

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Estudo da atividade antioxidante do ácido caféico e da PIH:
um polifenol natural e um quelante sintético**

Angelo de Queiroz Mauricio

Dissertação apresentada como
requisito para a obtenção do título de
Mestre em Química Analítica pelo
Instituto de Química da Universidade
de Brasília

Orientador
Prof. Dr. Marcelo Hermes Lima
IB – UnB

Brasília – DF

Brasil

2006

folha aprovação

Dedico este trabalho ao Senhor Jesus Cristo, o único que é
verdadeiramente digno de ser chamado de Mestre

A minha família, Cauê, Ana Terra e Dhyana, pelo
compromisso que representam com meu passado e meu
futuro

*“Não estamos mais cansados por causa do ontem.
Somos outros, não mais quem
éramos antes.
As calamidades de ontem, as
dificuldades de ontem, eram válidas
para o dia de ontem.
Não para o dia de hoje!”*

Cinema Uenebê

Agradecimentos

À Deus, por tudo.

À minha família, pelo alto preço que tem pago.

À todos meus amigos, pelas orações e apoio.

Em especial ao Nanshiu, César, Rodrigo, Natacha, Janini, Ricardo, Thiago.

Ao Prof. Luis Carlos Behring Nasser.

Ao Prof. Marcelo Hermes-Lima, por confiar em mim todo este tempo

Resumo

As Espécies Reativas de Oxigênio – EROs, dentre as quais se incluem os radicais hidroxil e superóxido, têm participação crucial nas reações bioquímicas de dano oxidativo à sistemas fisiológicos. A formação destas espécies reativas depende em grande escala da presença de íons metálicos, em especial íons do elemento químico ferro. Desta forma, a caracterização de novas substâncias capazes de inibir a formação de EROs ou mesmo minimizar as reações de dano oxidativo é de relevante interesse bioquímico. O presente trabalho se propõe a estudar duas substâncias com potencial antioxidante, o polifenol ácido caféico – AC, e a piridoxal isonicotinoil hidrazona – PIH. Demonstramos que o mecanismo de ação da PIH se deve à sua capacidade formar um complexo estável com íons Fe(III), o qual seria menos suscetível a participar de reações geradoras de radicais hidroxil. A PIH foi capaz de inibir a oxidação do ascorbato, a formação do radical ascorbil (medido por RPE), e a degradação oxidativa da deoxiribose (2-DR). Esta inibição é dependente das concentrações de Fe(III), da natureza do quelante ao qual o Fe(III) está previamente complexado e do tempo de pre-incubação da PIH com o complexo Fe(III)-quelante. Com relação ao ácido caféico, este polifenol se mostrou capaz de eficientemente inibir a formação de radicais hidroxil a partir de íons Fe(II) e peróxido de hidrogênio, e o consequente dano oxidativo à 2-DR. Verificou-se que esta inibição é dependente do pH do meio reacional e da temperatura de incubação da reação. Propõem-se que a ação antioxidante do AC está relacionada à habilidade deste polifenol em quelar íons Fe(II), tendo sido observada a formação de um complexo com íons ferrosos através do sítio catecol do AC. Curiosamente incubando-se o meio reacional a 98°C, foi verificado um efeito pró-oxidante do AC, sendo este efeito correlacionado à interações deste composto com íons ferro.

Palavras-chave : *PIH, Cafeico, Polifenol, Fenton, Antioxidante, Quelante, Ferro*

Abstract

Reactive Oxygen Species – ROS, including hydroxyl and superoxide radicals, play a significant role in all biochemical reactions that cause oxidative damage to physiological systems. Formation of these species are usually mediated by metal ions, specially iron ones. Thus, the characterization of new molecules capable of inhibiting oxyradical formation are of relevant interest. This present work focuses on two compounds with potential antioxidant activity : Cafeic Acid – CAF, and Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone – PIH. We demonstrate the PIH's antioxidant action is due to its ability to form an stable complex with iron(III), wich is less suceptible to undergo reduction and consequently form oxyradicals by Fenton reaction. PIH was able to inhibit iron-mediated ascorbate oxidation and also ascorbil radical formation, as well as oxidative deoxyribose damage. It was found that this inhibitory action of PIH was dose-dependent and also depends on pre-incubation time (between PIH and iron ions) and on the nature of a co-chelator previously complexing iron(III). Relating to Cafeic Acid, it was observed that this polifenolic compound was able to efficiently inhibit oxyradical formation by Fenton reaction and consequent damage to deoxyribose. It was also found that this inhibition was pH-dependent, as well as dependent of the incubation temperature of the reaction systems. We propose that the antioxidant activity showed by CAF is related to its ability to complex iron(II) ions, being observed the formation of a complex with iron involving catechol sites of CAF. Surprisingly, it was also observed that CAF presents a pro-oxidant activity when reaction media is incubated at 98°C, being this behaviour associated to temperature-mediated interactions between iron and CAF.

Key words : *PIH, Cafeic, poliphenol, antioxidant, Fenton, chelator, iron*

Sumário

| | |
|---|-----------|
| Objetivos | 01 |
| 1. Introdução | 02 |
| 1.1 Radicais Livres | 02 |
| 1.1.1 Conceitos | 02 |
| 1.1.2 Radicais livres e suas reações | 05 |
| 1.1.3 Técnicas analíticas de detecção | 07 |
| 1.1.4 Antioxidantes | 09 |
| 1.2 PIH | 11 |
| 1.2.1 Histórico | 11 |
| 1.2.2 A ação antioxidante da PIH | 12 |
| 1.2.3 Fatos novos acerca da PIH | 14 |
| 1.3 Polifenóis | 17 |
| 1.3.1 Dieta e biodisponibilidade | 19 |
| 1.3.2 Ação antioxidante | 22 |
| 1.3.3 Toxicidade | 26 |
| 1.3.4 Ácido Caféico | 27 |
| 1.3.4.1 Aspectos estruturais | 28 |
| 2. Materiais e Métodos | 32 |
| 2.1 Oxidação do ascorbato | 32 |
| 2.2 RPE do radical ascorbil | 33 |
| 2.3 Dano oxidativo a 2-DR | 33 |
| 2.4 Redução do complexo Fe(III)-(PIH) ₂ promovida pelo ascorbato. | 34 |
| 3. Resultados e Discussão | 35 |
| 3.1 Estudos sobre a ação antioxidante da PIH | 35 |
| 3.1.1 Influência da natureza do co-quelante na atividade antioxidante da PIH | 35 |
| 3.1.2 Influência do tempo de pré-incubação na atividade antioxidante da PIH | 41 |
| 3.1.3 Influência da concentração de PIH e da proporção entre os Ligantes (PIH e co-quelantes) e o Fe | 44 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.1.4 | Efeito da ação redutora do ascorbato sobre o complexo Fe(III)-(PIH) ₂ | 47 |
| 3.2 | Estudo da ação do ácido caféico | 48 |
| 3.2.1 | Atividade antioxidante do ácido caféico (AC) e efeito do pH | 48 |
| 3.2.2 | Estudos espectrofotométricos da ligação de íons Fe(II) ao AC | 51 |
| 3.2.3 | Efeito da temperatura de incubação | 55 |
| 3.2.4 | Efeito da pré-incubação | 58 |
| 3.2.5 | Efeito dos íons Fe(III) sobre a degradação da 2-DR e sobre o AC | 60 |
| 3.2.6 | Efeito da concentração de AC e 2-DR | 65 |
| 4. | Conclusão | 69 |
| 5. | Bibliografia | 75 |
| | ANEXO I | 83 |

Lista de abreviaturas e acrônimos

| | |
|-------|---|
| 2-DR | 2-deoxi-D-ribose |
| Abs | Absorbância |
| AC | Ácido caféico |
| AT | Ácido Tânico |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| DFO | Desferoxamina |
| DNA | Ácido desoxiribonucléico |
| EDTA | Ácido etileno-diamino-tetracético |
| RPE | Ressonância paramagnética eletrônica |
| EROs | Éspécies Reativas de Oxigênio |
| HEPES | Ácido N-(2-hidroxi-etil)piperazina-N-(2-etenosulfônico) |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| LDL | Lipoproteínas de baixa densidade |
| MES | Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico |
| NTA | Ácido nitrilo-acético |
| PIH | Piridoxal isonicotinoil hidrazona |
| SOD | Superoxido dismutase |
| TBARS | Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico |
| TEAC | Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox |

Lista de tabelas

| | | |
|----------|---|-----------|
| TABELA 1 | Distribuição dos principais polifenóis em alguns alimentos | Página 20 |
| TABELA 2 | Percentual de proteção da PIH contra oxidação da 2-DR com diferentes co-quelantes | Página 39 |
| TABELA 3 | Efeito da concentração de PIH na formação do radical ascorbil | Página 45 |

Lista de figuras

| | | |
|---------|---|-----------|
| FIG. 1 | Representação esquemática da Piridoxal Isonicotinoil Hidrazona – PIH | Página 13 |
| FIG. 2 | Representação esquemática dos flavanóides | Página 18 |
| FIG. 3 | Representação esquemática dos ácidos hidroxicinâmicos | Página 19 |
| FIG. 4 | Representação da estrutura básica dos flavonóis | Página 23 |
| FIG. 5 | Precusores biosintéticos do ácido caféico | Página 28 |
| FIG. 6 | Mecanismo proposto para oxidação do AC | Página 29 |
| FIG. 7 | Mecanismo alternativo para oxidação do AC | Página 30 |
| FIG. 8 | Esquema da decomposição do AC mediada por íons Fe(III) | Página 31 |
| FIG. 9 | Dependência da oxidação do ascorbato com a concentração de Fe-NTA | Página 35 |
| FIG. 10 | Dependência da oxidação do ascorbato com a concentração de Fe-EDTA | Página 36 |
| FIG. 11 | Dependência da formação do radical ascorbil com a concentração de Fe-EDTA (dados de RPE) | Página 37 |
| FIG. 12 | Efeito da PIH na redução do sinal do radical ascorbil com diferentes co-quelantes | Página 39 |
| FIG. 13 | Efeito da pré-incubação de Fe(III)-EDTA e PIH na oxidação do ascorbato | Página 41 |
| FIG. 14 | Efeito da pré-incubação de Fe(III)-EDTA e PIH na formação do radical ascorbil | Página 42 |
| FIG. 15 | Efeito da pré-incubação de Fe(III)-EDTA e PIH na degradação da 2-DR | Página 43 |
| FIG. 16 | Efeito da concentração de PIH na oxidação do ascorbato em dois diferentes tempos de pré-incubação | Página 45 |
| FIG. 17 | Efeito da concentração de PIH na oxidação | Página 46 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| | do ascorbato em duas diferentes proporções Fe-EDTA | |
| FIG. 18 | Efeito da presença de AC na degradação da 2-DR | Página 48 |
| FIG. 19a | Perfil espectral do AC puro e do AC em presença de Fe(II) em pH 4,0 | Página 51 |
| FIG. 19b | Perfil espectral do AC em presença de Fe(II) em pH 7,2 | Página 52 |
| FIG. 19c | Perfil espectral do AC em presença de Fe(II) em pH 5,6 | Página 52 |
| FIG. 19d | Reimpressão dos dados das figuras 17 a, b e c em escala ampliada | Página 53 |
| FIG. 20 | Acompanhamento temporal da formação de espécie química a 604 nm | Página 54 |
| FIG. 21 | Efeito da presença de AC na degradação da 2-DR a 98°C | Página 55 |
| FIG. 22 | Efeito do tempo de pré-incubação sobre a degradação da 2-DR | Página 58 |
| FIG. 23a | Efeito do AC sobre a reação de degradação da 2-DR promovida por Fe(III) e peróxido de hidrogênio | Página 61 |
| FIG. 23b | Comparação das reações de degradação da 2-DR promovidas por peróxido de hidrogênio e Fe(II) (Reação de Fenton) ou por Fe(III) | Página 62 |
| FIG. 24a | Comparação do perfil espectral de sistemas contendo Fe(II) ou Fe(III) | Página 63 |
| FIG. 24b | Reimpressão dos dados da figura 22a em escala ampliada na região de comprimento de onda de interesse | Página 63 |
| FIG. 25a | Efeito da variação da concentração de 2-DR | Página 65 |
| FIG. 25b | Percentual de proteção oferecido pelo AC contra a degradação da 2-DR em diferentes concentrações da molécula alvo | Página 66 |
| FIG. 26 | Efeito da variação da concentração de AC em diferentes concentrações de 2-DR | Página 68 |

Objetivos

- Fornecer evidências adicionais de que o mecanismo antioxidante *in vitro* demonstrado pela Piridoxal Isonicotinoil Hidrazona – PIH, se deve principalmente à inibição da reação de redução do Fe(III), principal contribuinte fisiológica das reações de Fenton que inevitavelmente acompanham patologias relacionadas à superexposição férrica.
- Investigar o potencial antioxidante *in vitro* do polifenol Ácido Caféico, verificando seu comportamento e mecanismo de ação face a presença de íons ferrosos em solução aquosa a pH fisiológico, elementos cruciais na geração de Espécies Reativas de Oxigênio – EROs, no organismo.

1. Introdução

1.1 Radicais Livres

1.1.1. Conceitos

Em níveis fisiológicos de oxigênio, supõe-se que cerca de 0,1 % de todo o O_2 reduzido na mitocôndria irá formar o radical livre superóxido [Hermes-Lima 2004]. Esta afirmação abrange três aspectos importantes da bioquímica de radicais livres, quais sejam: A relação dos radicais livres com a presença do oxigênio, o paradoxo vida/morte inerente a este gás e a inevitabilidade destes radicais já que neste caso, os mesmos estão associados ao ato intrínseco de respirar.

Exatamente por ser imprescindível à maioria dos organismos (exceto no caso daqueles anaeróbicos), se torna obscurecido o fato de que o oxigênio é um gás tóxico e mutagênico, responsável por diversas situações de severo stress fisiológico ao qual todos estamos inevitavelmente submetidos. Neste sentido, é curioso observar que dado às suas características, as quais serão abordadas adiante, o oxigênio é indispensável para a produção de energia nas cadeias de transporte de elétrons, mas leva também à oxidações celulares danosas e por vezes letais.

Esta energia relacionada à presença de O_2 é derivada da oxidação dos combustíveis metabólicos sendo convertida em ATP, uma solução bioquímica para o “armazenamento” e rápida mobilização energética na célula. Em organismos eucarióticos sob condições aeróbicas, o ATP é gerado como resultado de um mecanismo conhecido como cadeia transportadora de elétrons. Tal cadeia é constituída por quatro complexos enzimáticos, que atuam em uma série de reações de oxidação e redução, “conduzindo” os elétrons ao longo da membrana mitocondrial, de um complexo para o outro, até estes alcançarem seu destino final: a

combinação com o oxigênio molecular, reduzindo-o a duas moléculas de água.

Por outro lado, o O_2 exerce também um papel deletério em diversos sistemas biológicos. Exposição ao oxigênio em altas pressões, frequentemente causa toxicidade aguda do sistema nervoso central produzindo convulsões, o que é de especial interesse em atividades como mergulho e permanência em estações espaciais e submarinos. A exposição de humanos ao oxigênio puro por 24 horas, leva em todos os casos reportados ao dano alveolar nos pulmões e conseqüente edema, em decorrência da morte de células epiteliais dos alvéolos, degradação das barreiras capilares e vazamento do plasma para o espaço intersticial [Halliwell e Gutteridge 2000]. A exposição prolongada também é responsável pela denominada fibrose pulmonar, impedindo permanentemente as trocas gasosas.

Assim, durante o processo evolutivo (acredita-se que inicialmente a atmosfera continha pequena quantidade de O_2), os organismos desenvolveram complexos sistemas de defesa antioxidante, como forma de proteção contra os efeitos tóxicos do O_2 . Por muito tempo esta toxicidade estava apenas associada à capacidade de inibir a produção ou a ação de enzimas celulares [Haugard 1968]. De fato, a perda da atividade de enzimas tais como a nitrogenase em *Clostridium pasteurianum* se deve, por exemplo, à ação direta do O_2 .

Porém Gilbert, traçando um paralelo entre os efeitos do oxigênio e aqueles causados por radiações ionizantes, propôs que a maior parte da atividade danosa deste gás podia ser atribuída à formação de espécies denominadas radicais livres de oxigênio [Gilbert 1981]. Por exemplo, a inibição do crescimento observada em *E.coli* exposta à O_2 em alta pressão está associada à ação de uma espécie reativa de oxigênio, o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o qual neste caso inibe a síntese da valina [Flint 1993].

Espécies reativas de oxigênio (EROs) é um termo usado para designar mais amplamente tanto radicais de oxigênio (como o superóxido ou o hidroxil - HO[•]), quanto derivados não radicalares do oxigênio, tais como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ácido hipocloroso (HClO) e ozônio (O₃). Segundo Halliwell, a expressão “reativo” é relativa, já que nem O₂^{•-} ou H₂O₂ são particularmente reativos em solução aquosa [Halliwell 2000].

Já o termo radical livre é usado num sentido bastante abrangente e simples, para designar qualquer espécie capaz de existência independente (daí a palavra “livre”) e que possua em sua estrutura eletrônica um ou mais elétrons desemparelhados. Um elétron desemparelhado é aquele que ocupa sozinho um orbital atômico ou molecular. A existência destes elétrons desemparelhados é justamente a causa do principal interesse nestas espécies, já que os mesmos usualmente conferem a estes radicais uma alta reatividade frente a outras moléculas (apesar de a reatividade química dos radicais variar enormemente).

Outra característica advinda do desemparelhamento eletrônico é a capacidade que elétrons desemparelhados têm de interagir com campos magnéticos. Esta característica, reportada como paramagnetismo, propicia uma aplicação metodológica importante na detecção de radicais livres: A técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica, RPE, a qual será discutida adiante.

Deste modo, segundo o conceito supracitado, diversas espécies podem ser classificadas como radicais livres, entre elas o hidrogênio atômico, o cloro atômico gerado pela homólise do gás cloro e até mesmo metais de transição como Ferro e Cobre [Halliwell e Gutteridge 2000]. No entanto, dado o interesse eminentemente biológico deste trabalho, principal atenção será dada aos radicais derivados do oxigênio, em especial o radical hidroxil.

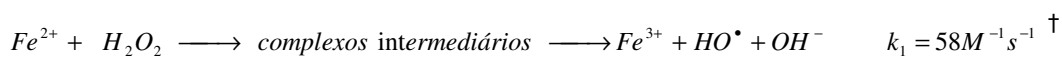
1.1.2. Radicais livres e suas reações

Apenas a título de ilustração, descreve-se a seguir esquemas que representam tanto a geração de radicais quanto as reações das quais estes tomam parte.

Formação de radicais

De um modo geral, radicais são formados pela cisão homolítica de uma ligação covalente, normalmente sendo necessário para tanto, o fornecimento de considerável quantidade de energia oriunda de processos tais como aquecimento ou radiação eletromagnética. Um bom exemplo são as reações iniciadas em câmaras de radiação UV ou mesmo as reações de combustão. No entanto, dependendo das espécies presentes no meio, processos catalíticos podem ocorrer, permitindo que a reação ocorra por mecanismos outros, os quais possuam menor energia de ativação.

Dentro deste contexto, de especial interesse é a reação de Fenton, importante tributária da geração *in vivo* de espécies reativas de oxigênio (esta reação é um bom exemplo de reações de formação de radicais livres catalisadas por metais de transição). Um sistema contendo H_2O_2 e um sal de Fe(II) é capaz de oxidar diversas moléculas orgânicas, tendo sido Henry Fenton o primeiro a reportar seu comportamento frente à amostras de ácido tartárico [Fenton 1894]. Apesar de mais de 100 anos terem se passado desde então, ainda há discussões sobre o mecanismo exato de oxidação de moléculas orgânicas pelo sistema de Fenton. O mais provável é que estejam envolvidas diversas espécies oxidantes, entre elas o radical hidroxil, conforme a **equação 1**:

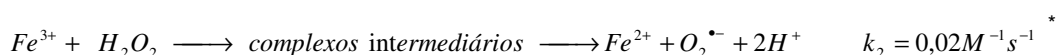


(equação 1)

[†] Constante k_1 segundo Chen (Chen et al. 2002)

Esta reação é termodinamicamente favorecida uma vez que os potenciais padrão de redução das semi-reações, corrigidos para pH 7, são aproximadamente 0,32 V (H_2O_2/HO^\bullet) e 0,11 V (Fe^{3+}/Fe^{2+}) [Halliwell 2000].

Atuando paralelamente à reação de Fenton, traços de Fe(III) podem reagir com peróxido de hidrogênio especialmente se estiverem ligados a certos quelantes, embora esta seja uma reação mais lenta que aquela com Fe(II), conforme a **equação 2**:



(equação 2)

Gutteridge reporta que HO^\bullet pode ser formado a partir de sistemas contendo certos quelatos de Fe(III) (por exemplo, EDTA férrico) e H_2O_2 , aparentemente envolvendo $O_2^{\bullet-}$ uma vez que esta reação é inibida pela presença da enzima superóxido dismutase - SOD [Gutteridge 1990].

Desta forma, os sistemas de Fenton são especialmente relevantes em patologias nas quais se verifica o acúmulo de ferro, como por exemplo a hemocromatose e a beta-talassemia, já sendo bem conhecida a correlação existente entre estas enfermidades e os efeitos oriundos de danos oxidativos [Bacon e Britton 1990].

Reações de radicais

Caso duas espécies radicalares reajam entre si, como resultado obtém-se a reação inversa daquela descrita como cisão homolítica. Ocorre neste caso a formação de um novo orbital molecular no qual podem ser encontrados ambos os elétrons anteriormente desemparelhados, formando-se portanto uma nova ligação covalente e a conseqüente extinção das espécies radicalares originais.

* Constante k_2 segundo Chen (Chen et al. 2002)

No entanto, caso a espécie radicalar reaja com um não-radical, o produto é um novo radical, e diferentemente da situação anterior, dá-se início a uma série de reações em cadeia, que prosseguem até que seja alcançada uma etapa usualmente descrita como terminação.

As **equações de 3 a 6**, representam como estas reações com espécies não-radicalares podem ocorrer :

a) Adição de um radical a outra molécula



b) Redução da espécie não-radicalar, por transferência de elétron



c) Oxidação da espécie não-radicalar por abstração de elétron



d) Abstração de H de uma ligação R-H



Em células, as reações radicalares podem fornecer radicais livres do tipo tio, oxigênio, carbono ou nitrogênio-centradas, devido à presença de grupos SH, OH, NH e CH nas mais variadas estruturas químicas encontradas nas proteínas [Hermes-Lima 2004]. Tem sido reportadas como principais reações *in vivo*, as reações de peroxidação lipídica e de degradação ao DNA.

1.1.3 Técnicas analíticas de detecção

As características físico-químicas das espécies radicais presentes no meio reacional, podem ser utilizadas no desenvolvimento de técnicas analíticas de detecção de radicais de oxigênio. No entanto, devido à sua reatividade

frente a outras moléculas e, por conseguinte a seu curto período de existência, é difícil a medida direta destes radicais *in vivo*.

A espectroscopia da ressonância paramagnética eletrônica (por vezes também chamada ressonância de spin eletrônico – RSE) permite a detecção direta de radicais livres, baseada na interação existente entre um campo magnético externo e o elétron desemparelhado do radical livre.

Se considerarmos que o elétron possui rotação em torno de seu próprio eixo, pode-se atribuir à esta partícula um momento angular. Uma vez que o elétron possui carga, o seu vetor momento angular ($\vec{S}\hbar$) está necessariamente associado a um momento magnético ($\vec{\mu}$). Na presença de um campo magnético externo, momentos magnéticos tendem a se alinhar ao campo buscando atingir um estado de mínima energia. Mediante a aplicação deste campo magnético, ocorre então uma separação dos níveis de energia dos estados de spin, chamada de efeito Zeeman. A condição de ressonância se dá quando a diferença de energia ΔE entre os estados de spin é igual à energia do fóton da radiação eletromagnética, ocorrendo assim a absorção de energia e o consequente espectro de ressonância paramagnética eletrônica [Rettori 2000].

Esta técnica é geralmente pouco sensível para a medição direta de radicais instáveis do tipo HO^\bullet e $\text{O}_2^{\bullet-}$ em sistemas vivos, sendo por outro lado, suficientemente sensível para medir diretamente espécies mais estáveis, como por exemplo o radical ascorbil. Um espectro típico do radical ascorbil pode ser visto na **Fig. 10**. Contudo, esta dificuldade em relação aos radicais hidroxil e superóxido pode ser contornada empregando-se a estratégia chamada “*spin-trapping*”, na qual estes radicais são capturados por certas moléculas diamagnéticas (por exemplo o 5,5-dimetil-1-pirrolina-n-óxido - DMPO), no intuito de formar espécies radicalares mais estáveis chamadas de “spin adduct”, e portanto passíveis de detecção por RPE [Rice-Evans 1991]. A técnica do *spin-trapping* pode ser usado também para gerar produtos hidroxilados mensuráveis por

fluorescência, como por exemplo, o benzoato, cujo derivado hidroxilado fornece um sinal característico a 512 nm [Gutteridge 1987].

Outra alternativa metodológica para a detecção de radicais é o uso de técnicas de *fingerprinting*, cujo princípio se baseia na detecção de produtos de degradação formados pela ação oxidativa das espécies reativas de oxigênio, os quais são, em sua maioria, compostos diamagnéticos. Esta é portanto uma detecção indireta, já que não se mede a espécie radicalar propriamente dita, mas sim o dano por elas causado. Como exemplo cite-se o ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (conhecido como TBARS) empregado neste trabalho, ensaio este que mede a degradação oxidativa do açúcar 2-deoxi-D-ribose [Halliwell 1987 e Gutteridge 1981].

1.1.4 Antioxidantes

Considerando a toxicidade do O_2 e a extensão na qual o mesmo é utilizado nos processos metabólicos, pode-se supor que os organismos aeróbicos somente são capazes de sobreviver sob uma atmosfera rica em O_2 , graças ao desenvolvimento de eficientes sistemas de defesa antioxidante. A existência de substâncias capazes de minimizar os efeitos oxidantes deste gás sobre os componentes celulares é portanto de crucial importância para a manutenção da vida aeróbica na terra.

Por outro lado, há autores que mencionam que uma proteção demasiada por parte destes antioxidantes pode ser conflituosa do ponto de vista evolutivo, já que esta defesa excessiva poderia prevenir alterações oxidativas do DNA as quais poderiam levar a mutações gênicas e eventualmente à outras estruturas celulares [Harman 1981].

A definição exata de antioxidante é pouco clara, por ser este um termo bastante abrangente e arraigado em diversas áreas do conhecimento, as quais vão desde a curadoria de museus e restauração de obras de arte, à indústria petroquímica, passando pela ciência de alimentos. Cada uma

destas áreas tem sua própria visão sobre o que seria um bom antioxidante. Em termos biológicos, propõem-se comumente que um antioxidante é “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas àquelas de um substrato oxidável, significativamente previne a oxidação deste substrato” [Halliwell e Gutteridge 2000]. O termo “substrato oxidável” se refere a todo tipo de molécula encontrada *in vivo*.

De qualquer modo, os sistemas de defesa antioxidante dos organismos vivos podem ser divididos em quatro subclasses [Hermes-Lima 2004]:

- i) Defesas antioxidantes primárias de natureza enzimática e não-enzimática, que estão diretamente relacionadas às espécies reativas de oxigênio. Como exemplo cite-se a atividade das enzimas catalase (ação sobre H_2O_2), e superóxido dismutase – SOD, (ação sobre $O_2^{\bullet-}$), além das vitaminas E (alfa-tocoferol, com ação sobre radicais peróxil) e C (ácido ascórbico, com ação sobre ozônio e hidroxil).
- ii) Defesas auxiliares que dão suporte ao funcionamento das defesas antioxidantes primárias, por exemplo, reciclando ou sintetizando substratos de enzimas antioxidantes. É o caso também da vitamina C a qual participa da reciclagem de alfa-tocoferol.
- iii) Proteínas complexantes de metais (ferritina e transferrina) ou compostos de baixa massa molar que previnem ou minimizam a participação de metais na geração de radicais, devido a sua ação quelante (Desferoxamina – DFO);
- iv) Sistemas de reparo enzimático capazes de reconstituir biomoléculas degradadas, especialmente DNA oxidado (endonucleases e DNA glicosilases).

É importante ressaltar que a maioria das defesas antioxidantes não-enzimáticas não são sintetizadas endogenamente por animais, devendo ser obtidas a partir da dieta. Portanto verifica-se a existência de uma relação íntima entre nutrição e defesa antioxidante. O reino vegetal dispõe de uma imensa gama de compostos com potencial atividade antioxidante

in vivo (apesar de muitos outros compostos oriundos de plantas apresentarem também atividade pró-oxidante *in vitro*). Estes compostos vegetais têm em geral grande importância na dieta, como é o caso dos polifenóis, discutidos ao longo deste trabalho.

1.2 PIH

1.2.1 Histórico

A piridoxal isonicotinoil hidrazona (PIH) foi descrita originalmente em 1954 por Sah, em estudos de síntese orgânica, sendo produto de uma reação de condensação do piridoxal com a isoniazida [Sah 1954]. Porém somente a partir de 1979 o interesse por esta substância cresceu consideravelmente, quando Ponka e outros pesquisadores relataram a capacidade da PIH em mobilizar ferro acumulado em reticulócitos e induzir a excreção biliar deste metal em ratos [Ponka et al. 1979 e Cikrt et al. 1980]. Neste ponto é interessante mencionar que tal descoberta se deu em grande parte graças a uma “serendipidade”, uma vez que Ponka estudava o metabolismo de ferro em ratos tratados concomitantemente com um co-fator da vitamina B6 (piridoxal-5-fosfato) e com ácido isoniazídico, uma droga usada no tratamento da tuberculose.

A partir de então diversos estudos clínicos foram conduzidos com a PIH numa tentativa de caracterizar seu potencial farmacológico como alternativa eficiente no tratamento de doenças correlacionadas ao acúmulo de ferro, tais como beta-talassemia e hemocromatose. Neste contexto, apenas a substância Desferoxamina (DFO) era usada como fármaco, em um processo terapêutico relativamente caro e de baixo rendimento em termos de absorção intestinal [Pippard 1989]. Estudos recentes apontam também para o uso clínico da substância Deferiprona (DFP) combinada com o DFO no tratamento destas doenças [Kattamis

2005 e D'Angelo 2004]. Atualmente, novos modos de administração do DFO foram desenvolvidos, o que propiciou um considerável incremento na comodidade do tratamento [Yarali et al. 2006]. Porém o tratamento continua tendo um alto custo, o que dificulta sua popularização.

A PIH revelou-se ser um potente ligante de ferro intracelular, com alta afinidade e seletividade por este metal, além de possuir estabilidade em condições fisiológicas e razoável permeabilidade à biomembranas, facilitando sua absorção e excreção [Johnson et al. 1982 e Brittenham 1990]. Estas características, aliadas à inexistência de efeitos colaterais em estudos toxicológicos, são extremamente desejáveis do ponto de vista clínico.

Conforme já discutido anteriormente a respeito da reação de Fenton, a habilidade de um composto em induzir balanço negativo de ferro no organismo, é especialmente importante na prevenção de danos oxidativos em estruturas celulares causados por EROs. Na medida em que o ferro exerce papel preponderante na formação de oxi-radicais, estando envolvido em diversas patologias de cunho oxidativo, um eficiente quelante de ferro é um potencial agente antioxidante.

Diante deste cenário, Schulman e Hermes-Lima investigaram as propriedades antioxidantes da PIH in vitro, correlacionando-as à sua capacidade quelante [Schulman 1995 e Hermes-Lima et al. 1998]. Estudos com simulacros biológicos evidenciaram a habilidade da PIH em prevenir danos ao DNA [Hermes-Lima et al. 1998] e inibir a peroxidação lipídica em mitocôndrias [Santos 2001].

1.2.2 A ação antioxidante da PIH

A PIH é um ligante tridentado que forma um complexo bastante estável com Fe(III) [Avramovich-Grisaru 1985] (**Fig. 1**).

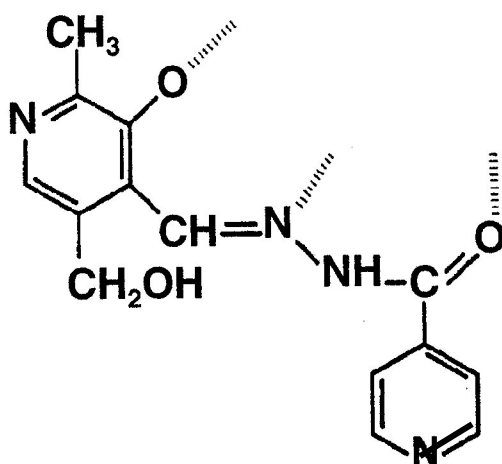


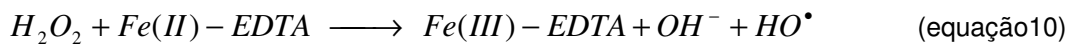
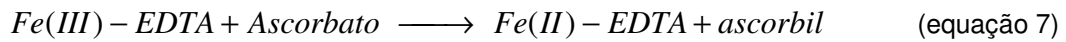
Fig. 1. Representação esquemática da Piridoxal Isonicotinoil Hidrazona – PIH, evidenciando os sítios ligantes de íons Fe.

Conforme o modelo de simulação, os seis sítios do cátion Fe(III) estão coordenados formando um complexo $[\text{Fe}(\text{PIH})_2]^{2+}$, sendo o grupo carbonila, o nitrogênio da hidrazona e a hidroxila fenólica, os principais sítios ligantes (apesar do nitrogênio da piridina ser usualmente um bom sítio complexante, supõem-se que devido a um impedimento estérico tal não ocorra no caso da PIH).

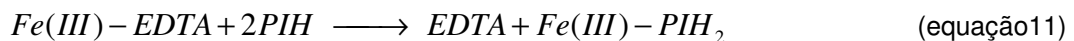
Em meios aquosos com pH próximo de 7 a literatura relata que podem ser encontradas coexistindo as seguintes substâncias : H_2L (forma neutra) e HL^- (forma monodesprotonada) [Murphy et al 1985]. Cada uma destas espécies de PIH pode coordenar-se aos íons férricos gerando um complexo numa proporção ligante:metal igual a 2:1. Gomes relata a formação de pelo menos dois complexos diferentes a partir da oxidação do complexo ferroso [Gomes 2005].

Baseado na comparação da PIH com outros ligantes metálicos e com seqüestradores de oxi-radicais clássicos, Hermes-Lima e colaboradores sugerem que o mecanismo de ação antioxidante da PIH se deve à sua habilidade quelante, apesar de não excluir a possibilidade de reação direta da PIH com o radical hidroxil via hidroxilação do anel aromático [Hermes-Lima et al. 1998].

Consideremos que sistemas contendo Fe(III)-EDTA, ascorbato e oxigênio dissolvido são capazes de gerar radicais hidroxil, segundo as reações descritas nas **equações 7-10** :



Foi então proposto que o PIH quebraria a cadeia de reações acima descrita, removendo o íon férrico do co-quelante EDTA e formando o já mencionado complexo mais estável $[Fe(PIH)_2]^{2+}$ conforme a **equação 11** :



Tal complexo seria estável o suficiente para minimizar de forma relevante a redução do Fe(III), suprimindo portanto a formação do radical hidroxil, produto final das reações de 7 a 10.

1.2.3 Fatos novos acerca da PIH

As características ferro-mobilizadoras e antioxidantes relatadas acerca da PIH desde a década de 80, aliadas à sua capacidade de se comportar com desenvoltura em sistemas biológicos, sem dúvida nenhuma alçaram este composto à condição de “bom mocinho” em avaliações clínicas para fins terapêuticos. No entanto, diversos estudos recentes tem revelado que os efeitos biológicos deste quelante, entre eles a sua toxicidade *in vivo*, têm sido sistematicamente subestimada [Buss 2002]. Desta forma, um lado menos benéfico da PIH tem ficado obscurecido desde a descoberta de 1979.

Uma das principais causas desta avaliação inconsistente do comportamento bioquímico da PIH se deve principalmente à capacidade deste composto em sofrer reações de hidrólise, quer em meio ácido, quer em meio básico. Estudos espectrofotométricos revelaram que os produtos desta reação são na verdade os precursores sintéticos da PIH, estabelecendo-se portanto um equilíbrio químico entre a hidrólise e a condensação [Buss e Ponka 2002].

Buss descreve que em função desta reação, as concentrações efetivas de PIH nos experimentos de mobilização de Fe provavelmente são bem menores do que as originalmente relatadas, uma vez que estes experimentos foram conduzidos em condições nas quais a hidrólise ocorre em uma extensão significativa. Por outro lado, no caso dos estudos de toxicidade, a concentração de PIH nos quais se verificou inibição do crescimento celular foram subestimadas, já que as concentrações de PIH remanescente no meio reacional são bem menores que as concentrações iniciais. De qualquer forma, a hidrólise da PIH não tem significativo impacto e relevância para fins deste presente trabalho, já que em pH próximo do neutro, a reação de hidrólise ocorre muito mais vagarosamente [Richardson et al. 1989].

Adicionalmente, em estudos subsequentes descreve-se a capacidade da PIH e análogos em induzir a apoptose em células hematopoiéticas devido à suas propriedades de quelante de ferro [Buss et al. 2003]. Nesse referido estudo, é estabelecida uma relação entre a toxicidade celular da PIH e a sua interação com o ferro intracelular, já que o tratamento de linfócitos Jurkat T com complexos Fe(III)-(PIH)_2 , levou à morte celular. Considerando que a PIH é capaz de mobilizar ferro de células, ocorre em consequência uma acumulação do complexo Fe-quelante no citosol (acumulação esta aumentada com a lipofilicidade do complexo). Desta forma, presume-se que o estresse oxidativo causado pelo acúmulo intracelular do complexo Fe-quelante seja o responsável pela toxicidade verificada [Buss et al. 2004].

Somando-se aos efeitos indesejados da PIH, Gomes relata que apesar da PIH ter apresentado eficiente ação antioxidante na autooxidação de Fe(II), foi verificado um significativo efeito pró-oxidante em baixas concentrações de tampão fosfato [Gomes 2005]. Sistemas contendo Fe(II) e PIH promoveram uma maior degradação da 2-DR quando as concentrações de tampão fosfato ficaram abaixo de 1 mmol/L. Similarmente, em estudos de EPR Gomes e colaboradores verificaram que em baixas concentrações de fosfato, ocorre a formação de espécies radicalares quando em presença de PIH.

Outro fato observado por Gomes é que a PIH promove a oxidação do Fe(II), na presença de tampão fosfato, sem permitir no entanto que esta oxidação esteja envolvida em uma excessiva formação de EROs [Gomes 2005]. Esta oxidação do Fe(II) pode possivelmente ser causada pela própria PIH, tendo sido observada a formação de um complexo ferroso (na proporção 1:1) menos estável que o férrico. Foi então postulado que o complexo Fe(II)-PIH é rapidamente oxidado a Fe(III)-(PIH)₂, em decorrência da PIH promover a diminuição do potencial redox do par Fe²⁺/Fe³⁺. Assim, o Fe(II) presente no meio seria rapidamente convertido ao complexo férrico de PIH. Eliminando-se o Fe(II) ou mesmo Fe(II)-PIH presente para reagir com o peróxido de hidrogênio gerado *in situ*, a produção de EROs ficaria desta forma inibida.

É interessante notar que em estudos espectrofotométricos, Gomes aponta que o complexo formado entre Fe(III) e PIH a partir da oxidação de Fe(II) é estruturalmente diferente daquele formado pela reação direta de Fe(III) com a PIH.

1.3 Polifenóis

Os compostos polifenólicos, ou simplesmente polifenóis, são geralmente descritos na literatura como aqueles pertencentes a um vasto grupo de compostos encontrados na natureza, os quais possuem como característica principal a presença de múltiplos grupos funcionais do tipo fenol [Tuckmantel 1999]. Os polifenóis estão usualmente presentes em plantas como produtos do metabolismo destas, exercendo papel importante na morfologia e fisiologia vegetais, na medida em que estão relacionados a diversos aspectos do crescimento e reprodução vegetal [Bravo 1998]. Entre uma de suas funcionalidades mais interessantes está a capacidade de proteger as plantas contra patógenos e predadores herbívoros (alguns compostos podem atuar como toxinas naturais ou conferir sabor indesejado ao alimento tornando-o menos palatável) [Bravo 1998] e principalmente contra estresse fotossintético e formação de espécies reativas de oxigênio [Yang et al. 2001].

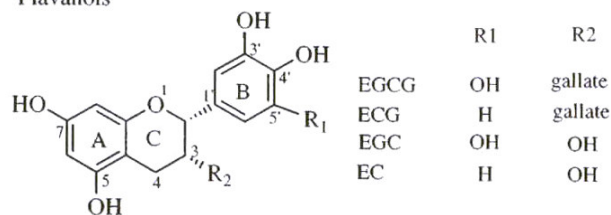
Baseado em sua estrutura química, os polifenóis podem ser divididos em pelo menos dez diferentes classes, sendo que as principais são os flavonóides, taninos e ácidos fenólicos e derivados.

Flavonóides

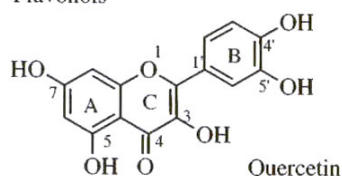
Classe com maior número de substâncias conhecidas e cuja estrutura básica consiste de dois anéis aromáticos ligados entre si por três carbonos os quais geralmente formam um heterociclo oxigenado. Subdividem-se em flavonas, catequinas, isoflavonas, flavonóis e antocianinas [Bravo 1998]. A **Fig. 2** apresenta as fórmulas estruturais básicas dos flavanóis, flavonóis e isoflavonas, principais subclasses dos flavonóides.

Flavonoids

Flavanols



Flavonols



Isoflavones

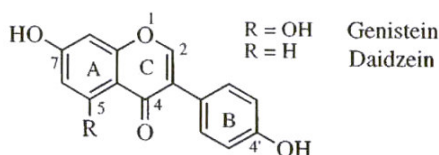


Fig. 2. Representação esquemática dos flavanóis, flavonóis e isoflavonas, principais subclasses dos flavonóides (Yang et al. 2001).

Taninos

São compostos de massa molar relativamente alta e se apresentam intensamente hidroxilados. Podem formar complexos insolúveis com carboidratos e proteínas, inclusive as proteínas salivares, sendo esta a razão de sua característica adstringente ao paladar. Um composto de especial interesse no que diz respeito à capacidade antioxidante é o ácido tânico - AT, que demonstrou possuir efeito em reações oxidativas mediadas por íons metálicos [Lopes et al. 1999].

Ácidos Fenólicos

Classe subdivida em ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos. Nas plantas usualmente ocorrem na forma de ésteres os quais podem ser ambos solúveis (acumulando-se em vacúolos) ou insolúveis (componentes da parede celular). Dentre os ácidos hidroxibenzóicos os mais importantes são os ácidos elágico e gálico, os quais estão presentes principalmente em frutas vermelhas e castanhas/nozes [Maas 1991].

Os representantes mais importantes dos ácidos hidroxicinâmicos são o ácido caféico (AC) e o ácido ferúlico presentes no café e em diversas frutas.

Os derivados dos ácidos hidroxicinâmicos são também muito abundantes, tais como o ácido clorogênico (originário da reação do ácido caféico com o ácido quínico), o qual representa cerca de 7% do conteúdo dos grãos do café e é um importante substrato na oxidação enzimática responsável pelo escurecimento de frutas como maçã e pêra [Yang et al. 2001]. Este derivado caféico está especialmente presente em grande quantidade nos diversos grãos e sementes [Sondheimer 1958]. Os principais compostos da sub-classe dos ácidos hidroxicinâmicos estão representados na **Fig. 3** abaixo:

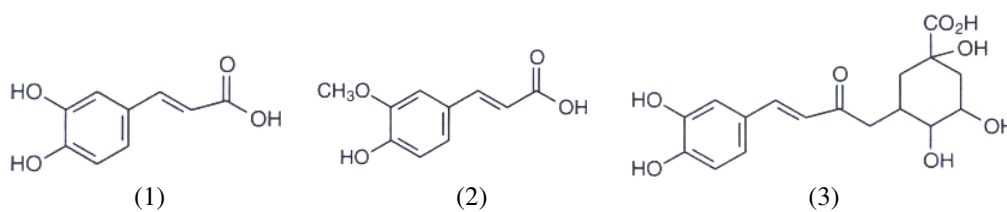


Fig. 3. Representação esquemática do ácido caféico (1), ácido ferúlico (2) e ácido clorogênico (3), principais componentes dos ácidos hidroxicinâmicos.

1.3.1 Dieta e biodisponibilidade

Por estarem amplamente distribuídos nas mais diversas espécies de vegetais, os polifenóis constituem-se em um importante componente da dieta humana. A **tabela 1** a seguir, fornece dados quantitativos da distribuição dos principais polifenóis em alguns alimentos selecionados [King e Young 1999]. Salienta-se que enquanto a maioria dos compostos descritos na tabela 1 têm suas quantidades expressas em partes por milhão (ppm ou mg/kg), os ácidos hidroxicinâmicos quantificados no café em grãos estão expressos em g/kg, evidenciando sua forte presença neste fruto.

Tabela 1. Distribuição dos principais polifenóis em alguns alimentos

| Classes e Subclasses | Compostos | Alimentos | Quantidade |
|-----------------------------|--|---------------------|-------------------|
| Flavonóides | | | |
| Flavonóis | Quercetina, kaempferol, miricetina | Azeitona | 270-830 mg/kg |
| | | Cebola | 347 mg/kg |
| | | Alface | 308 mg/kg |
| | | Tomate Cereja | 17-203 mg/kg |
| | | Brócolis | 102 mg/kg |
| | | Maçã | 21-72 mg/kg |
| | | Feijão | 49 mg/kg |
| | | Endívia | 46 mg/kg |
| | | Chá (folhas) | 30-45 g/kg |
| | | Chá (preto) | 20 mg/L |
| Flavonas | Apigenina, Luteolina | Aipo | 130 mg/kg |
| | | Azeitona | 6-29 mg/kg |
| Flavanóis | Catequina, Epicatequina | Pêra | 70-420 mg/kg |
| | | Vinho tinto | 274 mg/L |
| | | Chá (folhas) | 128-226 g/kg |
| | | Vinho branco | 35 mg/L |
| | | Maçã | 23-30 mg/kg |
| Isoflavonas | Genisteina, Daidzeina | Soja (grão seco) | 888-2407 mg/kg |
| | | Tofu | 280-499 mg/kg |
| | | Miso | 256-540 mg/kg |
| | | Proteína Text. Soja | 1175-1191 mg/kg |
| | | Leite soja | 105-251 mg/L |
| Ácidos Fenólicos | | | |
| Ácidos Hidroxicinâmicos | Caféico, Ferúlico, Clorogênico, Neoclorogênico | Mirtilo | 1881-2112 mg/kg |
| | | Cereja | 290-1280 mg/kg |
| | | Pêra | 44-1270 mg/kg |
| | | Maçã | 2-258 mg/kg |
| | | Laranja | 21-182 mg/kg |
| | | Batata | 100-190 mg/kg |
| | | Grapefruit | 25-60 mg/kg |
| | | Café (grãos) | 56 g/kg |
| Ácidos Hidroxibenzóicos | Elágico, Gálico | Framboesa | 19-102 mg/kg |
| | | Morango | 21-89 mg/kg |
| Taninos | Polímeros da Catequina e Epicatequina | Lentilha | 3800 mg/kg |
| | | Vinho tinto | 2567 mg/L |
| | | Vinho branco | 239 mg/L |
| | | Suco maçã | 8-87 mg/L |

Por diversas razões, incluindo a grande diversidade estrutural, a ausência de métodos analíticos devidamente validados e a significativa variação na composição que ocorre em cada alimento, tem sido extremamente difícil estimar a média de ingestão diária de polifenóis [Scalbert e Williamson 2000]. Grande parte dos autores se refere a dados publicados cerca de 30 anos atrás, quando foi estimada uma ingestão fenólica diária total de 1 g em dietas ocidentais [Kuhnau 1976]. Tem sido relatado que frutas geralmente são mais ricas em polifenóis que vegetais, razão pela qual uma grande fonte alimentar de polifenóis é o consumo regular de bebidas tais como café, vinho tinto e sucos de frutas, além de chás [Scalbert 2000 e Macheix et al. 1990]. Os ácidos fenólicos compreendem cerca de um terço dos compostos fenólicos da dieta humana, sendo os outros dois terços correspondentes à ingestão de flavonóides. Porém esta proporção depende fortemente do consumo de café [Clifford 1999], uma vez que consumidores inveterados desta bebida estarão ingerindo mais ácidos fenólicos que flavonóides.

No entanto, independentemente da ingestão, as propriedades biológicas dos polifenóis somente serão aproveitadas se a biodisponibilidade dos mesmos for favorável. A estrutura química dos polifenóis e a composição da microflora intestinal determinam a taxa e a extensão da absorção e a natureza dos metabólitos circulantes no plasma [Scalbert 2000]. A medida direta da concentração destes compostos no plasma e urina e a medida do aumento da capacidade antioxidante do plasma após sua ingestão, podem fornecer evidências de sua absorção no trato gastrointestinal.

Estudos apontam para o fato de que principalmente polifenóis de alta massa molecular ou aqueles ligados a fibras alimentares e proteínas e que permanecem insolúveis em solventes do tipo água, metanol ou acetona aquosa, são menos biodisponíveis. Um exemplo é o caso de taninos condensados, que normalmente se apresentam na forma de oligômeros ou polímeros [Bravo 1998]. No entanto a enorme variedade de compostos do grupo dos polifenóis, bem como a sua ocorrência natural sob a forma de misturas complexas de compostos fenólicos em diversas

matrizes, tem sido uma dificuldade no estudo da biodisponibilidade destas substâncias.

1.3.2 Ação antioxidante

Exatamente por se constituírem em fundamentais contribuintes da dieta, os primeiros estudos dos polifenóis estavam em sua maioria relacionados ao efeitos antinutricionais destes compostos, como por exemplo à diminuição na absorção e digestibilidade de alimentos devido a capacidade destes compostos de se ligar e precipitar minerais e macromoléculas tais como proteínas e carboidratos [Yang et al. 2001]. Mais recentemente o interesse principal tem recaído sobre o fato de que diversos compostos deste grupo revelaram possuir atividades antioxidantes, antiinflamatória e anticarcinogênicas.

Diversos estudos epidemiológicos tem sugerido associações entre uma dieta com alimentos ricos em polifenóis e a prevenção de doenças: O consumo de chá pode evitar o câncer [Steinmetz 1996] e disfunções cardíacas [Tjiburg 1997], assim como o consumo de uva e derivados pode prevenir doenças cardiovasculares [Criqui 1994]; frutas e verduras estão há muito associadas à prevenção de cânceres [Steinmetz 1996 e Renaud et al. 1992] e a soja pode impedir o aparecimento de câncer de mama e osteoporose [Adlercreutz et al.1997].

Muitos destes efeitos benéficos relacionados à prevenção de diversas enfermidades estão associados à própria natureza química deste grupo de compostos: devido à sua estrutura, polifenóis são em geral bons agentes redutores e juntamente com outros agentes redutores encontrados na dieta tais como vitamina C, vitamina E e carotenóides, podem proteger tecidos e estruturas celulares contra danos oxidativos.

Deste modo, a habilidade destes compostos em prevenir doenças conhecidamente associadas ao estresse oxidativo, tais como cardiopatias,

alguns tipos de câncer e processos inflamatórios podem estar vinculadas às propriedades antioxidantes dos polifenóis reportadas recentemente. Proteção contra a peroxidação de LDL pode ser útil no caso de doenças cardíacas, enquanto que compostos com potencial de proteção contra danos oxidativos ao DNA podem ser relacionados ao tratamento contra cânceres ou disfunções genômicas.

Como já discutido, vários mecanismos antioxidantes responsáveis pelo decréscimo da toxicidade de oxigênio celular podem estar operando em sistemas biológicos. No entanto os principais contribuintes da ação antioxidante total são i) à habilidade de moléculas em capturar espécies radicalares e ii) habilidade em quelar íons metálicos envolvidos na geração destas mesmas espécies radicalares.

Os compostos polifenólicos são reconhecidos por possuir atividade antioxidante devido a sua habilidade em “seqüestrar” radicais livres, interrompendo por exemplo a reação radicalar em cadeia da peroxidação lipídica [Rice-Evans 1996]. Estes compostos interferem nas reações de oxidação de lipídios e outras moléculas por meio de uma rápida transferência de átomos de hidrogênio aos radicais como por exemplo hidroxil e peroxil.

Em termos estruturais, os principais responsáveis por esta atividade são os dois grupos hidroxila na posição 3',4' do anel B, a dupla ligação em conjugação com um grupo cetônico no carbono 4 do anel C e os grupos hidroxila dos carbonos 5 e 7 do anel A, no caso dos flavonóis (**Fig. 4**).

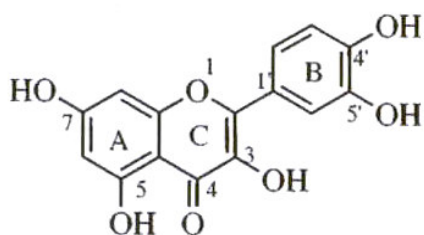


Fig.4. Representação dos anéis A, B e C e dos carbonos da estrutura básica dos flavonóis

Considerando o caso dos ácidos fenólicos, a estrutura hidroxifenólica conjugada com a dupla ligação da cadeia de ramificação, tem sido reportada como o principal componente da atividade antioxidante [Rice-Evans 1996].

Segundo Rice-Evans et al. em ensaios de TEAC[‡] (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox) de modo geral, a inserção de um grupo etilênico entre um anel fenólico contendo um grupo p-hidroxila e o grupo carboxilato, tem um efeito fortemente favorável nas propriedades redutoras do grupo OH e portanto na capacidade de estabilizar uma espécie reativa de oxigênio. Curiosamente os mesmos estudos indicaram também que a introdução de mais um grupo hidroxila em posição vicinal ao grupo p-hidroxi diminui a atividade antioxidante em fase aquosa segundo o ensaio da TEAC, porém aumenta a atividade antioxidante em sistemas lipofílicos [Rice-Evans 1996]. Este fatos têm grande impacto no mecanismo de ação do AC, conforme será discutido ao longo desta seção.

Seja como for, nestes casos em que polifenóis tem sua capacidade antioxidante devido a sua ação como seqüestradores de radicais, pode-se dizer que em geral a eficiência dos mesmos em prevenir danos oxidativos depende diretamente da sua habilidade em formar intermediários estáveis após reação com os radicais.

Outro mecanismo de ação antioxidante dos compostos polifenólicos de especial relevância é a sua capacidade de se ligar a metais tais como íons ferro e cobre, impedindo ou minimizando a participação destes em reações de Fenton. É o caso do AT, para o qual foi demonstrada sua habilidade em inibir a formação de radicais hidroxil devido a sua ação complexante de íons ferro [Lopes et al. 1999].

[‡] O valor TEAC é definido como a concentração milimolar (mmol/L) de uma solução de Trolox, que possua a mesma capacidade antioxidante de 1 mmol/L da solução da substância em estudo.

No entanto, dicotomicamente a interação dos polifenóis com metais pode conferir aos mesmos uma característica pró-oxidante em alguns casos. Compostos dos grupos dos flavonóides e ácidos fenólicos por exemplo, demonstraram ser antioxidantes inibindo a formação de radicais peroxil e hidroxil em diferentes sistemas oxidantes, porém na presença de Cu^{2+} os mesmos se revelaram pró-oxidantes [Cao et al. 1997 e Yamanaka 1997], provavelmente devido a reações de redução de Cu^{2+} a Cu^+ induzidas pelo polifenol, abrindo caminho para reações do tipo Fenton. Andrade Jr, em estudos sobre a capacidade do AT em prevenir danos oxidativos ao DNA induzidos por íons cobre, verificou um efeito pró-oxidante deste polifenol e também do complexo AT-Cu em presença de DNA [Andrade Jr 2004]. Esta atividade pró-oxidante induzida por metais, pode desempenhar um papel central nas já referidas patologias metalo-acumuladoras.

No entanto é importante ressaltar que uma proteção contra a ação de algumas espécies radicais in vitro, não necessariamente implica em proteção contra danos oxidativos em células. Por exemplo, Pool-Zobel descreve que tanto compostos isolados quanto amostras complexas de plantas contendo várias antocianinas e antocianidinas se mostraram potentes antioxidantes in vitro. Porém, pelo menos em células tumorais do colon humano, este grupo de compostos não foi capaz de minimizar o dano oxidativo endógeno ao DNA [Pool-Zobel 1999].

Da mesma forma, pequena atividade antioxidante in vitro, também não necessariamente significa que um composto não seja responsável por ação antioxidante in vivo. Cite-se o fato de que a interação de flavonóides tais como quercetina e catequina, com espécies antioxidantes intracelulares do tipo glutathione peroxidase (GPx) pode aumentar significativamente a atividade antioxidante destas [Ferguson 2001 e Nagata 1999]. Neste sentido, a indução de enzimas também pode ter papel importante, como por exemplo no caso da genisteína que pode induzir a expressão de metalotioneína (uma proteína ligante de metais com propriedades antioxidantes) em células Caco-2 [Kuo et al. 1999].

1.3.3 Toxicidade

A despeito de diversos estudos revelarem uma gama de efeitos benéficos dos polifenóis, principalmente relacionados às propriedades antioxidantes destes compostos, cabe referenciar a antiga afirmação atribuída a Paracelso a respeito do uso terapêutico de qualquer substância : “a diferença entre o veneno e o remédio está na dose administrada”.

Infelizmente, os potenciais efeitos tóxicos decorrentes da excessiva ingestão de flavonóides são comumente ignorados. Em doses altas, flavonóides podem agir como mutagênicos, geradores de radicais livres, e inibidores de enzimas chave do metabolismo de hormônios [Skibola et al. 2000].

Diversos estudos recentes tem revelado que além da atividade antioxidante apresentada pelos polifenóis, estes compostos uma vez presentes em sistema biológicos, podem possuir outros mecanismos de ação. Galati relata toxicidade mitocondrial associada a uma capacidade dos polifenóis em promover o colapso do potencial da membrana mitocondrial [Galati et al. 2004]. Já Skibola, descreve a habilidade de flavonóides em inibir enzimas associadas ao DNA, como por exemplo a topoisomerase [Skibola 2000]. A síntese de tiroxina também é inibida por certos polifenóis, os quais agem como substratos alternativos na iodinação da tirosina, dando lugar a formação de mono, di ou tri-iodo-isoflavonas [Divi et al. 1996]. Neste mesmo estudo, demonstrou-se que os flavonóides podem inibir irreversivelmente a tireoide-peroxidase, a qual é essencial para a síntese do hormônio da tireóide.

Apesar da toxicidade mitocondrial estar associada a uma atividade anticarcinogênica (alterações na permeabilização da membrana mitocondrial estão relacionadas à promoção de apoptose, sendo que a indução da apoptose por sua vez, suprime o desenvolvimento do câncer), os comportamentos acima descritos abrem espaço para uma melhor avaliação do potencial tóxico dos mesmos.

Neste sentido, curiosamente compostos fenólicos podem ser ambos antioxidantes ou pró-oxidantes, o que sugere que uma dieta rica em flavonóides e outros polifenóis pode se constituir mais em um risco oxidativo que em benefício [Decker 1997]

Tem sido verificado que compostos fenólicos presentes na dieta, podem agir como pró-oxidantes em sistemas contendo metais com potencial redox fisiologicamente relevante. Na presença de oxigênio, metais de transição tais como cobre e ferro catalisam o ciclo redox de polifenóis, levando a formação de EROs e radicais fenoxil que podem atacar o DNA, lipídeos e outras moléculas biológicas [Galati 2004]. Em presença de metais de transição, foi verificado que flavonois com grupos galoil ou catecol também são capazes de se autooxidar levando à degradação de LDL [Galati 2004]. No mesmo estudo, o composto epigalocatequin-galato, se mostrou capaz de induzir a geração de H_2O_2 e o subseqüente dano ao DNA celular.

Tais comportamentos pró-oxidantes serão de relevante interesse na discussão dos resultados obtidos neste trabalho.

1.3.4 Ácido caféico

Dentre os ácidos hidroxicinâmicos, aquele mais comumente encontrado e de maior representatividade na dieta é o ácido caféico (AC), composto sensível ao calor [Dimberg et al. 1996] e produzido a partir da L-fenilalanina ou L-tirosina, conforme a **Fig. 5**.

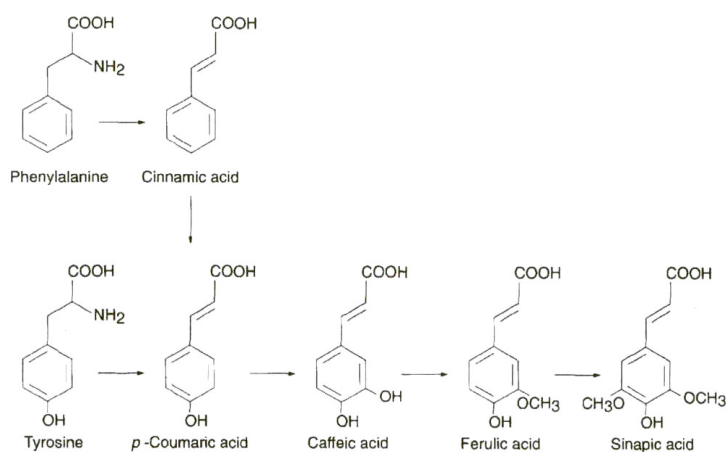


Fig.5. Precursores biosintéticos do ácido caféico (Rice-Evans 1996)

Apesar do nome que o remete ao café, pode também ser encontrado em frutas e vegetais como maçã, ameixa, uvas e tomates, sendo possível isolá-lo das folhas de *Alsophila spinulosa*, uma pteridófita originária da China, com propriedades já descritas para o tratamento de hepatite, gota e reumatismo [Chiang et al. 1994].

Os estudos acerca dos efeitos fisiológicos do AC incluem relatos sobre a sua capacidade de atuar como antiinflamatório [Chen et al. 1995], inibidor da xantina-oxidase [Chiang 1994], ligante metálico [Nardini et al. 1995] e como agente protetor contra citotoxicidade induzida por peróxido de hidrogênio [Nakayama 1994]. Estudos com AC em sistemas lipídicos indicaram um potencial deste polifenol em atenuar a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade [Castellucio et al. 1996 e 1995] e mesmo inibir a oxidação de LDL catalisada por íons metálicos [Nardini 1995].

1.3.4.1 Aspectos estruturais

No que diz respeito ao potencial antioxidante do AC, sua atividade anti-radical está intrinsecamente correlacionada à sua estrutura molecular, tanto em função de sua capacidade de estabilizar por ressonância o radical fenoxil gerado pela doação do seu H fenólico, quanto em função

de sua capacidade de interagir com metais indutores de reações de dano oxidativo.

Estudos de análise conformacional por métodos *ab initio* (otimização da geometria da molécula e cálculo de suas frequências vibracionais, por meio de métodos computacionais), revelam que as energias calculadas para o AC e moléculas similares sugerem uma clara preferência por uma geometria planar em um sistema completamente conjugado [Fiúza et al. 2004 e VanBesien et al. 2003]. Segundo estes estudos, esta preferência pela planaridade é previsível, uma vez que favorece a deslocalização de elétrons através de um sistema π expandido, estabilizando a molécula e fornecendo energias conformacionais mais baixas. Esta estabilidade molecular por deslocalização de elétrons em sistemas π conjugados, está fortemente correlacionada a capacidade antioxidante do AC, principalmente no que diz respeito a estabilização de radicais fenoxil.

Hotta por meio de estudos eletroquímicos demonstrou que o número n de elétrons envolvidos nas reações de oxidação do AC é igual a 2 em pH menor do que 7, porém este número aumenta consideravelmente com o aumento do pH [Hotta 2001]. O número de 2 elétrons obtido por ensaios voltamétricos é consistente com o número de hidroxilas fenólicas deste composto e, portanto com o mecanismo proposto na **Fig. 6** abaixo:

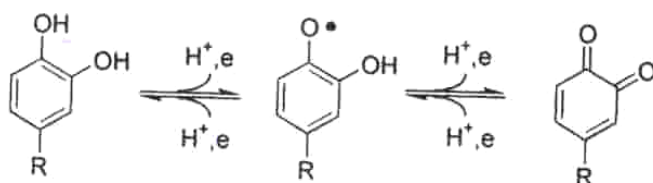


Fig.6. Mecanismo proposto para oxidação do AC (Hotta 2001)

Os valores de n mais altos observados em pH maior que 7 sugerem que em meio alcalino os polifenóis com grupos catecol estão sujeitos à alguma reação química (a qual se revelou irreversível segundo os estudos voltamétricos). Isto de algum modo altera sua estrutura, provavelmente em termos do número de hidroxilas [Hotta 2001]. Foi então proposto uma reação de dimerização como principal geradora dos produtos de oxidação

do AC em pH alcalino. Esta reação está em concordância com dados de espectroscopia Raman os quais confirmam a possibilidade da existência de estruturas diméricas (também previstas nos cálculos *ab initio*) [VanBesien 2003], corroborando o sugerido por Kokhar (diminuição no efeito quelante com o aumento da concentração de polifenóis devido à reações paralelas de dimerização) [Kokhar 2003].

Outra possível explicação para os elétrons adicionais envolvidos na reação de oxidação do AC em pH maior que 7, é dada conforme o mecanismo a seguir, expresso pela **Fig. 7**:

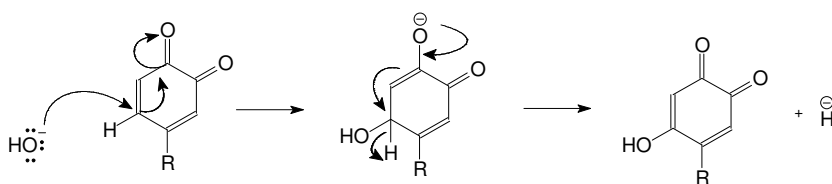


Fig.7. Mecanismo alternativo para oxidação do AC

No entanto, como uma das espécies formadas nesta reação é o hidreto, a energia dos produtos gerados seria bastante alta, o que torna improvável que a oxidação do AC ocorra por meio deste mecanismo.

Apesar dos estudos iniciais sobre a relação estrutura/atividade de ácidos fenólicos terem se concentrado na importância do grupo catecol [Chen 1997 e Moon 1998], indicando ser este um grupo importante tanto na estabilização de radicais livres [Hotta 2001] quanto na complexação de metais [Kokhar 2003, Hynes et al.2004 e Boilet et al. 2005], o papel do grupo etilênico e do grupo carboxílico devem também ser avaliados.

Teoricamente a dupla ligação seria importante para a atividade antioxidante na medida em que a mesma é imprescindível na estabilização de radicais fenoxil por conjugação, conforme já discutido [Rice-Evans 1996]. Porém no caso do AC, foi verificado que sua habilidade antioxidante é relativamente menor que a de análogos sem a presença da dupla ligação [Hotta 2001 e Rice-Evans 1996]. Esta observação poderia estar relacionada a impossibilidade do grupo etilênico

em efetuar rotações livremente, diminuindo assim a eficiência estérica da molécula em formar quelatos metálicos [Fiúza et al. 2004].

Em relação ao grupo carboxílico, estudos tem demonstrado sua participação central em algumas reações de complexação do AC com metais [Boilet 2005 e Khvan 2001], uma vez que esta interação tende a ser facilitada em meio neutro ou levemente alcalino. Adicionalmente, estudos espectroscópicos por UV e IR, realizados por estes autores confirmam a existência de estruturas metal:AC, nas proporções 1:1 (no caso do metal Pb^{2+}), 1:2 (no caso dos metais Cu^{2+} e Zn^{2+}), 2:1 (também no caso dos metais Pb^{2+} e Cu^{2+}) e 1:3 (no caso de Al^{3+}).

Cabe no entanto salientar que os diversos estudos da interação do AC com diferentes metais demonstram justamente que extrapolações de um complexo para outro não podem ser utilizadas no que diz respeito ao sítio ligante e aos mecanismos de complexação, posto que a natureza do complexo varia com o íon considerado.

Por fim vale mencionar que a capacidade do AC em interagir com Fe(III) depende da concentração deste metal. Conforme reportado por Deiana [Deiana et al. 1995], o AC é capaz de reduzir Fe(III), formando o-quinona ou decompondo-se completamente. A literatura relata ainda uma decomposição gradual de complexos Fe(III)-AC [Hynes 2004], conforme o mecanismo proposto na **Fig. 8** a seguir :

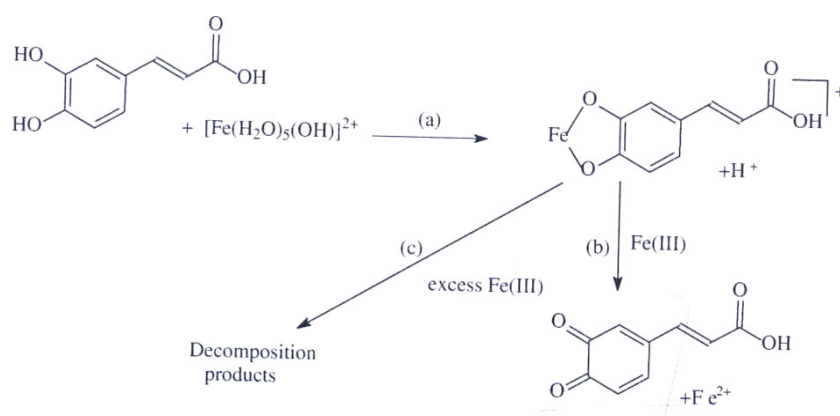


Fig.8. Esquema da decomposição do AC mediada por íons Fe(III) (Hynes 2004)

Foi ainda verificada a pouca eficiência do AC em remover Fe(III) de outro quelante típico, a Desferoxamina [Solinas et al. 1996]. Estas características do AC podem ser de relevante interesse uma vez que espécies férricas estão intimamente correlacionadas à presença de EROS, e influem grandemente na capacidade antioxidante das substâncias (vide item 1.2 a respeito da PIH).

2. Materiais e Métodos

2.1 Oxidação do Ascorbato

A taxa de oxidação do ascorbato induzida por íons férricos, fornece uma avaliação indireta da extensão da redução de íons Fe(III) a Fe(II), redução esta de relevante interesse bioquímico por gerar o reagente de Fenton e permitir a posterior formação de EROs. As absorbâncias de sistemas contendo Fe(III) previamente ligado à um co-quelante (EDTA, NTA ou citrato conforme o caso), tampão Hepes a pH 7,2 e PIH seguido da adição de ascorbato, foram medidas a 265 nm (comprimento de onda no qual ocorre absorção de luz por parte do ascorbato) durante 3 minutos. As respectivas inclinações da reta foram então calculadas, obtendo-se assim a taxa de oxidação de ascorbato em Abs./min, sendo que os controles correspondem a sistemas sem adição de PIH. A menos que expressamente indicado nas figuras, o tempo entre a adição de PIH e ascorbato foi de cerca de 8 minutos.

Neste ensaio foram utilizadas soluções estoque recém preparadas de PIH (0,5 e 2 mmol/L) e cloreto férrico (1mmol/L em solução diluída de HCl), além de soluções de tampão Hepes (20 mmol/L) e Fe(III)-co-quelantes (EDTA, NTA e Citrato). Todas as medições foram realizadas em espectrofotômetro Hitachi U-2001 a temperatura ambiente.

2.2 RPE do Radical ascorbil

A formação do radical ascorbil em sistemas reacionais tamponados por 20 mmol/L HEPES a pH 7,2, contendo Fe(III)-EDTA e PIH em diferentes concentrações, seguidos da adição de ascorbato foi acompanhada por meio de estudos de ressonância paramagnética eletrônica. A quantificação do radical ascorbil formado em cada reação foi proporcional à altura do pico obtido nos espectros, medido em unidades arbitrárias e já considerada uma linha base do sinal igual a 0,5 unidades arbitrárias. As medidas foram realizadas em um equipamento Bruker ESP 300 do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás - UFG, nas seguintes condições instrumentais: frequência de microondas de 9,42 GHz, frequência de modulação igual a 100 kHz, potência de microondas de 10 mW amplitude de modulação igual a 0,25 G e um ganho de $6,3 \cdot 10^5$. Todos os sistemas foram incubados à temperatura ambiente, sendo a medição iniciada sempre 3,5 minutos após a adição de ascorbato e os espectros obtidos por acumulação de duas varreduras.

2.3 Dano oxidativo a 2-DR

Utilizou-se o ensaio do TBARS que consiste na degradação oxidativa do açúcar 2-Deoxi-D-ribose (2-DR) por espécies reativas de oxigênio, formando entre outros produtos o malondialdeído (MDA), o qual reage em meio ácido com o ácido tiobarbitúrico (TBA) na proporção de 2:1 formando um éster com absorção característica a 532 nm [Halliwell 1987 e Gutteridge 1981].

Neste ensaio utilizaram-se soluções estoque de 2-DR 125 mmol/L mantidas sob refrigeração, solução de TBA 1% em NaOH 50 mmol/L preparada a cada 5 dias e solução de ácido fosfórico a 4%. As soluções estoque de AC 0,5 mmol/L foram preparadas diariamente por dissolução do composto em água à 45° C. O dano oxidativo à 2-DR foi induzido por um sistema gerador de radicais, do tipo Fenton, utilizando-se solução de

peróxido de hidrogênio preparada diariamente e solução de sulfato de ferro (apenas nos experimentos descritos nas figuras 16 e 19, foi utilizado sulfato de ferro amoniacal) preparada também diariamente.

No caso específico dos ensaios com PIH, não houve adição de reagentes de Fenton (peróxido e Fe(II)) e sim os precursores, Fe(III) e ascorbato. Como etapas do ensaio, o açúcar foi colocado no meio contendo a reação de Fenton, incubando-se a reação a 37° C (ou 100° C) em banho-maria e posteriormente adicionando-se 500 µL de TBA e ácido fosfórico. O meio resultante foi levado a fervura por 15 minutos, ao final do qual se obtiveram soluções cuja coloração é proporcional ao dano oxidativo causado pelas espécies reativas geradas, podendo-se desta forma mensurar suas absorvâncias a 532 nm em espectrofotômetros Hitachi U-2001 e Milton Roy. Utilizaram-se como brancos, dois sistemas : um contendo todos os reagentes exceto ferro e outro sem DR.

Nos ensaios do AC as reações foram pré-incubadas na presença de Fe(II) por 15 minutos, exceto quando expressamente mencionado outros tempos de pré-incubação. Nestes ensaios, todos os sistemas foram tamponados utilizando-se soluções de uma mistura equimolar de HEPES e MES com concentrações finais iguais a 20 mmol/L e 8 mmol/L (apenas nos estudos espectrofotométricos) em dois diferentes pHs : 5,6 e 7,2.

Os dados correspondem à média de três experimentos independentes (diferentes dias), cada um realizado em triplicata, a menos que expressamente indicado.

2.4 Redução do complexo Fe(III)-(PIH)₂ promovida pelo ascorbato

A redução do complexo Fe(III)-(PIH)₂ promovida pelo ascorbato foi medida espectrofotometricamente acompanhando-se durante 45 minutos a diminuição da absorvância a 476 nm, de sistemas contendo Fe(III) e PIH seguidos da adição de quantidades variáveis de ascorbato (0,1 a 50 mmol/L). A região de 476 nm corresponde ao pico de absorção do

complexo Fe(III)-(PIH)₂, conforme descrito na literatura (Hermes-Lima et al. 2000). Os meios reacionais foram mantidos em pH 7,2 pela adição de 5 mmol/L de tampão fosfato. As soluções foram previamente borbulhadas com gás nitrogênio de modo a prevenir a re-oxidação de íons Fe(II).

3. Resultados e Discussão

3.1 Estudos sobre a ação antioxidante da PIH

3.1.1 Influência da natureza do co-quelante na atividade antioxidante da PIH

Sistemas contendo 20 mmol/L de tampão Hepes em pH 7,2 e 100 μmol/L de ascorbato demonstram que 100 μmol/L da PIH conseguem inibir em cerca de 100%, a oxidação de ascorbato causada por até 20 μmol/L de Fe-NTA (**Fig 9**). Porém, a partir deste ponto esta inibição promovida pela PIH decresce com o aumento da concentração de Fe-NTA, na medida em que a taxa de oxidação do ascorbato aumenta proporcionalmente.

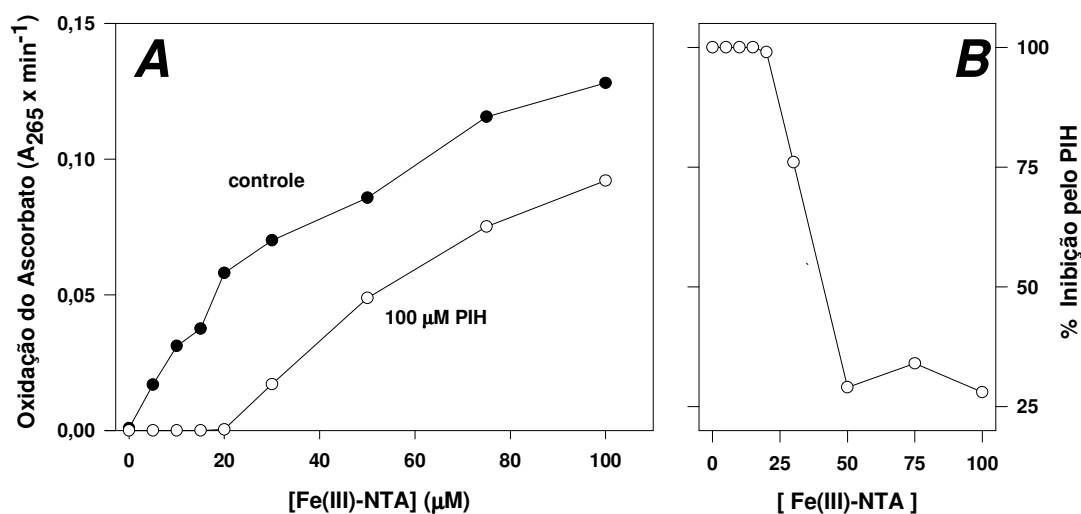


Fig. 9. Dependência da oxidação do ascorbato com a concentração de Fe-NTA (Quadro A). Concentrações finais : ascorbato (100 μmol/L), Hepes 20 mmol/L pH 7,2), PIH (0 e 200 μmol/L), Fe-NTA (variáveis sempre na proporção 1:2). O quadro B é uma rerepresentação dos mesmos dados do quadro A, mostrando o percentual de inibição da reação de oxidação do ascorbato pela PIH em relação aos controles (sem PIH).

Comparando estes resultados com aqueles obtidos em sistemas contendo Fe-EDTA (na proporção 1:1) (**Fig 10**), observa-se que a proteção da PIH decresce abruptamente com aumento das concentrações de Fe, sendo esta proteção diminuída para apenas 20% em concentrações iguais a 20 $\mu\text{mol/L}$.

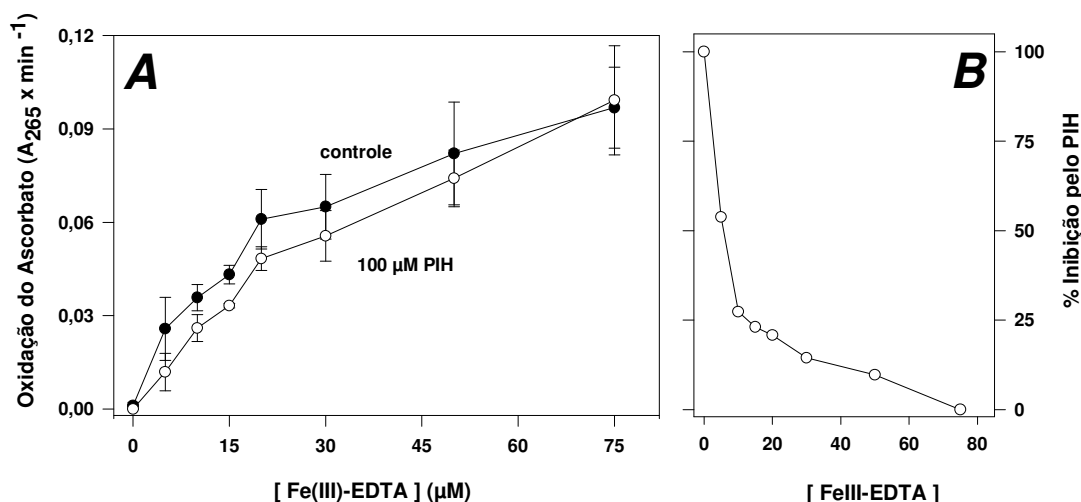


Fig. 10. Dependência da oxidação do ascorbato com a concentração de Fe-EDTA (Quadro A). Concentrações finais : ascorbato (100 $\mu\text{mol/L}$), Hepes 20 mmol/L pH 7,2), PIH (0 e 200 $\mu\text{mol/L}$), Fe-EDTA (variáveis sempre na proporção 1:1). O quadro B é uma reapresentação dos mesmos dados do quadro A, mostrando o percentual de inibição da reação de oxidação do ascorbato pela PIH em relação aos controles (sem PIH).

Estes resultados são comparáveis àqueles obtidos em ensaios de RPE, nos quais a extensão da reação de oxidação do ascorbato é acompanhada por meio da medição do radical ascorbil gerado in situ. A **Fig. 11**, utilizando a técnica da RPE, demonstra que a eficiência da PIH (200 $\mu\text{mol/L}$) em prevenir a formação de ascorbil é inversamente proporcional à concentração de Fe-EDTA.

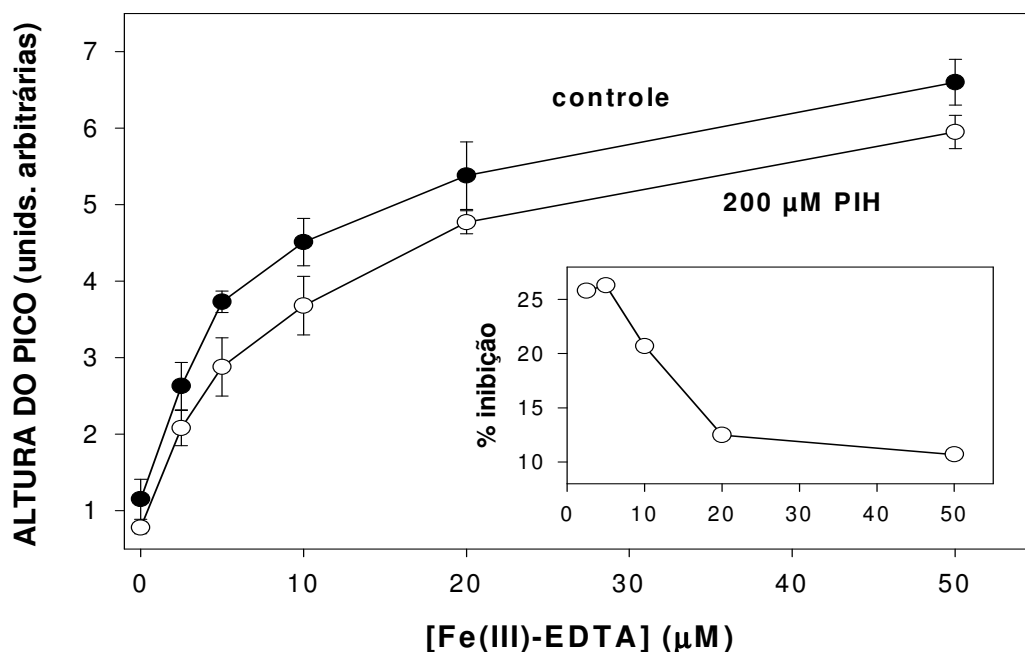
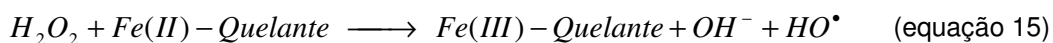
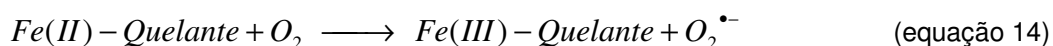
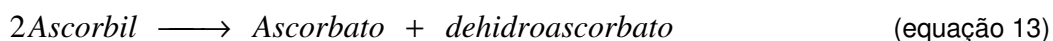
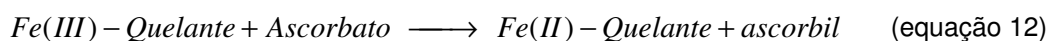


Fig. 11. Dependência da formação do radical ascorbil com a concentração de Fe-EDTA (dados de RPE). Concentrações finais : ascorbato (1mmol/L, adicionado após 30 minutos de pré-incubação), Hepes (20 mmol/L pH 7,2), PIH (0 e 200 µmol/L), Fe-EDTA (variáveis sempre na proporção 1:1). O "inset" é uma rerepresentação dos mesmos dados do quadro A, mostrando o percentual de inibição da reação de oxidação do ascorbato pela PIH em relação aos controles (sem PIH). Dados obtidos a partir de 4 experimentos independentes

Conforme os resultados expressos nas figuras 9, 10 e 11 foi observado que a presença da PIH de fato causou um efeito inibitório na oxidação do ascorbato, porém a eficiência do PIH em prevenir esta oxidação é dependente da concentração de Fe e principalmente da natureza da substância co-quelante previamente ligada aos íons férricos. A presença deste co-quelante de Fe(III) nos sistemas experimentais delineados para este trabalho é importante pois além de íons Fe(III) serem insolúveis no pH utilizado, pretendeu-se nestes experimentos simular condições fisiológicas, nas quais estes íons também não são encontrados em sua forma livre.

Propõem-se que as reações expressas nas **equações 12-15 e 9** descritas a seguir estariam em curso no meio reacional utilizado :



Dentro deste cenário, a PIH estaria formando um complexo estável com os íons Fe(III), competindo pelo ferro com os co-quelantes. Este complexo Fe-PIH de alguma maneira seria menos suscetível à sofrer redução do que os complexos com EDTA e NTA, inibindo portanto a reação de oxidação do ascorbato. No entanto, os resultados da Figura 9, 10 demonstram que a PIH não é capaz de remover Fe(III) do co-quelante EDTA tão eficientemente como o faz quando o co-quelante é o NTA.

Adicionalmente, a influência do co-quelante também pode ser identificada pelos espectros de RPE da **Fig. 12**, nos quais se verifica que na presença de 5 µmol/L de Fe-NTA (na proporção 1:2) (**A e B**), a PIH foi capaz de inibir drasticamente a formação da espécie ascorbil (0,9 Unidades Arbitrárias – UA, contra 2,33 UA observados nos controles sem PIH, o que significa cerca de 61% de inibição). Contrariamente, sistemas contendo PIH em presença de 5µmol/L de Fe-EDTA (na proporção 1:1), apresentaram apenas cerca de 25% de inibição (**Fig 12, C e D**).

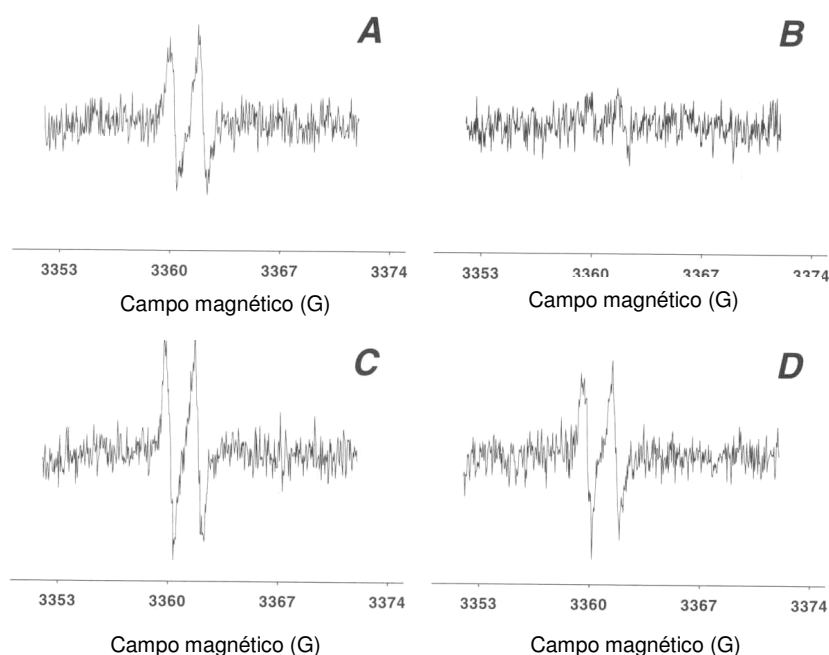


Fig. 12. Efeito da PIH na redução do sinal do radical ascorbil com diferentes coquelantes. Concentrações finais : ascorbato (1mmol/L), Hepes (20 mmol/L pH 7,2), PIH (200 μ mol/L), Fe-NTA (5 μ mol/L na proporção 1:2 – A e B), Fe-EDTA (5 μ mol/L na proporção 1:1 – C e D). Os espectros foram obtidos por acumulação de 2 varreduras. Os quadros A e C correspondem aos controles sem PIH.

Além disto, tanto os resultados das figura 9, 10 e 11 quanto aqueles da figura 12, estão plenamente de acordo com os dados obtidos em ensaios de dano oxidativo à 2-DR (utilizando-se o método do TBARS, no lugar dos métodos de oxidação do ascorbato e RPE, percebe-se que a complexação da PIH com Fe(III) também depende da natureza do coquelante). Estes dados estão expressos na **tabela 2** a seguir :

Tabela 2. Percentual de proteção da PIH contra oxidação da 2-DR com diferentes coquelantes. Concentrações finais : 2-DR (5 mmol/L), ascorbato (0,7 mmol/L). As reações foram tamponadas em pH 7,2 (10 mmol/L tampão fosfato) e pré-incubadas por 10 minutos antes da adição do ascorbato.

| Concentração PIH | Percentual de proteção contra oxidação da 2-DR em relação aos controles | | |
|---------------------|---|---------------------------------|-------------------------------------|
| | Fe(III)-EDTA (10 μ Mol/L) | Fe(III)-NTA (10 μ Mol/L) | Fe(III)-Citrate (10 μ Mol/L) |
| 20 μ Mol/L | 14% | 48% | 32% |
| 100 μ Mol/L | 32% | 83% | 93% |

Nestes ensaios, em meios contendo tampão fosfato (pH 7,2) e 10 $\mu\text{mol/L}$ Fe-NTA (ou Fe-Citrato, sendo o citrato um ligante fisiológico de ferro, encontrado em “*pools*” intracelulares deste metal [Britton et al. 1994], a eficiência da PIH (20 $\mu\text{mol/L}$) em prevenir a degradação da 2-DR foi cerca de 2 a 3 vezes maior que em meios contendo igual concentração de Fe-EDTA.

Estes resultados como um todo, sugerem que uma vez formado um complexo de Fe com a substância co-quelante EDTA, NTA ou Citrato, a PIH é capaz de remover o íon Fe deste complexo, formando um novo complexo, possivelmente do tipo $\text{Fe}-(\text{PIH})_2$. Esta remoção é tanto mais difícil ou demorada, quanto maior for a afinidade do co-quelante pelo metal. De fato, avaliando-se as constantes de formação já reportadas na literatura [Roche et al. 1990] para Fe(III)-EDTA ($\log \beta_{11} = 25,5$), Fe(III)-NTA ($\log \beta_{11} = 8,3$) e Fe(III)-Citrato ($\log \beta_{11} = 7,3$) [Konigsberger et al. 2000], percebe-se que NTA e Citrato formam complexos de certa forma mais “fracos”, dos quais é mais fácil a remoção do íon Fe para posterior complexação com a PIH ($\log \beta_{11} = 24,8$) [Webb et al. 1988 e Vitolo et al. 1990]. Apenas a título de comparação, a constante de formação Fe(III)-DFO foi calculada como $\log \beta_{11} = 30,6$ [Hou 1994].

Estes resultados, se encontram em harmônica associação com aqueles descritos nas seções seguintes, como se verá, levando à uma evidência experimental adicional de que o mecanismo de ação antioxidante da PIH se deve a sua complexação com íons Fe(III). Neste sentido, a PIH ao substituir o co-quelante no complexo com Fe(III), é capaz de formar uma estrutura tal que o novo complexo $\text{Fe}-(\text{PIH})_2$ apresenta capacidade menor de promover a oxidação do ascorbato.

3.1.2 Influência do tempo de pré-incubação na atividade antioxidante da PIH

A fim de investigar o comportamento da PIH ao longo do tempo nas reações descritas pelas equações de 7 a 10, foi testado o efeito da pré-incubação sobre : i) a oxidação do ascorbato; ii) a formação do radical ascorbil e iii) degradação da 2-DR. O tempo de pré-incubação corresponde ao intervalo antes da adição de ascorbato ao meio reacional contendo o metal e o PIH, já que esta substância é responsável por iniciar a reação.

Aumentando o tempo de pré-incubação de 0 para 85 minutos, de um sistema contendo 100 $\mu\text{mol/L}$ de PIH e 20 $\mu\text{mol/L}$ de Fe-EDTA (na proporção 1:1), observa-se um aumento de quase o dobro da inibição do PIH sobre a oxidação do ascorbato (**Fig. 13**).

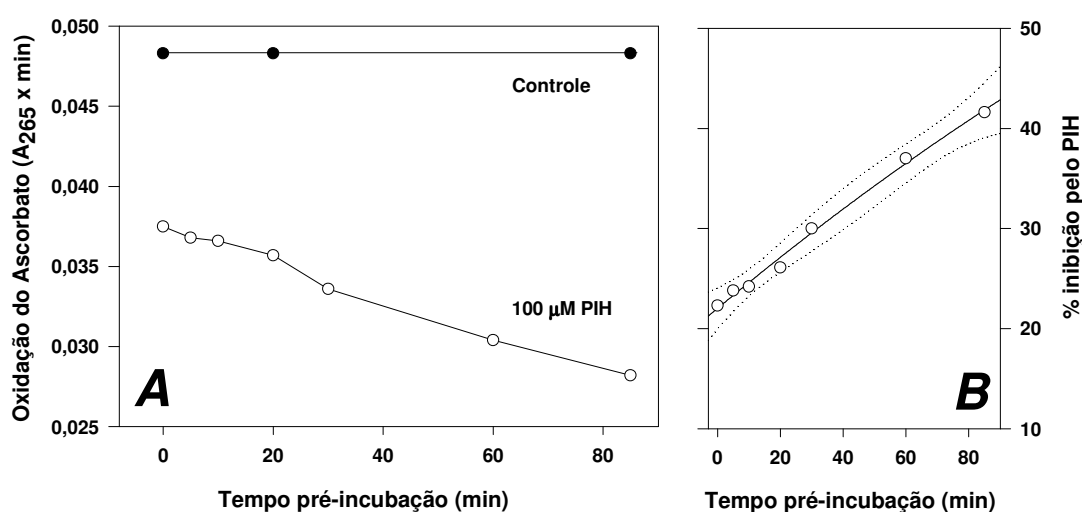


Fig. 13. Efeito da pré-incubação de Fe(III)-EDTA e PIH na oxidação do ascorbato (Quadro A). Concentrações finais : ascorbato (100 $\mu\text{mol/L}$), Hapes (20 mmol/L pH 7,2), PIH (0 e 100 $\mu\text{mol/L}$), Fe-EDTA (20 $\mu\text{mol/L}$ na proporção 1:1). O ascorbato foi adicionado após cada período de pré-incubação à temperatura ambiente. O quadro B é uma rerepresentação dos mesmos dados do quadro A, mostrando o percentual de inibição da reação de oxidação do ascorbato pela PIH em relação aos controles (sem PIH).

Empregando a RPE, foram obtidos os resultados da **Fig. 14**, os quais corroboram os achados anteriores. Estes resultados mostram que sistemas contendo PIH e Fe-EDTA pré-incubados por 90 minutos antes da adição de ascorbato, apresentaram percentual de inibição sobre a geração do radical ascorbil igual a 72%, contra apenas 8% de inibição de sistemas sem pré-incubação.

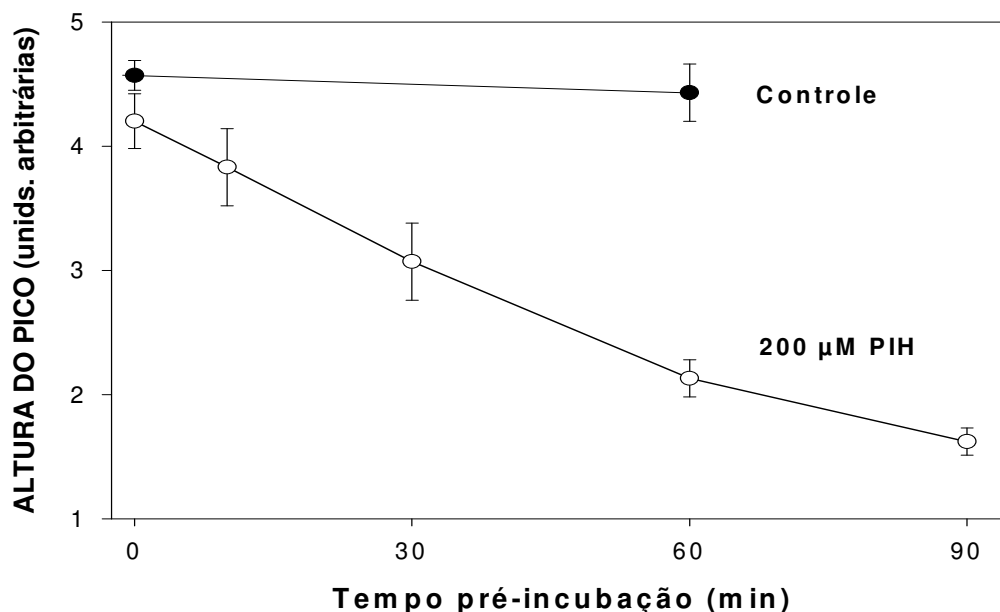


Fig. 14. Efeito da pré-incubação de Fe(III)-EDTA e PIH na formação do radical ascorbil. Concentrações finais : ascorbato (1 mmol/L), Hepes (20 mmol/L pH 7,2), PIH (0 e 200 µmol/L), Fe-EDTA (10 µmol/L na proporção 1:1). O ascorbato foi adicionado após cada período de pré-incubação à temperatura ambiente.

Apenas para confirmação foi utilizado o ensaio da 2-DR também em sistemas contendo PIH e Fe-EDTA pré-incubados. Assim como nos experimentos anteriores, a eficiência do PIH em prevenir a reação de redução de Fe(III) (e no caso deste ensaio, a eficiência em prevenir o dano a 2-DR por espécies radicalares oriundas desta reação), aumenta com o tempo. O dano à 2-DR decresce em mais de 50% após 2 horas de pré-incubação (**Fig. 15**).

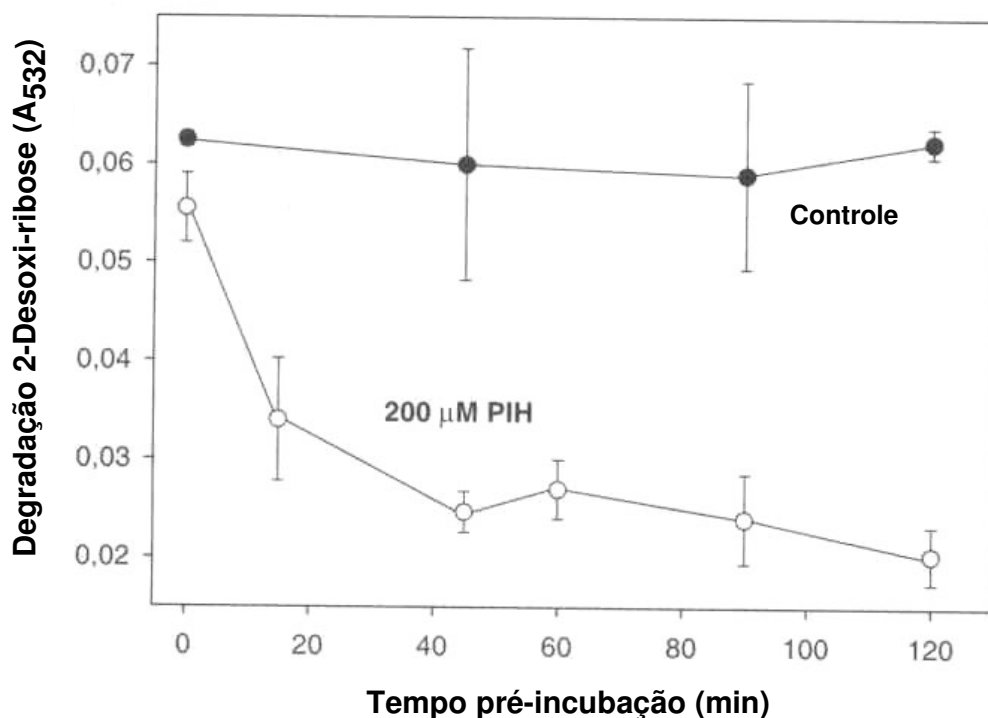


Fig. 15. Efeito da pré-incubação de Fe(III)-EDTA e PIH na degradação da 2-DR. Concentrações finais : ascorbato (0,7 mmol/L), Hepes (10 mmol/L pH 7,2), PIH (0 e 200 μmol/L), Fe-EDTA (10 μmol/L na proporção 1:1). O ascorbato e a 2-DR foram adicionados após cada período de pré-incubação à temperatura ambiente.

As **Figuras 13, 14 e 15** analisadas em conjunto demonstram que a habilidade da PIH em prevenir tanto a oxidação do ascorbato, quanto o dano à 2-DR ou a formação radical ascorbil, todos induzidos por espécies férricas, é dependente do tempo de pré-incubação da PIH com o complexo Fe-coquelante. Quanto maior o tempo em a PIH permanece em contato com o complexo Fe(III)-coquelante, maior a habilidade protetora da PIH contra a oxidação do ascorbato.

Sugere-se portanto que a remoção de íons Fe(III) do co-quelante pela PIH e a posterior formação do complexo Fe(III)-(PIH)₂ é um processo lento, e tão mais lento o será, quanto maior for a afinidade do co-quelante pelo íon metálico. Estudos de pré-incubação de PIH com Fe-NTA em condições idênticas, revelaram que não houve alteração da oxidação do ascorbato em função do tempo de pré-incubação, sugerindo que a remoção de Fe

neste caso é bastante rápida, o que está em bom acordo com as observações relatadas no item 3.1.1.

Desta forma, considera-se que tais resultados são explicáveis pelo fato de estar em curso uma competição entre a PIH e o co-quelante pela complexação com os íons Fe(III), em um sistema reacional onde co-existam estes três componentes. É portanto esperado que seja mais difícil (e por conseguinte mais demorado) para a PIH, remover íons Fe(III) de co-quelantes com altas constantes de formação.

Neste sentido, Hermes Lima determinou as velocidades de remoção de íons Fe(III) do EDTA e do NTA pela PIH e a conseqüente formação do complexo Fe(III)-(PIH)₂ [Hermes Lima et al. 2000]. Acompanhando a formação deste complexo a 476 nm, foi relatado que o mesmo é formado em poucos segundos quando se utiliza NTA como co-quelante, diferentemente do caso do EDTA, onde somente se observa formação do complexo com PIH após cerca de 30 minutos nas condições experimentais ali descritas. Estes resultados, em conjunto com aqueles apresentados neste trabalho, explicam a diferença de comportamento da PIH em relação a sistemas contendo EDTA ou NTA ou mesmo outro ligante de Fe(III) tal como Citrato.

3.1.3 Influência da concentração de PIH e da proporção entre os ligantes PIH e co-quelantes) e o Fe.

Verificou-se que o efeito da PIH tanto na oxidação do ascorbato quanto na formação do radical ascorbil dependem das concentrações deste quelante, sendo a ação antioxidante da PIH, diretamente proporcional a sua concentração.

A **Fig. 16** demonstra o efeito da concentração de PIH sobre a taxa de oxidação do ascorbato em dois diferentes tempos de pré-incubação

(círculos fechados = 8 minutos; círculos abertos = 2 horas). O valor do I_{50} em soluções pré-incubadas por 2 horas é igual a $90 \mu\text{mol/L}$ de PIH, em contraste com àquele obtido para soluções pré-incubadas por 8 minutos (I_{50} igual a $500 \mu\text{mol/L}$ de PIH).

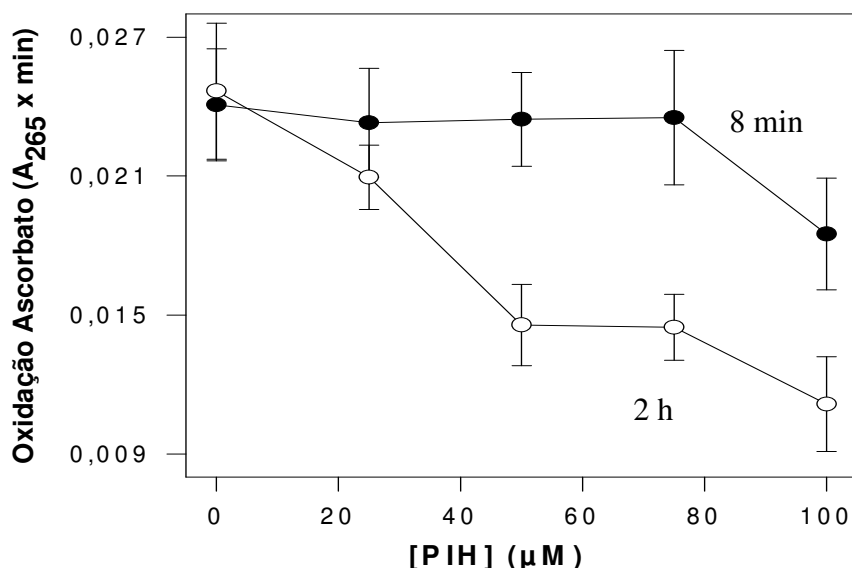


Fig. 16. Efeito da concentração de PIH na oxidação do ascorbato em dois diferentes tempos de pré-incubação. Concentrações finais : ascorbato ($100 \mu\text{mol/L}$), Hepes (20 mmol/L pH 7,2), PIH (variáveis), Fe-EDTA ($10 \mu\text{mol/L}$ na proporção 1:1). O ascorbato foi adicionado após cada período de pré-incubação à temperatura ambiente. Círculos fechados = 8 minutos e círculos abertos = 2 horas pré-incubação.

A **tabela 3** a seguir, indica o mesmo perfil em relação à formação do radical ascorbil, observando-se um I_{50} igual a $375 \mu\text{mol/L}$ de PIH em soluções contendo $5 \mu\text{mol/L}$ de Fe-EDTA e pré-incubadas por 30 minutos.

Tabela 3. Efeito da concentração de PIH na formação do radical ascorbil. Concentrações finais : ascorbato (1 mmol/L), Hepes (20 mmol/L pH 7,2), PIH (variáveis), Fe-EDTA ($5 \mu\text{mol/L}$ na proporção 1:1). O ascorbato foi adicionado após 30 minutos de pré-incubação à temperatura ambiente.

| Concentração de PIH ($\mu\text{mol/L}$) | Intensidade do sinal RPE (unidades arbitrárias) |
|---|---|
| 0 | $3,75 \pm 0,41$ |
| 100 | $3,11 \pm 0,17$ |
| 200 | $2,79 \pm 0,36$ |
| 300 | $2,21 \pm 0,17$ |
| 390 | $1,93 \pm 0,15$ |

A necessidade de concentrações relativamente mais altas de PIH para produzir um efeito antioxidante eficiente quando utilizadas soluções de Fe-EDTA está em total conformidade com a discussão apresentada no item 3.1.1. a respeito da natureza do co-quelante e sua afinidade com os íons de Fe(III). Teoricamente quanto mais forte for a interação entre os íons ferro e o co-quelante, maior quantidade de PIH será necessária para a produção de um efeito antioxidante.

Um fato de relevante interesse é o comportamento do PIH frente a diferentes proporções entre os íons férricos e o EDTA. Conforme o esperado, verificou-se que a habilidade da PIH em prevenir a oxidação do ascorbato é significativamente menor quando a proporção Fe:EDTA aumenta para 1:5 (**Fig. 17**).

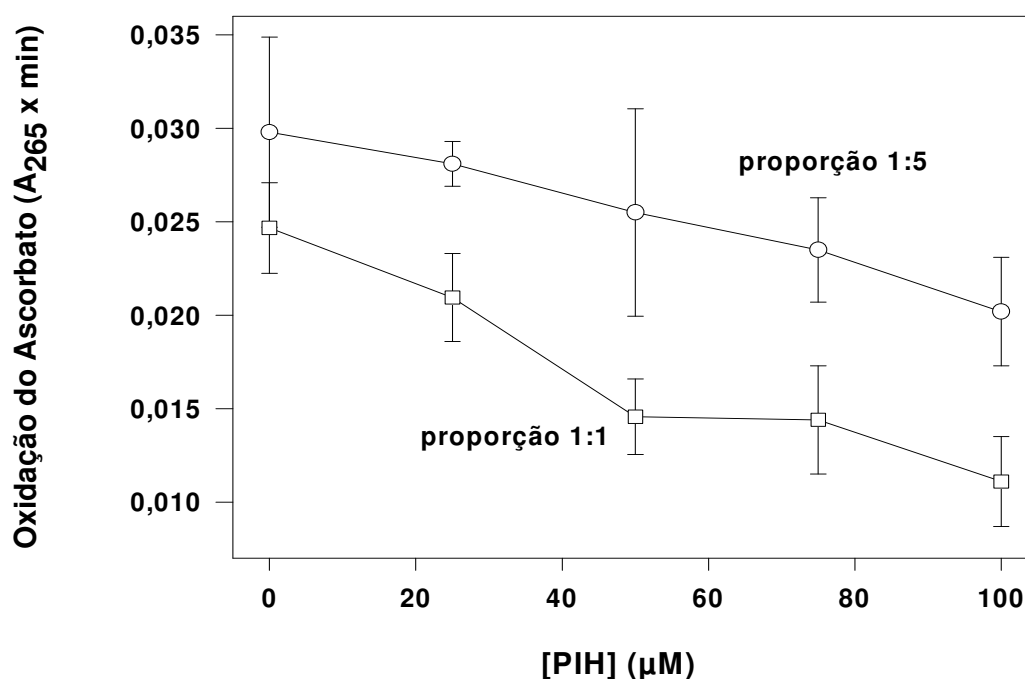


Fig. 17. Efeito da concentração de PIH na oxidação do ascorbato em duas diferentes proporções Fe-EDTA. Concentrações finais : ascorbato (100 µmol/L), Hepes (20 mmol/L pH 7,2), PIH (variáveis), EDTA (10 µmol/L na proporção 1:1 e 50 µmol/L na proporção 1:5). O ascorbato foi adicionado após 2 horas de pré-incubação à temperatura ambiente.

Incrementos na concentração de PIH não alteram este comportamento, pois mesmo em meios contendo 100 $\mu\text{mol/L}$ de PIH e 50 $\mu\text{mol/L}$ de EDTA (na proporção 1:5 em relação ao Fe), a taxa de oxidação do ascorbato é cerca de 40 % maior em relação à meios contendo Fe-EDTA na proporção 1:1. Semelhantemente ao já discutido para os resultados obtidos na pré-incubação (figuras 13, 14 e 15) e na titulação de PIH (figura 16 e tabela 3), percebe-se que quanto mais favorecida for a interação entre o co-quelante e os íons férricos, menor será o efeito protetor da PIH. Obviamente o favorecimento desta interação depende fortemente da concentração de co-quelante no meio reacional. Assim, uma provável explicação para a menor proteção da PIH quando se utiliza Fe-EDTA na proporção 1:5, é que a presença de excesso de EDTA não complexado ao Fe tornaria a formação do complexo Fe(III)-(PIH)_2 mais difícil devido a competições mecánísticas.

3.1.4 *Efeito da ação redutora do ascorbato sobre o complexo Fe(III)-(PIH)_2*

Considerando que a presença de ascorbato é capaz de reduzir íons Fe(III) mesmo estando estes complexados à moléculas quelantes do tipo EDTA (vide resultados dos controles figura 10), o efeito da ação redutora do ascorbato sobre o complexo Fe(III)-(PIH)_2 foi investigada. Com base na afinidade da PIH por íons férricos e nos resultados já relatados, presume-se que o Fe(III) complexado ao PIH é menos suscetível a sofrer redução.

À soluções contendo 50 $\mu\text{mol/L}$ Fe(III) e 100 $\mu\text{mol/L}$ da PIH, adicionaram-se quantidades crescentes de ascorbato, acompanhando-se então durante 30 minutos o comportamento do sistema a 476 nm (região do espectro correspondente ao pico de absorção do complexo Fe(III)-(PIH)_2). Concentrações de ascorbato variando de 0,1 a 2,5 mM, não foram capazes de reduzir em larga escala o ferro ligado. Na verdade, apenas 16% do ferro ligado foi reduzido por 2,5mM de ascorbato após 15 minutos de reação. No entanto, 5, 10 e 50 mM de ascorbato provocaram respectivamente 70%, 92% e 100 % de redução após 0,5 minuto.

Estes resultados parecem concordar com os anteriores, uma vez que a julgar pelo comportamento do PIH em relação à taxa de oxidação do ascorbato verificada nos experimentos já relatados, espera-se que a redução do complexo Fe(III)-(PIH)₂ ocorra mais lentamente que no caso dos complexos Fe-NTA, Fe-Citrato e mesmo Fe-EDTA.

3.2 Estudo da ação do ácido caféico

3.2.1 Atividade antioxidante do ácido caféico (AC) e efeito do pH

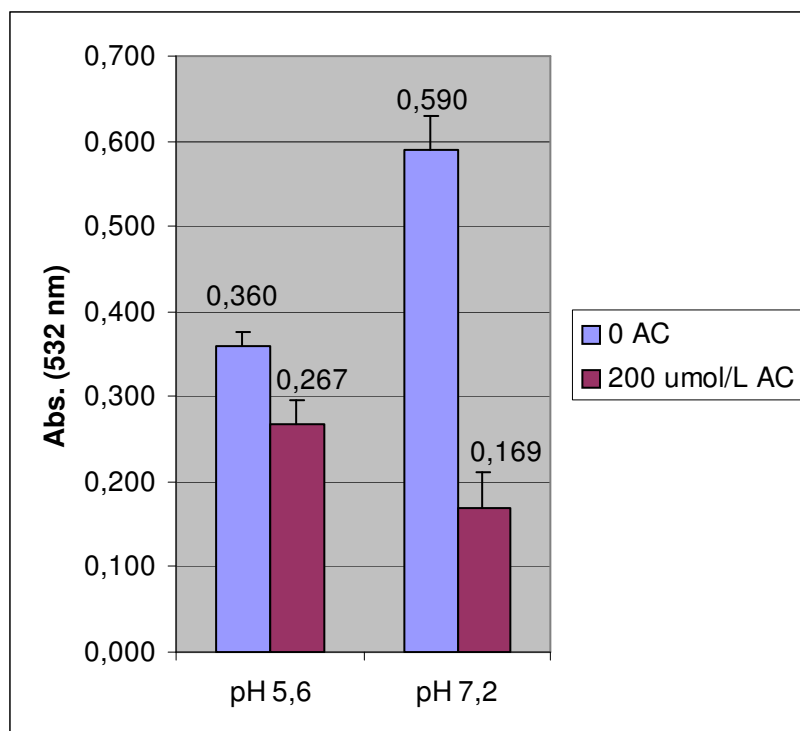


Fig. 18. Efeito da presença de AC na degradação da 2-DR. Concentrações finais : 2-DR (10 mmol/L), Tampão HEPES/MES (20 mmol/L pH 7,2 e 5,6), H₂O₂ (100 µmol/L), Fe(II) (30 µmol/L). O peróxido foi adicionado após 15 minutos de pré-incubação de AC e Fe(II) à temperatura ambiente. Após a adição de peróxido, todo o sistema foi incubado à 37°C por 20 minutos.

A fim de caracterizar o potencial antioxidante do AC foi medida a capacidade do mesmo em prevenir o dano oxidativo à 2-DR induzido por

30 $\mu\text{mol/L}$ de Fe(II) em uma típica reação de Fenton. Os meios reacionais contendo 200 $\mu\text{mol/L}$ de AC, incubados a 37° C apresentaram uma proteção de cerca de 71% em relação ao controle sem AC em pH 7,2 (**Fig. 18**), evidenciando que este polifenol eficientemente inibe a degradação oxidativa da 2-DR.

Já em sistemas tamponados em pH 5,6 observou-se que esta proteção cai para cerca de 26% em relação ao controle sem AC. Estas observações estão em bom acordo com os estudos relatados por Boilet, onde nenhuma complexação de AC com Pb(II) ocorre quando a função carboxílica e o grupo catecol estão totalmente protonados, como por exemplo em metanol puro [Boilet 2005].

É interessante notar que a reação de Fenton sem a presença de AC, propicia maior dano oxidativo à 2-DR em pH 7,2 que em pH 5,6.

Em estudos com o ácido elágico (AE) foi verificado semelhantemente que a habilidade antioxidante deste composto também depende do pH. Em sistemas de Fenton, observou-se que o AE é mais eficiente em inibir reações de degradação oxidativa em pHs mais altos, tendo sido este fato correlacionado com a desprotonação deste polifenol [Ginani 2005].

Os resultados descritos na figura 18, em associação com aqueles reportados por Boilet, demonstram que o pH exerce papel importante no mecanismo de ação antioxidante do AC. Propõe-se aqui que este efeito do pH seria devido ao favorecimento da formação de um complexo Fe(II) -AC pela desprotonação do grupo carboxila e das hidroxilas fenólicas, em meios alcalinos.

Considerando que o pK_{a1} e pK_{a2} do AC são iguais à 4,36 e 8,48 respectivamente [Silva et al. 2000], estima-se que em pH 7,2 já ocorra a desprotonação de parte das hidroxilas fenólicas. Os estudos espectrofotométricos descritos a seguir fornecem evidências adicionais de que a complexação depende substantivamente do grupo catecol.

Uma vez que foi observado um incremento significativo na proteção oferecida pelo AC em pH 7,2 , e considerando que tanto em pH 5,6 quanto em pH 7,2 o grupo carboxila já está quase que completamente desprotonado, sugere-se que o grupo catecol do anel tenha grande influência na ligação com íons Fe(II).

Na verdade, em face dos valores das constantes de dissociação ácida medidos por potenciometria [Silva et al. 2000], é bem provável que a complexação ocorra no grupo catecol, conforme a Fig. 8 descrita anteriormente, especialmente em pH 7,2.

No entanto, não pode ser descartada a hipótese de que a complexação com íons Fe(II) esteja ocorrendo também em função do grupo carboxila desprotonado. Analogamente ao reportado por Khvan em sistemas contendo Cu^{2+} [Khvan 2001], é possível que a formação de um complexo Fe(II)-AC esteja ocorrendo por meio de um mecanismo iônico de complexação pelo grupo carboxila, acompanhado pela liberação de prótons conforme a **equação 16**:



De qualquer forma, independentemente do grupo considerado, postula-se que a desprotonação de um ou mais hidrogênios exerceria forte influência na estabilização do complexo Fe(II)-AC, em função da deslocalização eletrônica ao longo da molécula do AC. Esta deslocalização permitiria escrever estruturas de ressonância envolvendo as hidroxilas fenólicas, o anel aromático, o grupo etilênico e a carboxila, todos em conjugação.

No entanto, a identificação precisa dos sítios ligantes do AC em relação aos íons Fe(II) carece ainda de aprofundamentos, devendo ser empregadas outras técnicas analíticas tais como difração de raio-X, espectroscopia de infra-vermelho, cromatografia, e ressonância magnética nuclear.

3.2.2 Estudos espectrofotométricos da ligação de íons Fe(II) ao AC

Com o objetivo de investigar o efeito do pH sobre a habilidade antioxidante do AC, foram conduzidos alguns estudos espectrofotométricos na região do UV-VIS.

As **Figuras 19 a,b,c** representam o espectro de absorção típico das espécies presentes no meio reacional. Considerando que o sistema tem coloração azulada, supõem-se que o complexo formado tenha absorção na região do visível. Por esta razão a **Figura 19 d** foi composta, sendo a mesma apenas uma ampliação das escalas das figuras 19 a,b,c na região de interesse.

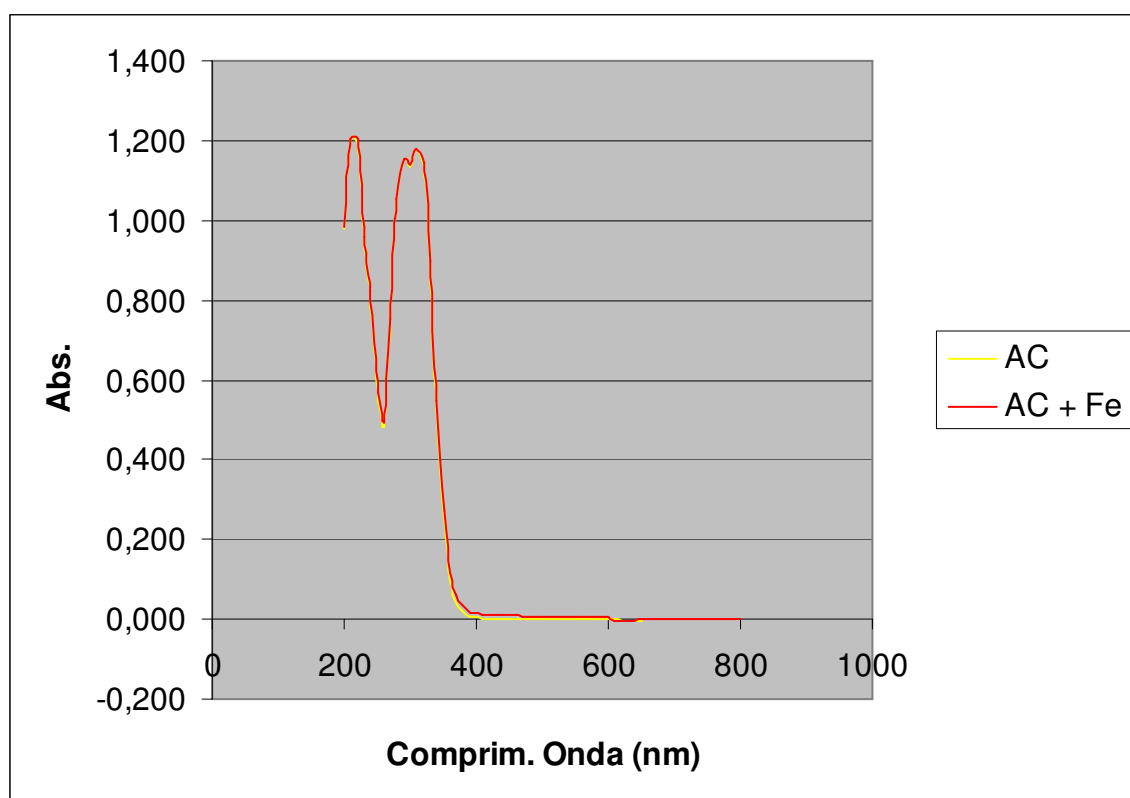


Fig. 19a. Perfil espectral do AC puro e do AC em presença de Fe(II) em pH 4,0. Concentrações finais : Fe(II) (8 $\mu\text{mol/L}$), AC (80 $\mu\text{mol/L}$). Os sistemas foram incubados à temperatura ambiente por até 90 minutos.

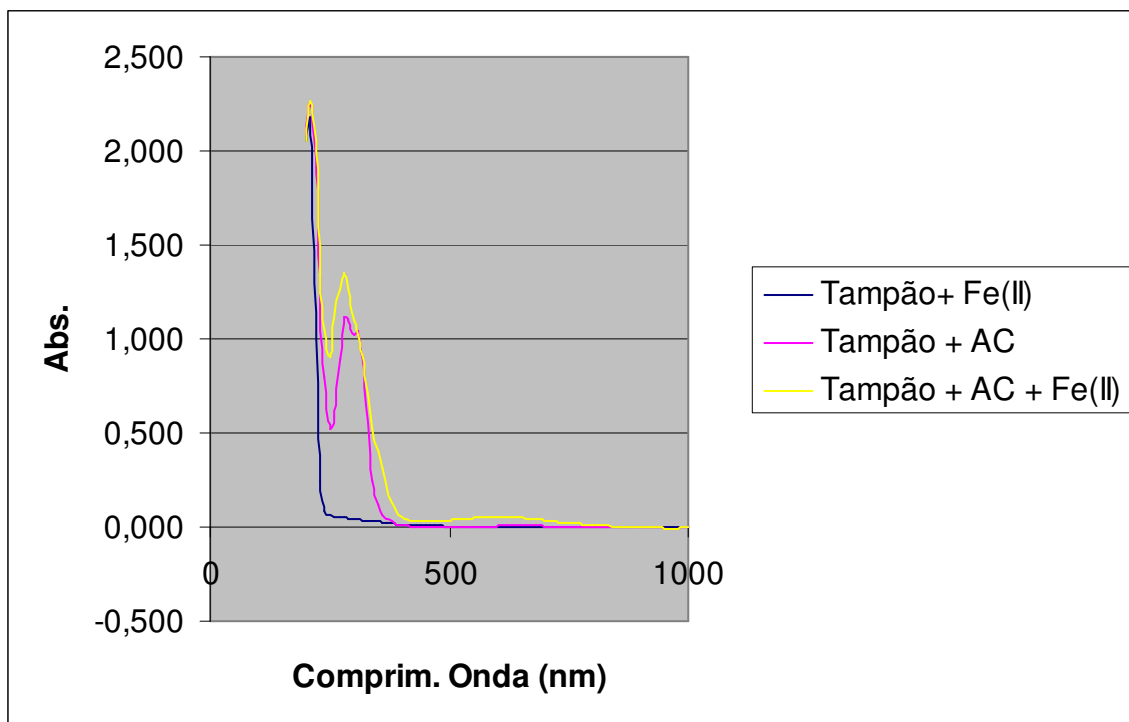


Fig. 19b. Perfil espectral do AC em presença de Fe(II) em pH 7,2. Concentrações finais : Fe(II) (8 $\mu\text{mol/L}$), AC (80 $\mu\text{mol/L}$), Tampão Hapes/MES (8 mmol/L e pH 7,2). Os sistemas foram incubados à temperatura ambiente por até 90 minutos.

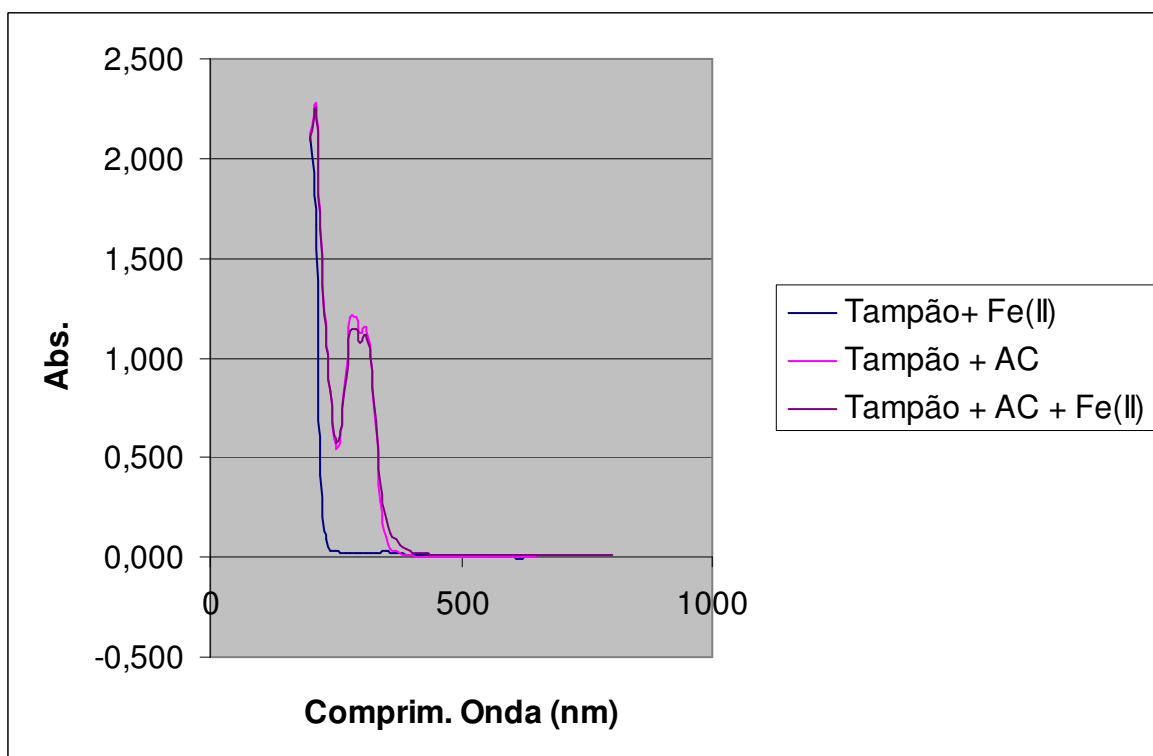


Fig. 19c. Perfil espectral do AC em presença de Fe(II) em pH 5,6. Concentrações finais : Fe(II) (8 $\mu\text{mol/L}$), AC (80 $\mu\text{mol/L}$), Tampão Hapes/MES (8 mmol/L e pH 5,6). Os sistemas foram incubados à temperatura ambiente por até 90 minutos.

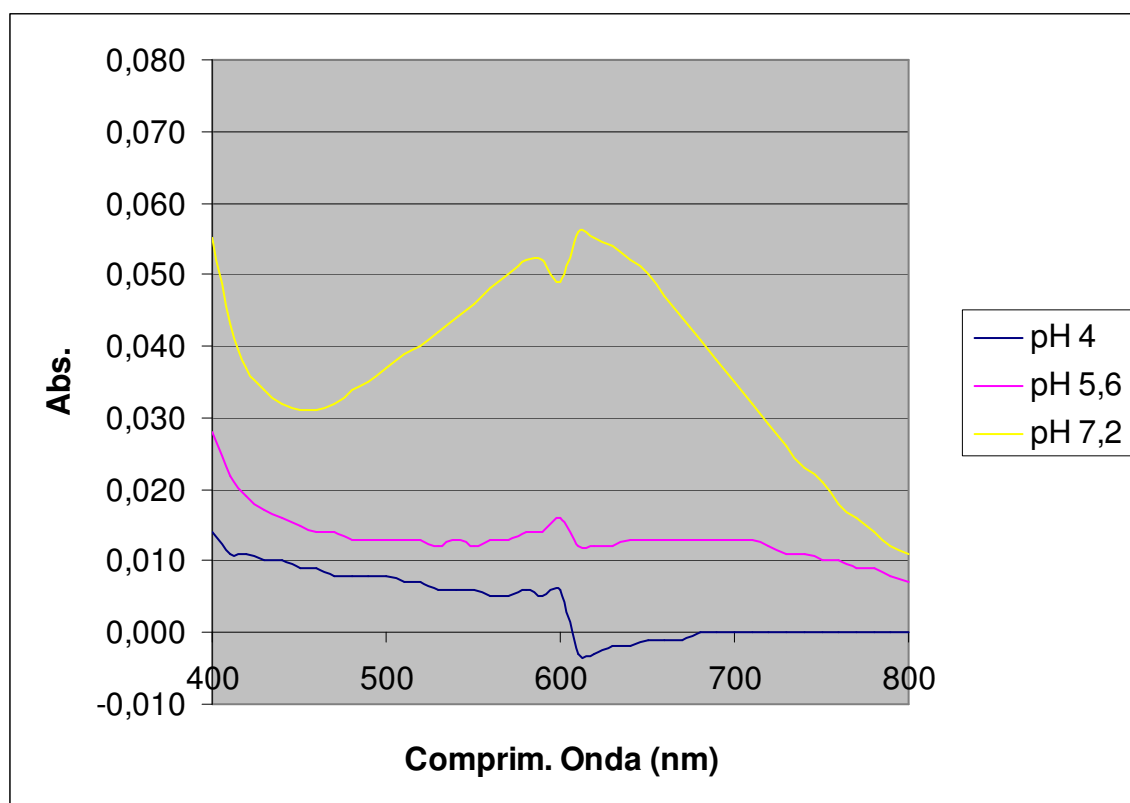


Fig. 19d. Reimpressão dos dados das figuras 17 a, b e c em escala ampliada. Os dados correspondem aos sistemas contendo Fe(II) ($8 \mu\text{mol/L}$), AC ($80 \mu\text{mol/L}$), e Tampão Hepes/MES (8mmol/L) em diferentes pHs.

Segundo as figuras 19 a,b,c e d percebe-se que o perfil espectral das espécies pode ser caracterizado por : i) AC (pico duplo bem definido na região de 300-400 nm e nenhum pico observável na região de 600 nm); ii) AC + Fe(II) em pH 7,2 (pico único com ombro discreto na região de 300-400 nm e pico largo duplo na região de 600 nm); iii) AC + Fe(II) em pH 5,6 (pico duplo bem definido na região de 300-400 nm e pico único extremamente discreto na região de 600 nm), sugerindo que em meios mais ácidos a complexação é desfavorecida ou ocorre mais lentamente.

Conforme o observado por Garcia, o espectro de absorção de soluções de AC não oxidado, às quais foi adicionado ferro, mostram um pico discreto na região de 600 nm [Garcia et al. 1996]. Shindo também reportou nesta mesma região, um pico largo correspondente ao complexo Fe-catecol [Shindo e Huang 1984]. A figura 19 d revela claramente que tal pico aparece principalmente em um sistema contendo AC e ferro cujo pH é 7,2,

sendo observada apenas uma formação extremamente reduzida em pH 5,6 ou 4,06. Tal fato está consistente com a proposta de que a formação do complexo Fe(II)-AC é favorecida pela desprotonação do grupo catecol após a desprotonação da carboxila.

A **Fig. 20** representa a formação ao longo do tempo (medida a 604 nm), de uma espécie que originalmente não estava presente em solução aquosa de AC, formação esta iniciada pela adição de Fe(II) (o tempo zero corresponde a leituras realizadas imediatamente antes da adição de íons ferrosos). Neste ensaio as concentrações de AC e Fe(II) foram as mesmas já descritas para a figura 18.

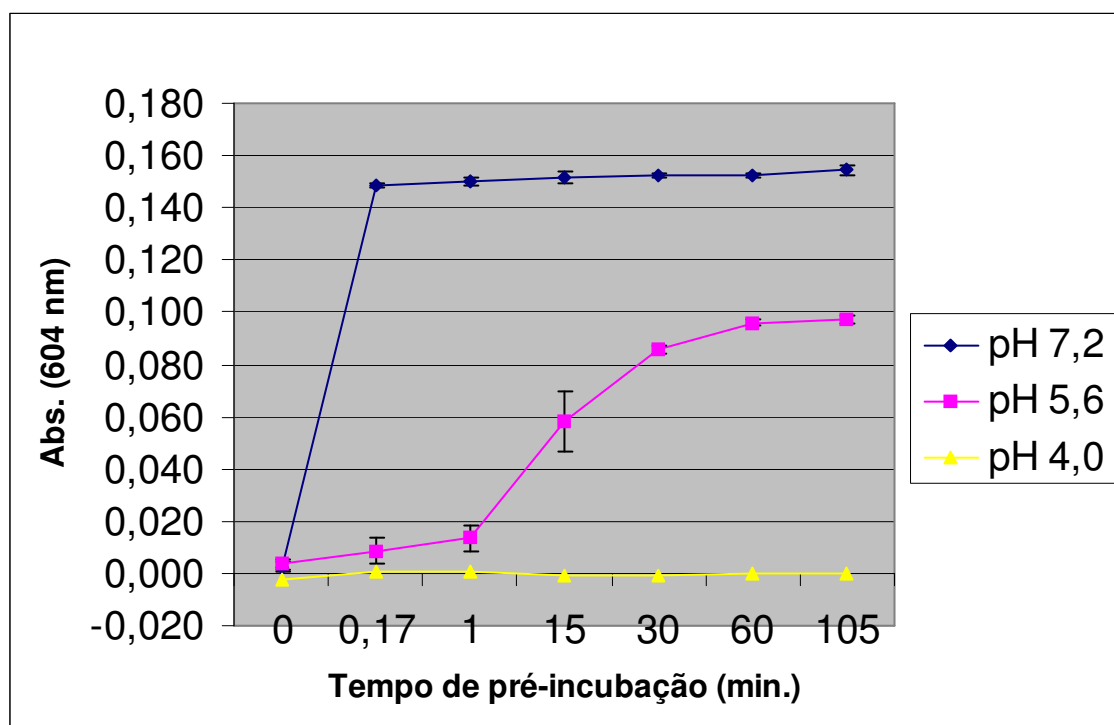


Fig. 20. Acompanhamento temporal da formação de espécie química a 604 nm. Concentrações finais : Tampão HEPES/MES (20 mmol/L pH 7,2 e 5,6), Fe(II) (30 $\mu\text{mol/L}$) e AC (200 $\mu\text{mol/L}$). O curso temporal da reação foi acompanhado à temperatura ambiente.

Considerando o resultado da Fig. 20 e as observações de Garcia e Shindo, sugere-se que a absorvância medida a 604 nm corresponde à formação de um complexo Fe-AC através do sítio ligante catecol. Conforme anteriormente mencionado, é interessante reiterar que a

formação deste complexo parece ocorrer mais rapidamente em pH levemente alcalino, provavelmente porque a desprotonação do AC gera cargas eletrônicas delocalizadas ao longo de sua estrutura, facilitando a interação do sítio ligante com cátions Fe(II). A inexistência de absorção em pH 4,0 (pH da solução de AC puro), também está consistente com a proposta de que em pH levemente alcalino, a complexação com íons ferrosos é facilitada. Desta forma, propõem-se que a complexação Fe-AC ocorra preferencialmente quando o AC se encontrar em sua forma bi-desprotonada.

3.2.3 Efeito da temperatura de incubação

Curiosamente, incubando-se a 98° C a mesma reação descrita na figura 18, foi verificado um efeito pro-oxidante do AC. A **Fig. 21** revela que em pH 7,2 a presença de AC promove um incremento na oxidação da 2-DR de cerca de 176% em relação ao controle sem AC.

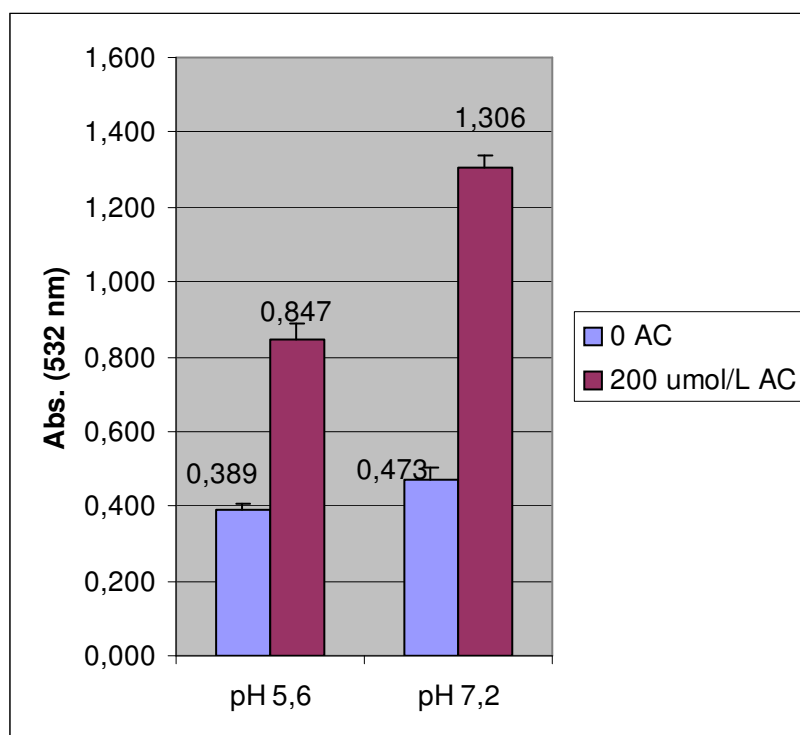


Fig. 21. Efeito da presença de AC na degradação da 2-DR a 98°C. Concentrações finais : 2-DR (10 mmol/L), Tampão HEPES/MES (20 mmol/L pH 7,2 e 5,6), H₂O₂ (100 µmol/L), Fe(II) (30 µmol/L). O peróxido foi adicionado após 15 minutos de pré-incubação de AC e Fe(II) à temperatura ambiente. Após a adição de peróxido, todo o sistema foi incubado à 98°C por 20 minutos.

É notoriamente sabido que o aumento da temperatura favorece a ocorrência de reações endotérmicas, podendo neste caso estar ocorrendo paralelamente uma série de reações simultâneas responsáveis pelo aumento da oxidação da 2-DR. Seria ainda possível a degradação térmica da 2-DR, induzida por outras espécies geradas in situ. Entretanto, como os sistemas controle sem AC forneceram valores consideravelmente menores que aqueles com 200 $\mu\text{mol/L}$ de AC, supõe-se de algum modo ser o AC o responsável pelo “dano oxidativo extra”. Ressalta-se que os controles utilizados foram iguais, tanto em reações à 37°C quanto em reações a 98°C, em qualquer dos valores de pH.

Dimberg et al. utilizando ensaios de HPLC, relata que a quantidade de AC presente em grãos de aveia decresce significativamente após processamento térmico de grãos hidratados, por aquecimento em forno à 100° C por 10 minutos, processo este que simula o tratamento industrial de aveia [Dimberg 1996]. Com base nestes resultados Dimberg e King [King e Young 1999] propõem que o AC é sensível ao calor, podendo dar lugar a produtos de sua decomposição térmica.

Hota et al, utilizando técnicas de eletrólise verificou que o número de elétrons (n) envolvidos na oxidação de ácidos fenólicos aumenta dramaticamente com o aumento do pH. Este resultado foi correlacionado à possibilidade de formação de um radical semiquinona. Este radical, por ser termodinamicamente estabilizado por estruturas de ressonância, estaria em maior abundância, permitindo que reações de polimerização envolvendo 4 elétrons, ocorressem preferencialmente [Hotta 2001].

Assim, é possível que o aumento da temperatura associado ao pH alcalino, promova estas reações de dimerização ou polimerização. Porém foi verificado em outros experimentos deste trabalho, que a presença de ferro no sistema é de fundamental importância para o curso destas prováveis reações e o conseqüente aparecimento do efeito pró-oxidante. Neste sentido, duas soluções distintas de AC puro preparadas à 37°C e à 98°C, foram testadas em um ensaio de TBARS e em estudos

espectrofotométricos. As soluções de AC puro preparadas à 37° e a 98°C não apresentaram diferença significativa no espectro UV-VIS obtido. Adicionalmente, ambas as soluções (AC preparado a 37° e a 98°C), quando utilizadas em um ensaio de TBARS à 37° C se mostraram antioxidantes, não havendo diferença significativa entre os dois resultados. Tais resultados indicam que não é a degradação térmica do AC puro, a responsável pelo efeito pró-oxidante. Desta forma propõem-se que AC e íons ferro a altas temperaturas sofram reações e modificações estruturais tais que promovam o aparecimento do efeito pró-oxidante observado.

Uma outra possível explicação para o comportamento pró-oxidante do AC em altas temperaturas, além das reações de dimerização, é a ocorrência de uma reação redox por meio de um mecanismo de esfera externa. O Fe(II) presente no meio reacional ao ser oxidado pelo peróxido, produz Fe(III) o qual se complexa com o AC. Neste mecanismo, ocorreria uma transferência de elétrons aos íons férricos do complexo Fe(III)-AC, formando-se então um complexo do tipo Fe(II)-AC. O Fe(II) presente neste complexo, poderia de alguma forma participar da formação de radicais hidroxil, embora em menor escala em relação à sua forma livre (íons em solução).

A ocorrência desta reação redox por esfera externa, depende de uma certa quantidade de energia requerida para levar os reagentes envolvidos ao estado de transição (energia de ativação) [Mingos 1998]. Gerloch menciona que esta energia de ativação está relacionada aos comprimentos de ligação entre o metal e o ligante, sendo que geralmente complexos de íons ferrosos tem ligações mais longas que àquelas de íons férricos [Gerloch e Constable 1994]. Desta forma, estados de transição onde os reagentes possuem comprimentos de ligação assimétricos possuem energia de ativação mais alta, de modo que quanto maior a diferença nestes comprimentos, maior a energia de ativação requerida [Cotton e Wilkinson 1978].

Esta reação redox depende também de uma quantidade adicional de energia requerida para rearranjar as esferas de solvatação dos complexos, de modo a acomodar as novas dimensões dos mesmos [Douglas et al. 1983] (a transferência de elétrons implica em mudança nas dimensões dos íons envolvidos). Assim, quando se aquece o sistema reacional a 98°C, esta reação redox por esfera externa é grandemente favorecida, justificando-se assim o grande efeito pró-oxidante verificado à altas temperaturas.

3.2.4 Efeito da pré-incubação

A pré-incubação de AC com Fe(II) antes da adição de peróxido de hidrogênio como iniciador da reação de Fenton, indica não haver variação na habilidade protetora do AC com o tempo, a partir de 1 minuto (**Fig. 22**). Neste estudo, foram utilizadas as mesmas condições relatadas na figura 16 e no ensaio de DR descrito no item materiais e métodos.

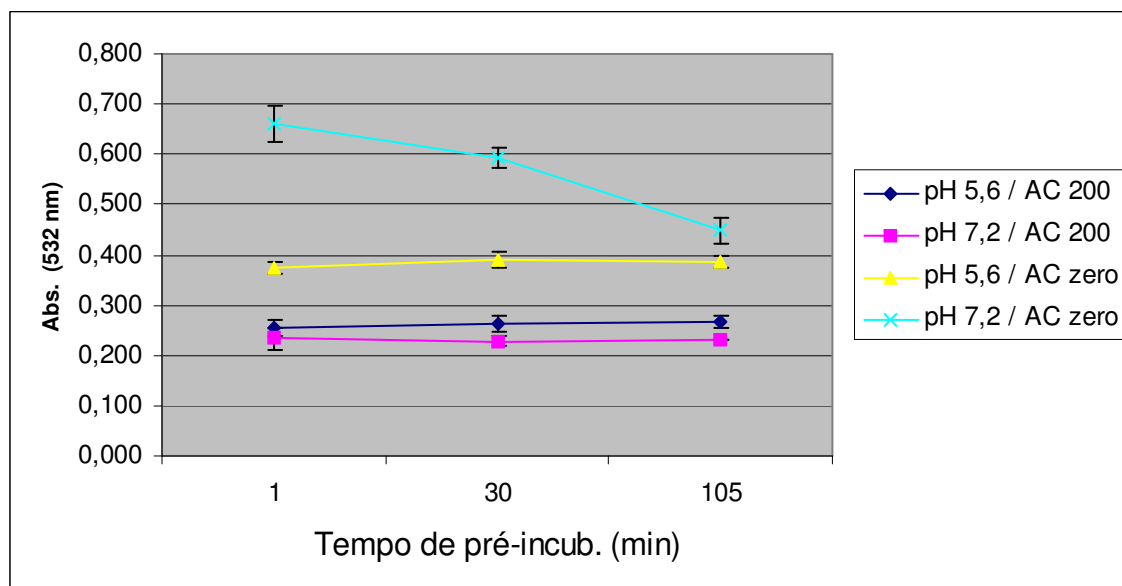


Fig. 22. Efeito do tempo de pré-incubação sobre a degradação da 2-DR. Concentrações finais : 2-DR (10 mmol/L), Tampão Hepes/MES (20 mmol/L pH 7,2 e 5,6), H₂O₂ (100 μmol/L), Fe(II) (30 μmol/L). O peróxido foi adicionado após cada tempo de pré-incubação de AC e Fe(II) à temperatura ambiente. Após a adição de peróxido, todo o sistema foi incubado por 20 minutos a 37°C.

A pequena variação na proteção do AC observada com o incremento do tempo de pré-incubação a partir de 1 minuto, pode sugerir que a reação de complexação é bastante rápida em pH 7,2. Uma possível explicação seria a de que todo o AC disponível para interagir com Fe(II) já teria se complexado antes de 1 minuto.

Tais resultados estão consistentes com aqueles descritos na figura 20, onde não mais se observa incrementos na absorbância em 604 nm (formação do complexo Fe-catecol) a partir de 1 minuto. Entretanto, segundo os resultados da figura 20, seria esperado pequeno aumento no poder antioxidante do AC em pH 5,6 com até 30 minutos de pré-incubação, o que não foi verificado.

Considerando os resultados obtidos com a pré-incubação do ácido tânico – AT, [Lopes et al. 1999], observou-se aumento no poder antioxidante da molécula estudada em função do tempo de pré-incubação na presença de íons ferro. Este estudo revela que a reação de complexação deste ligante com íons ferro é significativamente lenta.

É importante notar que estes resultados de pré-incubação podem apontar para a possibilidade de que o AC também esteja agindo como seqüestrador de radicais. Se hipoteticamente considerarmos que a complexação do AC com íons ferrosos é bastante lenta ou mesmo inexistente, a proteção observada seria exclusivamente devida a habilidade seqüestradora do AC, sendo portanto justificável o efeito protetor independente do tempo de pré-incubação.

Outro ponto de interesse é o fato de que em pH 7,2 parece haver grande influência do tampão na inibição da degradação da 2-DR especialmente se considerada uma reação de longo curso (após 1 hora e 45 minutos de pré-incubação apenas com tampão, a absorbância relativa ao dano oxidativo na 2-DR cai cerca de 30%).

Tal resultado pode ser explicado pela possibilidade de um dos componentes do tampão estar ligando ferro, ou funcionando como seqüestrador de oxi-radicais .

Outra possibilidade é a de que o tampão esteja promovendo a autooxidação de Fe(II), fazendo com que menor quantidade de íons ferrosos estejam presentes para reagir com o peróxido de hidrogênio adicionado posteriormente. Este efeito do tampão sobre as taxas de autooxidação de Fe(II) foram também relatadas por Aust num estudo onde se demonstrou que em pHs mais altos, a autooxidação é favorecida ao longo do tempo [Aust et al. 2002].

3.2.5 Efeito dos íons Fe(III) sobre a degradação da 2-DR e sobre o AC

Considerando que Fe(III) pode exercer papel importante na formação de EROs conforme já discutido anteriormente, foi estudado o efeito destes íons no sistema reacional e sua interação com o AC (**Figuras 23a , b**).

Nas mesmas condições experimentais relatadas na figura 18, substituiu-se o Fe(II) por cloreto férrico na concentração final de 30 µmol/L. Os resultados revelam que :

- a) Em sistemas contendo Fe(III) e peróxido de hidrogênio, a presença de 200 µmol/L de AC não demonstra proteção significativamente diferente em relação aos controles sem AC (**Fig. 23a**). Cabe neste ponto referenciar um estudo similar realizado com o composto polifenólico verbascosídeo [Zhao et al. 2005]. Diferentemente do AC, o polifenol verbascosídeo foi capaz de inibir dano oxidativo ao DNA tanto em presença de Fe(II) quanto Fe(III).

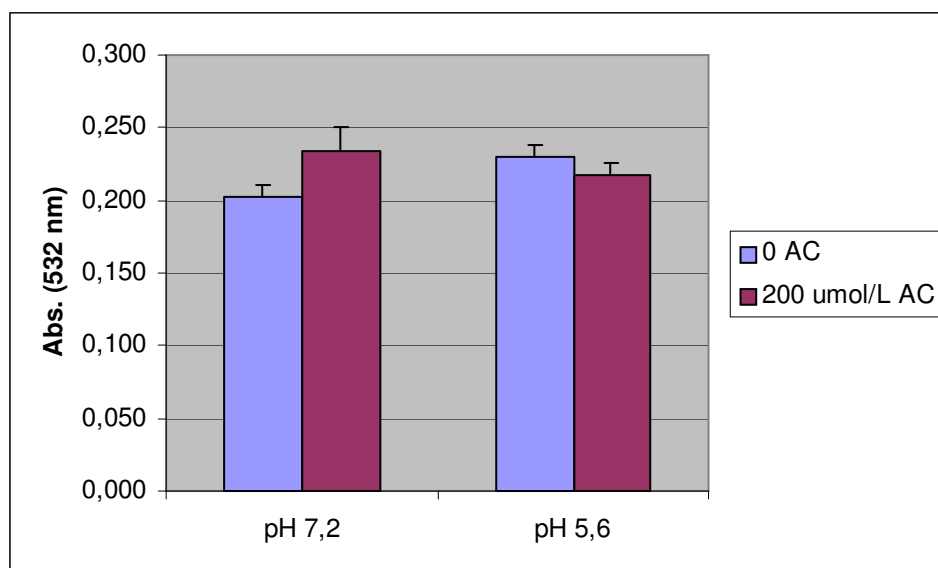


Fig. 23a. Efeito do AC sobre a reação de degradação da 2-DR promovida por Fe(III) e peróxido de hidrogênio. Concentrações finais : 2-DR (10 mmol/L), Tampão Hepes/MES (20 mmol/L pH 7,2 e 5,6), H₂O₂ (100 µmol/L), Fe(III) (30 µmol/L diluído em 10mmol/L HCl). O peróxido foi adicionado após 15 minutos de pré-incubação de AC e Fe(III) à temperatura ambiente. Após a adição de peróxido a reação foi incubada por 20 minutos a 37°C.

- b) O dano observado em sistemas contendo Fe(III) é significativamente menor, quando comparado com sistemas clássicos de Fenton com íons ferrosos nas mesmas condições experimentais (**Fig. 23b**). Tais observações estão consistentes com a proposta das equações anteriormente discutidas, que prevêem a geração de EROs a partir de Fe(III), porém em escala menor que no sistema clássico de Fenton com Fe(II).

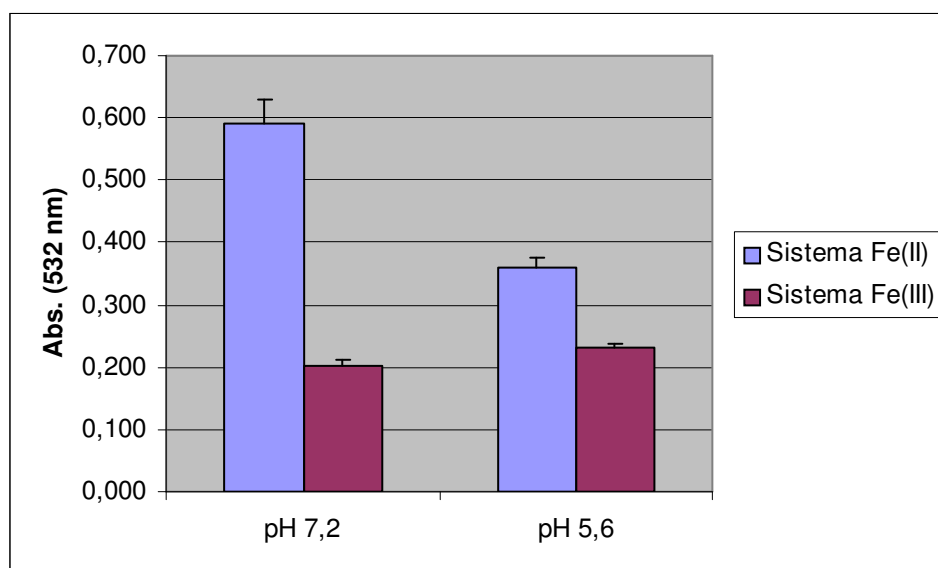


Fig. 23b. Comparação das reações de degradação da 2-DR promovidas por peróxido de hidrogênio e Fe(II) (Reação de Fenton) ou por Fe(III). Condições experimentais idênticas às das figuras 18 e 23a.

A fim de investigar o comportamento do AC em presença de íons Fe(III), foi realizada uma varredura na região de comprimento de onda de interesse, de um sistema contendo 8 mmol/L de tampão (pH 7,2), 80 $\mu\text{mol/L}$ de AC, 8 $\mu\text{mol/L}$ de Fe(III) e 800 $\mu\text{mol/L}$ de EDTA (**Fig. 24a**).

Considerando que o sistema contendo Fe(III) tem coloração esverdeada, prevê-se a formação de um complexo, o qual tenha absorção na região do visível. Por esta razão a **Figura 24b** foi composta, sendo a mesma apenas uma ampliação na escala dos mesmos dados descritos na figura 24a.

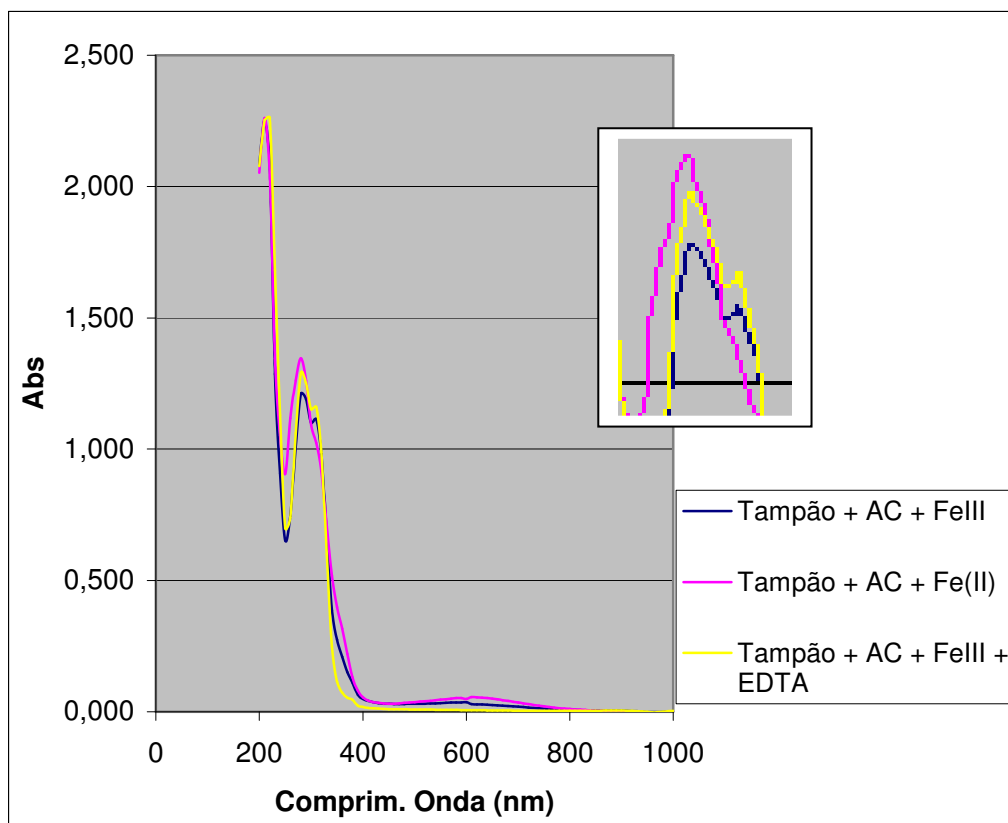


Fig. 24a. Comparação do perfil espectral de sistemas contendo Fe(II) ou Fe(III). Concentrações finais : Tampão Hepes/MES (8 mmol/L pH 7,2), Fe(III) (8 $\mu\text{mol/L}$ diluído em 10mmol/L HCl), AC (80 $\mu\text{mol/L}$), EDTA (800 $\mu\text{mol/L}$).

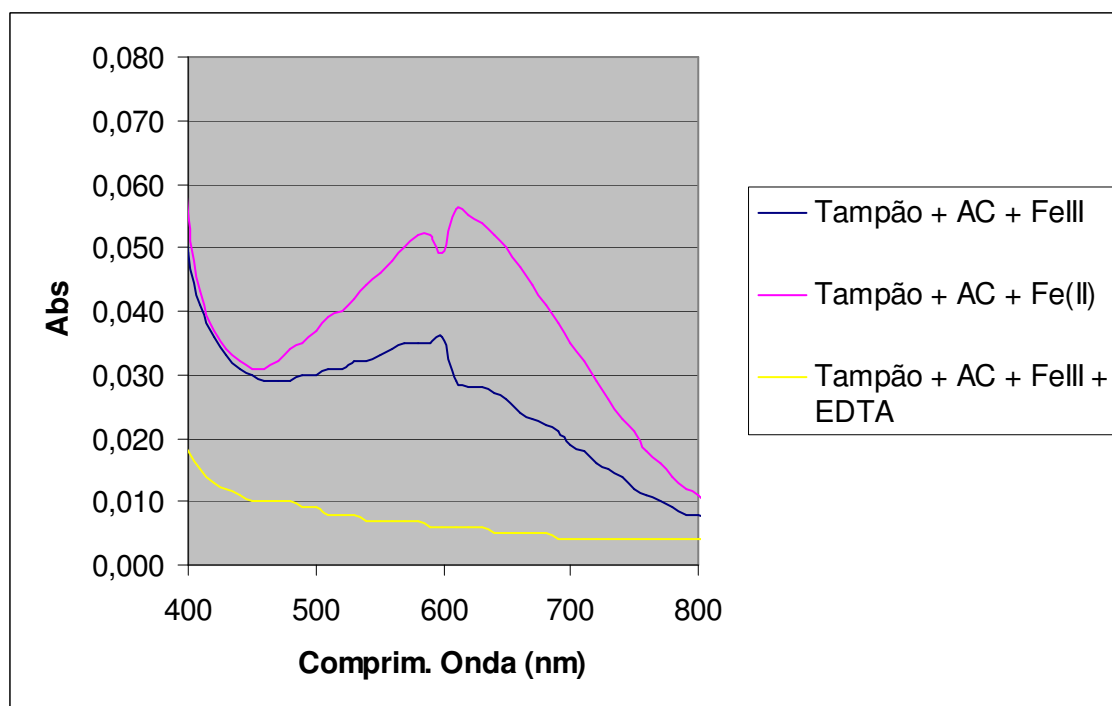


Fig. 24b. Reimpressão dos dados da figura 24a em escala ampliada na região de comprimento de onda de interesse.

Das figuras 24 a e b, observa-se que o espectro de soluções contendo AC e Fe(III) é razoavelmente diferente daquele contendo Fe(II). Com base nestes espectros, conclui-se que ocorre a formação tanto do complexo de AC com Fe(II) quanto com Fe(III), sendo observados picos de absorção dos complexos a 610 nm e 600 nm respectivamente. Cabe ressaltar que apesar das concentrações de Fe(II) e Fe(III) serem idênticas nos dois sistemas (8 $\mu\text{mol/L}$), as absorbâncias verificadas nos meios contendo Fe(III) são cerca de metade daquelas referentes aos sistemas com Fe(II) (Fig. 24b).

A comprovação da ocorrência do complexo com Fe(III) é fornecida quando EDTA é adicionado ao meio reacional contendo Fe(III) e AC. Neste caso, não se verifica o pico característico na região de 600 nm. Estes dados demonstram que o EDTA é capaz de remover íons férricos complexados previamente com AC, desfazendo o complexo originalmente formado.

Das observações acima expostas, surgem duas possíveis explicações para a ineficiência do AC em proteger a 2-DR contra danos oxidativos quando em presença de íons Fe(III), quais sejam :

- a) O AC reduz Fe(III), conforme já discutido no item 1.3.4.1 [Deiana et al. 1995] e a forma oxidada deste polifenol não é capaz de complexar eficientemente o Fe(II) gerado *in situ*, deixando-o livre para catalisar a formação de oxiradicais. Neste caso haveria uma pequena atividade pró-oxidante do AC quando em presença de íons férricos, já que o Fe(II) gerado *in situ* poderia participar de reações de Fenton subsequentes;
- b) Mesmo complexado ao AC, os íons ferro são capazes de catalisar a formação de radicais hidroxil. O complexo Fe(III)-AC poderia de alguma forma sofrer reações de esfera externa, nas quais o AC funcionaria como uma espécie de ponte para a transferência de elétrons ao Fe(III). Através de seu sistema π conjugado, o AC poderia

estar promovendo a transferência de elétrons aos íons férricos por meio de um mecanismo de esfera externa, resultando em um complexo do tipo Fe(II)-AC. O Fe(II) deste último complexo, apesar de menos suscetível a participar de reações de Fenton do que o próprio Fe(II) livre, poderia ainda assim catalisar a formação de radicais hidroxil.

3.2.6 Efeito da concentração de 2-DR e AC

A **Fig. 25a** mostra a variação no perfil de proteção do AC em função das diferentes concentrações de 2-DR, molécula alvo da ação oxidativa dos radicais hidroxil gerados *in situ*.

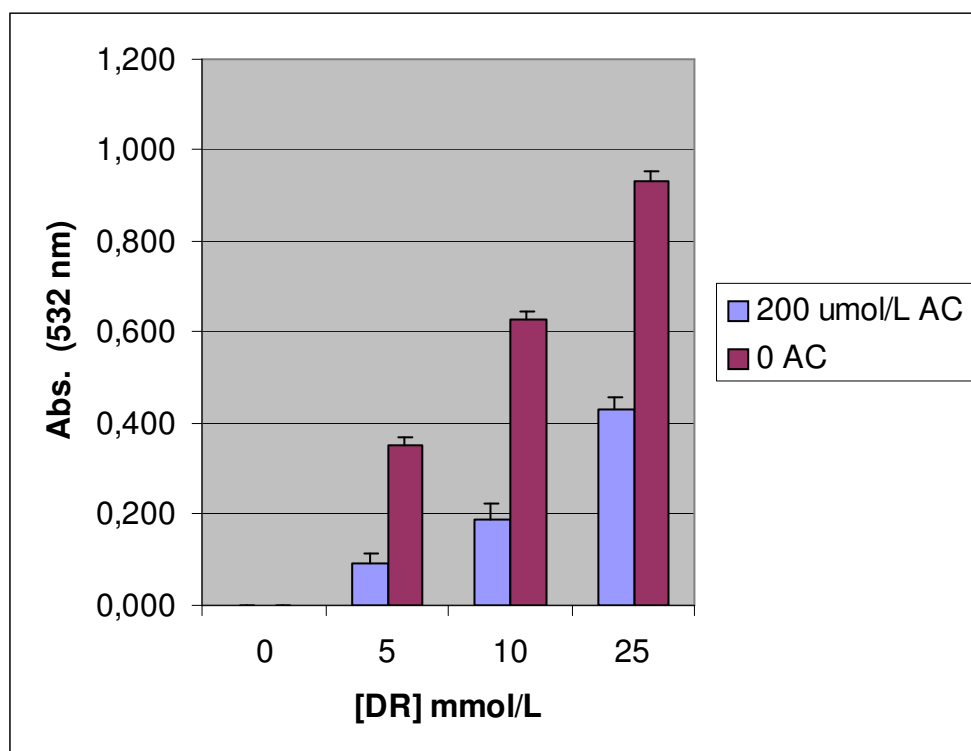


Fig. 25a. Efeito da variação da concentração de 2-DR. Concentrações finais : Tampão Hepes/MES (20 mmol/L pH 7,2), H₂O₂ (100 µmol/L), Fe(II) (30 µmol/L). O peróxido foi adicionado após 15 minutos de pré-incubação de AC e Fe(II) à temperatura ambiente. Após a adição de peróxido a reação foi incubada por 20 minutos a 37°C.

Como o esperado verifica-se um aumento na degradação da 2-DR, proporcional ao aumento da concentração deste açúcar no meio reacional. No entanto, verifica-se adicionalmente que para uma mesma concentração de AC (200 $\mu\text{mol/L}$), o percentual de proteção deste polifenol decresce proporcionalmente ao aumento da concentração de 2-DR, verificando-se que meios contendo 25 mmol/L de 2-DR apresentaram uma proteção cerca de 27% menor que meios contendo 5 mmol/L (**Fig. 25b**).

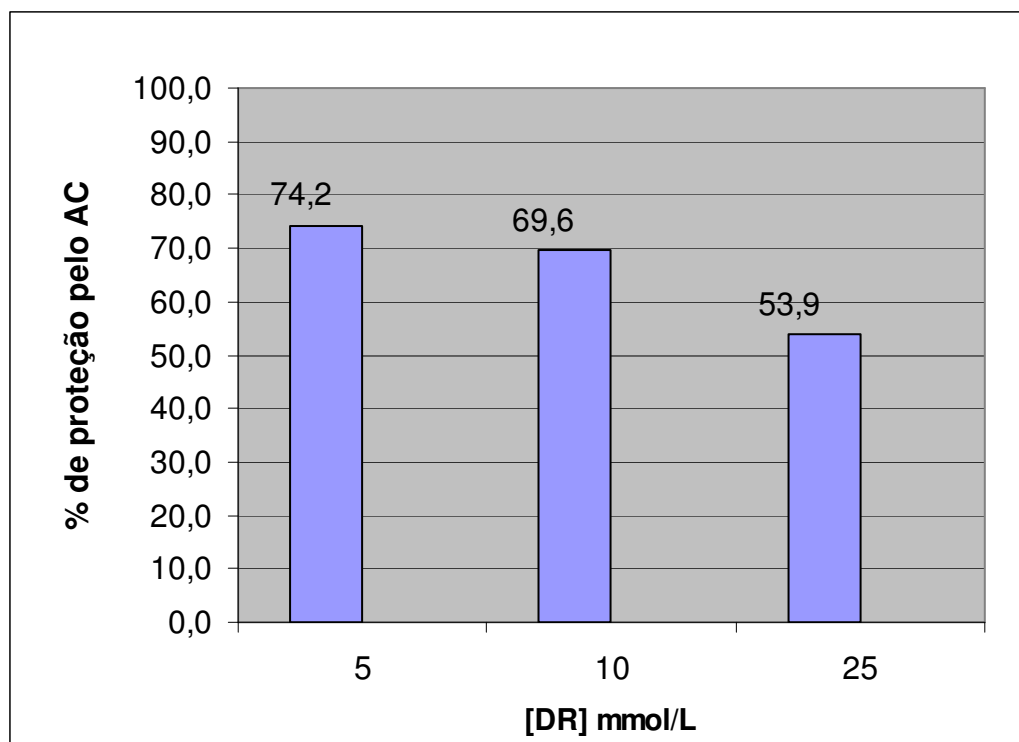


Fig. 25b. Percentual de proteção oferecido pelo AC contra a degradação da 2-DR em diferentes concentrações da molécula alvo. Os dados correspondem àqueles apresentados na figura 25a.

Tais resultados sugerem que o AC pode apresentar em sua ação antioxidante uma componente seqüestradora de oxi-radicais. Este comportamento não seria de todo inesperado, já que a estrutura do AC, conforme anteriormente discutido, é capaz de estabilizar por conjugação, um possível radical fenoxil gerado pelo ataque de radicais hidroxil diretamente ao AC.

Se o AC funcionasse apenas como quelante de ferro, não haveria diferença significativa no percentual de proteção em relação aos controles, em diferentes concentrações da 2-DR. Neste caso, o AC não estaria interferindo na reação entre oxirradicais e a 2-DR, e sim impedindo a própria formação do radical e por conseguinte agindo antes da colisão deste com a molécula alvo. Este é justamente o caso da PIH, conforme verificado no já referido trabalho [Hermes-Lima et al. 2000].

Uma pequena ação seqüestradora do AC é relatada em ensaios da TEAC [Rice-Evans et al. 1996]. Tal ensaio é comumente utilizado para medir a capacidade de substâncias em seqüestrar oxi-radicais. Entretanto, neste estudo observou-se que a atividade seqüestradora do AC, apesar de existente, é significativamente menor que a de outras substâncias análogas, como por exemplo ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido 3,4-dihidroxi-fenilacético. A atividade do AC também foi menor que a aquela apresentada por flavonóides como catequina, quercetina, ácido gálico e epigallocatequina galato (estes dois últimos, flavonóides reconhecidamente seqüestradores de oxi-radicais). Neste sentido, em outros estudos de TEAC [Kokhar et al 2003] sugere que características estruturais de compostos com alta eficiência em ligar ferro são opostas às características existentes em compostos com atividade seqüestradora de radicais, exceto pela presença de grupos 3,4 dihidroxi, importantes tanto para quelação quanto para a captura de radicais.

Considerando o exposto, sugere-se que o AC atue tanto como seqüestrador de oxi-radicais quanto como quelante, sendo esta última no entanto, a principal componente da atividade antioxidante do AC. Tal observação está em bom acordo com as conclusões reportadas em relação ao AT [Andrade et al 2005].

A **Fig. 26** apresenta o comportamento do sistema em diferentes concentrações de AC, mostrando que a eficiência deste polifenol em inibir a degradação da 2-DR é dependente da concentração. Considerando três diferentes meios reacionais contendo 5 mmol/L, 10 mmol/L e 25 mmol/L

de 2-DR, 100 $\mu\text{mol/L}$ de AC foi capaz de inibir, respectivamente 57%, 54% e 40% da reação de degradação em relação aos controles. Tais resultados, corroborando aqueles descritos na figura 25b, demonstram que quanto menor a concentração de 2-DR, maior a eficiência do AC em inibir o dano oxidativo.

Com uma concentração apenas três vezes superior à concentração de íons Fe(II) presentes no meio, o AC é capaz de reduzir o dano oxidativo à 2-DR em mais de 50% (considerando $[\text{PIH}] = 100 \mu\text{mol/L}$, $[\text{Fe}] = 30 \mu\text{mol/L}$ e $[\text{DR}] = 10 \text{ mmol/L}$). Comparando-se estes resultados com aqueles obtidos em condições similares com um antioxidante clássico, a Desferoxamina (DFO), percebe-se que a ação antioxidante do AC é também eficiente. Em sistemas contendo concentrações idênticas de Fe(II) e peróxido de hidrogênio, 100 $\mu\text{mol/L}$ de DFO apresentou um percentual de inibição de 58% em relação aos controles [Hermes lima et al. 1999].

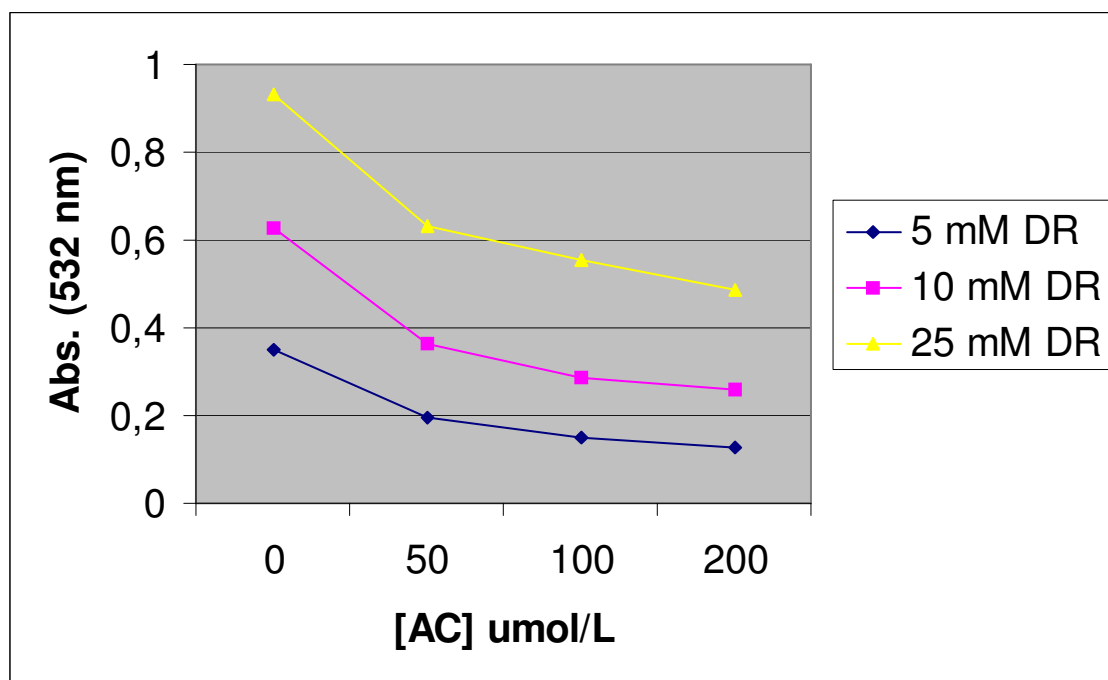


Fig. 26. Efeito da variação da concentração de AC em diferentes concentrações de 2-DR. Concentrações finais : 2-DR (5,10 e 25 mmol/L), Tampão HEPES/MES (20 mmol/L pH 7,2 e 5,6), H_2O_2 (100 $\mu\text{mol/L}$), Fe(II) (30 $\mu\text{mol/L}$). O peróxido foi adicionado após 15 minutos de pré-incubação de AC e Fe(II) à temperatura ambiente. Após a adição de peróxido a reação foi incubada por 20 minutos a 37°C.

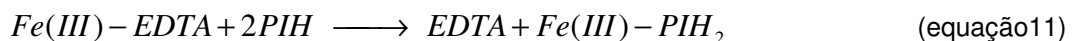
4. CONCLUSÃO

Em relação à atividade antioxidante da PIH, verificou-se que a mesma está inequivocamente relacionada à capacidade deste composto em prevenir a redução de íons férricos a ferrosos.

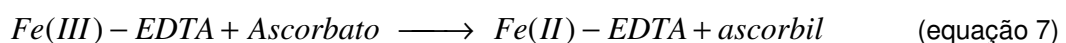
Com base nos resultados obtidos verificou-se que esta capacidade diz respeito à habilidade da PIH em remover íons ferro previamente complexados a outros quelantes (por exemplo citrato, em meio fisiológico). Por conseguinte a atividade antioxidante da PIH depende fortemente de:

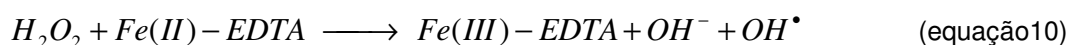
- a) tempo de pré-incubação da PIH com os íons Fe(III), uma vez que maiores tempos de pre-incubação fornecem menores taxas de redução do Fe(III) e conferem maior proteção contra danos oxidativos;
- b) natureza do co-quelante de ferro, já que foi verificado que esta atividade antioxidante é tanto maior quanto menor for a afinidade do co-quelante em relação à íons Fe(III);
- c) concentração do co-quelante de ferro e sua proporção em relação aos íons férricos, já que proporções mais baixas permitem maior proteção contra danos oxidativos.

Com base nestas observações experimentais, demonstra-se que o mecanismo de ação antioxidante da PIH *in vitro*, se deve à sua habilidade em se ligar à íons Fe(III), segundo a **equação 11** :



e conseqüentemente impedir que as reações descritas nas **equações de 7 a 10** tomem parte em sistemas nos quais íons Fe(III) e ascorbato estejam presentes.



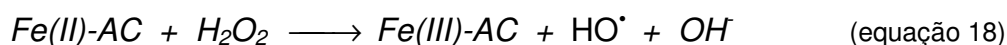
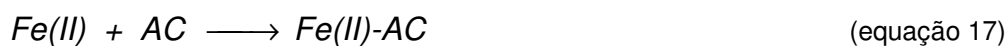


A similaridade e harmonicidade de comportamento da PIH quer seja como inibidor da reação de oxidação do ascorbato, quer seja como inibidor da formação de radical ascorbil ou da degradação da 2-DR, claramente demonstram que a ação antioxidante da PIH se deve principalmente à inibição da reação descrita na **equação 7**. Quanto menor taxa de oxidação do ascorbato mediada por Fe(III), menor a concentração de Fe(II) presente no meio reacional e por conseguinte, menor a extensão da reação de Fenton e a consequente formação de radicais hidroxil.

Verifica-se que o complexo Fe(III)-(PIH)₂ formado é substancialmente menos suscetível a sofrer redução, ou em outras palavras, a promover a oxidação do ascorbato. Propõem-se então que tal característica se deve ao fato de que ao ocupar todos os seis sítios ligantes do Fe(III) com grupos funcionais de alta densidade eletrônica [Murphy 1985 e Avramovici-Grisaru 1985], a PIH inibe a transferência de elétrons do ascorbato para o íon férrico. Tal transferência somente ocorre a taxas relevantes, em altas concentrações de ascorbato.

No que diz respeito à atividade antioxidante do AC, verifica-se que este composto é capaz de eficientemente inibir reações de degradação oxidativa causada por espécies reativas de oxigênio, geradas via reações de Fenton.

Em caráter hipotético propõe-se que tal atividade antioxidante possa ser explicada pela capacidade do AC em complexar Fe(II), e subsequentemente ser atacado pelo radical hidroxil antes que este ataque a 2-DR ou qualquer outro substrato oxidável. Assim, as seguintes reações descritas nas **equações 17, 18 e 19** poderiam estar acontecendo :



Tal proposta encontra paralelo nas proposições de Andrade e Ginani, em estudos com os polifenóis AT e AE respectivamente (Andrade et. al 2005 e Ginani 2005). Porém para o aprofundamento de tal proposta seria necessário um estudo adicional envolvendo a caracterização do radical AC em presença de 2-DR ou outro substrato oxidável alvo dos radicais hidroxil.

Outra possível explicação para a atividade antioxidante do AC seria a de que ela se deve em especial à capacidade deste composto em formar complexos estáveis com cátions de ferro, os quais, semelhantemente ao já discutido para a PIH, se tornam inaptos a participar da reação de Fenton.

Adicionalmente, propõem-se que a complexação do AC com íons ferro é fortemente influenciada pela desprotonação do grupo catecol e carboxila, uma vez que a eficiência do AC em inibir reações de degradação oxidativa depende em grande escala do pH do meio reacional. O seguinte esquema é então sugerido :

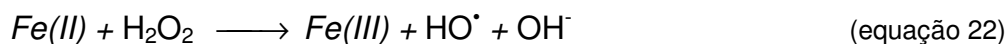
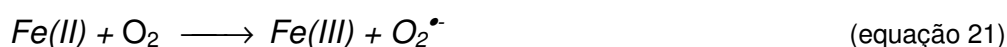
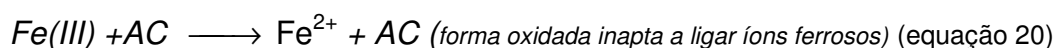
- a) ACH_2 : não ocorre complexação;
- b) ACH^- : não ocorre complexação ou a mesma é lenta ou com interações fracas;
- c) AC^{2-} : ocorre complexação efetiva envolvendo o grupo catecol.

Com base no aparecimento de um pico na região de 604 nm para sistemas ferro-AC, propõem-se que a complexação ocorra no sítio catecol. No entanto não pode ser descartada a possibilidade de estar sendo formado um quelato bidentado envolvendo uma hidroxila fenólica desprotonada e o grupo carboxilato, ou mesmo um mecanismo de

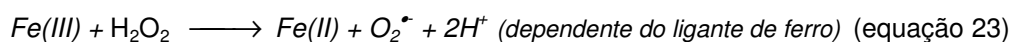
complexação iônica envolvendo apenas a carboxila. Os resultados apontam também para uma maior afinidade do AC por íons Fe(II), já que nenhuma proteção significativa foi observada em reações de Fenton induzidas por íons Fe(III) (em presença de íons Fe III, o AC não se mostrou eficiente em prevenir danos oxidativos à 2-DR).

Verificou-se também um comportamento pro-oxidante do AC em altas temperaturas de incubação da reação de Fenton (98° C), provavelmente devido à degradação térmica do AC induzida por íons ferro. Tal fato poderia ser também causado pela capacidade do AC em reduzir íons férricos [Deiana et al. 1995] gerados *in situ* pela ação do peróxido de hidrogênio, possibilitando assim a reciclagem de Fe(II) e conseqüente dano adicional por reação de Fenton.

É possível que a reação de dimerização do AC anteriormente referida, em função dos 4 elétrons envolvidos poderia de algum modo provocar a redução de Fe(III), o qual em presença de H₂O₂ poderia novamente gerar radicais hidroxil via Fenton. Desta forma, em um meio reacional à altas temperaturas, as seguintes reações poderiam estar ocorrendo simultaneamente, levando a um ciclo redox, expresso pelas **equações 20, 21, 22 e 9**:



Além de das reações descritas nas **equações 23 e 24** :



Uma outra alternativa mais provável para explicar o comportamento pró-oxidante do AC em altas temperaturas, é a ocorrência de uma reação redox por meio de um mecanismo de esfera externa. Neste mecanismo, ocorreria uma transferência de elétrons aos íons férricos, formando-se um complexo do tipo Fe(II)-AC. O Fe(II) presente neste complexo, apesar de menos suscetível a participar de reações de Fenton do que o próprio Fe(II) livre, poderia ainda assim catalisar a formação de radicais hidroxil. Considerando que a transferência de elétrons por meio de mecanismos de esfera externa possuem uma considerável energia de ativação, justifica-se o grande efeito pró-oxidante quando o sistema é aquecido a 98°C.

Este mecanismo explicaria inclusive o comportamento ineficiente do AC em proteger a oxidação da 2-DR diante de íons Fe(III), já que o complexo Fe(II)-AC formado nesta transferência de elétrons poderia propiciar uma pequena formação de oxiradicias.

Por fim, propõe-se neste trabalho que as condições de preparo das soluções estoque de AC bem como as condições reacionais, não são fator trivial no que diz respeito ao estudo das propriedades deste polifenol. Na literatura existente, a maior parte das referências bibliográficas sequer menciona a forma e as condições de preparo de soluções de AC.

Considerando que o AC é :

- a) razoavelmente insolúvel em água pura (solubilidade em etanol a quente é de 50 mg/mL conforme Merck Index, 12th ed., #1673);
- b) sensível a variações de pH (além do efeito do pH relatado neste trabalho, estudos preliminares do AC em nosso laboratório revelam que quando o mesmo é preparado em meio básico – adição de NaOH 1 mol/L para propiciar solubilização – a capacidade antioxidante é bastante diminuída);
- c) sensível a grandes variações de temperatura em presença de íons ferro.

propomos que as propriedades deste polifenol é grandemente afetada pela forma de preparo de suas soluções, sendo necessário um estudo mais criterioso a respeito, especialmente no que concerne ao seu comportamento frente a íons de ferro em altas temperaturas.

5. BIBLIOGRAFIA

- Adlercreutz H. e Mazur W. Phitoestrogens and western diseases. *Ann Med* 29 (1997) 95-120
- Andrade Jr. R.G. et al. Tannic Acid inhibits in vitro iron-dependent free radical formation. *Biochimie* (2005). No prelo.
- Andrade Jr. R.G. Mecanismos de ação antioxidante e pró-oxidante do polifenol AT na presença de íons cobre. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília (2004).
- Aust S.D. et al. Iron autoxidation and free radical generation : Effects of buffers, ligands and chelators. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 397 (2002) 360-392.
- Avramovici-Grisaru S. et al. The synthesis, crystal and molecular structure and oxidation state of iron complex from pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and ferrous sulphate. *Israel Journal of Chemistry* 25 (1985) 288-292.
- Bacon B.R. e Britton R.S. The pathology of hepatic iron overload : A free radical-mediated process? *Hepatology* 11 (1990) 127-137.
- Boilet L. et. al. Determination of the chelating site preferentially involved in the complex of Lead (II) with caffeic acid : A spectroscopic and structural study. *Jour Phys Chem A* 109 (2005) 1952-1960.
- Bravo L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56 (1998) 317-333
- Brittenham G.M. PIH : an effective iron chelator after oral administration. *Semin Hematol* 2 (1990) 112-116.
- Brittenham G.M. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone. Effective iron chelation after oral administration. *Ann NY Acad Sci* 612 (1990), 315-326.
- Britton R.S. et al. Mechanisms of iron toxicity. In : *Iron metabolism in health and disease*. Brock J.H. (Editor). Saunders, London (1994).
- Buss J.L. e Ponka P. Hydrolysis of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and its analogs. *Biochimica et Biophysica Acta* 25451 (2002) 1-10.

- Buss J.L. et al. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogs induce apoptosis in hematopoietic cells due to their iron-chelating properties. *Biochemical Pharmacology* 65 (2003) 161-172.
- Buss J.L.et. al. Oxidative stress mediates toxicity of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogs. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 421 (2004) 1-9.
- Cao G. et al. Antioxidant and pro-oxidant behaviour of flavonoids : structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 22 (1997) 749-760.
- Castelluccio C. et al. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS lett* 368 (1995) 188-192
- Castelluccio C. et al. Differential distribution of ferulic acid to the major plasma constituents in relation to its potential as an antioxidant. *Biochem Jour* 316 (1996) 691-694.
- Chen C.P. e Ho C.T. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *Jour Agric Food Chem* 45 (1997) 2374-2378.
- Chen F. et al. Fenton degradation of malachite green catalyzed by aromatic additives. *J Phys Chem A* 106 (2002) 9485-9490.
- Chen Y.F. et al. Anti-inflammatory and analgesic activities from roots of *Angelica pubescens*. *Planta Med* 61 (1995) 2-8
- Chiang H.C. et al. Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Alsophila spinulosa* (Hook) Tryon. *Jour Enzym Inhib* 8 (1994) 61-71
- Cikrt M et al. Biliary iron excretion in rats following pyridoxal isonicotinoyl hydrazone. *Br J Haematol* 45 (1980) 275-283.
- Clifford M.N. Chlorogenic acids and other cinamates : nature, occurrence and dietary burden. *Jour Sci Food Agric.* 79 (1999) 362-372.
- Cotton F.A. e Wilkinson G. *Química Inorgânica*. Editora Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro (1978).
- Criqui M.H. e Ringel B.L. Does diet or alcohol explain the French paradox? *Lancet* 344 (1994) 1719-1723

- D'Angelo E. et al. Combined therapy with desferrioxamine and deferiprone: a new protocol for iron chelation in thalassemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 26 (2004) 451-453.
- Decker E.A. Phenolics: pro-oxidants or antioxidants? *Nutr Rev* 55 (1997) 396-407.
- Deiana S. et al. Phenolic acid redox properties : pH influence on iron (III) reduction by caffeic acid. *Soil Sci Soc Am J* 59 (1995) 1301-1307.
- Dimberg L.H. et al. Variation in oat groats due to variety, storage and heat treatment I: Phenolic compounds. *Journal of Cereal Science* 24 (1996) 263-272.
- Divi R.L. et al. Inhibition of thyroid peroxidase by dietary flavonoids. *Chem Res Toxicol* 9 (1996) 16-23.
- Douglas B. et al. Concepts and models of inorganic chemistry. 2a ed. John Wiley & Sons, New York (1983).
- Fenton H.J.J. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of Chemical Society* 65 (1894), 899-910.
- Ferguson L.R. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research* 475 (2001) 89-111.
- Fiuza S.M. et al. Conformational analysis of trihydroxylated derivative of cinnamic acid – a combined Raman spectroscopy and Ab initio study. *Jour of Mol Struc* 693 (2004) 103-118
- Flint D.H. et al. The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by $O_2^{\bullet -}$. *J Biol Chem* 268 (1993) 22369.
- Galati G. e O'Brien P. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics : significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Rad Biol Med* 37 (2004) 287-303.
- Garcia P. et al. Effect of metal cations on the chemical oxidation of olive o-diphenols in model systems. *Jour Agric Food Chem* 44 (1996) 2101-2105.
- Gerloch M. e Constable E.C. Transition metal chemistry, VCH Press, Weinheim (1994).
- Gilbert D.L. Oxygen and Living Processes : an Inter-disciplinary Approach. Springer, New York (1981).

- Ginani J.S. Estudo da ação antioxidante in vitro do polifenol Ácido Elágico. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília (2005).
- Gomes C.S. Estudos da oxidação de íons ferro e estanho na produção de radicais livres : Efeitos de antioxidantes. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília (2005).
- Gutteridge J.M.C. Ferrous-salt-promoted damage to deoxyribose and benzoate. *Biochem J.* 243 (1987) 709-714.
- Gutteridge J.M.C. Superoxide-dependent formation of HO[•] from Fe(III) complexes and H₂O₂ : an evaluation of 14 iron chelators. *Free Rad Res Commun* 9 (1990) 119.
- Gutteridge J.M.C. Thiobarbituric Acid-reactivity following iron-dependant free radical damage to aminoacidas and carbohydrates. *FEBS Lett* 128 (1981) 343-346.
- Halliwell B. e Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3^a edição, Oxford University Press, Oxford (2000).
- Halliwell B. et al. The deoxyribose method : a simple test tube assay for determination of rate constants for reaction of hydroxyl radical. *Anal Biochem* 165 (1987) 215-219
- Harman D. *Proc Natl Acad Sci USA* 78 (1981) 7124 – 7128.
- Haugard N. Cellular Mechanisms of oxygen toxicity. *Physiol Rev* 48 (1968) 229.
- Hermes-Lima et al. The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) and its analogues prevent damage to 2-deoxyribose mediated by ferric iron plus ascorbate. *Biochim Biophys Acta* 1523 (2000) 154-160.
- Hermes-Lima et al. EPR spin trapping and 2-deoxyribose degradation studies of the effect of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) on [•]OH formation by the Fenton reaction. *Biochim Biophys Acta* 1426 (1999) 475-482.
- Hermes-Lima et al. The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) protects plasmid pUC-18 DNA against OH⁻ mediated strand breaks. *Free Rad Biol Med* 28 (1998) 875-880.
- Hermes-Lima M. in *Functional Metabolism : Regulation and Adaptation*. Storey K.B. (editor). John Wiley and Sons, New Jersey (2004).

- Hotta H. et al. Unusually large numbers of electrons for the oxidation of polyphenolic antioxidants. *Biochimica Biophysica Acta* 1526 (2001) 159-167.
- Hou Z. et al. Potentiometric, spectrophotometric, and ¹H NMR study of four desferrioxamine B derivatives and their ferric complexes. *J Am Chem Soc* 116 (1994) 840-846.
- Hynes M.J. e Mairtin O'Coinceanainn. The kinetics and mechanisms of reactions of iron (III) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin. *Jour Inorg Biochem* 98 (2004) 1457-1464.
- J. Webb et al. Pirydoxal Isonicotinoyl Hydrazone (PIH) : a promising new iron chelator. *Birth Defects Orig Artic Ser* 23 (1988) 63-70.
- Johnson D.K. et al. An in vivo evaluation of iron chelating drugs derived from pyridoxal and its analogs. *J Pharmacol Exp Ther* 221 (1982) 399-403.
- Kattamis A. Combined Therapy with Deferoxamine and Deferiprone. *Ann N Y Acad Sci.* 1054 (2005) 175-182.
- Khokhar S. e Apenten R.K.O. Iron binding characteristics of phenolic compounds : some tentative structure-activity relations. *Food Chemistry* 81 (2003) 133-140.
- Khvan A.M. et.al. Complexation of caffeic and ferulic acids by transition metal ions. *Chemistry of Natural Compounds.* 37 (2001) 72-75.
- King A. e Young G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Jour Amer Diet Assoc* 99 (1999) 213-218.
- Konigsberger L.C. et al. Complexation of iron(III) and iron(II) by citrate. Implications for iron speciation in blood plasma, *J. Inorg. Biochem.* 78 (2000) 175-184.
- Kuhnau J. The flavonoids: a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 24 (1976) 117-191
- Kuo S.M. e Leavitt P.S. Genistein increases metallothionein expression in human intestinal cells, Caco-2. *Biochem Cell Biol* 77 (1999) 79-88.

- Lopes G.K.B. et al. Poliphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complex ferrous ions. *Biochimica Biophysica Acta : General subjects.* 1472 (1999) 142-147.
- Maas J.L. et al. Ellagic acid, an anticarcinogen in fruits, especially in strawberries : a review. *Horticult Sci.* 26 (1991) 10-13.
- Macheix J. et al. *Fruit phenolics.* CRC Press, Boca Raton, Florida (1990).
- Mingos D.M.P. *Essentials of inorganic chemistry - Oxford chemistry primers,* Oxford University Press, Avon (1998).
- Moon J.A. e Terao J. Antioxidant activity of caffeic acid and dihydrocaffeic acid in lard and human low-density lipoprotein. *Jour Agric Food Chem* 46 (1998) 5062-5065.
- Murphy T.B. et al. Syntheses of Iron(III) aroyl hydrazones containing pyridoxal and salicylaldehyde. The crystal and molecular structure of two Iron(III)-pyridoxal isonicotinoyl hydrazone complexes. *Inorganica Chimica Acta* 108 (1985) 183-194.
- Nagata H. et al. antioxidative action of flavonoids, quercetin and catechin, mediated by the activation of glutathione peroxidase, *Jour Exp Clin Med* 24 (1999) 1-11
- Nakayama T. Suppression of hydroperoxide-induced cytotoxicity by poliphenols. *Cancer Res* 54 (1994) 1991-1993.
- Nardini M. et al. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Free Rad Biol Med* 19 (1995) 541-552.
- Pippard M.J. Clinical use iron chelators. In: de Sousa M, Brock JH (editores) *Cancer and Inflammation,* John Wiley and Sons (1989) 361-392.
- Ponka P. et al. Mobilization of iron from reticulocytes. Identification of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone as a new iron chelating agent. *FEBS lett* 97 (1979) 317-321.
- Pool-Zobel B.L. Anthocyanins are potent antioxidants in model systems, but do not reduce endogenous oxidative DNA damage in human colon cells. *Eur Jour Nutr* 38 (1999) 227-234.

- Renaud S. e De Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339 (1992) 1523-1526.
- Rettori D. Estudos fisico-quimicos e biologicos da violaceina: um pigmento produzido pela *chromobacterium violaceum*. Tese de doutorado. UNICAMP (2000).
- Rice-Evans C. et al. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med* 20 (1996) 933-956
- Rice-Evans C.A. et al. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam (1991).
- Richardson D.R. et al. Pyridoxal Isonicotinoyl Hydrazone and analogues : Study of their stability in acidic, neutral and basic aqueous solutions by UV-VIS spectrophotometry. *Biol Met* 2 (1989) 69-76.
- Roche M. et al. Chimie des solutions. Collection Info Chimie, Technique et Documentation. Lavoisier. Paris (1990).
- Sah P.P.T. Nicotinyl and isonicotinyl hydrazones of pyridoxal. *Journal of American Chemical Society*, 76 (1954) 300.
- Santos N.C.F. et al. The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone inhibits mitochondrial lipid peroxidation induced by Fe(II)-citrate. *European Journal of Pharmacology* 428 (2001) 37-44.
- Scalbert A. e Williamson G. Dietary intake and bioavailability of poliphenols. *The Journal of Nutrition : Supplement* (2000) 2073S-2085S.
- Schulman H.M. In vitro antioxidant properties of the iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) and some of its analogs. *Redox Report* 1 (1995) 373-378.
- Shindo H. e Huang P.M. Catalytic effects of Mn(IV), iron(III), aluminium, and silicon oxides on the formation of phenolic polymers. *Soil Sci Soc Am J.* 48 (1984) 927-934.
- Silva F.A.M. et al. Phenolic acids and derivatives : Studies on the relationship among structure, radical scavenging activity and

- physicochemical parameters. *J Agr Food Chem* 48 (2000) 2122-2126.
- Skibola C.F. e Smith M.T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Rad Biol Med* 29 (2000) 375-383.
- Solinas V. et. al. Reduction of the Fe(III)-Desferrioxamine-B complexes by caffeic acid : a reduction mechanism of biochemical significance. *Soil Biol Biochem* 28 (1996) 649-654
- Sondheimer E. On the distribution of caffeic acid and the chlorogenic acid isomers in plants. *Arch Biochem Biophys.* 74 (1958) 131-138.
- Steinmetz K.A. e Potter J.D. Vegetables, fruit, and cancer prevention : A review. *Jour Amer Diet Assoc* 96 (1996): 1027-1039
- Tjiburg L.B.M. et al. Tea flavonoids and cardiovascular diseases : A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 37 (1997) 771-785
- Tuckmantel W. et. al. *Jour Am Chem Soc* 121 (1999) 12073.
- VanBesien E. e Marques M.P.M. Ab initio conformational study of caffeic acid. *Theo Chem* 625 (2003) 265-275.
- Vitolo L.M.W. et al. Iron chelators of the PIH class: Part 2. Formation constants with iron(III) and iron(II). *Inorg Chim Acta* 170 (1990) 171-174.
- Yamanaka N. et al. prooxidant activity of caffeic acid, dietary non-flavonoid phenolic acid, on Cu²⁺ induced lipoprotein oxidation. *FEBS Lett* 405 (1997) 186-190.
- Yang C.S. et al. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr* 21 (2001) 381-406.
- Yarali N. et al. Subcutaneous bolus injection of deferoxamine is an alternative method to subcutaneous continuous infusion. *J Pediatr Hematol Oncol.* 28 (2006) 11-6.
- Zhao C. et al. In vitro protection of DNA from Fenton reaction by plant polyphenol verbascoside. *Biochim Biophys Acta* 1723 (2005) 114-123.