVI, 2008).

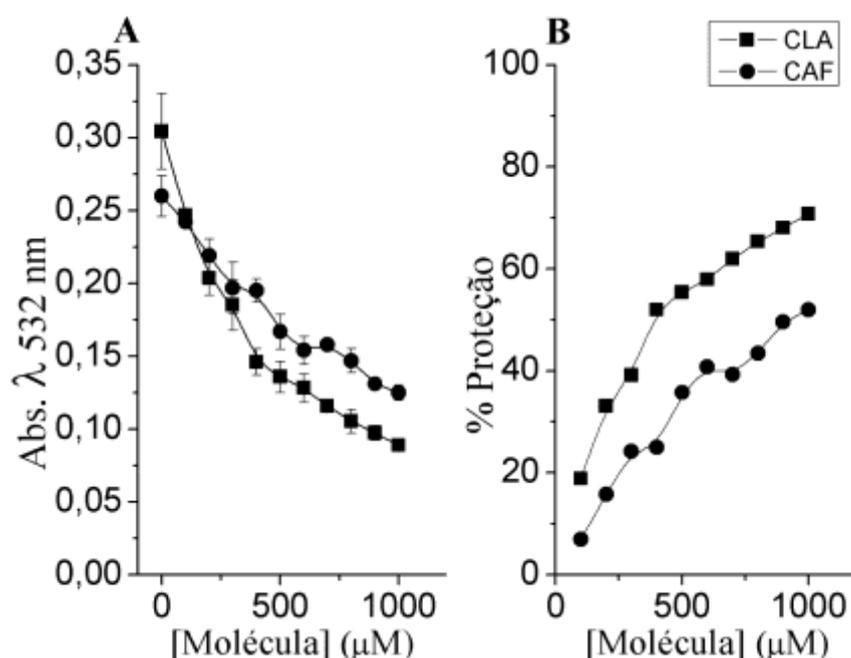


Figura 5.2 (Painel A) Efeito da variação da concentração do (●) CAF e (■) CLA sobre a degradação oxidativa da 2-DR (5 mM) mediada por Cu^{2+} (5 μM) e por ascorbato (0,5 mM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 7,2. Os valores acima representam a média \pm DP (n = 3). Os reagentes foram pré-incubados por 10 minutos antes da adição de ascorbato e o tempo de reação foi de 30 minutos. **(Painel B)** Análise dos dados apresentados no painel A demonstrando a dependência da concentração do (●) CAF e (■) CLA no meio sobre sua ação antioxidante.

Como pode ser observado na figura 5.3, com o aumento na concentração de 2-DR, há uma diminuta alteração ($\approx 10\%$) no percentual de proteção tanto do CAF como do CLA. Isso indica comportamento híbrido de ambas as moléculas, atuando tanto como sequestradores de radicais hidroxil quanto como quelantes de íons Cu^{2+} . Isso se deve à estrutura orto-dihidroxil localizada no grupo catecol (SON e LEWIS, 2001).

Dentre os compostos analisados, o CLA foi o que apresentou melhor potencial antioxidante, pois em uma concentração 40% inferior, o CLA apresentou o mesmo percentual de proteção que o CAF. De acordo com Maurya e Devasagayam (2010) tanto o CLA como o CAF apresentam uma fraca capacidade de quelação de íons metálicos, corroborando os achados do presente estudo. Em comparação com outras moléculas estudadas em nosso laboratório, tanto o CAF como o CLA apresentam reduzida capacidade antioxidante. Isto fica evidente quando comparamos a outros compostos como, por exemplo, o ácido tânico, ácido elágico e piridoxal isonicotinoil hidrazona (PIH) que, em condições similares, apresentam efeito protetor máximo na faixa de 50 μM , 20 μM e 10 μM respectivamente (HERMES-LIMA *et al.*, 1998; ANDRADE JR, 2004; DALVI, 2008).

Ensaio com variação de concentração de Cu^{2+} no meio reacional (0 – 50 μM) contendo CAF (500 μM) ou CLA (300 μM) apresentaram proteção de forma dependente da concentração de Cu^{2+} (Figura 5.4 – painéis A e C). À medida que se aumenta a concentração do íon cobre no meio reacional, sem a alteração da concentração do CLA e CAF, tem se aumentada a probabilidade de ter íons metálicos não complexados no meio reacional. Dessa forma, o dano oxidativo da 2-DR aumenta proporcionalmente à concentração de metal disponível no meio reacional, sendo essa mais uma forma de caracterizar o mecanismo de ação de antioxidante do composto estudado. Moléculas que apresentam características puramente sequestradoras de radicais OH não apresentariam diminuição do percentual de proteção com o aumento da concentração de metal, enquanto moléculas com capacidade de complexação de íons metálicos iriam apresentar grande redução do percentual de proteção.

Na presença de CAF e CLA, a partir de 5 μM de Cu^{2+} , há uma queda gradual do percentual de proteção de aproximadamente 15% para o CLA e de aproximadamente 10% para o CAF (Figura 5.4 – painéis B e D). Esse resultado indica que tanto o CLA como o CAF apresentam comportamento híbrido de ação com baixa capacidade de complexação de íons Cu^{2+} e pequena capacidade de sequestrar radicais hidroxil, corroborando os resultados obtidos nos experimentos em que se teve a variação da concentração do alvo, no caso a 2-DR. Caso essas moléculas apresentassem elevada capacidade de complexação de íons metálicos, haveria maior redução do percentual de proteção com o aumento da concentração de cobre, como é o caso do PIH. O PIH é uma molécula sintética que apresenta potente capacidade de ligação de íons metálicos tanto *in vitro* como *in vivo* (PONKA *et al.*, 1979; HERMES-LIMA *et al.*, 1998; HERMES-LIMA, GONÇALVES e ANDRADE, 2001).

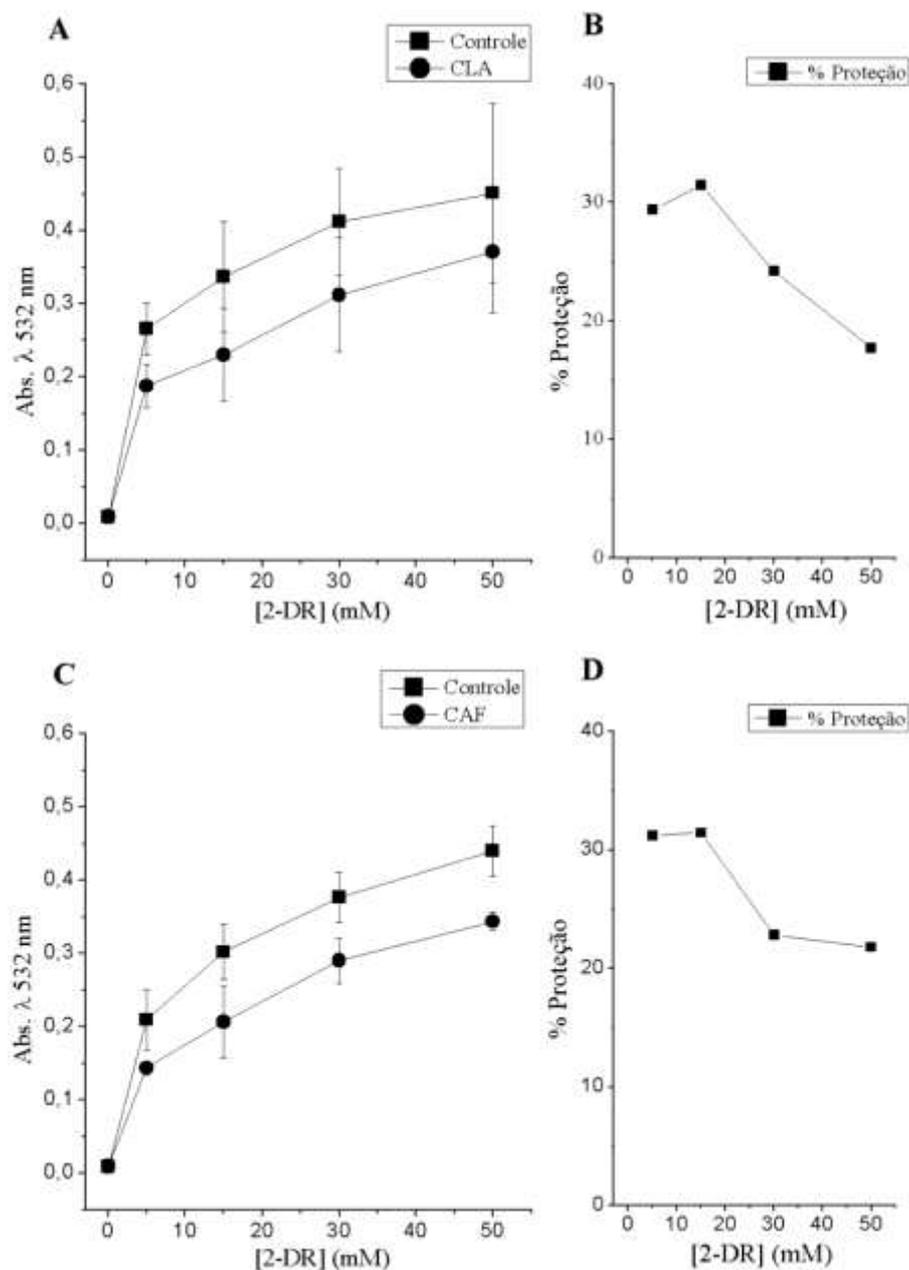


Figura 5.3: Efeito da variação da 2-DR (0 - 50 mM) sobre sua degradação mediada por íons por Cu^{2+} e ascorbato (0,5 mM) na ausência ou presença de CLA (Painel A) e CAF (Painel C) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 7,2. Os reagentes foram pré-incubados por 10 minutos antes da adição de ascorbato e o tempo de reação foi de 30 minutos. (Painel A) (■) Controle Cu^{2+} ; (●) Cu^{2+} na presença de CLA 300 μM . (Painel B) Análise dos dados apresentados no Painel A demonstrando o efeito protetor do ácido clorogênico (CLA) 300 μM sobre a degradação oxidativa da 2-DR mediada por Cu^{2+} . (Painel C) (■) Controle Cu^{2+} ; (●) Cu^{2+} na presença de CAF 500 μM . (Painel D) Análise dos dados apresentados no Painel C demonstrando o efeito protetor do ácido cafeico (CAF) 500 μM sobre a degradação oxidativa da 2-DR mediada por Cu^{2+} . Os valores acima representam a média \pm DP (n = 3).

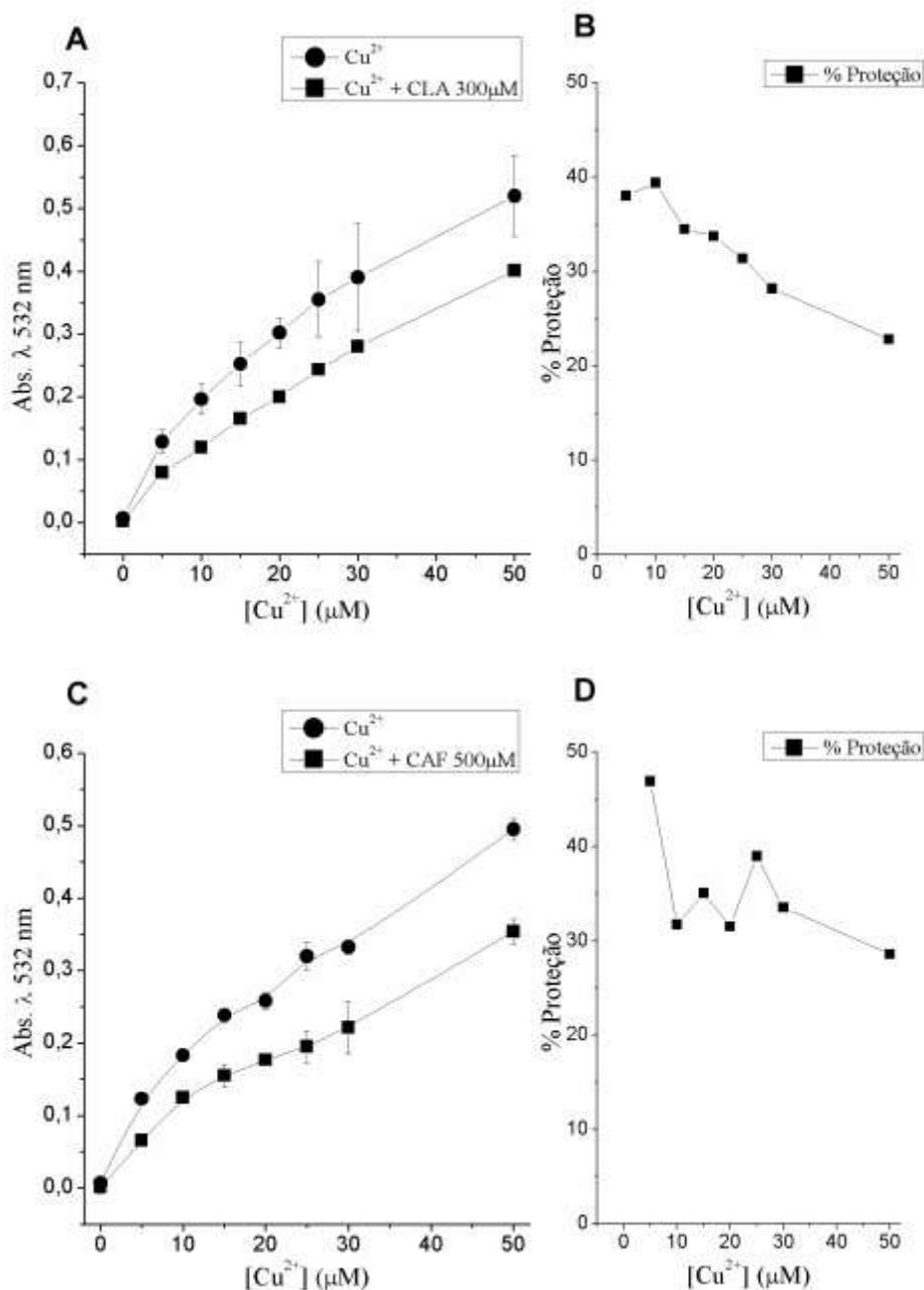


Figura 5.4: Estudo da ação antioxidante do CLA (Painel A) e CAF (Painel C) mediada por diferentes concentrações de Cu²⁺ e ascorbato (0,5 mM) na degradação oxidativa da 2-DR (5 mM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 7,2 . Os reagentes foram pré-incubados por 10 minutos antes da adição de ascorbato e o tempo de reação foi de 30 minutos (Painel A) (●) Controle Cu²⁺; (■)Cu²⁺ na presença de CLA 300 μM. (Painel B) Análise dos dados apresentados no Painel A demonstrando o efeito protetor do ácido clorogênico (CLA) 300μM sobre a degradação oxidativa da 2-DR mediada por Cu²⁺. (Painel C) (●) Controle Cu²⁺; (■) Cu²⁺ na presença de CAF 500 μM. (Painel D) Análise dos dados apresentados no Painel C demonstrando o efeito protetor do ácido cafeico (CAF) 500μM sobre a degradação oxidativa da 2-DR mediada por Cu²⁺. Os valores acima representam a média ± DP (n = 3).

O CAF, além de reduzida capacidade de complexação de íons Cu^{2+} e baixa capacidade sequestradora de radicais OH, apresenta redução na sua capacidade antioxidante ao longo do tempo de incubação em um ensaio de oxidação de 2-DR (Figura 5.5). O CAF apresenta elevada capacidade de proteção nos primeiros 10 minutos da reação; depois disso, ocorre uma queda abrupta do percentual de proteção. Essa diminuição no percentual de proteção deve-se, possivelmente, à degradação das moléculas de CAF pelos íons Cu^{2+} não complexados que estão disponíveis no meio reacional. São necessários mais estudos para confirmar esse comportamento, tanto do CAF como do CLA, com a utilização de diversos tampões e em diferentes faixas de pH.

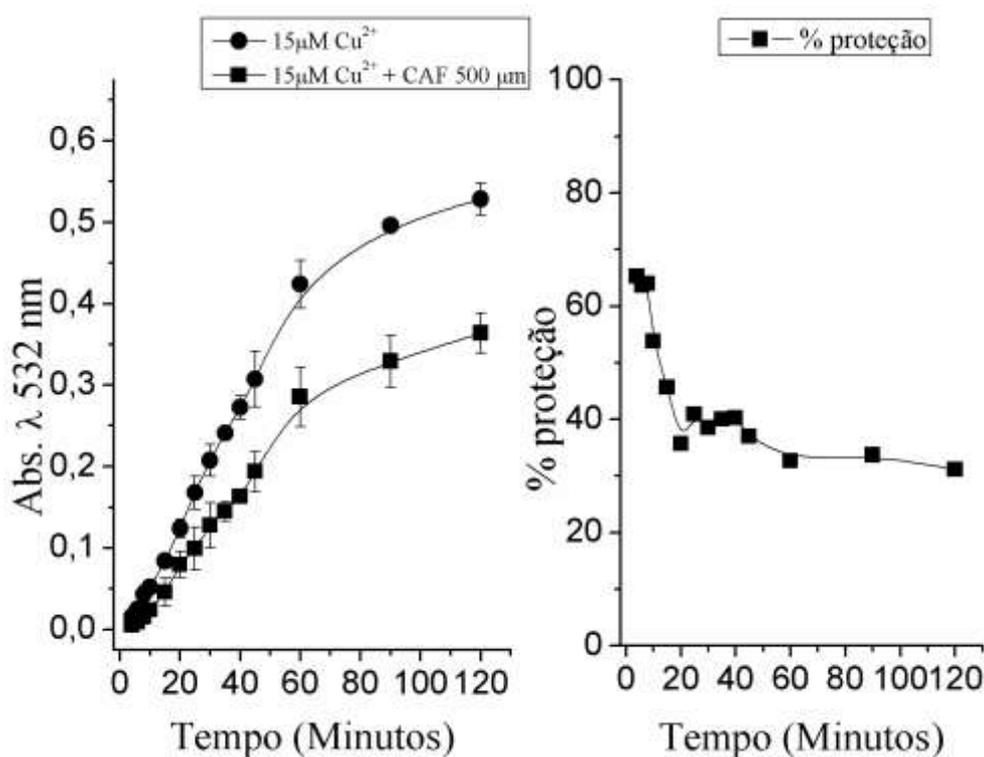


Figura 5.5: (Painel A) Estudo da ação antioxidante do ácido cafeico (CAF) no curso temporal da degradação oxidativa da 2-DR (5 mM) mediada por íons Cu^{2+} (5) e ascorbato (0,5 mM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 7,2 e em 2 situações: (●) Cu^{2+} 5 μM ; (■) Cu^{2+} 5 μM na presença de CAF 500 μM . Os reagentes foram pré-incubados por 10 minutos antes da adição de ascorbato. Os valores acima representam a média \pm DP (n = 3). (Painel B) Análise dos dados apresentados no painel A demonstrando o efeito protetor do ácido cafeico (CAF) 500 μM sobre a degradação oxidativa da 2-DR mediada por Cu^{2+} .

Para verificar o comportamento quelante dos compostos estudados, foram elaborados experimentos de espectroscopia ultravioleta-visível a fim de analisar a formação de um complexo entre o metal (Cu^{2+}) e os polifenóis CAF e CLA. Esses experimentos foram realizados na presença de CAF e CLA (500 μM) e com a variação da concentração de Cu^{2+} (0 - 50 μM). Foram observados dois picos de absorção do CAF e do CLA, ocorrendo em 226 e 310 nm e em 220 e 318, respectivamente (Figura 5.6, painéis A e C). Na figura 5.6, painéis A e C, ainda é possível verificar-se alterações nos comprimentos de onda em λ 252 nm e λ 262 nm nos espectros do ácido cafeico e do ácido clorogênico, respectivamente, sendo esses aumentos concomitantes à concentração de cobre no meio reacional (Figura 5.6, painéis B e D). De acordo com Oess *et al.* (OESS *et al.*, 1999), o comprimento de onda de aproximadamente 260 nm é típico do grupo catecol não complexado, demonstrando que há uma pequena interação entre o grupo catecol da molécula fenólica e o metal.

Segundo Oess *et al.* (1999), a complexação do cobre pelo CAF e pelo CLA pode ocorrer da seguinte forma: inicialmente, o cobre interage com o grupo catecol, havendo a liberação de 2H^+ ; em seguida, tem-se a estabilização da conformação do complexo e, posteriormente, a formação de um complexo de esfera interna (Figura 5.7). A velocidade da formação, bem como o tipo da conformação dos complexos, são dependentes do pH. A velocidade de formação do complexo CAF- Cu^{2+} é mais lenta em pHs elevados, podendo demorar mais de 24 horas. De acordo com Nardini *et al.* (1995), o complexo CAF- Cu^{2+} não é estável, sendo sua formação inibida em condições anaeróbicas.

Os resultados de Oess *et al.* (1999) demonstram a lenta complexação do Cu^{2+} pelo CAF, sendo esses resultados diferentes dos obtidos no estudo realizado por Nardini *et al.* (1995). Segundo esses autores, após uma hora em meio tamponado com PBS e em pH 7,4 há complexação do Cu^{2+} com o CAF, sendo esse resultado discrepante dos obtidos no presente estudo e no estudo de Oess *et al.* (1999), pois em condições similares, não foi verificada a formação do complexo Cu^{2+} -CAF. Nardini *et al.*, (1995) ainda relatam que a adição de EDTA inibe a complexação do Cu^{2+} pelo CAF, demonstrando que ele

apresenta a constante de afinidade menor ao metal do que o EDTA. Na Tabela 5.1 é apresentada a constante de afinidade de diversas moléculas com o Cu^{2+} .

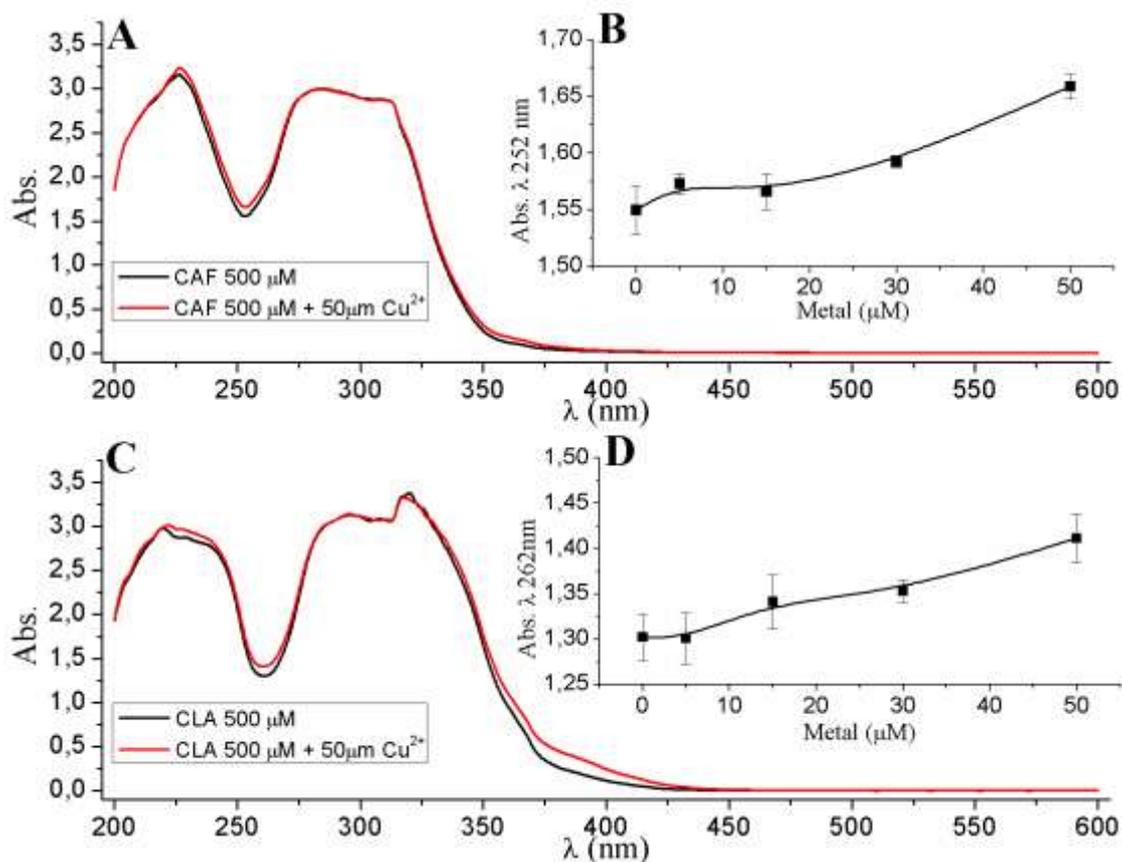


Figura 5.6: (Painel A) Perfil espectral do CAF (500 μM) e em presença de Cu^{2+} (50 μM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 7,2. Os reagentes foram pré-incubados por dez minutos (não houve adição de ascorbato). (Painel B) Aumento da absorbância em λ 252nm com crescentes concentrações de Cu^{2+} . (Painel C) Perfil espectral do CLA (500 μM) e em presença de Cu^{2+} (50 μM) em tampão KPi (20 mM) pH 7,2. Os reagentes foram pré-incubados por dez minutos (não houve adição de ascorbato). (Painel D) Aumento da absorbância em λ 262nm com crescentes concentrações de Cu^{2+} . (Painéis A e C) Os resultados representam respectivamente a curva mais representativa. (Painéis B e D) Os valores representam a média \pm DP (n = 3).

Apesar do mecanismo de complexação proposto tanto por Oess *et al.*, (1999) como Nardini *et al.* (1995) apresentarem elevada similaridade, os resultados do presente estudo são mais similares aos obtidos por Oess *et al.* (1999). Nesse sentido, há a necessidade de outros experimentos em diferentes faixas de pH, a utilização de outros tampões e outras técnicas (Difração de raio-x, Ressonância Magnética Nuclear - RMN) para verificar se o CAF e o CLA

apresentam o mesmo comportamento de complexação dos íons Cu^{2+} . De acordo com Andjelkovic *et al.* (2006), o tipo de solvente utilizado pode interferir nos resultados espectrofotométricos e na capacidade de complexação das moléculas.

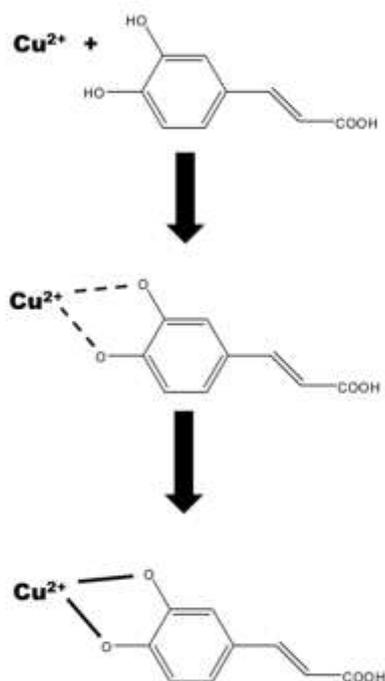


Figura 5.7: Esquema da formação do complexo CAF- Cu^{2+}

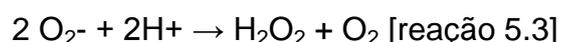
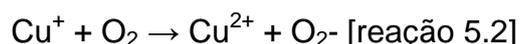
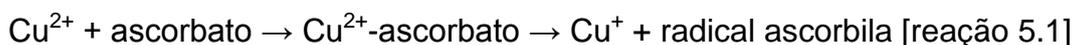
Após os experimentos de oxidação da 2-DR e de espectroscopia ultravioleta-visível, foram realizados experimentos utilizando a técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE). Por meio dessa técnica, é possível a visualização do sinal característico do radical de forma direta. Nesse caso, foi utilizado o sinal do radical ascorbilo, que é gerado a partir da primeira reação oxirredução entre o metal e o ascorbato (Reação 5.1). A aferição do sinal do radical ascorbilo deu-se pela medida métrica da primeira linha do sinal do radical, que é composto por duas linhas bem definidas (Figura 5.8), sendo essas diretamente proporcionais à quantidade de radical ascorbilo no meio reacional. Como observado no Figura 5.8, foram utilizadas duas concentrações dos ácidos fenólicos e quatro concentrações de Cu^{2+} , não havendo diferença estatística entre os pontos analisados (ANOVA-SNK) (Figuras 5.8 e 5.9).

Tabela 5.1: Constante de estabilidade do Cu^{2+} com diversas moléculas:

| Molécula | log K_1 | Molécula | log K_1 |
|-----------------------|-----------|-------------------------|-----------|
| Ácido benzóico | 1,6 | Histamina | 9,55 |
| Citrato | 5,9 | NTA | 13,03 |
| Ácido cítrico | 6,1 | Desferri-ferrioxamina E | 13,7 |
| Pirofosfato | 6,7 | HEDTA | 17,52 |
| Leucina | 7,0 | EGTA | 17,84 |
| β -fenilalanina | 7,74 | EDTA | 18,89 |
| Glicina | 8,22 | Cisteína | 19,2 |

NTA: Ácido nitrilotriacético; EDTA: Ácido etileno diamino tetracético; HEDTA: Ácido hidroxietilenodiaminotetracético; EGTA: Ácido etileno glico-bis(b-amino éter) N, N, N', N'-tetracético. (FURIA, 1980; FRANCIS e DODGE, 1993; WIDMER, 2001; PATTON, 2011).

Tanto o CAF como o CAL apresentaram comportamento similar (reação 5.1) nas condições utilizadas neste estudo. Assim, verificamos que na presença de CLA e de CAF não há alteração da intensidade do sinal de RPE, indicando que os compostos atuam na primeira etapa do conjunto de reações que levam à formação de radicais hidroxila. Este resultado é uma evidência indireta e reflete a baixa capacidade de quelação dos compostos estudados.



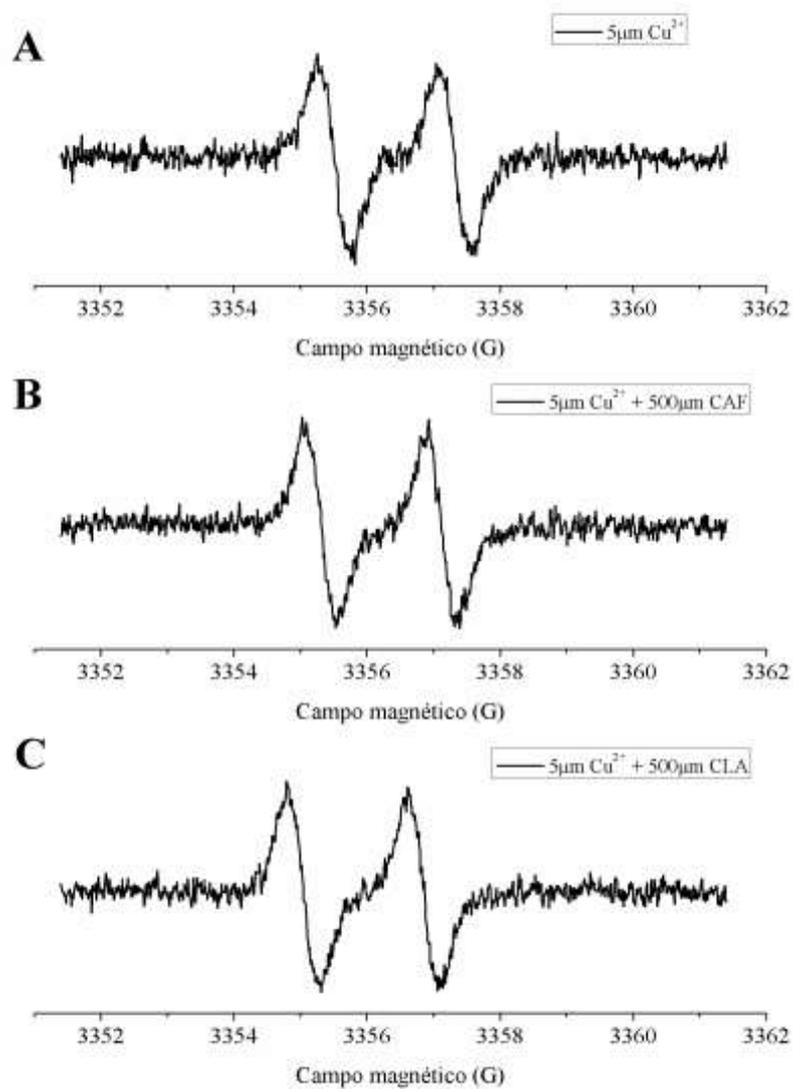


Figura 5.8: Intensidade do sinal de EPR do radical ascorbila em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 7,2 em três condições: (painel A) controle - Cu^{2+} (5 μM); (painel B) Cu^{2+} (5 μM) na presença de CAF 500 μM . (painel C) Cu^{2+} (5 μM) na presença de CLA 500 μM .

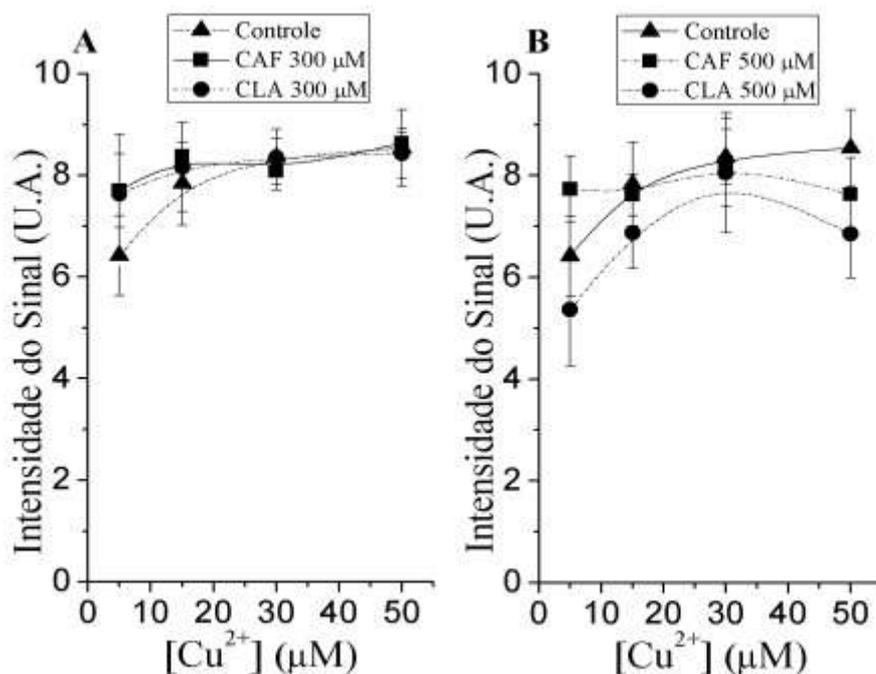


Figura 5.9: Efeito da variação da concentração de Cu^{2+} sobre a intensidade do sinal de EPR do radical ascorbila em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 7,2 em três condições: (▲) controle - Cu^{2+} ; (■) Cu^{2+} na presença de CAF; (●) na presença de CLA. (Painel A): CAF e CLA (300 μM). (Painel B): CAF e CLA (500 μM). Os valores representam a média \pm DP no mínimo de três pontos. (ANOVA-SNK)

Em seguida, resolvemos testar a metodologia da hidroxilação do ácido tereftálico (TPA), que, de acordo com a literatura, é muito sensível, apresentando taxa de hidroxilação mais rápida do que os outros agentes sequestradores de OH^{\cdot} (exemplo: ácido salicílico, fenilalanina). Além disso, apresenta uma eficiência de fluorescência, ou seja, o aumento relativo de fluorescência por hidroxilação, cerca de três vezes maior do que o método de hidroxilação do ácido salicílico (SARAN e SUMMER, 1999; YAN *et al.*, 2005). Esse método não gera subprodutos da reação como no ensaio da degradação oxidativa da 2-DR, que poderiam interferir na interpretação adequada dos resultados.

Primeiramente, foi realizada a cinética da reação mediada por íons Cu^{2+} e ascorbato. Foram utilizadas quatro concentrações de Cu^{2+} (5, 15, 30, 50 μM) e três concentrações de CLA (0, 50, 100, 500 μM) para a padronização da metodologia.

Como pode ser observado na Figura 5.10, a diminuição de maneira dependente da concentração do antioxidante na intensidade de fluorescência, indicando que o CLA inibe a formação de radical hidroxil, corroborando os resultados obtidos com os ensaios de degradação oxidação da 2-DR. Pode-se verificar que 500 μM de CLA tem quase a inibição completa da hidroxilação do TPA. Após estabelecer as condições experimentais, foram realizados ensaios adicionais na presença de CAF e CLA.

Os resultados obtidos na Figura 5.11 indicam que tanto o CLA como o CAF causam diminuição dependente da concentração na intensidade de fluorescência. O CAF apresentou menor proteção em relação ao CLA, possivelmente por causa do reduzido número de grupos hidroxil do CAF. Também se pode observar que em baixas concentrações de Cu^{2+} , o CAF apresenta aparente comportamento pró-oxidante, sendo necessários mais estudos para melhor elucidação desse efeito, uma vez que esse resultado pode ser devido a um artefato do método.

Para verificar se havia algum outro composto sendo excitado junto com o TPA, foi realizado o espectro de excitação do TPA no qual se variou o comprimento de onda da excitação de λ 250 nm até λ 395 nm e a emissão fixada em λ : 420 nm. Verifica-se na Figura 5.11 que tanto o CLA como o CAF apresentam proteção contra a hidroxilação do TPA de maneira dependente da concentração dos compostos estudados. Ainda na figura 5.12, é possível observar-se que mesmo na ausência de metal há um aumento discreto na fluorescência do TPA concomitantemente com a concentração do CLA e um aumento significativo do CAF. Isso possivelmente se deve à interferência desses compostos na fluorescência do TPA.

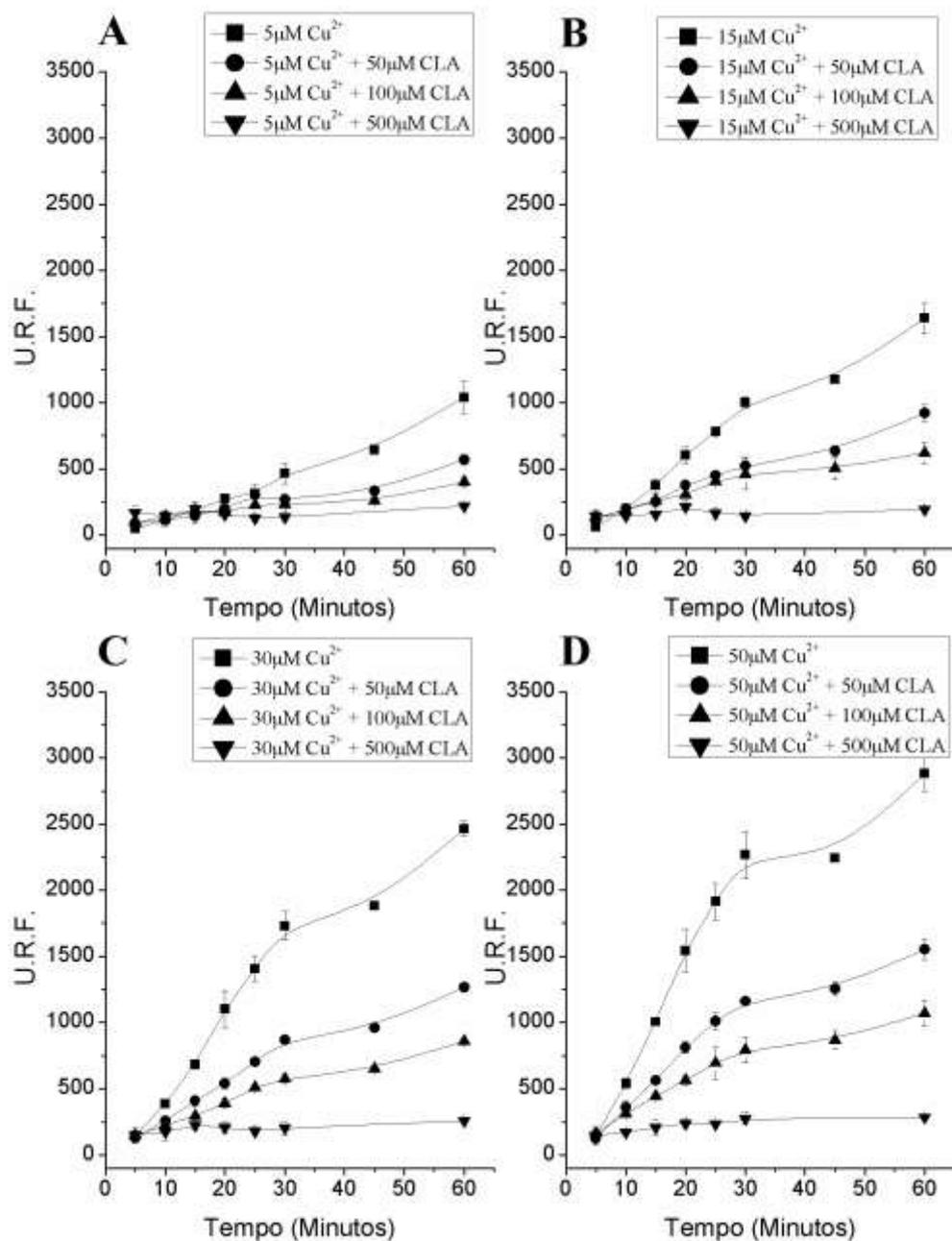


Figura 5.10: Curso temporal da hidroxilação do TPA (125 μM) mediada por diferentes concentrações de Cu²⁺ e ascorbato (0,5 mM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 7,2 em 4 condições (■)Cu²⁺; (●)Cu²⁺ na presença de CLA (50 μM); (▲)Cu²⁺ na presença de CLA (100 μM); (▼) Cu²⁺ na presença de CLA (500 μM). (Painel A): hidroxilação do TPA mediada por Cu²⁺ (5 μM); (Painel B): hidroxilação do TPA mediada por Cu²⁺ (15 μM) (Painel C) hidroxilação do TPA mediada por Cu²⁺ (30 μM); (Painel D): hidroxilação do TPA mediada por Cu²⁺ (50 μM). Os reagentes foram pré-incubados por dez minutos antes da adição de ascorbato. Os valores acima representam a média ± DP (n = 3).

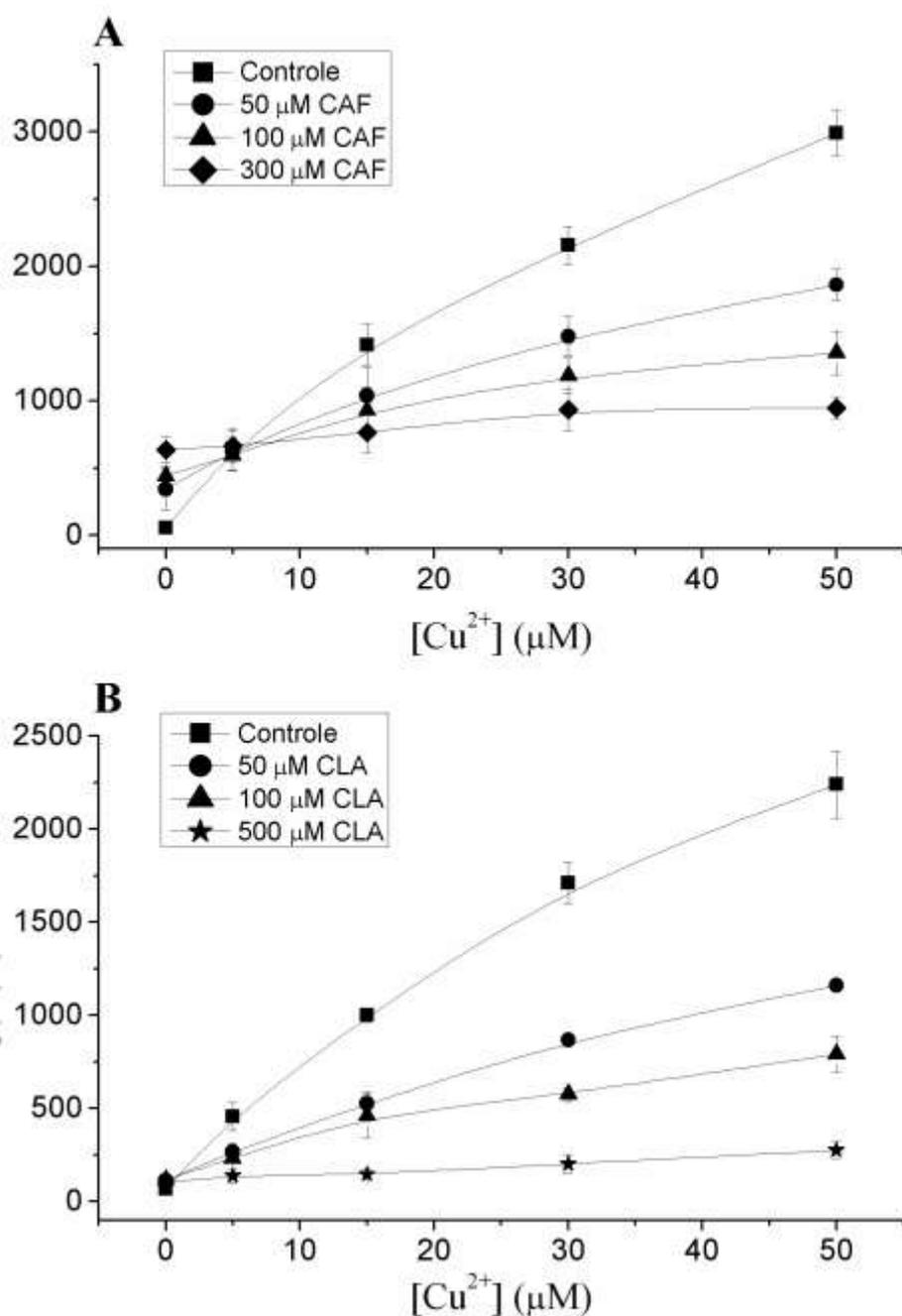


Figura 5.11: Estudo da ação antioxidante do CAF (Painel A) e CLA (Painel B) mediada por diferentes concentrações de Cu²⁺ e ascorbato (0,5 mM) na hidroxilação do TPA (125 μM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 7,2 . Os reagentes foram pré-incubados por 10 minutos antes da adição de ascorbato e o tempo de reação foi de 30 minutos (Painel A) (■) Controle Cu²⁺; (●) Cu²⁺ na presença de CAF 50 μM; (▲) Cu²⁺ na presença de CAF (100 μM); (◆) Cu²⁺ na presença de CAF (300 μM); (Painel B) (■) Controle Cu²⁺; (●) Cu²⁺ na presença de CAF 50 μM; (▲) Cu²⁺ na presença de CAF (100 μM); (★) Cu²⁺ na presença de CAF (500 μM). Os reagentes foram pré-incubados por dez minutos antes da adição de ascorbato. Os valores acima representam a média ± DP (n = 3).

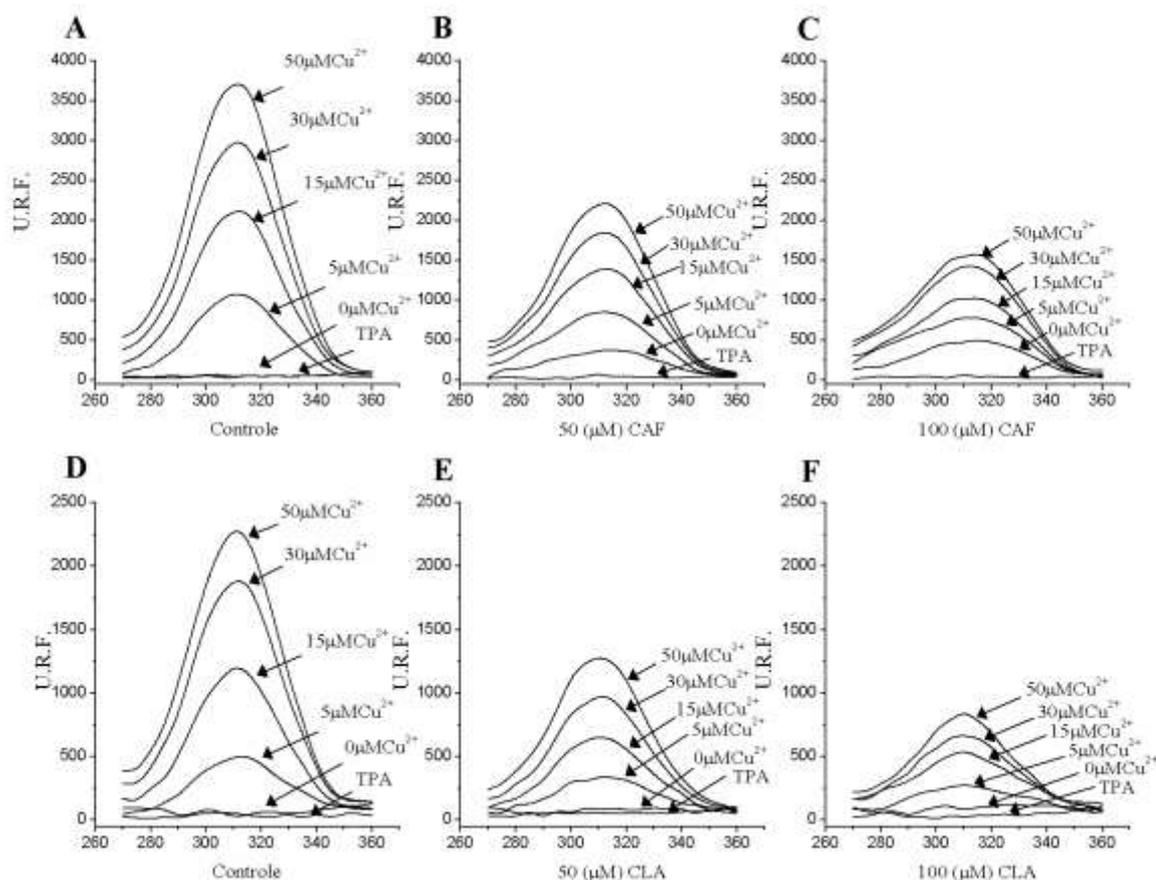


Figura 5.12: Perfil espectral da hidroxilação do TPA (125 μM) na presença de CAF e CLA (50 e 100 μM) em diversas concentrações Cu^{2+} (50 μM) em tampão fosfato de potássio (20 mM) pH 7,2. Os reagentes foram pré-incubados por dez minutos antes da adição de ascorbato e o tempo de reação foi de 45 minutos. (Painel A); Perfil espectral da hidroxilação do TPA sem adição de CAF. (Painel B): Perfil espectral da hidroxilação do TPA com adição de CAF 50 μM ; (Painel C): Perfil espectral da hidroxilação do TPA sem adição de CLA. (Painel D); Perfil espectral da hidroxilação do TPA com adição de CLA 50 μM ; (Painel E) Perfil espectral da hidroxilação do TPA com adição de CLA 100 μM . Os resultados representam respectivamente a curva mais representativa.

5.4 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os resultados expostos neste capítulo mostram que sistemas aquosos em que se tem a 2-DR como alvo tanto o ácido clorogênico como o ácido cafeico em reações radicalares mediada por íons Cu^{2+} apresentam comportamento híbrido de ação antioxidante, atuando tanto como complexante de íons Cu^{2+} como sequestrador de radicais hidroxil. Os resultados também sugerem que em sistemas em que se tem o ácido terafitálico como alvo, tanto o ácido cafeico como o ácido clorogênico apresentam características de sequestradoras de radicais OH, corroborando os resultados obtidos com a metodologia da degradação oxidação da 2-DR.

Com base nessas observações experimentais demonstrou-se que o mecanismo de ação antioxidante do ácido clorogênico como o ácido cafeico em sistemas aquosos na faixa de pH 7,2, deve-se às suas habilidades de sequestrar radicais hidroxil e de ligar-se fracamente a íons Cu^{2+} .

Para melhor elucidação do mecanismo de ação dessas moléculas em reações radicalares mediadas por íons Cu^{2+} e ascorbato faz-se necessária a realização de novos experimentos envolvendo principalmente outras técnicas como difração de raio-x para verificar a formação do complexo entre os íons Cu^{2+} e os polifenóis ácido cafeico e clorogênico e o uso de diferentes tipos de tampões, uma vez que o meio reacional pode afetar os resultados espectrofotométricos e na capacidade de complexação das moléculas (ANDJELKOVIC *et al.*, 2006). Além disso, sugere-se verificar o consumo de oxigênio, para constatar se o mecanismo proposto por Nardini *et al.* (1995), no qual a formação do complexo CAF- Cu^{2+} é dependente de oxigênio.

6. Análise do potencial antioxidante do ácido cafeico (CAF) e do ácido 5-o-cafeoilquínico (ácido clorogênico) em sistema lipofílico na presença de azo composto hidrossolúvel 2'-2'-azobis 2-amidino propano hidrocloreto (AAPH)

6.1 MEMBRANAS BIOLÓGICAS

6.1.1 Estrutura e função das membranas biológicas

Em 1972, Singer e Nicolson (SINGER e NICOLSON, 1972) propuseram o modelo do mosaico fluido para as membranas biológicas, no qual se tem as proteínas de membrana distribuídas aleatoriamente e que estão engastadas nos lipídios, que formam uma bicamada, que resulta uma estrutura complexa. Essa estrutura é formada principalmente pelos fosfolipídios que estão distribuídos assimetricamente entre as monocamadas interna e externa da membrana. Porém, estudos mais recentes têm revelado a existência de domínios lipídicos especializados nas membranas denominados *rafts*, que apresentam composição lipídica diferenciada e estão diretamente relacionados à transdução de sinais e podem afetar a fluidez da membrana (SEAN, 2003; LINGWOOD e SIMONS, 2010). As membranas não são barreiras meramente passivas, essas são flexíveis, autosselantes e seletivamente permeáveis a solutos polares, além de exercerem regulação sobre a síntese de lipídios e de certas proteínas (YAWATA, 2003).

A fluidez da membrana pode ser influenciada diretamente por diversos fatores, dentre esses: o conteúdo de colesterol na membrana, o tipo de colesterol esterificado ou livre. Membranas ricas em colesterol são mais ordenadas no estado de cristal líquido e tendem a ser mais resistentes à peroxidação lipídica, apresentando baixa mobilidade e têm sua propagação radicalar reduzida (SEVANI e URSINI, 2000), além de participar da modulação da microviscosidade dos lipídios. A interação lipídio-proteína e o grau de insaturação dos ácidos graxos influenciam a fluidez. Os ácidos graxos

insaturados tendem a fazer a membrana mais fluida comparada aos ácidos graxos saturados, devido à diferença na temperatura de transição e juntamente com o menor empacotamento da cadeia de ácidos graxos poli-insaturados na membrana. Isso se deve à configuração CIS das duplas ligações (CHOE, JACKSON e YU, 1995), que provocam uma dobra de 30° na cadeia, dificultando a agregação das moléculas, o comprimento da cadeia acila, a presença de compostos anfipáticos como os *lisofosfatídeos*, produtos da peroxidação lipídica (SEVANI e URSINI, 2000; LIU *et al.*, 2002), a relação colesterol/fosfolipídios e a composição dos fosfolipídios que influenciam de forma direta a fluidez da membrana.

A distribuição dos lipídios na membrana processa-se da seguinte forma: o colesterol é distribuído uniformemente entre as monocamadas interna e externa da membrana e os fosfolipídios estão distribuídos assimetricamente entre essas camadas. A fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina estão localizadas predominantemente na monocamada interna. Já a fosfatidilcolina e a esfingomiélna estão alocadas majoritariamente na monocamada externa. Na tabela 3.1 é apresentada a composição de lipídios da membrana de eritrócitos.

6.1.2 Membrana plasmática de eritrócito

A membrana do eritrócito é um modelo conveniente para a investigação do(s) fenômeno(s) lítico(s) da perda de fluidez da membrana e tem sido extensivamente utilizada. Essa membrana é de fácil obtenção e isolamento e as suas principais características são bem conhecidas, representando um ótimo modelo para estudo de membranas mais complexas e de outros tipos celulares. Além disso, possui uma única membrana, que pode ser isolada sem contaminação por outras membranas celulares.

O eritrócito apresenta uma membrana extremamente resistente e com alto grau de deformidade, sendo capaz de transpor capilares com diâmetro de 3-4 µm, que corresponde à metade de seu próprio diâmetro, além de ser rico

em antioxidantes e em enzimas. Porém, a abundância de ácidos graxos poliinsaturados na membrana dos eritrócitos resulta em uma membrana susceptível à oxidação e, por isso, é um bom modelo experimental para os estudos de dano oxidativo (LIU *et al.*, 2002).

Tabela 6.1: Composição de lipídios da membrana do eritrócito

| Lipídios | µg por 10 ¹⁰ células vermelhas |
|---|---|
| Colesterol livre (CL) | 1202 ± 103 |
| Total fosfolipídio (TF) | 2604 ± 241 |
| <i>lisofosfatidilcolina</i> (L-PC) | 34 ± 18 (1,3 ± 0,7%) |
| <i>fosfatidilcolina</i> (PC) | 747 ± 73 (28,7 ± 2,8%) |
| Esfingomiéline (SM) | 674 ± 49 (25,9 ± 1,9%) |
| Fosfatidil-etinonamida (PE) | 805 ± 42 (30,9 ± 1,6%) |
| Fosfatidilserina (PS) + <i>fosfatidil</i> inositol (PI) | 344 ± 34 (13,2 ± 1,3%) |
| PC + SM+L-PC/PE+OS+PI | 1,27 ± 0,04 |
| Razão CL/TF | 0,90 ± 0,04 |
| Razão SM/PC | 0,090 ± 0,07 |

Os valores representam µg por 10¹⁰ células vermelhas; Valores dentro dos parênteses representam o percentual de fosfolipídios (M ± DP). Adaptado de Yawata (2003)

O eritrócito de mamífero é uma célula anucleada de forma discóide bicôncava que contém hemoglobina em alta concentração. Por não possuir núcleo nem organelas, muitos autores não consideram o eritrócito como célula verdadeira. Possui meia-vida de cerca de 60-120 dias antes de ser degradado

pelo baço e apresentar diversas funções no organismo, dentre elas o transporte de O_2 e a remoção de CO_2 e H^+ .

As células vermelhas de adulto apresentam diferenças funcionais em relação às células vermelhas de recém-nascido como: aumento de volume celular, redução da filtrabilidade, declínio acelerado da deformidade celular e internalização da membrana durante o envelhecimento celular, aumento de anomalias morfológicas, susceptibilidade aumentada à peroxidação lipídica e à redução da meia-vida em cerca de um terço. (CRESPO, BIFANO e FREEDMAN, 1988).

É bem documentado na literatura que alterações nas características físicas da estrutura da membrana de eritrócitos, bem como na fluidez da membrana, podem influenciar na funcionalidade celular (CHOE, JACKSON e YU, 1995). Essas alterações estão associadas aos metabólitos da peroxidação lipídica, como o 4-hidroxinonal, ao processo de senescência e também em alguns processos patológicos. Butterfield e Markesbery (1980) demonstraram que pacientes portadores de distrofia muscular miotônica, distrofia muscular de Duchenne e na *miotonia congênita* (exemplo:: doença de Thomsen) também possuíam alterações na fluidez da membrana.

6.1.3 Marcadores de spin

Grande parte dos sistemas biológicos de interesse não apresentam centros paramagnéticos, tornando-se necessária a utilização de sondas específicas, normalmente conhecidas como marcadores de spin ou *spin label* para a utilização da técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) (SALMON *et al.*, 2007). O termo marcador de spin foi proposto por McConnel em 1965 para descrever radicais livres estáveis utilizados como sonda, e tem sido aplicado a moléculas biológicas, fornecendo informações a respeito de mudanças químicas e estruturais do sistema.

Os marcadores de spin vêm sendo utilizados para detecção de mudanças na membrana citoplasmática de eritrócitos que se relacionam com algum tipo de anormalidade (exemplo: anemia falciforme) ou mesmo com o envelhecimento dos eritrócitos (aumento da rigidez da membrana), fornecendo informações sobre a função da membrana e de proteínas (BUTTERFIELD e MARKESBERY, 1980; CRESPO, BIFANO e FREEDMAN, 1988; CHEN, LU e WANG, 1992; GORNICKI e GUTSZE, 2000; LIU *et al.*, 2002; PAWLIKOWSKA-PAWLEGA *et al.*, 2003; KOPANI *et al.*, 2006; SPASOJEVIĆ *et al.*, 2011)

A fluidez dos lipídios tem sido extensivamente estudada nos últimos 20-30 anos relacionando os parâmetros de ordem. Em estudos envolvendo sistemas biológicos, os marcadores de spin mais utilizados são os que contêm o grupo nitróxido, por apresentarem espectros de RPE sensíveis ao movimento molecular e à polaridade do ambiente. Além disso, apresentam boa estabilidade química do fragmento paramagnético até cerca de 80°C e no intervalo de pH entre 3,0 e 10,0 (SALMON *et al.*, 2007). Existe uma variedade de marcadores de spin com radical nitróxido, sendo esses classificados em: pouco estáveis (pirolidinas, que são mais estáveis que as piperidinas), hidrofílicos, lipofílicos, carregados ou neutros (SPASOJEVIĆ *et al.*, 2011).

No caso das membranas, têm sido utilizados os marcadores de spin derivados de ácidos graxos ou de fosfolipídios, pois esses possuem semelhança estrutural com os componentes biológicos, reproduzindo a estrutura e a mobilidade do sistema biológico. Esses se inserem na membrana, orientando o grupo carboxílico (hidrofílico) na fase aquosa da bicamada lipídica e a cadeia de ácidos graxos pela parte central da membrana (SPASOJEVIĆ *et al.*, 2011). No caso dos marcadores derivados do ácido esteárico e que apresentam o grupo doxil em sua estrutura química, o eixo Z do radical nitróxido, e a direção do orbital $2p\pi$ do nitróxido, está aproximadamente paralelo ao eixo normal a bicamada, refletindo melhor a mobilidade do sistema biológico

A possibilidade de inserir o grupo doxil, que contém o fragmento paramagnético, em diferentes posições da cadeia de ácidos graxos, permite avaliar a fluidez da membrana em diferentes profundidades da bicamada pela

mensuração do grau de restrição do marcador de spin (SPASOJEVIĆ *et al.*, 2011). O 5-doxil ácido esteárico (5-DSA, "5-doxyl stearic acid") (figura 6.1), contendo o grupo doxil no quinto carbono da cadeia acila, monitora a mobilidade da membrana lipídica próxima à cabeça do fosfolipídio, enquanto o 16-doxil ácido esteárico (16-DSA, "16-doxyl stearic acid") fornece informações sobre o centro hidrofóbico da membrana (GORNICKI e GUTSZE, 2000).

Neste trabalho foi utilizado o marcador de spin 5-DSA, que fornece informações sobre a região hidrofílica da membrana (GORNICKI e GUTSZE, 2000; LIU *et al.*, 2002)

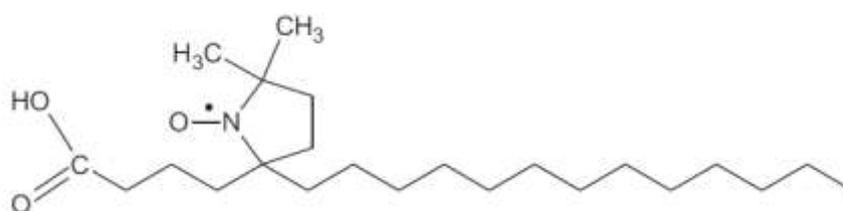


Figura 6.1: Marcador de spin 5-doxil estearato (5-DSA) que contém um grupo nitróxido ligado no 5º carbono da cadeia acila.

6.2 OBJETIVOS

Este capítulo tem como objetivo geral a análise do potencial antioxidante do ácido cafeico (CAF) e do ácido 5-*o*-cafeoilquínico (CLA) em sistema lipofílico na presença de azo composto hidrossolúvel 2'-2'-azobis 2-amidino propano hidrocloreto (AAPH).

Objetivos específicos: I - Estudar, por meio da RPE, a variação do grau de organização das membranas de eritrócitos, comparando o efeito do CAF e CLA; II - Verificar o efeito de diferentes antioxidantes como o BHA, BHT, trolox sobre a oxidação de membranas causada por um sistema gerador de radicais livres que é independente da presença de metal (ver tópico 6.3.1.1.2),

6.3. MATERIAL E MÉTODOS

6.3.1 Material

6.3.1.1 Reagentes

Foram utilizados reagentes de qualidade analítica adquiridos da Sigma Chemical Co.: 2'-2'-azobis 2-amidino propano hidrocloreto (AAPH), 5-Doxil estearato (5-DSEA), 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico (Trolox®), ácido acético, ácido cafeico, ácido clorogênico, butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), alfa-tocoferol,

6.3.1.1 Soluções

O preparo das principais soluções usadas na elaboração deste capítulo é apresentado abaixo.

6.3.1.1.1 Ácido cafeico e ácido clorogênico

As soluções de ácido cafeico (CAF) e ácido clorogênico (CLA) foram preparadas diariamente em tampão fosfato salina (PBS). As soluções de CLA e de CAF foram submetidas à sonicação no banho ultrassônico Branson modelo 2510 (Branson Ultrasonics Corporation - USA) com frequência de 40 kHz, durante dois minutos com temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. As soluções estoques apresentavam concentrações de 2 mM e eram preparadas minutos antes de serem realizados os experimentos.

6.3.1.1.2 2'-2'-azobis 2-amidino propano hidrocloreto (AAPH)

AAPH é um azo composto hidrossolúvel, que durante o processo de decomposição dependente de temperatura produz de forma constante dois radicais 2-amidinopropil (C-radical). Alguns desses radicais podem combinar-se para produzir produtos estáveis devido à proximidade da geração, mas muitos se difundem e reagem rapidamente com O₂ formando radicais peroxila (NIKI, 1990; CELEDON *et al.*, 2001). O AAPH tem uma taxa constante de geração de radicais peroxil constante de $1,36 \times 10^{-6}$ [AAPH] mol/litro/segundo durante as primeiras horas em solução, apresentando meia-vida de 175 horas em pH neutro (NIKI, 1990). De acordo com Stefek *et al.* (2005), durante as três primeiras horas do processo de decomposição tem-se uma redução da concentração do AAPH inferior a 3% por hora.

Nos experimentos de peroxidação lipídica foram utilizados 50 mM de AAPH, no qual são gerados $\approx 0,730$ mM de radicais peroxil durante as três horas de incubação na temperatura de 37°C. A taxa de produção de radicais segue a fórmula proposta por Niki (1990).

$$1,36 \times 10^{-6} [\text{AAPH}] \times T \text{ (Fórmula 6.1)}$$

Onde: [AAPH] é a concentração do AAPH em mM e T o tempo de reação expresso em segundos.

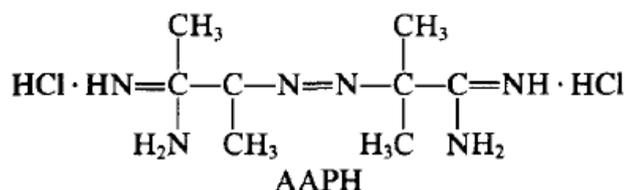
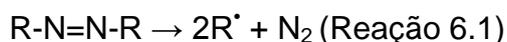


Figura 6.2: Estrutura química 2'-2'-azobis 2-amidino propano hidrocloreto (AAPH) (Retirado de Niki (1990))

O mecanismo comumente aceito de decomposição do AAPH é apresentado a seguir:



6.3.2 MÉTODOS

6.3.2.1 Peroxidação lipídica em membranas de eritrócitos

6.3.2.1.1 Preparação das membranas de eritrócitos (*Ghosts* de eritrócitos)

Amostras de sangue humano gentilmente cedidas pelo Laboratório INGOH (Goiânia, GO), foram diluídas em tampão PBS (10 mM de fosfato, 154 mM de NaCl, pH 7,4) e centrifugadas (200 × g, 5 min., 4°C). Os demais componentes sanguíneos foram removidos por aspiração e, em seguida, o pellet formado foi ressuspensionado em tampão PBS pH 7,4. Esse processo foi realizado três vezes a fim de se obter um concentrado de hemácias, livre dos demais componentes sanguíneos.

Para a remoção do tampão PBS, as amostras foram centrifugadas a 16.000 × g, 10 min., 4°C. Depois disso, o concentrado de hemácias foi diluído 40 vezes em tampão lisante (10 mM de fosfato, pH 8,0) e centrifugado a 16.000 × g, 10 min., 4°C. O pellet formado foi ressuspensionado em tampão lisante (10 mM de fosfato, pH 8,0). Esse processo foi repetido cinco vezes. Para recuperar a integridade das membranas eritrocitárias, o pellet obtido foi ressuspensionado

em tampão de osmolaridade e pH fisiológico PBS (10 mM de fosfato, 154 mM de NaCl, pH 7,4), centrifugado a 16.000 x g, 10 min., 4°C. Após três a quatro repetições consecutivas desse processo, obteve-se um concentrado livre de hemoglobina com coloração esbranquiçada, que foi armazenado a -20°C e utilizado no máximo em cinco dias.

6.3.2.1.2 Oxidação das membranas de eritrócitos

As membranas de eritrócitos livres de hemoglobina (~ 4 mg de proteína/mL) foram diluídas em 1,5 mL de tampão PBS (10 mM de fosfato, pH 7,4 154 mM de NaCl) contendo 50 mM do azo composto 2,2'- azobis(2-amidinopropano) (AAPH) e incubadas por três horas a 37°C. Essa concentração foi escolhida, pois se consegue evidenciar claramente o parâmetro espectral $2A_{||}$ de aproximadamente 58,3 Gauss no espectro de RPE.

O trabalho desenvolvido por Silva (2011), no laboratório de Biofísica da UFG, demonstrou uma correlação positiva entre a formação de malondialdeído e a rigidez de membrana de eritrócitos submetida ao estresse oxidativo com diferentes concentrações de AAPH, como pode ser visualizado na figura 6.3.

6.3.2.1.3 Compostos utilizados

Foram utilizadas as seguintes moléculas antioxidantes em nossos experimentos:

- Compostos sintéticos: ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano (Trolox®), análogo hidrossolúvel da vitamina E (solubilizado em PBS), butilato de hidroxianisole (BHA) e o butilato de hidroxitolueno (BHT) solubilizados em etanol.
- Compostos naturais: α -tocoferol (solubilizado em etanol), ácido cafeico, ácido clorogênico (solubilizados em PBS).

Nos ensaio sem que compostos eram solubilizados em etanol (α -tocoferol, BHA e BHT), o etanol era primeiramente evaporado, utilizando fluxo de nitrogênio e o filme formado do composto foi pré-incubado com as membranas eritrocitárias durante 45 minutos. Após o período de pré-incubação adicionava-se o AAPH.

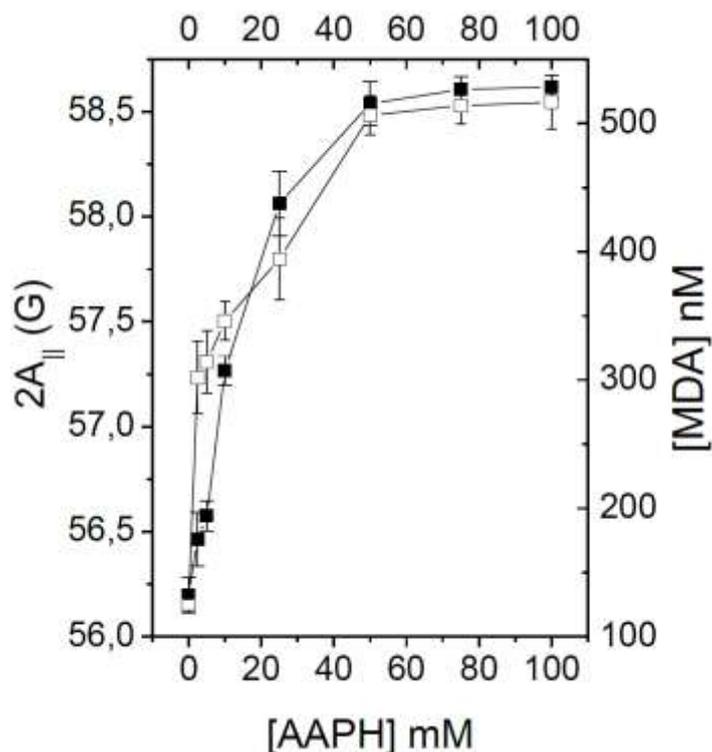


Figura 6.3: Parâmetro espectral $2A_{||}$ (G), do marcador 5-DSA em membranas de eritrócitos (■) e concentração de MDA formado pela peroxidação dos lipídios em função da concentração de AAPH (□). As membranas diluídas em tampão PBS (10 mM, 154 mM NaCl) pH7,4 foram Incubadas com diferentes concentrações de agente oxidante AAPH por três horas a 37°C. Adaptado de Silva (2011)

6.3.2.1.4 Marcação das amostras

Após o processo de oxidação induzido pelo AAPH, as membranas de eritrócitos foram centrifugadas a 16.000 x g, 10 min., 4°C e o pellet ressuspenso em PBS (10 mM de fosfato, 154 mM de NaCl, pH 7,4). Esse processo foi realizado duas vezes para máxima remoção do AAPH do meio reacional. Após esse procedimento, foram adicionadas às membranas 2 μ L do marcador de spin 5-doxil ácido esteárico (5-DAS) (figura 6.1), e essas amostras foram colocadas em capilares e as pontas seladas para obtenção do espectro.

6.3.2.1.5 Mensuração do parâmetro espectral $2A_{||}$

Em sistemas com características anisotrópicas e para marcadores de spin que apresentam restrições de movimento, como os marcadores de spin derivados do ácido esteárico quando incorporado à bicamada lipídica, o grau de restrição desses movimentos pode ser utilizado como uma medida de fluidez da membrana (SPASOJEVIĆ *et al.*, 2011).

Para mensuração da rigidez da membrana foi utilizado o parâmetro espectral $2A_{||}$. Esse parâmetro reflete o grau de movimento do marcador de spin na membrana (PERUSSI, RUGGIERO e TABAK, 1985; PAWLIKOWSKA-PAWLEGA *et al.*, 2003; SPASOJEVIĆ *et al.*, 2011). Quanto maior o dano oxidativo sofrido pela bicamada lipídica, maior será seu grau de enrijecimento e o marcador de spin passa a possuir menor mobilidade e valores mais elevados do $2A_{||}$ (esquema 6.1). Os valores do $2A_{||}$ são medidos a partir do espectro de RPE, como pode ser visualizado na figura 6.4.

Esquema 6.1:

Eritrócito + RL → Oxidação Lipídios/ Proteínas → Dano oxidativo → $> 2A_{||}$

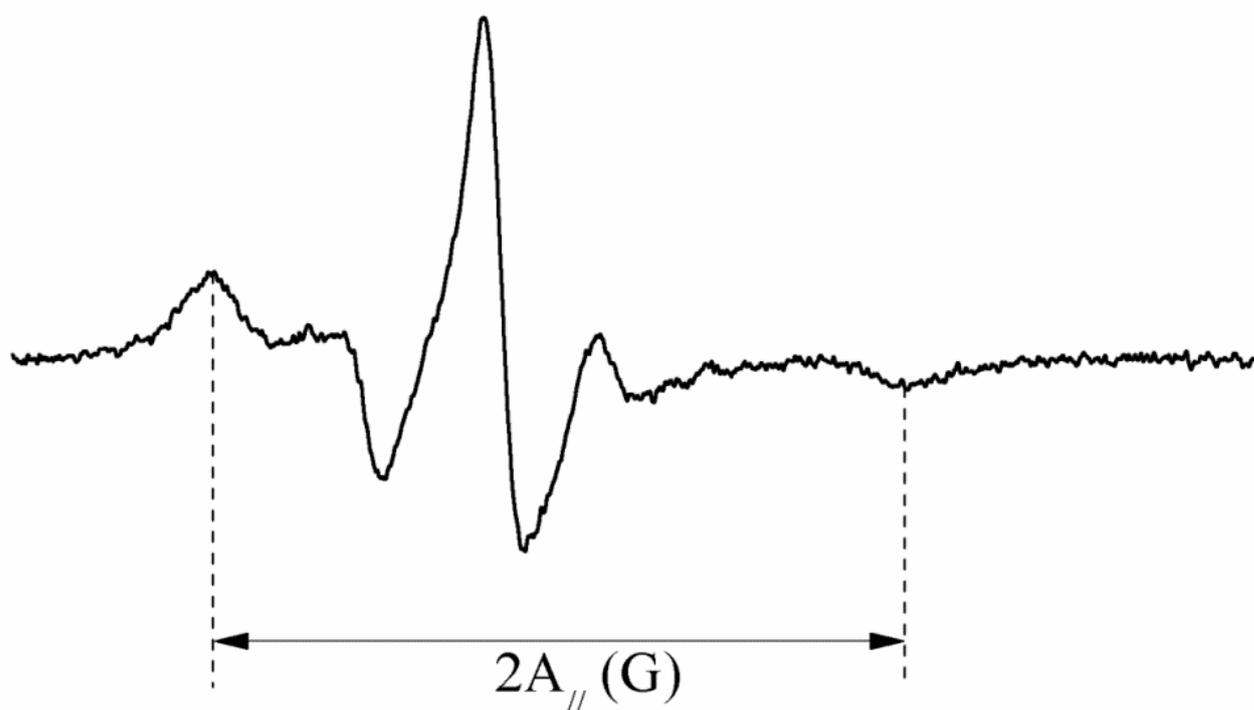


Figura 6.4: Espectro de RPE do marcador de spin 5-DSA obtido em temperatura ambiente com a indicação do parâmetro $2A_{//}$

6.3.2.1.6 Condições operacionais do espectrômetro de RPE

As medidas foram realizadas no laboratório de ressonância paramagnética eletrônica da Universidade Federal de Goiás (UFG). Foi utilizado um espectrômetro Bruker ESP 300, equipado com a cavidade de ressonância padrão ER4102 ST, operando em banda-X (aproximadamente 9,4 GHz) e com as seguintes condições operacionais: potência da micro-onda, aproximadamente 20 mW; frequência de modulação, 100 KHz; amplitude de modulação, 1,024 G; varredura do campo magnético, 100 G; tempo de varredura, 168 s e constante de tempo de detecção, 41 s.

6.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, foi feita análise descritiva da amostra e logo após a verificação se os valores de 2A// apresentaram distribuição normal utilizando o teste Shapiro-Wilk ($P > 0,05$). Satisfeita essa condição, foi efetuada a ANOVA com o pós-teste de Dunnett monocaudal. Valores de p inferior a 0,05 representam diferença estatística entre os grupos.

6.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A membrana do eritrócito é um modelo conveniente para a investigação dos fenômenos líticos da perda de fluidez da membrana e tem sido extensivamente utilizada. Uma vez que a membrana do eritrócito é ricamente composta de ácidos graxos poli-insaturados, isso a torna muito susceptível ao ataque de radicais livres, sendo um bom modelo experimental para o estudo da lesão oxidativa (LIU *et al.*, 2002).

A ação dos radicais livres nos eritrócitos pode levar a uma série de alterações, como formação de lipoperóxidos, redução da deformidade, aumento da rigidez da membrana, mudanças na morfologia, ligação cruzada e fragmentação de proteínas, hemólise e alterações no metabolismo intracelular (BEGUM; TERAO, 2002; SATO *et al.*, 1995; SADHU; WARE; GRISHAN, 1992).

De acordo com Spasojević *et al.* (2011), a peroxidação lipídica afeta de forma extensiva dependente a fluidez da membrana dos eritrócitos, podendo ser aferida pelo parâmetro $2A_{//}$ que é proporcional à fluidez da membrana (SPASOJEVIĆ *et al.*, 2011).

Neste trabalho foram aferidos os parâmetros $2A_{//}$ do sinal do marcador de spin 5-DSA em membranas de eritrócitos. Na Figura 6.5, podemos verificar o efeito de diversas moléculas (500 μ M) sobre o sinal espectral característico do 5-DSA e os pontos de aferição do parâmetro $2A_{//}$.

Os resultados obtidos, apresentados na figura 6.6, demonstram o efeito de diversos compostos e em diferentes concentrações sobre o parâmetro espectral $2A_{//}$ (G). Como observado, todas as moléculas utilizadas apresentaram atividade antioxidante dependente da concentração. O composto que apresentou menor efeito protetor em todas as concentrações foi o α -toc, sendo um resultado semelhante aos encontrados por Silva (2011).

Na Figura 6.7 (reapresentação do Figura 6.6), é possível verificar que na concentração de 10 μ M todos os compostos analisados apresentaram reduzida capacidade antioxidante. A partir de 100 μ M, os compostos BHT, CAF, CLA e trolox apresentaram elevada capacidade antioxidante, demonstrando que os compostos estudados CAF e CLA apresentaram forte ação antioxidante em

sistemas lipofílicos, equiparando-se ao BHT um potente antioxidante lipofílico muito utilizado na indústria alimentícia.

Silva (2011) demonstrou que os compostos quercitina, catequina e 4-nerolidilcatecol (4-NRC) (molécula recentemente isolada da pariparoba, *Pothomorphe umbellata*, planta nativa da mata atlântica) apresentaram melhor ação antioxidante que o α -Toc em todas as concentrações utilizadas. Os valores elevados de $2A_{\gamma}$ do sistema com α -Toc podem ser devidos ao tipo de marcador de spin utilizado, uma vez que o 5-DSA encontra-se na região hidrofílica da membrana do eritrócito (LIU *et al.*, 2002) e o α -Toc deve estar atuando na região interna da bicamada lipídica.

Por meio dos ensaios de peroxidação lipídica foi possível observar o efeito protetor do CAF e do CLA em sistema no qual se tem a geração de espécies radicalares pelo azo composto. Verificou-se que a capacidade antioxidante do CAF e do CLA está relacionada de forma dependente da concentração no meio reacional, proporcionando um efeito protetor significativo a partir de 100 μ M. Resultados semelhantes aos encontrados por Maurya e Devasagayam (2010) demonstraram que os ácidos hidroxicinâmicos, como o ácido ferúlico, apresentam uma potente capacidade de inibição da peroxidação lipídica de membranas microssomas e de linfócitos esplênicos, de forma concentração dependente das espécies reativas (radicais centrados em carbono e peroxila) gerados pelo AAPH, corroborando os achados deste trabalho.

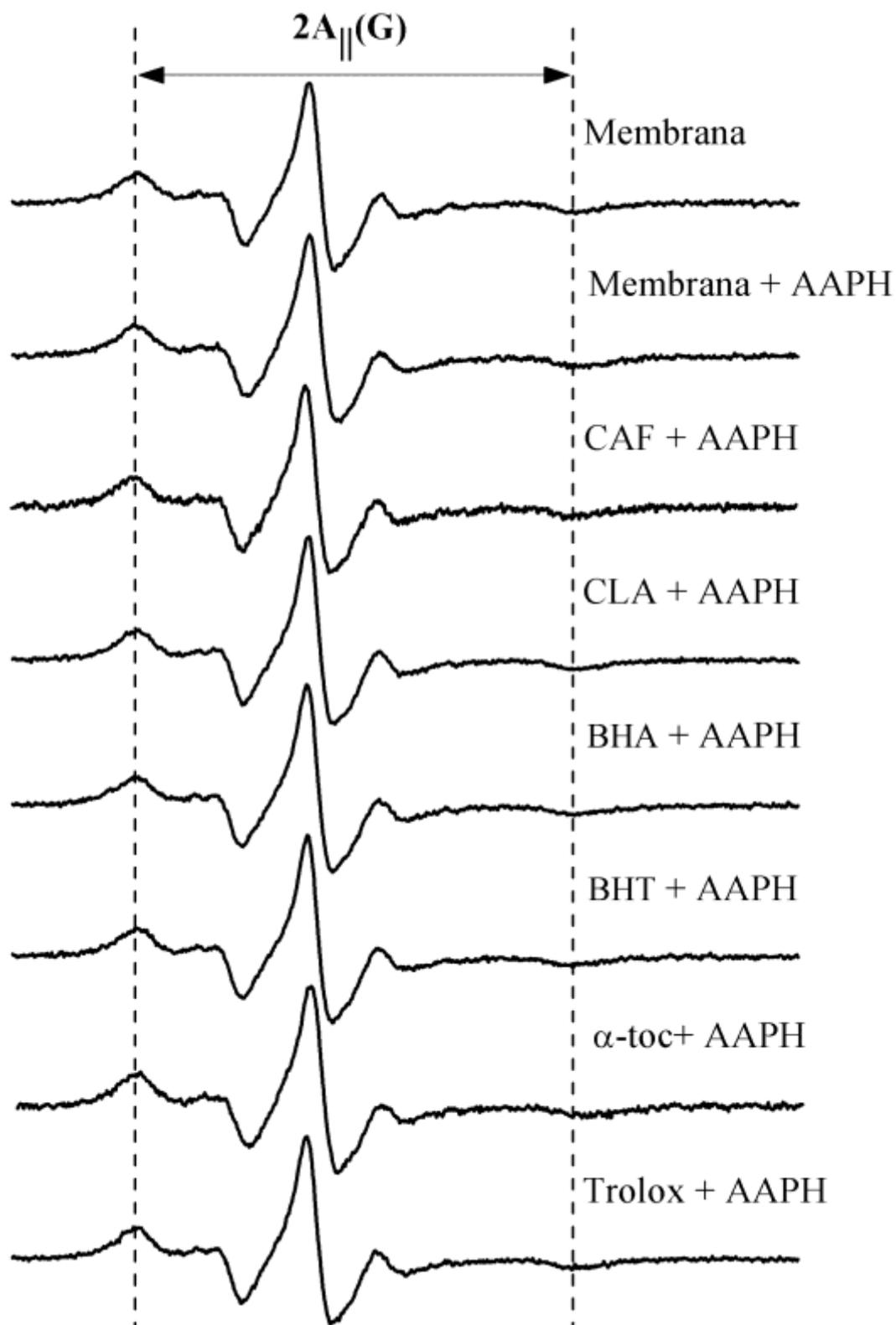


Figura 6.5: Efeito de diversas moléculas (500 μ M) sobre o parâmetro espectral 2A_{||} (G) do marcador 5-doxil estearato (5-DSA) em membranas de eritrócitos incubadas durante três horas com AAPH (50 mM) a 37°C em tampão PBS (10 mM, 154 mM NaCl) pH7,4.

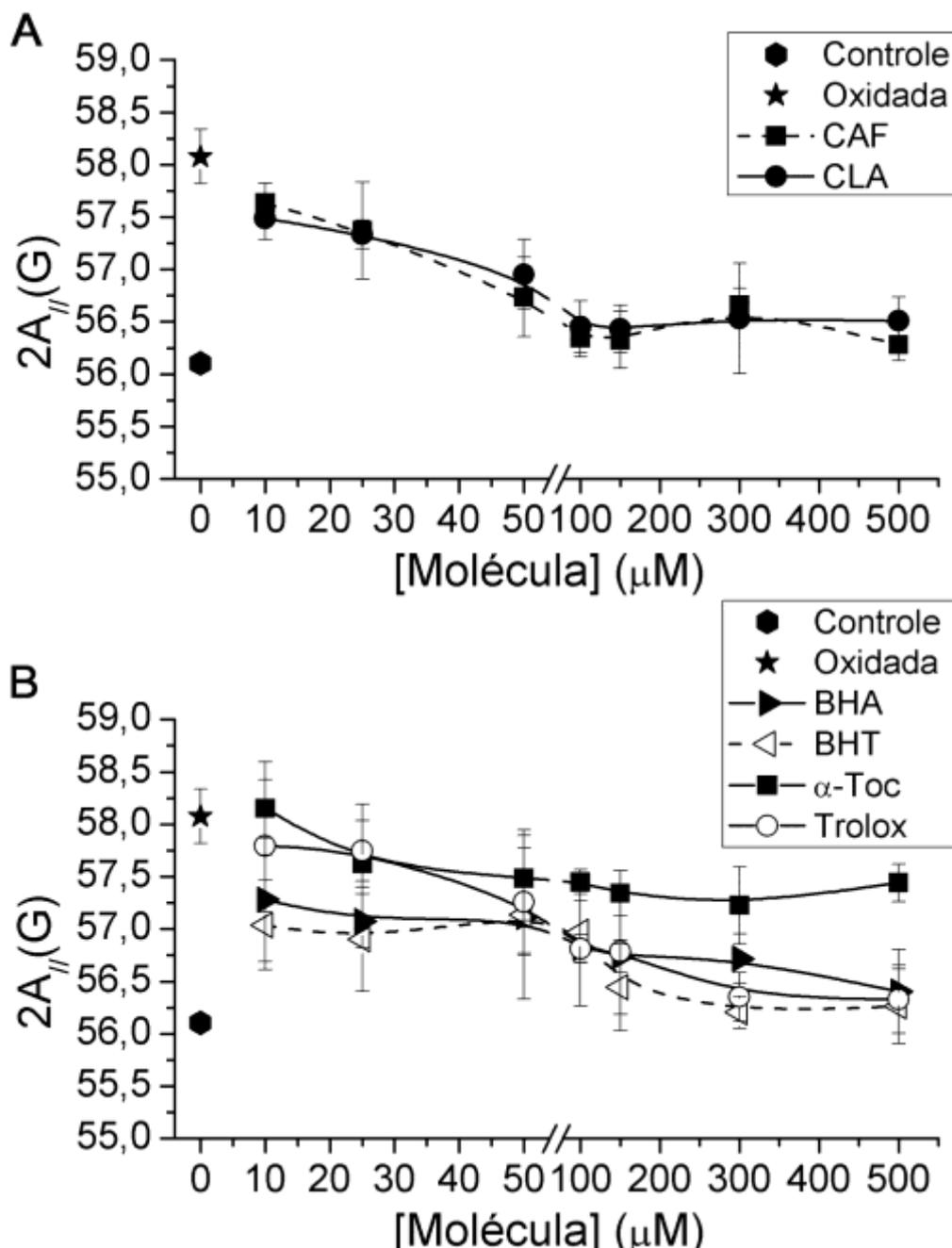


Figura 6.6: Efeito da concentração de diversas moléculas sobre o parâmetro espectral $2A_{//}$ (G) do marcador 5-Doxil estearato (5-DSA) em membranas de eritrócitos incubadas durante três horas com AAPH (50 mM) a 37°C em tampão PBS (10 mM, 154 mM NaCl) pH7,4. (Painel A) (●) Controle: membrana intacta na ausência de AAPH e molécula; (★) Oxidada: membrana oxidada na presença de AAPH ausente de antioxidante; (■) CAF: membrana na presença de AAPH e CAF em diferentes concentrações; (●) CLA: membrana na presença de AAPH e CLA em diferentes concentrações. (Painel B) (●) Controle: membrana intacta na ausência de AAPH e moléculas testadas; (★) Oxidada: membrana oxidada na presença de AAPH ausente de antioxidante; (■) α -Toc: membrana na presença de AAPH e α -Toc em diferentes concentrações; (○) Trolox: membrana na presença de AAPH e Trolox® em diferentes concentrações; (◁) BHT: membrana na presença de AAPH e BHT em diferentes concentrações; (▶) BHA: membrana na presença de AAPH e BHA em diferentes concentrações. As moléculas α -TOC, BHA, BHT foram pré-incubados durante 45 minutos com membranas de eritrócitos antes da adição de AAPH. Os valores acima representam a média \pm DP (n = 3).

Apesar de o CAF e o CLA serem compostos polares e exibirem uma limitada ação de complexação de íons metálicos (MAURYA e DEVASAGAYAM, 2010), quando utilizados em sistema lipofílicos apresentaram efeito protetor sobre as membranas de eritrócitos dependente da concentração, com redução dos valores do parâmetro $2A_{\lambda}$ do sinal do 5-DSA, semelhante aos compostos apolares (BHT, BHA). Isso possivelmente se deve à orientação dos compostos CLA e CAF na interface óleo-água, atuando de forma direta contra as espécies reativas geradas no sistema (FRANKEL *et al.*, 1994). Resultados similares ao presente estudo foram obtidos por Cuvelier, Bondet e Berset (2000), que analisaram diversos compostos hidrofílicos (eriodictiol, ácido caféico, quercetina, catequina e ácido rosmarínico) e lipofílicos (BHT, α -TOC, Guaiacol, BHA) e esses apresentaram valores semelhantes, corroborando os achados do presente estudo. Na tabela 6.2 são apresentados os fatores de apolaridades de diversas moléculas, de acordo com o trabalho de Cuvelier, Bondet e Berset (2000), o BHT apresentou maior fator de apolaridade (93) e a *isoquercitrina* e o ácido rosmarínico apresentaram o menor fator de apolaridade (2).

Tabela 6.2: Fator de apolaridade de alguns compostos

| Composto | Fator de apolaridade |
|--------------------------------|-----------------------------|
| BHT | 93 |
| α-TOC | 92 |
| BHA | 84 |
| TROLOX | 65 |
| Ácido Ferúlico | 64 |
| <i>Naringenina</i> | 53 |
| Ácido p-cumarico | 47 |
| CAF | 24 |
| Quercitina | 19 |
| Catequina | 5 |
| Ácido rosmarínico | 2 |
| <i>Isoquercitrina</i> | 2 |

Adaptado de Cuvelier, Bondet e Berset (2000).

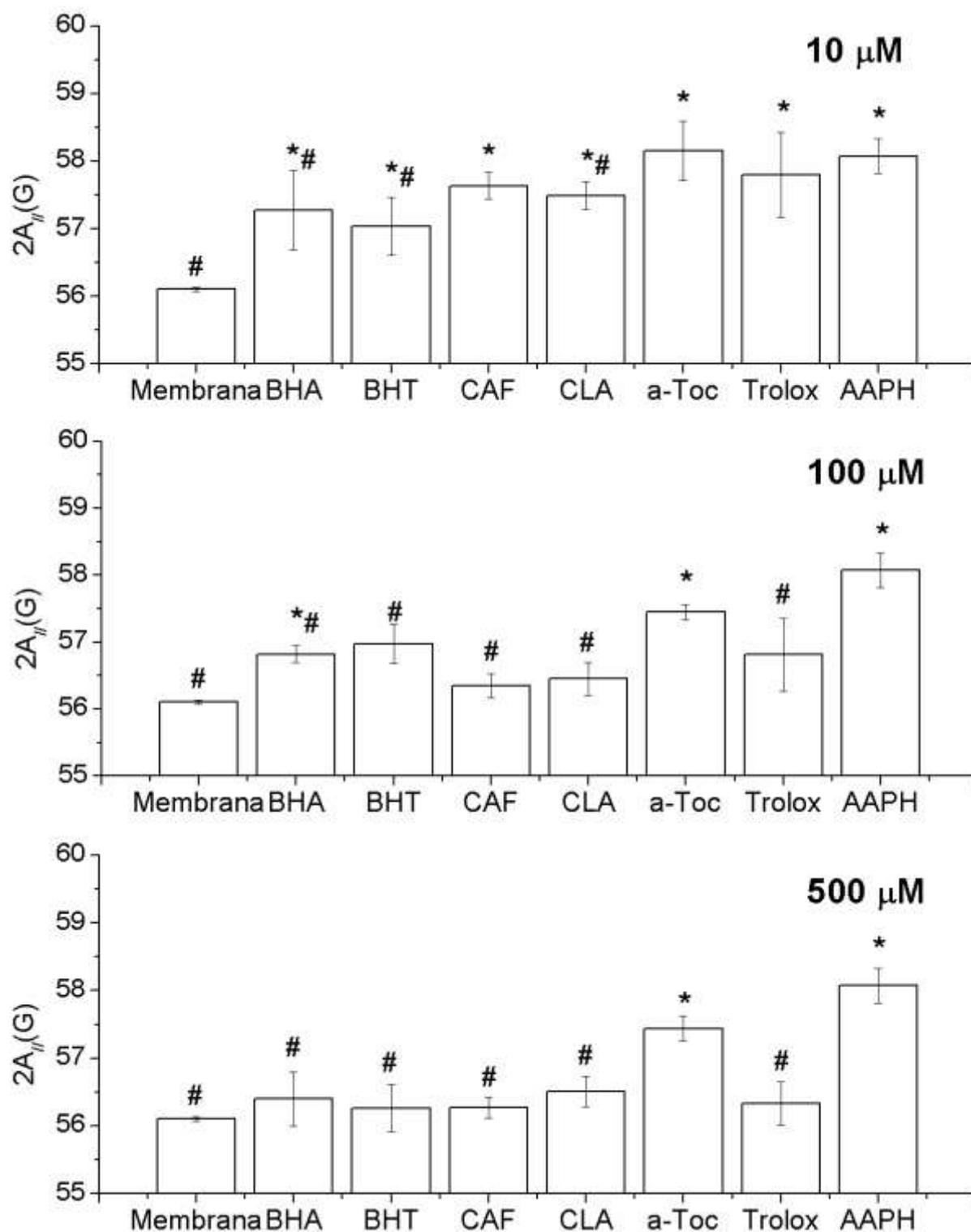


Figura 6.7: (Reapresentação do Figura 6.6) Efeito de diversas moléculas (concentrações: 10, 100 e 500 μM) sobre o parâmetro espectral $2A_{//}$ em Gauss do marcador 5-DSA em membranas de eritrócitos incubadas durante três horas com AAPH (50 mM) a 37°C em tampão PBS (10 mM, 154 mM NaCl) pH7,4. Os valores acima representam a média \pm DP (n = 3).

* Diferença estatística em relação à membrana controle, # Diferença estatística em relação à membrana oxidada $P < 0,05$.

6.6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste capítulo pudemos concluir que tanto o CAF como o CLA, que são compostos polares, apresentaram atividade antioxidante em sistema lipofílico equiparada aos antioxidantes apolares como o BHT, BHA. Tanto o BHA como o BHT não apresentam sítio coordenação de metais, apenas um grupo fenólico capaz de sequestrar espécies radicaleres. De acordo com Cuvelier, Bondet e Berset (2000), apenas o conhecimento da estrutura não é capaz de predizer o comportamento antioxidante de um composto. Deve-se considerar também a polaridade da molécula e o meio em que ela se encontra.

Diante dos resultados obtidos, faz-se necessária a realização de mais estudos para melhor elucidação do mecanismo de ação do CAF e do CLA em membranas de eritrócitos. Uma vez que foi avaliada apenas a superfície da membrana do eritrócito, utilizando o marcador de spin 5-DSA e a geração de espécies radicaleres deu-se de forma restrita na fase aquosa.

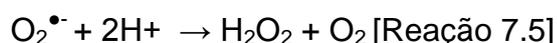
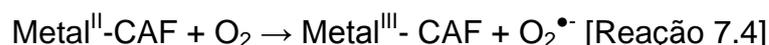
O trabalho realizado por *Sato et al.* (1995), relata que a alteração da fluidez da membrana é dependente não somente da profundidade e da superfície da membrana como também do tipo de iniciador radical. Para melhor avaliação da atividade antioxidante dessas moléculas usar diferentes marcadores de spin, em que se tem o grupo nitróxido alocado em diferentes posições da cadeia de ácidos graxos, bem como a utilização de azo-compostos lipofílicos, como exemplo o 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitrila) (AMVN) e o 2,2'-azobis(4-metoxi-2,4-dimetilvaleronitrila) (MeO-AMVN), onde haverá a geração de radicais peroxil dentro da membrana (diferentemente do sistema utilizado em que o AAPH gera radicais peroxil na fase aquosa do sistema).

7 Conclusão geral e perspectivas

Os resultados expostos nesta dissertação mostram que em sistemas aquosos no qual se tem a 2-DR e o ácido tereftálico como alvo “radicalar”, tanto o ácido clorogênico (CLA) como o ácido cafeico (CAF) em reações redox catalisadas por íons Cu^{2+} ou Fe^{3+} , e na presença de diferentes compostos de coordenação (EDTA e citrato) apresentam reduzida capacidade antioxidante. Os resultados sugerem a formação de compostos de coordenação entre os íons metálicos e as moléculas analisadas (CAF e CLA). Resultados semelhantes foram obtidos por Maurya e Devasagayam (2010), onde demonstraram que tanto o CLA como CAF apresentam uma fraca capacidade de formação de compostos de coordenação com os íons metálicos (Cu^{2+} e Fe^{2+}), corroborando os achados do presente estudo. De acordo com Mauricio (2006), o CAF é capaz de coordenar-se eficientemente ao Fe^{2+} , tornando-o indisponível para catalisar a formação de EROs ($\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e HO^{\bullet}). Resultados semelhantes foram obtidos por Mattos (2009), no qual foi proposto que o complexo formado entre CAF e Fe^{2+} , poderia reagir com H_2O_2 , porém o produto de reação (HO^{\bullet}) reagiria de forma sitio-específica com o complexo ferro-CAF, inibindo assim a oxidação da 2-DR.



De acordo as propostas de Mauricio (2006) e Mattos (2009), e de acordo com nossas observações experimentais foi possível propor que o mecanismo de ação antioxidante do CAF em sistemas aquosos na faixa de pH 7,2, se deve a sua habilidade de se coordenar a íons Fe^{2+} (e não a íons Fe^{3+}) formados na segunda parte da primeira reação de geração de radicais livres [Reação 6.1]. Nossa conclusão se baseia no fato do CAF não inibir a formação de radicais ascorbil, pela ausência de efeito da pré-incubação (de CAF e Fe^{III} -EDTA) sobre a oxidação da 2-DR e pela fato do CAF remover pouco Fe^{III} do complexo com EDTA. Além disso, foi observado que a eficiência antioxidante do CAF é maior na presença de citrato do que com EDTA - o que só poderia ser explicado por um mecanismo quelante-antioxidante.



Ligante: EDTA ou citrato

Os resultados obtidos por Oess et al.,(1999) demonstram a lenta formação de complexo de coordenação entre os íons Cu^{2+} e o CAF, sendo estes diferentes dos resultados obtidos no estudo realizado por Nardini et al.,(1995). Segundo Nardini et al.,(1995), após uma hora em meio tamponado com PBS e em pH 7,4 há formação de complexo de coordenação entre os íons Cu^{2+} e o CAF. Este resultado são discrepantes dos obtidos do estudo de Oess et al.,(1999), pois em condições similares não foi verificada a formação do complexo Cu^{2+} -CAF. Nossos resultados (espectrofotometria de UV e visível) indicaram uma pequena complexação de íons cobre ao CAF (e ao CLA) nas condições experimentais analisadas. Nardini et al.,(1995) ainda relata que a adição de EDTA inibe a coordenação dos íons Cu^{2+} pelo CAF demonstrando que o CAF apresenta a constante de afinidade menor ao metal do que o EDTA.

Na presença de íons cobre, nossos resultados indicaram que o CAF e CLA agem tanto como antioxidantes-quelantes como seqüestradores e HO^{\bullet} . Isso se deve aos resultados obtidos com ácido tereftálico (detector de HO^{\bullet}), e com os ensaios da 2-DR (outro detector de HO^{\bullet}), quando se variou a concentração dos íons Cu^{2+} ou se variou a concentração a 2-DR (ensaio de competição). A baixa eficiência antioxidante do CAF e CLA nos ensaios da 2-DR pode ser explicada pela pequena capacidade desses compostos de ligarem íons cobre. Entretanto, o que foi removido de cobre livre das soluções (formando complexo com CAF e CLA) seria suficiente para inibir parcialmente a formação de HO^{\bullet} e a oxidação da 2-DR.

Para melhor elucidação do mecanismo de ação antioxidante do CFA e CLA em sistemas aquosos e em reações radicalares mediadas por diferentes íons metálicos (Cu^{2+} , Fe^{3+}) e ascorbato se faz necessário a realização de novos experimentos, envolvendo outras técnicas como espectrofotometria de massa e difração de raios-x para se determinar a formação do complexo entre os íons metálicos e os polifenóis CAF e CLA, e o uso diferentes tipos de tampões (Hepes, MES, etc) e em diferentes pHs (mais ácidos ou mais alcalinos, o que poderia influenciar a ligação dos compostos aos metais), uma vez que o meio reacional pode afetar os resultados espectrofotométricos e na capacidade de coordenação das moléculas (ANDJELKOVIC *et al.*, 2006). Além disso, seria importante verificar a taxa de consumo de oxigênio para confirmar o mecanismo proposto por Nardini *et al.*, (1995), no qual a formação do complexo Cu^{2+} -CAF é dependente de oxigênio (NARDINI *et al.*, 1995). Em nosso modelo de mecanismo de reação antioxidante (na presença de íons cobre e ascorbato) é esperado que o consumo de oxigênio seja parcialmente inibido por CAF ou CLA.

Nesse trabalho ainda podemos concluir que tanto o CAF como o CLA, compostos responsáveis pelo o aroma e da pigmentação do café durante a torra, apresentam considerável atividade antioxidante em sistemas lipofílicos, equiparada aos antioxidantes apolares como o butil-hidroxi-anisol (BHA) e o butil-hidroxi-tolueno (BHT). Tanto o BHA como o BHT não apresentam sítio de coordenação de metais, apenas um grupo fenólico capaz de sequestrar espécies radicalares. Resultados semelhantes foram obtidos por Nardini *et al* (1995), Laranjinha (2001) e Laranjinha, Almeida e Madeira (1994), que demonstraram que o CAF pode aumentar a resistência da lipoproteína de baixa densidade (LDL) à peroxidação lipídica, sendo esta relacionada à sua capacidade de sequestrar os radicais livres gerados na fase aquosa. Mattos (2009) demonstrou que em reação medidas por reagentes de Fenton (Fe^{2+} e H_2O_2) o CAF inibiu de forma dependente da concentração a peroxidação em membranas de fígado de rato. Mattos (2009) observou ainda que o CAF provocou, de maneira dependente da concentração, o prolongamento da fase lag (ou fase de iniciação) da peroxidação lipídica e a diminuição na velocidade da fase log da peroxidação (ou fase de propagação), sugerindo que o CAF

tenha um mecanismo antioxidante do tipo *chain breaker*. O estudo realizado por Maurya (2010), demonstrou que o CAF inibiu de forma dependente da concentração os danos oxidativos em membranas de linfócitos de ratos causado por 2'-2'-azobis 2-amidino propano hidrocloreto (AAPH) corroborando os achados do presente estudo.

O trabalho realizado por *Sato et al.* (1995), relata que a alteração da fluidez da membrana é dependente não somente da profundidade e da superfície da membrana como também do tipo de iniciador radical. Para se ter uma melhor avaliação da atividade antioxidante dos compostos estudados (CAF e CLA) deve-se fazer o uso de diferentes marcadores de spin, onde se tem o grupo nitróxido alocado em diferentes posições da cadeia de ácidos graxos, bem como a utilização de azo-compostos lipofílicos, como exemplo o 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitrila) (AMVN) e o 2,2'-azobis(4-metoxi-2,4-dimetilvaleronitrila) (MeO-AMVN), onde haverá a geração de radicais peróxil no interior da membrana (diferentemente do sistema utilizado no qual o AAPH gera radicais livres na fase aquosa do sistema).

Diante dos resultados obtidos pela técnica de RPE, faz-se necessário a realização de mais estudos para melhor elucidação do mecanismo de ação antioxidante do CAF e do CLA em membranas de eritrócitos. Isso porque foi apenas avaliado, no presente trabalho, a superfície da membrana do eritrócito, utilizando o marcador de spin 5-DSA e a geração de radicais livres (via AAPH) na fase aquosa do sistema.

Finalmente, acreditamos que os presentes resultados desse trabalho de mestrado ajudaram a entender mais dos mecanismos antioxidantes do CAF e CLA em sistemas modelo. Tais resultados não podem ser ainda aplicados para condições *in vivo* e não podem ser usados como referência para o consumo do café como fonte de antioxidantes para o ser humano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDJELKOVIC, M. et al. Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. **Food Chemistry**, v. 98, n. 1, p. 23-31, 2006.

ANDRADE JR, R. G. **Mecanismos de ação antioxidante e pró-oxidante do polifenol ácido tânico na presença de íons cobre**. 2004. 140 (Mestrado). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília.

ANDRADE, R. G., JR. et al. The antioxidant effect of tannic acid on the in vitro copper-mediated formation of free radicals. **Arch Biochem Biophys**, v. 437, n. 1, p. 1-9, May 1 2005.

ANDRADE, R. G., JR. et al. Tannic acid inhibits in vitro iron-dependent free radical formation. **Biochimie**, v. 88, n. 9, p. 1287-96, Sep 2006.

ARUOMA, O. I. Deoxyribose assay for detecting hydroxyl radicals. In: LESTER, P. (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v. Volume 233, 1994. p.57-66.

BANERJEE, R. et al. **Redox Biochemistry**. Wiley, 2007.

BARRETO, J. C. et al. Terephthalic acid: a dosimeter for the detection of hydroxyl radicals in vitro. **Life Sci**, v. 56, n. 4, p. PL89-96, 1995.

BENDER, D. A. **Nutritional Biochemistry of the Vitamins**. 2. Cambridge University Press, 2009.

BONINI-DOMINGOS, C. R. Aumento de ferro, hemocromatose hereditária e defeitos no gene HFE: o que conhecemos na população brasileira? **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 4, p. 341-342, 2007.

BUETTNER, G. R.; JURKIEWICZ, B. A. Ascorbate free radical as a marker of oxidative stress: an EPR study. **Free Radic Biol Med**, v. 14, n. 1, p. 49-55, Jan 1993.

BUETTNER, G. R.; JURKIEWICZ, B. A. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. **Radiat Res**, v. 145, n. 5, p. 532-41, May 1996.

BURKHEAD, J. L.; GRAY, L. W.; LUTSENKO, S. Systems biology approach to Wilson's disease. **Biometals**, v. 24, n. 3, p. 455-66, Jun 2011.

BUTTERFIELD, D. A.; MARKESBERY, W. R. Specificity of biophysical and biochemical alterations in erythrocyte membranes in neurological disorders--Huntington's disease, Friedreich's ataxia, Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, and myotonic and duchenne muscular dystrophy. **J Neurol Sci**, v. 47, n. 2, p. 261-71, Aug 1980.

CELEDON, G. et al. Free radical-induced protein degradation of erythrocyte membrane is influenced by the localization of radical generation. **IUBMB Life**, v. 51, n. 6, p. 377-80, Jun 2001.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G. D.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 441-449, 2007.

CHEN, L. X.; LU, J. F.; WANG, K. The influence of bilirubin on fluidity and rotational correlation times of human erythrocyte membrane. **Cell Biol Int Rep**, v. 16, n. 6, p. 567-73, Jun 1992.

CHOE, M.; JACKSON, C.; YU, B. P. Lipid peroxidation contributes to age-related membrane rigidity. **Free Radic Biol Med**, v. 18, n. 6, p. 977-84, Jun 1995.

CILLIERS, J. J. L.; SINGLETON, V. L. Nonenzymic autoxidative phenolic browning reactions in a caffeic acid model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 4, p. 890-896, 1989/07/01 1989.

CLIFFORD, N. N. Chlorogenic acids and other cinamates: nature, occurrence and dietary burden. **J Sci Food Agric**, v. 80, n. 7, p. 1033-1043, 2000.

CRESPO, L. M.; BIFANO, E. M.; FREEDMAN, J. C. Membrane lipid fluidity and filterability of red blood cells from adults and newborns. **Pediatr Res**, v. 24, n. 4, p. 433-7, Oct 1988.

CUVELIER, M.-E.; BONDET, V.; BERSET, C. Behavior of phenolic antioxidants in a partitioned medium: structure—Activity relationship. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, n. 8, p. 819-824, 2000.

DAAYF, F.; LATTANZIO, V. **Recent Advances in Polyphenol Research**. 1. Wiley-Blackwell, 2008.

DALVI, L. T. **Mecanismo de ação de antioxidantes de origem vegetal: Estudo do polifenol ácido elágico e do extrato de caqui (Diospyros kaki)**. 2008. 143 (Mestrado). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília.

DE BIE, P. et al. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. **J Med Genet**, v. 44, n. 11, p. 673-88, Nov 2007.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**, v. 27, p. 586-592, 2004.

DOREA, J. G.; DA COSTA, T. H. Is coffee a functional food? **Br J Nutr**, v. 93, n. 6, p. 773-82, Jun 2005.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, v. 82, n. 1, p. 47-95, Jan 2002.

DUTRA, F. L. G.; HOFFMANN-RIBANI, R.; RIBANI, M. Determinação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência isocrática durante estacionamento da erva-mate. **Química Nova**, v. 33, p. 119-123, 2010.

EL-AYAAN, U.; JAMESON, R.; LINERT, W. A kinetic study of the reaction between noradrenaline and iron(III): an example of parallel inner- and outer-sphere electron transfer. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, n. 8, p. 1315-1320, 1998.

ESCARPA, A.; GONZALEZ, M. C. An Overview of Analytical Chemistry of Phenolic Compounds in Foods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 57-139, 2001/04/01 2001.

FAASSEN, E. V.; VANIN, A. **Radicals for Life: the various forms of nitric oxide** Elsevier Science, 2007.

FENG, R. et al. Inhibition of activator protein-1, NF-kappaB, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. **J Biol Chem**, v. 280, n. 30, p. 27888-95, Jul 29 2005.

FERREIRA, G. C.; MOURA, J. J. G.; FRANCO, R. **Iron Metabolism Inorganic Biochemistry and Regulatory Mechanisms**. Wiley-VCH, 1999.

FLEMING, R. E.; PONKA, P. Iron Overload in Human Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 4, p. 348-359, 2012.

FLEURIET, A.; MACHEIX, J. J. Phenolic Acids in Fruits and Vegetables. In: RICE-EVANS, C. A. e PACKER, L. (Ed.). **Flavonoids in Health and Disease**. 2: Marcel Dekker, 2003. cap. 1, p.1-42.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, p. 265-271, 2000.

FONTECAVE, M.; PIERRE, J. L. Iron: Metabolism, toxicity and therapy. **Biochimie**, v. 75, n. 9, p. 767-773, 1993.

FRANCIS, A. J.; DODGE, C. J. Influence of complex structure on the biodegradation of iron-citrate complexes. **Appl Environ Microbiol**, v. 59, n. 1, p. 109-113, Jan 1993.

FRANKEL, E. N. et al. Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants: Bulk Oils vs Emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 5, p. 1054-1059, 1994/05/01 1994.

FURIA, T. E. **CRC Handbook of Food Additives**. 2. CRC Press, 1980. 424.

GENARO-MATTOS, T. C. et al. Reevaluation of the 2-deoxyribose assay for determination of free radical formation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1790, n. 12, p. 1636-42, Dec 2009.

GILBERT, D.; COLTON, C. Reactive Oxygen Species and Neuronal Function Reactive Oxygen Species in Biological Systems. In: (Ed.): Springer US, 2002. p.569-589.

GINANI, J. V. **Estudo da ação antioxidante in vitro do polifenol ácido elágico**. 2005. 140 (Mestrado). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília.

GONÇALVES, M. S. **Determinação da capacidade do piridoxal isonicotinóil hidrazona (PIH) de complexar íons cobre e prevenir a formação de radicais livres.** 1999. (Mestrado). Universidade de Brasília, Brasília.

GORNICKI, A.; GUTSZE, A. In vitro effects of ozone on human erythrocyte membranes: an EPR study. **Acta Biochim Pol**, v. 47, n. 4, p. 963-71, 2000.

GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v. 30, n. 5, p. 390-397, 2008.

GUTTERIDGE, J. M. Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free-radical damage to amino acids and carbohydrates. **FEBS Lett**, v. 128, n. 2, p. 343-6, Jun 15 1981.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. **Biochem Pharmacol**, v. 49, n. 10, p. 1341-8, May 17 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 4. Oxford University Press, 2007.

HARMAN, D. The aging process. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 11, p. 7124-7128, November 1, 1981 1981.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: STOREY, K. B. (Ed.). **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation.** Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2004. p.319-368.

HERMES-LIMA, M.; GONÇALVES, M. S.; ANDRADE, R. G. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) prevents copper-mediated in vitro free radical formation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 228, n. 1, p. 73-82, 2001.

HERMES-LIMA, M. et al. The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) protects plasmid pUC-18 DNA against *OH-mediated strand breaks. **Free Radic Biol Med**, v. 25, n. 8, p. 875-80, Nov 15 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**, v. 1523, n. 2-3, p. 154-60, Oct 18 2000.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, Â. D. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, p. 1170-1179, 2008.

HUSTER, D. Wilson disease. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 24, n. 5, p. 531-9, Oct 2010.

HYNES, M. J.; O'COINCEANAINN, M. The kinetics and mechanisms of reactions of iron(III) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, n. 8, p. 1457-1464, 2004.

INOUE, Y. et al. Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 274, n. 38, p. 27002-9, Sep 17 1999.

JACOB, C.; PAUL G. WINYARD, P. G. **Redox Signaling and Regulation in Biology and Medicine** Wiley-VCH, 2009.

JOHNSTON, K. L.; CLIFFORD, M. N.; MORGAN, L. M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. **Am J Clin Nutr**, v. 78, n. 4, p. 728-33, Oct 2003.

KAHLE, K.; KRAUS, M.; RICHLING, E. Polyphenol profiles of apple juices. **Mol Nutr Food Res**, v. 49, n. 8, p. 797-806, Aug 2005.

KALER, S. G. ATP7A-related copper transport diseases-emerging concepts and future trends. **Nat Rev Neurol**, v. 7, n. 1, p. 15-29, Jan 2011.

KATSUÓKA, L. **Agentes complexantes no controle analítico de traços de fluoreto por eletrodo íon-seletivo**. 1996. (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **J Am Diet Assoc**, v. 99, n. 2, p. 213-8, Feb 1999.

KINNULA, V. L. Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway diseases. **Thorax**, v. 60, n. 8, p. 693-700, August 1, 2005 2005.

KITTS, D. D.; WIJEWICKREME, A. N. Effect of dietary caffeic and chlorogenic acids on in vivo xenobiotic enzyme systems. **Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)**, v. 45, n. 3, p. 287-298, 1994.

KONO, Y. et al. Antioxidant activity of polyphenolics in diets: Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1335, n. 3, p. 335-342, 1997.

KOPANI, M. et al. Oxidative stress and electron spin resonance. **Clin Chim Acta**, v. 364, n. 1-2, p. 61-6, Feb 2006.

LARANJINHA, J. Redox cycles of caffeic acid with α -tocopherol and ascorbate. In: LESTER, P. (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v. Volume 335, 2001. p.282-295.

LARANJINHA, J. A.; ALMEIDA, L. M.; MADEIRA, V. M. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. **Biochem Pharmacol**, v. 48, n. 3, p. 487-94, Aug 3 1994.

- LEIFERT, W. R.; ABEYWARDENA, M. Y. Cardioprotective actions of grape polyphenols. **Nutr Res**, v. 28, n. 11, p. 729-37, Nov 2008.
- LI, S. et al. Chlorogenic acid protects MSCs against oxidative stress by altering FOXO family genes and activating intrinsic pathway. **Eur J Pharmacol**, v. 674, n. 2-3, p. 65-72, Jan 15 2012.
- LINGWOOD, D.; SIMONS, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. **Science**, v. 327, n. 5961, p. 46-50, Jan 1 2010.
- LINXIANG, L. et al. An HPLC assay of hydroxyl radicals by the hydroxylation reaction of terephthalic acid. **Biomed Chromatogr**, v. 18, n. 7, p. 470-4, Sep 2004.
- LIU, M. et al. Immobilization-induced changes in erythrocyte membrane fluidity in rabbits: a spin-label electron spin resonance study. **Ann Clin Lab Sci**, v. 32, n. 4, p. 399-403, Fall 2002.
- LOPES, G. K.; SCHULMAN, H. M.; HERMES-LIMA, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. **Biochim Biophys Acta**, v. 1472, n. 1-2, p. 142-52, Oct 18 1999.
- LORINCZ, M. T. Neurologic Wilson's disease. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1184, p. 173-87, Jan 2010.
- LYNCH, S. Case studies: iron. **Am J Clin Nutr**, v. 94, n. 2, p. 673S-8S, Aug 2011.
- MANACH, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Curr Opin Lipidol**, v. 16, n. 1, p. 77-84, Feb 2005.
- MANACH, C. et al. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **Am J Clin Nutr**, v. 81, n. 1 Suppl, p. 230S-242S, Jan 2005.
- MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1370-1376, Apr 15 2009.
- MATTOS, T. G. **Efeitos da ação antioxidante do Ácido Cafêico em reações de oxidação mediadas por íons Fe(II)**. 2009. (Mestrado). Departamento de Química, Universidade de Brasília, Brasília.
- MAURICIO, A. Q. **Estudo da atividade antioxidante do ácido cafêico e da PIH: um polifenol natural e um quelante sintético**. 2006. 95 (Mestrado). Instituto de Química, Universidade de Brasília Brasília
- MAURYA, D. K.; DEVASAGAYAM, T. P. Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. **Food Chem Toxicol**, v. 48, n. 12, p. 3369-73, Dec 2010.

MISHIN, V. M.; THOMAS, P. E. Characterization of hydroxyl radical formation by microsomal enzymes using a water-soluble trap, terephthalate. **Biochem Pharmacol**, v. 68, n. 4, p. 747-52, Aug 15 2004.

NARDINI, M. et al. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. **Free Radic Biol Med**, v. 19, n. 5, p. 541-52, Nov 1995.

NIKI, E. Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 100-8, 1990.

NIKI, E. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. **Free Radic Biol Med**, v. 47, n. 5, p. 469-84, Sep 1 2009.

NIKI, E. et al. Oxidation of lipids. XV. Role of hydrophilic diarylamines as antioxidants in the oxidations of lipids and biological tissues. **Chem Biol Interact**, v. 67, n. 1-2, p. 81-93, 1988.

NIKI, E. et al. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 338, n. 1, p. 668-76, Dec 9 2005.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

OESS, A. et al. Elucidation of phenol-Cu interaction mechanisms by potentiometry, ESR, UV absorption spectroscopy and molecular simulations. **The Science of The Total Environment**, v. 228, n. 1, p. 49-58, 1999.

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. . **Quím. Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051-1056 2011.

OLTHOF, M. R. et al. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. **J Nutr**, v. 133, n. 6, p. 1806-14, Jun 2003.

OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **J Nutr**, v. 131, n. 1, p. 66-71, Jan 2001.

PATTON, C. W. maxchelator.stanford.edu. 2011. Disponível em: <
<http://maxchelator.stanford.edu/xlsconstants.htm>>. Acesso em: 20 junho

PAWLIKOWSKA-PAWLEGA, B. et al. The study of the quercetin action on human erythrocyte membranes. **Biochem Pharmacol**, v. 66, n. 4, p. 605-12, Aug 15 2003.

PERUSSI, J. R.; RUGGIERO, A. C.; TABAK, M. O Método de Marcadores de SPIN Aplicado à Bioquímica **Quím. Nova**, v. 8, n. 4, p. 313-324, 1985.

PFEIFFER, R. F. Wilson's disease. **Handb Clin Neurol**, v. 100, p. 681-709, 2011.

PONKA, P. et al. Mobilization of iron from reticulocytes. Identification of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone as a new iron chelating agent. **FEBS Lett**, v. 97, n. 2, p. 317-21, Jan 15 1979.

PRYOR, W. A. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. **Annu Rev Physiol**, v. 48, p. 657-67, 1986.

RICHARD J, B. Effect Of Exercise On Oxidative Stress Biomarkers. In: GREGORY, S. M. (Ed.). **Advances in Clinical Chemistry**: Elsevier, v. Volume 46, 2008. p.1-50.

SALMON, C. E. G. et al. Simulação de espectros de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) através do programa NLSL. **Química Nova**, v. 30, p. 1240-1248, 2007.

SARAN, M.; SUMMER, K. H. Assaying for hydroxyl radicals: hydroxylated terephthalate is a superior fluorescence marker than hydroxylated benzoate. **Free Radic Res**, v. 31, n. 5, p. 429-36, Nov 1999.

SATO, Y. et al. Mechanism of free radical-induced hemolysis of human erythrocytes: hemolysis by water-soluble radical initiator. **Biochemistry**, v. 34, n. 28, p. 8940-9, Jul 18 1995.

SCALBERT, A. et al. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 45, n. 4, p. 287-306, 2005.

SEAN, M. Lipid Rafts: Elusive or Illusive? **Cell**, v. 115, n. 4, p. 377-388, 2003.

SEVANIAN, A.; URSINI, F. Lipid peroxidation in membranes and low-density lipoproteins: similarities and differences. **Free Radic Biol Med**, v. 29, n. 3-4, p. 306-11, Aug 2000.

SHAHIDI, F.; CHANDRASEKARA, A. Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 1, p. 147-170, 2010.

SHARMA, M. K. et al. Ascorbyl free radical as a real-time marker of free radical generation in briefly ischemic and reperfused hearts. An electron paramagnetic resonance study. **Circ Res**, v. 74, n. 4, p. 650-8, Apr 1994.

SHILS, M. E. et al. **Modern Nutrition in Health and Disease**. 10. Lippincott Williams & Wilkins, 2005. 2146

SIES, H. **Oxidative Stress**. Elsevier Science & Technology Books 1985.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SILVA, A. H. M. **Estudo da dinâmica molecular de membrana modelo e de eritrócito sob ação de agentes oxidantes e antioxidantes por ressonância**

paramagnética eletrônica. 2011. (Mestrado). Departamento de Física, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175, n. 23, p. 720-31, Feb 18 1972.

SKOOG, D. A.; HOLLER, J. F.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental** Bookman, 2009.

SON, S.; LEWIS, B. A. Free Radical Scavenging and Antioxidative Activity of Caffeic Acid Amide and Ester Analogues: Structure–Activity Relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 468-472, 2001.

SOTO-OTERO, R. et al. Inhibition of 6-hydroxydopamine-induced oxidative damage by 4,5-dihydro-3H-2-benzazepine N-oxides. **Biochem Pharmacol**, v. 75, n. 7, p. 1526-37, Apr 1 2008.

SOUZA, A. F. M. D.; CARVALHO-FILHO, R. J.; CHEBLI, J. F. Hemocromatose hereditária: relato de caso e revisão da literatura. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 38, p. 194-202, 2001.

SPASOJEVIĆ, I. et al. The role of EPR spectroscopy in studies of the oxidative status of biological systems and the antioxidative properties of various compounds. **J. Serb. Chem. Soc.**, v. 76, n. 5, p. 647-677, 2011.

STEFEK, M. et al. Oxidative modification of rat eye lens proteins by peroxy radicals in vitro: protection by the chain-breaking antioxidants stobadine and Trolox. **Biochim Biophys Acta**, v. 1741, n. 1-2, p. 183-90, Jun 30 2005.

TCKMANTEL, W.; KOZIKOWSKI, A. P.; ROMANCZYK, L. J. Studies in Polyphenol Chemistry and Bioactivity. 1. Preparation of Building Blocks from (+)-Catechin. Procyanidin Formation. Synthesis of the Cancer Cell Growth Inhibitor, 3-O-Galloyl-(2R,3R)-epicatechin-4 β ,8-[3-O-galloyl-(2R,3R)-epicatechin]. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 121, n. 51, p. 12073-12081, 1999.

TUMER, Z.; MOLLER, L. B. Menkes disease. **Eur J Hum Genet**, v. 18, n. 5, p. 511-8, May 2010.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VOUTILAINEN, S. et al. Carotenoids and cardiovascular health. **Am J Clin Nutr**, v. 83, n. 6, p. 1265-71, Jun 2006.

WHO-FAO. **Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases: Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation**. World Health Organization. Geneva, p.150. 2003

WIDMER, M. Titrimetry. In: MEYERS, R. A. (Ed.). **Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory, and Instrumentation 1**: Wiley, v.15, 2001. p.14344.

YAN, E. B. et al. Novel method for in vivo hydroxyl radical measurement by microdialysis in fetal sheep brain in utero. **J Appl Physiol**, v. 98, n. 6, p. 2304-10, Jun 2005.

YAWATA, Y. **Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model**. . Wiley-VCH 2003. 454.