

Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**MECANISMOS DA AÇÃO ANTIOXIDANTE
DOS ÁCIDOS CAFÉICO E TÂNICO EM
SISTEMAS CONTENDO ÍONS FERRO.**

Aluno: Thiago Cardoso Genaro de Mattos

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Hermes Lima

**BRASÍLIA
2009**

Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

MECANISMOS DA AÇÃO ANTIOXIDANTE DOS ÁCIDOS CAFÉICO E TÂNICO EM SISTEMAS CONTENDO ÍONS FERRO.

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação do Instituto de Química da
Universidade de Brasília, como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre**

Aluno: Thiago Cardoso Genaro de Mattos

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Hermes Lima

**BRASÍLIA
2009**

Folha de Aprovação

"E aqueles que foram vistos dançando, foram julgados insanos por aqueles que não podiam ouvir a música."

Friedrich Nietzsche

"Se tão alto cheguei, é porque me apoiei em ombros de gigantes."

Sir Isaac Newton

Aos meus pais e à minha irmã.

AGRADECIMENTOS

Ao amigo professor Marcelo Hermes Lima, pela confiança, paciência, entusiasmo e orientação desde o início. Por ter me aberto as portas do laboratório ainda tão cedo e por respeitar as minhas idéias. Por ensinar mais que ciência; ensinar o correto, o moral e o ético. Muito Obrigado!

Aos meus pais Jorge e Rosângela, cuja dedicação, incentivo, apoio e exemplo de persistência tornaram isso possível;

À Luana, cujas palavras aqui escritas não serão suficientes para expressar meu agradecimento; Muito obrigado por tudo, pela paciência, cumplicidade, companhia, carinho, compreensão e auxílio;

À minha irmã Flávia, pelo apoio e incentivo nos momentos difíceis;

Ao César, pela amizade, paciência, dedicação e por ter me ensinado os conhecimentos básicos de um laboratório;

À Luana, Juliana e ao Roberto pelas várias discussões sobre ciência que muito acrescentaram a este trabalho;

Aos amigos superóxidos: Luana, Juliana, Carol, Rafaella, Roberto, Daniel, Marcus Aurélio, Alexis, Marlize, Marcos Bürger, Janini e Taís, que fazem do laboratório um ambiente de trabalho único e especial;

Ao Ricardo, Janini e Luana pela imensa contribuição na realização de vários experimentos do artigo do “Super-Branco”;

Aos professores Daniel Rettori e Carolina Giongo, pela amizade, hospitalidade e colaboração. Agradeço especialmente ao professor Daniel Rettori, pela colaboração nos experimentos de EPR e do ABTS e, principalmente, pelas horas de discussão que muito contribuíram na minha formação;

Ao professor Etelvino Bechara, por ter me recebido em seu laboratório e pelas discussões que contribuíram para minha formação;

À Rafaella, pela companhia, pelos inúmeros cafés e pela “garimpagem” na biblioteca;

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

Aos membros da banca, profa. Claudia, prof. Alexandre e prof. Francisco, por aceitarem o convite;

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

À Tatá, por me receber, em sua casa durante as “expedições” à São Paulo;

Ao Chiquinho, pela amizade e apoio sempre que necessário;

Aos grandes amigos, Márcio, Leo, Chinês, Thiago (Azeite), Batata, Pardal, Pedro, Natália, Marcão, Julinho e Tiago (PD), pelos inesquecíveis momentos de diversão;

À Karla, cuja amizade e apoio foram fundamentais na reta final deste trabalho;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de pesquisa;

Ao IQ e seus funcionários (em especial ao Tiago, Rogério, Rafael e Júnior) pelo auxílio;

À FINATEC, pelo fomento à minha participação no congresso da SFRBM em Indianópolis;

Ao CNPq e ao Milênio-Redoxoma, pelos anos de fomento aos projetos de pesquisa desenvolvidos pelo Grupo de Pesquisa em Radicais Livres (GPRO).

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ESQUEMAS.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xvi
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Radicais Livres.....	3
2.2 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	3
2.3 Efeitos Biológicos dos radicais livres.....	7
2.3.1 Peroxidação Lipídica.....	8
2.3.2 Oxidação de Proteínas.....	11
2.3.3 Oxidação de DNA.....	12
2.4 Patologias associadas aos Radicais Livres.....	13
2.4.1 Câncer.....	13
2.4.2 Doença de Alzheimer.....	14
2.4.3 Doença de Parkinson.....	15
2.5 Defesas Antioxidantes.....	16
2.6 Ferro.....	18
2.6.1 Fenton e a Autoxidação do Fe(II).....	19
2.7 Polifenóis.....	21
2.7.1 Ácido Tânico.....	24
2.7.2 Ácido Caféico.....	26
3. Materiais e Métodos.....	27
3.1 Reagentes.....	27
3.2 Degradação Oxidativa da 2-Desoxi-D-Ribose.....	28
3.3 Degradação Oxidativa do DNA plasmidial.....	30
3.4 Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR).....	34
3.4.1 EPR do DMPO/•OH.....	37
3.4.2 EPR do sinal do Fe(III).....	40
3.5 Peroxidação Lipídica em Homogenato de Fígado de Rato <i>in vitro</i>	41

3.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	42
3.7 Consumo de Oxigênio (oximetria).....	44
3.8 Método do Radical ABTS.....	45
3.9 Método da Ferrozina.....	47
3.10 Análises estatísticas.....	48
4. Capítulo 1 – A interferência do íon Fe(III) na metodologia da degradação oxidativa da 2-Desoxi-D-ribose (2-DR).....	49
4.1 Introdução e Objetivos.....	49
4.2 Metodologias Utilizadas.....	50
4.3 Resultados e Discussões.....	50
4.4 Conclusões do Capítulo 1.....	71
5. Capítulo 2 – Atividade antioxidante do ácido caféico, em comparação com o ácido tânico, frente à reação de Fenton.....	81
5.1 Introdução e Objetivos.....	81
5.2 Metodologias Utilizadas.....	86
5.3 Resultados e Discussões.....	86
5.4 Conclusões do Capítulo 2.....	108
6. Capítulo 3 – Atividade antioxidante dos ácidos caféico e tânico frente à autoxidação do Fe(II).....	112
6.1 Introdução e Objetivos.....	112
6.2 Metodologias Utilizadas.....	113
6.3 Resultados e Discussões.....	113
6.4 Conclusões do Capítulo 3.....	138
7.Considerações Finais.....	145
8. Referências Bibliográficas.....	147
Anexo I.....	158
Anexo II.....	204

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

·OH	Radical hidroxil
2-DR	2-desoxi-D-ribose
A	Absorbância
Asc·	Radical ascorbil
Asc	Ácido ascórbico, ascorbato
AT	Ácido tânico
AC	Ácido caféico
AE	Ácido elágico
AG	Ácido gálico
CAT	Catalase
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
MDA	Malonidialdeído
DFO	Desferral
DMPO	5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido
DMPO/·OH	Aduto 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido hidroxilado
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPR	Ressonância paramagnética eletrônica
EROs	Espécies reativas de oxigênio
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GPX	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
HEPES	Ácido n-(2-hidroxietil)piperazina-n'-(2-etenosulfônico)
HNE	4-hidroxi-2-nonenal
HOO·	Radical hidroperoxil
LO·	Radical alcolxil
LOO·	Radical peroxil
LOOH	Radical hidroperóxido
KPi	Tampão fosfato
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
O₂^{·-}	Ânion radical superóxido
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
PIH	Piridoxal isonicotinoil hidrazona
Pi	Fosfato inorgânico
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas do TBA
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfil do curso temporal da peroxidação lipídica.....	11
Figura 2. Fórmula estrutural do AT.....	24
Figura 3. Fórmula estrutural do AC.....	26
Figura 4. Fórmula estrutural do brometo de etídeo.....	32
Figura 5. Primeira derivada do sinal absorvivo de uma amostra com spin nuclear $I = 0$ e spin eletrônico $S = \frac{1}{2}$	36
Figura 6. Demonstração da obtenção do sinal absorvivo de EPR a partir do sinal experimental.....	36
Figura 7. Simulação do sinal de EPR quando o elétron interage com diferentes núcleos.....	37
Figura 8. Sinal característico do aduto DMPO/ \cdot OH.....	38
Figura 9. Sinal característico do aduto DMPO/ $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$	39
Figura 10. Fórmula estrutural do ABTS.....	45
Figura 11. Cromatogramas do aduto MDA-TBA ₂	51
Figura 12. Efeito da concentração de íons ferro na degradação da 2-DR induzida pelo sistema da autoxidação do Fe(II).....	57
Figura 13. Efeito da concentração de íons ferro na degradação da 2-DR induzida por reagentes de Fenton.....	59
Figura 14. Efeito da concentração de Fe(III) no dano à 2-DR na presença e na ausência de H ₂ O ₂	60
Figura 15. Efeito de crescentes concentrações de H ₂ O ₂ no dano oxidativo à 2-DR induzido por Fe(II) ou Fe(III).....	61
Figura 16. Efeito da concentração de 2-DR em sistemas contendo Fe(II) e Fe(III).....	63
Figura 17. Efeito da concentração de AT na degradação da 2-DR induzida por ferro.....	65
Figura 18. Molécula do DFO.....	67
Figura 19. Molécula do PIH.....	67
Figura 20. Efeito do tempo de fervura na reação do Fe(III) com a 2-DR..	68
Figura 21. Efeito do tempo de incubação na degradação oxidativa induzida por Fe(II) ou Fe(III).....	69
Figura 22. Efeito do tempo de fervura na redução de Fe(III) a partir dos	

reagentes presentes no meio reacional da reação entre o Fe(III) e a 2-DR.....	70
Figura 23. Fórmulas estruturais dos 4 açúcares testados e da 2-DR.....	80
Figura 24. Varredura espectrofotométrica do AC na presença de Fe(II) em diferentes pHs.....	82
Figura 25. Curso temporal da formação do complexo AC-Fe(II).....	83
Figura 26. Ilustração dos sítios de complexação do AC.....	84
Figura 27. . Efeito do AC na degradação oxidativa da 2-DR induzida por reagentes de Fenton em 2 pHs.....	85
Figura 28. Efeito de crescentes concentrações do AC na redução do ABTS ^{•+}	87
Figura 29. Fórmulas estruturais do AC e AT.....	88
Figura 30. Comparação entre os valores de TEAC.....	89
Figura 31. Efeito do AC no sinal do DMPO/•OH.....	92
Figura 32. Efeito da concentração de AC na formação do aduto radicalar DMPO/•OH via reação de Fenton.....	93
Figura 33. Efeito do AT no sinal do DMPO/•OH.....	96
Figura 34. Efeito da concentração de AT na formação do aduto radicalar DMPO/•OH via reação de Fenton.....	97
Figura 35. Efeito de crescentes concentrações de Fe(II) na hidroxilação do DMPO na presença e ausência de AC e AT.....	99
Figura 36. Efeito do AC na peroxidação lipídica de homogenato de fígado de rato induzida por reagentes de Fenton.....	101
Figura 37. Efeito de crescentes concentrações de AC na velocidade de propagação (fase log) da peroxidação lipídica.....	104
Figura 38. Efeito da concentração do AC na peroxidação lipídica induzida por reagentes de Fenton.....	105
Figura 39. Efeito da concentração de Fe(II) no dano ao DNA na presença e ausência de AC.....	106
Figura 40. Efeito de crescentes concentrações de AT e AC na degradação da 2-DR induzida pela reação de autooxidação do Fe(II).....	114
Figura 41. Efeito de crescentes concentrações de Fe(II) na degradação da 2-DR na presença e ausência de AT e AC.....	116

Figura 42. Efeito do AT e AC no curso temporal da peroxidação lipídica induzida pela reação da autoxidação do Fe(II).....	120
Figura 43. Efeito dos antioxidantes na velocidade da fase log da peroxidação lipídica induzida pela reação da autoxidação.....	124
Figura 44. Foto do gel de agarose do dano ao DNA induzido pela reação de autoxidação do Fe(II) na presença de crescentes concentrações de AC.....	126
Figura 45. Foto do gel de agarose do dano ao DNA induzido pela reação de autoxidação do Fe(II) na presença de crescentes concentrações de AT.....	126
Figura 46. Efeito de crescentes concentrações de AT e AC na degradação oxidativa de DNA plasmidial induzida pela reação de autoxidação do Fe(II).....	127
Figura 47. Foto do gel de agarose do dano ao DNA induzido pela reação de autoxidação do Fe(II) com crescentes concentrações de Fe na presença de AC.....	128
Figura 48. Foto do gel de agarose do dano ao DNA induzido pela reação de autoxidação do Fe(II) com crescentes concentrações de Fe na presença de AT.....	129
Figura 49. Efeito de crescentes concentrações de Fe(II) na degradação oxidativa de DNA plasmidial induzida pela reação de autoxidação do Fe(II).....	129
Figura 50. Efeito do AC e AT na intensidade do sinal de EPR do aduto radicalar DMPO/C ₂ H ₅ O [•]	132
Figura 51. Efeito da variação do Fe(II) na intensidade do sinal de EPR do aduto radicalar DMPO/C ₂ H ₅ O [•]	133
Figura 52. Efeito do AC e AT no consumo de O ₂	134
Figura 53. Fórmulas estruturais dos ácidos caféico, tânico e gálico.....	136
Figura 54. Efeito do AC e do AT no sinal de EPR do Fe(III).....	137
Figura 55. Artigos publicados por ano utilizando a metodologia da 2-DR.....	145

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Orbitais moleculares do oxigênio e de diversas EROs.....	4
Esquema 2. Formação do radical hidroxil via reação de Fenton e subsequente ataque ao DNA.....	7
Esquema 3. Seqüência de reações da peroxidação lipídica.....	10
Esquema 4. Esquema ilustrando a participação de metais de transição em processos carcinogênicos.....	14
Esquema 5. Mecanismo de defesa antioxidante enzimático.....	17
Esquema 6. Esquema ilustrando a participação do ferro nas reações da autoxidação do Fe(II).....	19
Esquema 7. Degradação oxidativa da 2-DR mediada pelo radical hidroxil.....	28
Esquema 8: Formação do cromóforo a partir da reação do TBA com MDA.....	29
Esquema 9. Diferença de tamanho entre as três formas de DNA.....	30
Esquema 10. Foto de um gel de agarose mostrando a intensidade das três bandas geradas.....	32
Esquema 11. Níveis de energia para spin $S = \frac{1}{2}$ sob influência do campo magnético.....	35
Esquema 12. Reação do radical hidroxil com o DMPO.....	38
Esquema 13. Configuração eletrônica do Fe(III) na forma spin baixo.....	40
Esquema 14. Esquema da redução e oxidação do ABTS ²⁻	46
Esquema 15. Ilustração simplificada reação de autoxidação em pH 7,2 e 1,3.....	52
Esquema 16. Mecanismo da formação de MDA a partir do ataque do radical hidroxil a molécula da 2-DR.....	72
Esquema 17. Formação de MDA a partir da reação do Fe(III) com a 2-DR.....	73
Esquema 18. Possível mecanismo de oxidação da 2-DR pelo Fe(III).....	73
Esquema 19. Esquema pelo qual o TBA reduz Fe(III) na presença e ausência de 2-DR.....	74
Esquema 20. Ilustração da atividade antioxidante na fase de iniciação da	

peroxidação.....	102
Esquema 21. Ilustração mostrando, simplificada, o possível complexo entre o Fe(II), o AC/AT e o DNA.....	107
Esquema 22. Ilustração do complexo $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ orientado no plano cartesiano.....	108
Esquema 23. Possível estrutura do complexo Fe(II)-AC ₂	109
Esquema 24. Hipótese do mecanismo parcial de ação antioxidante do AC baseado na reação entre o complexo e o radical hidroxil na região de solvatação ($\text{OH}_{(\text{solvatação})}$).....	110
Esquema 25. Ilustração da atividade antioxidante na fase de iniciação da peroxidação.....	121
Esquema 26. Ilustração da redução do Fe(III) após a formação do complexo.....	138
Esquema 27. Ilustração da formação do complexo Fe:catecol.....	140
Esquema 28. Ilustração do mecanismo pelo qual o AC e AT aceleram o consumo de oxigênio.....	141
Esquema 29. Oxidação de íons ferrosos por compostos fenólicos.....	141
Esquema 30. Ilustração do ciclo redox entre o composto fenólico, Fe(II)/Fe(III) e O ₂	142
Esquema 31. Ilustração do possível mecanismo antioxidante do AC.....	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Característica de algumas EROs biologicamente relevantes.....	5
Tabela 2. Exemplos de compostos dos sistemas de defesa enzimático e não enzimático.....	17
Tabela 3. Classes de polifenóis.....	22
Tabela 4. Efeito de antioxidantes na oxidação da 2-DR mediada por Fe(II) e Fe(III).....	53
Tabela 5. Efeito de diferentes tampões nas reações de Fenton, autooxidação do Fe(II) e na reação do Fe(III) com a 2-DR.....	55
Tabela 6. Efeito do H ₂ O ₂ no dano a 2-DR na ausência ou presença de Fe(III).....	62
Tabela 7. Efeito de quelantes de ferro nas reações de Fenton, autooxidação do Fe(II) e na reação do Fe(III) com a 2-DR.....	66
Tabela 8. Efeito de quelantes de ferro na reação de Fenton.....	76
Tabela 9. Efeito de crescentes concentrações de 2-DR na presença e ausência de AC.....	77
Tabela 10. Efeito de crescentes concentrações de 2-DR na presença e ausência de AC.....	78
Tabela 11. Variação da concentração da 2-DR na presença e ausência de AC.....	90
Tabela 12. Efeito de crescentes concentrações de 2-DR na presença de AC.....	118

RESUMO

Este trabalho foi dividido em três capítulos distintos. No primeiro capítulo, foi feita uma reavaliação da metodologia da degradação oxidativa da 2-desoxirribose (2-DR) em sistemas geradores de radicais livres mediados por íons ferrosos. Este ensaio é amplamente utilizado para avaliar a atividade pró/antioxidante de moléculas isoladas ou extratos vegetais. Entretanto, verificou-se que o Fe(III) – produto das reações de Fenton e autooxidação do Fe(II) – reage com a 2-DR levando à formação de malonildialdeído (MDA). Os resultados mostram que a reação entre o Fe(III) e a 2-DR não é influenciada pela presença de antioxidantes, pelo tipo de tampão utilizado ou pela presença de quelantes de ferro. A reação do Fe(III) com a 2-DR consiste em um artefato metodológico, que não descontado propriamente (por meio de um novo branco proposto neste capítulo), pode levar à subestimação da atividade antioxidante ou a incorreta interpretação dos mecanismos de ação dos compostos estudados. Nos capítulos 2 e 3, foram estudados os efeitos do ácido caféico (AC) nas reações de Fenton e da autooxidação do Fe(II), respectivamente. Os resultados foram comparados com o polifenol ácido tânico (AT), composto bastante estudado em nosso laboratório e com conhecida atividade antioxidante. Em ambas as reações, o AC apresentou atividade antioxidante na metodologia da degradação oxidativa da 2-DR, na hidroxilação do DMPO (somente na reação Fenton) e na peroxidação lipídica em fígado de rato. A proteção conferida pelo AC foi diretamente proporcional à sua concentração e inversamente proporcional à concentração de ferro. O efeito do AC em concentrações micromolares sugere que o seu mecanismo de ação antioxidante seja do tipo quelante, ao formar um complexo 1:2 Fe(II):AC que inibe a oxidação proporcionada pelo radical hidroxil. Além disso, o AC apresentou uma componente sequestradora de radicais livres, o que foi verificado por meio da redução do radical ABTS e pelo prolongamento da fase lag da peroxidação lipídica. Tanto o AC como o AT aceleram o consumo de oxigênio pela reação de autooxidação do Fe(II) e foram capazes de reduzir Fe(III) a Fe(II) por uma transferência eletrônica de esfera interna.

Palavras-Chave: ferro; ácido caféico; ácido tânico; antioxidante; radicais livres; 2-desoxirribose; Fenton; autooxidação.

ABSTRACT

The present work was divided in three distinct chapters. In the first chapter, we performed a reevaluation of the 2-deoxyribose (2-DR) degradation assay for metal-mediated free radical formation. This assay is widely employed to evaluate the pro/antioxidant activity of pure compounds or plant extracts. However, we observed that Fe(III) – a product of Fenton and Fe(II) autoxidation reactions – reacts with 2-DR generating great amounts of malondialdehyde (MDA). The results show that the reaction between Fe(III) and 2-DR is not influenced by buffer composition, by the addition of antioxidant compounds or iron chelators. This reaction consists in a methodological artifact that leads to antioxidant capacity underestimation or/and incorrect interpretation of the studied mechanisms. To correct this interference, we proposed a new assay's blank – based on the use of Fe(III). In chapters 2 and 3, we studied the effects of caffeic acid (CA) on Fenton and Fe(II) autoxidation reactions, respectively. Results were compared to tannic acid (TA), a polyphenol largely studied in our lab with known antioxidant activity. In both Fenton and Fe(II) autoxidation reactions, CA acted as antioxidant by inhibiting the iron-mediated 2-DR degradation, DMPO hydroxylation (only in the presence of Fenton reactants) and rat liver lipid peroxidation. The protection was dose-dependent on CA concentration and inversely correlated to iron concentration. CA performed its antioxidant activity in the micromolar range, which suggests a chelating antioxidant mechanism. Furthermore, we suggested a 1:2 Fe(II)-CA ratio that could be responsible for the inhibition of hydroxyl radical mediated oxidations. CA also presented a free radical scavenger activity by reducing ABTS radical and extending the lag phase of lipid peroxidation. Moreover, we observed that both CA and TA increased the rate of Fe(II) autoxidation reaction (by accelerating the oxygen consumption) and were able to reduce Fe(III) to Fe(II) by an inner-sphere electron transfer.

Keywords: iron; caffeic acid; tannic acid; antioxidant; free radicals; 2-deoxyribose; Fenton; autoxidation.

1 - Introdução

A associação da participação de metais de transição - como ferro, cobre, cobalto, cromo, chumbo e arsênio – no desenvolvimento de diversas patologias, provocou um grande esforço da comunidade científica no sentido de prevenir ou remediar a alta absorção desses metais pelo organismo. A utilização de bombas contendo uma grande variedade de compostos químicos ao longo da primeira guerra mundial incentivou os cientistas da época a pesquisarem antídotos para os diversos tipos de envenenamento. O envenenamento por arsênio, metal utilizado em algumas bombas durante as guerras, levou ao desenvolvimento do composto Dimercaprol[®] por bioquímicos ingleses a fim de remover este metal do organismo das vítimas⁽¹⁾. Esta foi uma das primeiras evidências da chamada terapia quelante, que envolve uma série de compostos com afinidades diferentes por diversos metais.

Patologias associadas ao acúmulo de ferro (i.e. hemocromatose ou ataxia de Friedreich) são usualmente tratadas com a desferrioxamina (composto também chamado de desferal ou DFO), uma vez que este composto possui alta afinidade por íons férricos e complexa-os efetivamente até a sua remoção pela urina. Entretanto, o tratamento com DFO é limitado, uma vez que este é incapaz de atravessar certas barreiras celulares⁽²⁾. Alternativas ao tratamento com o DFO são constantemente pesquisadas, onde se busca compostos com alta afinidade por ferro e com baixa toxicidade.

A toxicidade dos metais de transição pode estar associada à participação destes em reações de oxi-redução que levam à formação de radicais livres⁽³⁾. A participação de radicais livres, em particular de espécies reativas de oxigênio (EROs), no desenvolvimento de quadros patológicos é amplamente descrita na literatura⁽⁴⁾. Tendo em vista os aspectos envolvendo a toxicidade de metais de transição, bem como os efeitos deletérios dos radicais livres, é de extrema importância o desenvolvimento de pesquisas que tenham como objetivo a caracterização de compostos antioxidantes capazes de complexar íons metálicos (em particular o ferro). Esta dissertação se insere nesse panorama, buscando elucidar os mecanismos da atividade antioxidante

dos ácidos caféico e tânico, ambos compostos fenólicos naturais com conhecida atividade antioxidante, em sistemas contendo íons ferro.

Esta dissertação foi dividida em três capítulos distintos. No primeiro capítulo fizemos uma reavaliação da metodologia da degradação oxidativa da 2-desoxirribose (2-DR), uma metodologia amplamente utilizada na literatura (e inclusive neste trabalho) para estudo da atividade pró/antioxidante de extratos vegetais ou moléculas isoladas⁽⁵⁻⁷⁾. Ao longo da discussão, diversas evidências são dadas mostrando uma interferência do íon Fe(III) na metodologia, interferência que, quando não descontada corretamente, consiste em um artefato metodológico. Propõe-se, neste trabalho, um novo branco para o método da degradação oxidativa da 2-DR, que possibilitará aos seus usuários a correta interpretação dos resultados.

No segundo capítulo estudamos o efeito do ácido caféico (AC) na reação de Fenton. Estudos sugerem o envolvimento do radical hidroxil, formado via reação de Fenton, em processos biológicos deletérios, como a oxidação de bases nitrogenadas do DNA^(8, 9), a peroxidação lipídica⁽¹⁰⁾ e a oxidação de proteínas^(11, 12). Nossos resultados mostram que o AC possui atividade antioxidante ao diminuir a formação do radical hidroxil, ao inibir a degradação oxidativa da 2-DR e a peroxidação lipídica. Além disso, os resultados sugerem que o principal mecanismo antioxidante do AC seja do tipo quelante.

No terceiro capítulo estudamos o efeito do AC, em comparação com o ácido tânico (AT), na reação de autooxidação do Fe(II). Ressalta-se que este é o primeiro estudo visando estudar o efeito desses compostos fenólicos nessa reação. Segundo alguns autores, a reação de autooxidação do Fe(II) pode desempenhar um papel mais importante na formação de espécies oxidantes que a reação de Fenton *per se*, uma que vez que a concentração intracelular de O₂ é cerca de 10³ vezes maior que a de H₂O₂^(13, 14). Nossos resultados mostram que tanto o AC como o AT são antioxidantes nesse sistema, inibindo a oxidação em diversas metodologias utilizadas.

2 - Revisão Bibliográfica

2.1 Radicais Livres

Radicaís livres são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital mais energético e que possuem existência independente⁽³⁾. Um elétron desemparelhado pode ocupar um orbital atômico (átomo radicalar) ou um orbital molecular (molécula radicalar). Radicaís livres possuem a capacidade de serem atraídos por um campo magnético, conferindo-lhes a propriedade paramagnética. Destaca-se que, em alguns casos, a presença de elétrons desemparelhados torna-os extremamente reativos, podendo reagir com diversas biomoléculas⁽³⁾.

Estas espécies podem ser formadas de três maneiras distintas: i) por meio da perda de um elétron de uma molécula não radicalar (**equação 1**); ii) do ganho de um elétron por uma molécula não radicalar (**equação 2**); iii) da fissão homolítica de uma ligação covalente (**equação 3**)⁽³⁾.



Diferentes espécies de radicaís livres podem ser produzidas no organismo, tais como radicaís de carbono, de enxofre, de nitrogênio e de oxigênio. Dessas espécies, destacam-se os radicaís livres de oxigênio pela a sua abundância e alta reatividade⁽¹⁵⁾.

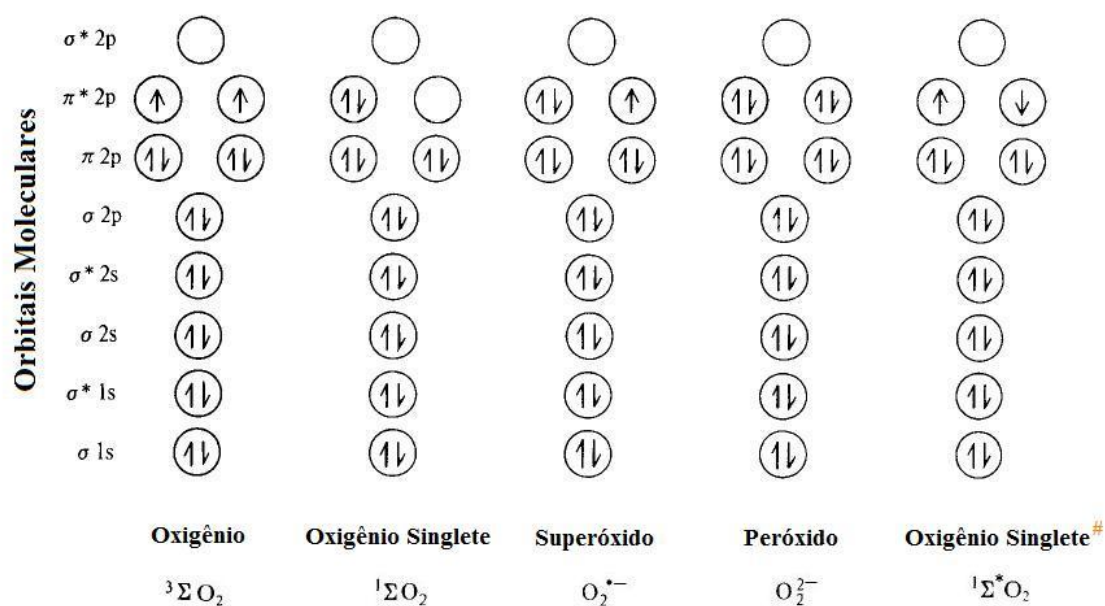
2.2 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

O gás oxigênio, molécula formada por dois átomos de oxigênio (O₂), compõe cerca de 21% da atmosfera terrestre. Mais de 99% do oxigênio naturalmente encontrado está sob a forma do isótopo ¹⁶O. É também encontrado sob a forma dos isótopos ¹⁷O (0,04%) e ¹⁸O (0,2%). Os organismos aeróbios utilizam este elemento para a produzir energia, onde é utilizado na síntese de ATP na cadeia transportadora de elétrons (CTE). Por outro lado, o

oxigênio é um agente tóxico que, em elevadas concentrações, pode ser letal^(3, 16).

Em seu estado fundamental, a molécula de oxigênio é paramagnética, possuindo dois elétrons desemparelhados em seus orbitais π^*2p_z e π^*2p_y (oxigênio tripleto ($^3\Sigma O_2$), $S=3$). A partir dela são formadas as espécies reativas de oxigênio (EROs) que estão relacionadas a diversos processos metabólicos e diversas patologias. Estas patologias serão posteriormente abordadas.

As EROs são espécies de oxigênio que, em geral, são mais reativas que o próprio O_2 . Podem ser formadas a partir de diferentes reduções da molécula de O_2 ou da absorção de energia por parte desta molécula (i.e. oxigênio singleto ($^1\Sigma O_2$), $S=1$). O **esquema 1** ilustra os orbitais moleculares do oxigênio e de diferentes EROs: as duas formas do oxigênio singleto, o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o ânion peróxido (O_2^{2-})⁽¹⁷⁾.



Esquema 1. Orbitais moleculares do oxigênio e de diversas EROs. [#]Estado singleto ($^1\Sigma^* O_2$) mais energético (15,1 kcal a mais) que o outro estado singleto ($^1\Sigma O_2$). Adaptado de Halliwell, (2006)⁽¹⁷⁾.

Na **tabela 1** são mostradas as principais EROs e algumas de suas principais características em sistemas biológicos.

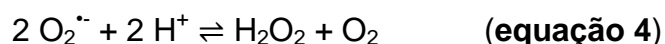
Tabela 1. Característica de algumas EROs biologicamente relevantes. Adaptado de Genestra (2007)⁽¹⁸⁾.

EROs	Representação	Características
Ânion radical superóxido	$O_2^{\cdot -}$	Estado monoelêtronicamente reduzido do O_2 Formado em muitas reações de autooxidação e na CTE É capaz de liberar o ferro da ferritina
Peróxido de hidrogênio	H_2O_2	Estado dieletronicamente reduzido do O_2 Formado por meio do desproporcionamento do $O_2^{\cdot -}$ Lipossolúvel; Capaz de atravessar membranas celulares Em solução aquosa é capaz de reduzir e oxidar íons metálicos
Radical hidroxil	$\cdot OH$	Estado trielêtronicamente reduzido Formado a partir da reação de Fenton e da decomposição do peroxinitrito Possui tempo de meia vida de aproximadamente 10^{-9} s e alta reatividade Ataca diversas biomoléculas
Hidroperóxido lipídico	LOOH	Formado a partir de reações entre radicais livres e lipídeos de membrana
Radical alcóxil e radical peróxil	$RO\cdot$ e $ROO\cdot$	Participam na cadeia de reações da peroxidação lipídica Produzidos na presença de oxigênio pela adição radicalar a duplas ligações ou pela abstração de hidrogênio
Hipoclorito	HOCl	Formado a partir do H_2O_2 pela mieloperoxidase Lipossolúvel e altamente reativo Capaz de oxidar grupamentos tióis, amino e metionina
Peroxinitrito	$ONOO\cdot$	Formado a partir da reação do $O_2^{\cdot -}$ com o $NO\cdot$ Lipossolúvel e possui reatividade similar ao HOCl Danifica diversas biomoléculas como DNA e proteínas Após protonação forma o ácido peroxinitroso, que pode sofrer homólise formando $\cdot OH$ e NO_2

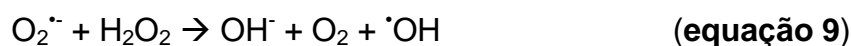
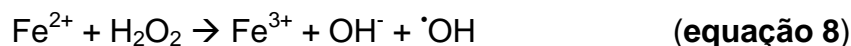
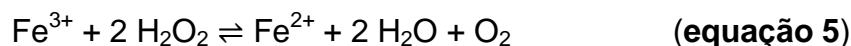
O $O_2^{\cdot -}$, formado a partir da redução monovalente do O_2 , é uma fonte primária de EROs. Sua formação no organismo pode ocorrer por diversos processos, tais como: **i)** autooxidação de pequenas moléculas (adrenalina, noradrenalina, cisteína, dopamina, entre outras); **ii)** autooxidação de íons metálicos (i.e. Fe(II) e Cu(I)); **iii)** oxidação de NADPH pelo complexo da enzima NADPH oxidase; **iv)** complexo de detoxificação da enzima citocromo p450; **v)**

oxidação da hipoxantina ou da xantina no metabolismo das purinas; **vi**) na cadeia transportadora de elétrons (CTE). A fonte mais relevante de produção de $O_2^{\cdot-}$ *in vivo* é a CTE na mitocôndria, que apresenta vazamento de elétrons principalmente via complexos I e III⁽¹⁹⁾. No complexo I o $O_2^{\cdot-}$ é formado via NADH desidrogenase e no complexo III via transferência de um elétron do radical ubisemiquinona (intermediário de reação da coenzima Q) para o O_2 ^(19, 20). Afirma-se que a quantidade de $O_2^{\cdot-}$ formado na CTE seja entre 0,1-0,4%⁽¹⁹⁻²¹⁾.

A partir do $O_2^{\cdot-}$ diversas outras EROs podem ser formadas. Uma das principais é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, embora não seja uma espécie radicalar, possui potencial oxidante elevado. É formado espontaneamente a partir do desproporcionamento (ou dismutação) do $O_2^{\cdot-}$ (**equação 4**). Esta reação pode ocorrer catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD)⁽²²⁾ (tema que será abordado em tópico específico).

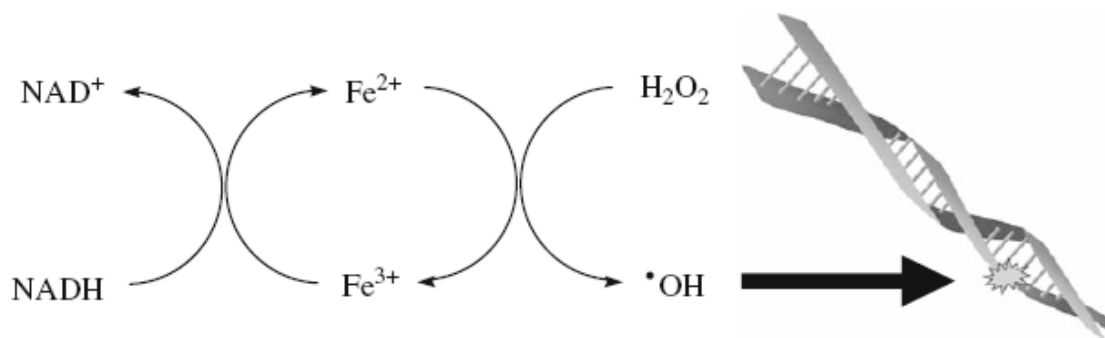


O peróxido de hidrogênio apresenta um risco em potencial, pois é capaz de formar o radical hidroxil ($\cdot OH$). O $\cdot OH$, por sua vez, é a espécie com o maior potencial oxidante em sistemas biológicos. Pode ser formado por meio da reação do H_2O_2 com íons metálicos (i.e. ferro, cobre), via reação de Fenton (**equação 8**)^(15, 23, 24) ou da reação do H_2O_2 com o $O_2^{\cdot-}$ (**equação 9** – conhecida como reação de Haber-Weiss)^(25, 26).



O $\cdot OH$ possui um tempo de meia vida da ordem de 10^{-9} s e provavelmente reagirá com a primeira molécula que encontrar. Suas constantes de reação com biomoléculas variam entre 10^7 e $10^{10} M^{-1} \cdot s^{-1}$,

tornando-o capaz de oxidar com facilidade carboidratos, proteínas, lipídeos e o próprio DNA (**esquema 2**)^(15, 17, 18).



Esquema 2. Formação do radical hidroxil via reação de Fenton e subsequente ataque ao DNA. O Fe(III) pode ser reciclado por redutores biológicos (i.e. NADH). Retirado de Perron e Brumaghim (2009)⁽²⁷⁾.

2.3 Efeitos biológicos dos Radicais Livres

Radicaís livres estão, em geral, associados a ações deletérias no organismo. Entretanto, eles ocorrem naturalmente e participam de processos metabólicos essenciais a vida. Tal fato é evidenciado na sua participação em processos inflamatórios onde estão envolvidos na defesa contra vírus e bactérias⁽²⁸⁾. Outro exemplo é o radical óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), uma espécie reativa de nitrogênio (ERNs), que participa na comunicação entre neurônios e possui ação vaso dilatadora que influencia, inclusive, na pressão arterial.

As causas tóxicas associadas ao oxigênio só vieram ao conhecimento da comunidade científica na década de 1950. Até então, sabia-se que radiações ionizantes eram capazes de formar radicaís livres. A incidência de raios-X, por exemplo, em soluções aquosas levava a formação de $\text{H}\cdot$ e $\cdot\text{OH}$ e, em uma etapa posterior, a formação de H_2O_2 e $\text{HO}_2\cdot$ ⁽²⁹⁾. Em 1954, Rebeca Gerschman e colaboradores observaram que os efeitos causados em ratos por radiação ionizante (raios-X) eram os mesmos observados na presença de concentrações elevadas de oxigênio (5-6 atm de O_2). Com bases nesses dados, os autores propuseram a teoria que mostra o envolvimento do oxigênio na produção de radicaís livres com poder oxidante⁽³⁰⁾. Desde então, vários estudos mostraram que radicaís livres estão associados a diversas doenças e também ao envelhecimento⁽³¹⁾.

O envelhecimento celular é tópicos de discussão e especulação na comunidade científica há muitos anos. Durante a primeira metade do século XX diversos trabalhos correlacionaram atividade metabólica com longevidade. Sabia-se também que quanto maior a taxa metabólica maior era a produção de radicais livres. No entanto, a conexão entre radicais livres e envelhecimento ainda não havia sido feita.

Dois anos após a publicação de Gerschman e colaboradores, Denham Harman (1956) publicou seu trabalho intitulado “*Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry*”. Neste trabalho, Harman propôs que o envelhecimento está basicamente associado a ataques deletérios de radicais livres a constituintes celulares⁽³²⁾. A partir de então, a pesquisa envolvendo bioquímica de radicais livres cresceu exponencialmente, sendo, atualmente, objeto de pesquisa de vários cientistas.

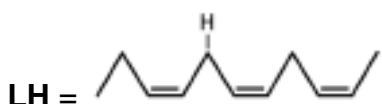
De maneira geral, o organismo lida muito bem com a produção excessiva de radicais livres. Isso ocorre devido ao sistema de defesa antioxidante que organismo dispõe e que mantém o equilíbrio entre a produção excessiva de radicais livres e os antioxidantes. Quando há uma alteração neste balanço, que pode ser devido a um aumento na produção de radicais livres e/ou uma diminuição no sistema de defesa antioxidante, ocorre o chamado estresse oxidativo. Este quadro de estresse, com aumento na produção de radicais livres, provoca danos a diversas biomoléculas como lipídeos (causando a peroxidação lipídica), proteínas (causando a oxidação de proteínas) e ácidos nucleicos (causando a oxidação de DNA)^(3, 15, 33).

2.3.1 Peroxidação Lipídica

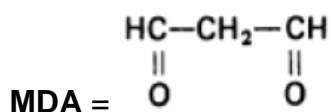
O radical hidroxil pode reagir com lipídeos de membrana provocando a peroxidação lipídica. Ao reagir com os fosfolipídios presentes na membrana das células, o $\cdot\text{OH}$ abstrai um hidrogênio e um elétron (H^\cdot) de um ácido graxo poliinsaturado (representado aqui por **LH** – vide estrutura abaixo) dando início a peroxidação lipídica (fase **I; iniciação**)^(3, 15). A abstração do H^\cdot leva a formação de H_2O e de um radical lipídico (L^\cdot). Este radical lipídico sofre um rearranjo formando um dieno conjugado (que pode ser observado espectrofotometricamente em 234 nm) e então reage com o O_2 presente no

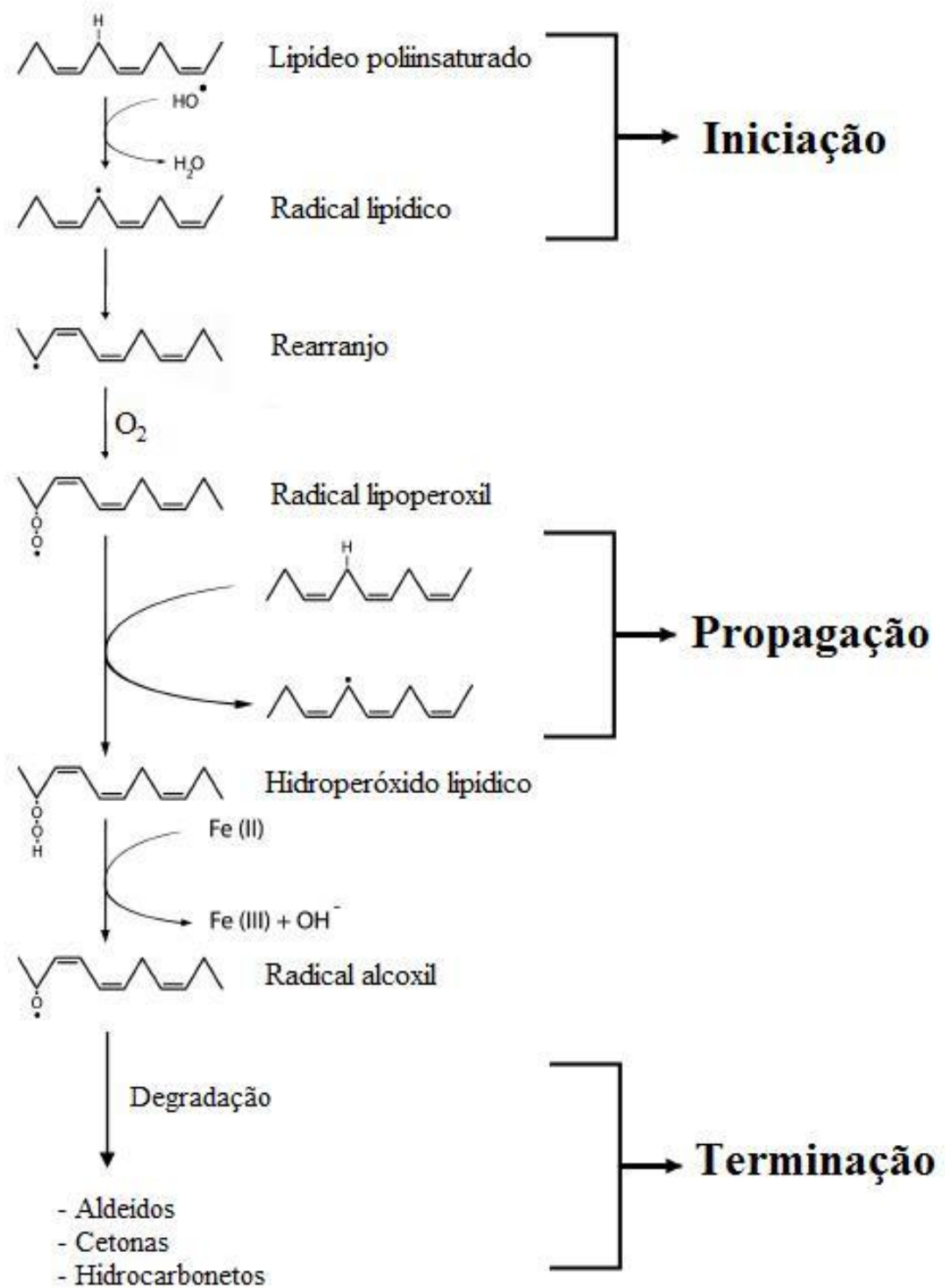
meio para formar o radical lipoperoxil (**LOO[•]**). O radical lipoperoxil, por sua vez, é o responsável pelo início da segunda fase da peroxidação lipídica, a propagação (fase **II**)^(3, 15). Ele, diferentemente do radical lipídico (**L[•]**), tem a capacidade de reagir com outro ácido graxo presente na membrana celular e abstrair um hidrogênio, formando hidroperóxido lipídico (**LOOH**) e um novo radical lipídico (vide **esquema 3**).

em que,



A terminação da peroxidação lipídica (fase **III**) pode ocorrer de duas maneiras distintas: **1**) reação entre duas espécies radicalares (**LO[•]**, por exemplo) formando um produto estável; ou **2**) decomposição do **LOOH**, **LO[•]** e **LOO[•]** formando aldeídos (principalmente o malonildialdeído (**MDA**) e o 4-hidroxi-s-nonenal (**4-HNE**)), cetonas e outros hidrocarbonetos⁽¹⁵⁾. Diversos estudos mostram que os produtos da peroxidação lipídica (aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos) são extremamente tóxicos ao organismo e estão relacionados ao envelhecimento e a diversas patologias^(17, 34, 35). Além disso, os aldeídos formados nesse processo podem oxidar proteínas levando à formação de resíduos carbonílicos (vide seção 2.3.2 para maiores detalhes).





Esquema 3. Sequência de reações da peroxidação lipídica. Adaptado de Hermes-Lima, 2004⁽¹⁵⁾.

Ao observar um gráfico acompanhando o curso temporal da peroxidação lipídica notam-se, claramente, as três fases supracitadas (**figura 1**). Nos primeiros minutos observa-se uma região com baixos níveis de

peroxidação (coeficiente angular pequeno) e baixos níveis de produtos (pouco MDA formado) (fase I ou fase lag), seguida por uma região com um aumento significativo em ambos os níveis (alto valor do coeficiente angular e aumento nos níveis de MDA formado) (fase II ou fase log) e, por último, uma região com baixos níveis de peroxidação (coeficiente angular pequeno) e altos níveis de produtos (altos valores de MDA formado) (fase III ou terminação).

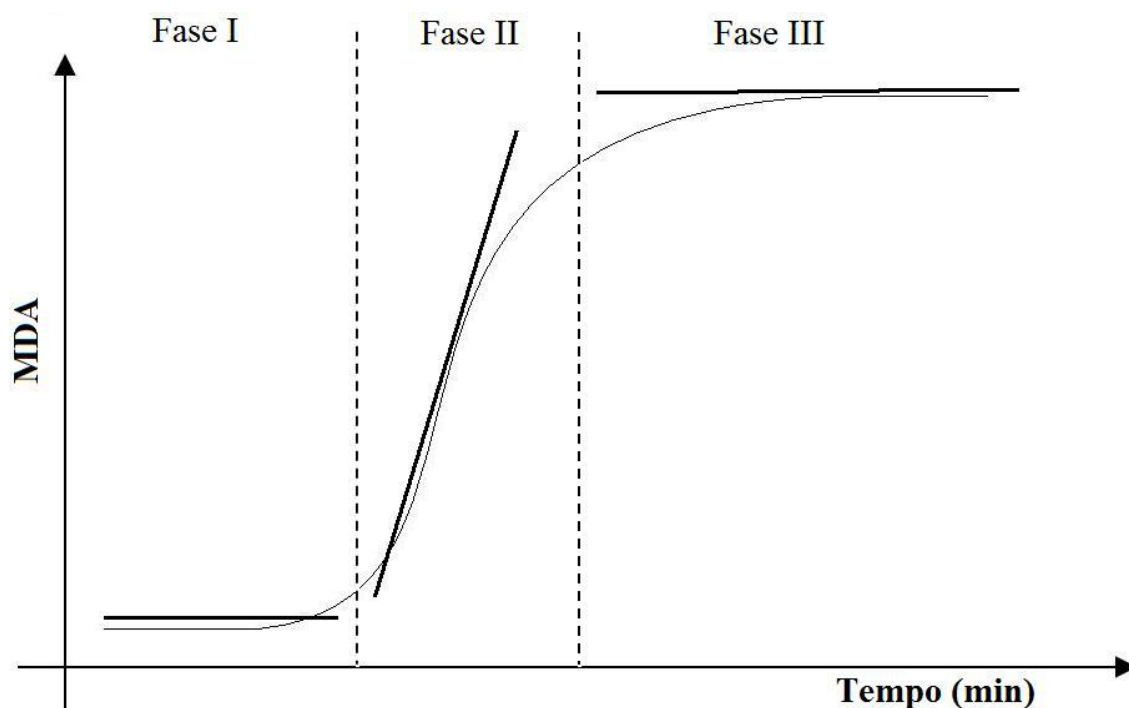


Figura 1. Perfil do curso temporal da peroxidação lipídica.

2.3.2 Oxidação de Proteínas

As EROs, em especial o radical hidroxil, ao reagir com proteínas e enzimas pode oxidá-las. Esta oxidação pode levar à clivagem de ligações peptídicas, ao aparecimento de grupos carbonílicos na estrutura da proteína, à inativação da enzima e até mesmo à quebra proteolítica⁽³⁶⁾. Um estudo clássico de Szveda e Stadtman mostra os efeitos do radical hidroxil, formado via reação de Fenton, na atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). Eles observaram que o radical hidroxil levou à formação de um resíduo carbonílico na estrutura da enzima, que acarretou em sua inativação^(15, 37). Estes resíduos carbonílicos são os principais produtos da oxidação de proteínas e são considerados marcadores clássicos de estresse oxidativo. A

quantidade de proteínas carboniladas pode ser quantificada espectrofotometricamente em 355-390 nm utilizando o reagente 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH)⁽³⁸⁾. Além disso, as EROs são capazes de oxidar grupamentos sulfidríla (-SH) de proteínas, sendo os resíduos cisteína e metionina os mais susceptíveis à oxidação. Tal oxidação pode levar a alterações conformacionais e, conseqüentemente, à desnaturação da proteína^(3, 15).

2.3.3 Oxidação de DNA

O DNA é uma molécula longa composta por um grande número de desoxirribonucleotídeos. Cada um destes segmentos é composto por uma base nitrogenada, pelo açúcar 2-desoxirribose, e por um grupo fosfato. As bases nitrogenadas podem ser divididas em dois grupos: purinas (adenina e guanina) e pirimidinas (timina e citosina). Dentro do núcleo, duas cadeias de DNA estão associadas formando uma dupla hélice, com a cadeia hidrofóbica (composta pelas purinas e pirimidinas) voltada para dentro e os grupos fosfato e 2-desoxirribose voltados para fora. Em condições fisiológicas (pH 7,2) os grupos fosfato adquirem carga negativa, o que lhes confere a capacidade de ligar metais (i.e. ferro e cobre)⁽³⁾.

Em condições normais, a molécula de DNA é bastante estável, mas sofre naturalmente alterações químicas. Diversos trabalhos mostraram a capacidade do estresse oxidativo em acelerar estas alterações, ocasionando mutações genéticas^(3, 9).

Devido à capacidade do DNA em ligar metais, reações do tipo Fenton podem ocorrer constantemente ao seu redor. O radical hidroxil formado nestas reações pode reagir com o próprio DNA, em sítio específico, e provoca danos às bases purina e pirimidina como também ao açúcar 2-desoxirribose^(3, 9, 31). Dentre esses danos, destaca-se a formação de 8-hidroxi-guanina (8-OHG), produto do ataque do $\cdot\text{OH}$ ao carbono C-8 da guanina. Este produto é um marcador de estresse oxidativo e pode ser quantificado por HPLC ou por GC-MS⁽⁹⁾. O ataque ao açúcar 2-desoxirribose pelo $\cdot\text{OH}$ leva, após uma série de reações, à quebra da ligação C-C e a conseqüente fragmentação do DNA. Outro produto desse ataque é o malonildialdeído (MDA), produto tóxico que

possui propriedades mutagênicas e carcinogênicas. O MDA pode ser detectado, *in vitro*, espectrofotometricamente por meio do ensaio de TBARS (vide seção 3.2)^(3, 9).

2.4 Patologias associadas aos Radicais Livres

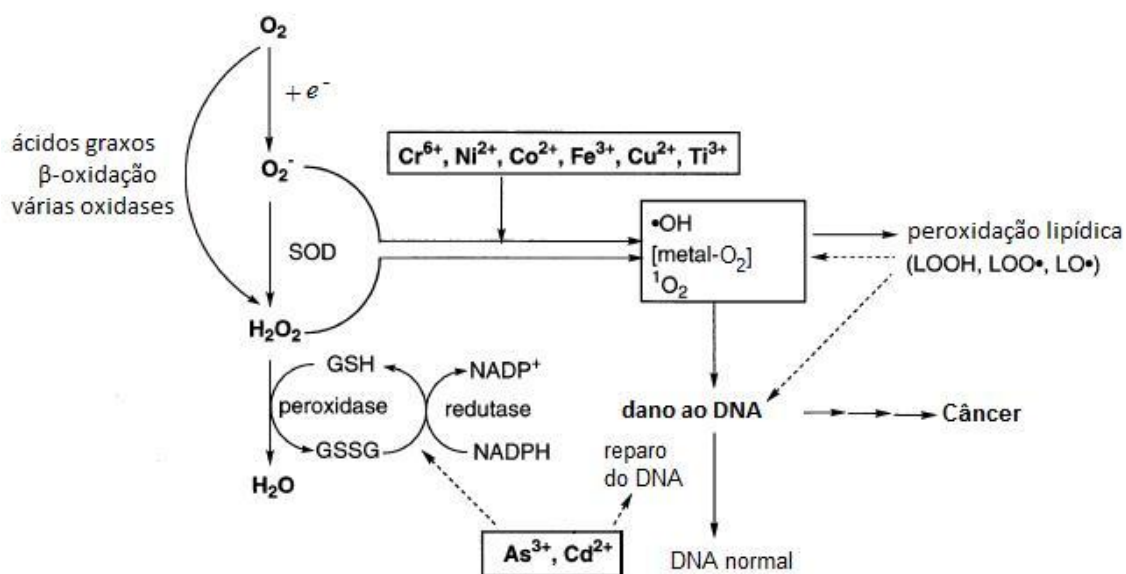
Ao quadro de estresse oxidativo foram associadas diversas patologias tais como doenças cardiovasculares, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica (ELA), diabetes Mellitus, artrite reumatóide e diversos tipos de câncer^(31, 39). A seguir serão abordados, sucintamente, o envolvimento de radicais livres nas doenças de Alzheimer, Parkinson e câncer.

2.4.1 Câncer

A associação entre a participação de EROs (especialmente o radical hidroxil) na patologia de câncer vem da sua capacidade em modificar a estrutura do DNA, levar a replicações imprecisas e, com isso, promover mutações. Além disso, danos oxidativos a lipídeos e proteínas (i.e. enzimas de reparo do DNA) estão também associados a processos carcinogênicos^(17, 31, 39).

A participação de metais de transição no desenvolvimento de câncer é discutida na literatura. Estudos mostram que níveis elevados de ferro ou cobre no organismo podem levar a uma predisposição a esse processo, isso devido à capacidade desses íons metálicos em participar de reações de oxi-redução que levam a produção de radicais livres⁽⁴⁰⁻⁴²⁾.

Além de íons ferro e cobre, outros metais são relatados como mediadores de processos carcinogênicos. Kawanishi e colaboradores (2002) relatam a capacidade dos íons cromo, níquel, cobalto, titânio, arsênio e cádmio em mediar reações de oxi-redução e produção de radicais livres⁽⁴⁾. O **esquema 4** ilustra a participação desses metais nos processos que podem levar ao câncer.



Esquema 4. Esquema ilustrando a participação de metais de transição em processos carcinogênicos. Adaptado de Kawanishi, 2002⁽⁴⁾.

Os metais podem estar atuando como mediadores de reações tipo Fenton, formando o radical hidroxil que irá oxidar o DNA (vide seção 2.3.3). Podem também oxidar proteínas ou enzimas (vide seção 2.3.2) que participam do sistema de defesa antioxidante (i.e. glutathiona (GSH), glutathiona redutase (GR)), ou ainda, oxidar as enzimas do sistema de reparo do DNA⁽⁴⁾.

2.4.2 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA), caracterizada pelo neuropatologista alemão Alois Alzheimer em 1907, é uma desordem neurodegenerativa progressiva que acarreta perda de memória e diversos outros distúrbios cognitivos⁽⁴³⁾. Do ponto de vista patológico, observa-se no cérebro de indivíduos com DA, dentre outras alterações, a presença de placas senis com acúmulo da proteína β -amilóide e perda neuronal. A presença dessa proteína no cérebro de indivíduos com esta doença constitui no achado histológico mais característico da DA.

Embora a etiologia dessa patologia ainda não esteja totalmente esclarecida, há evidências que apontam para a participação de radicais livres no seu desenvolvimento⁽⁴⁴⁾. Estudos mostram que antes do aparecimento dos primeiros sintomas ocorre um aumento nos níveis de estresse oxidativo nas

regiões afetadas pela doença. São observados, por exemplo, aumentos nos produtos da peroxidação lipídica (i.e. MDA, 4-HNE), nos produtos da oxidação do DNA (i.e. 8-OHG) e nos produtos da oxidação de proteínas (i.e. proteínas carboniladas)⁽⁴⁴⁾. Outros autores mostram que a própria proteína β -amilóide possui propriedades oxidantes, sendo capaz de gerar radicais livres (**equação 10**). Em outras palavras, a deposição desta proteína leva a um aumento nos níveis de estresse oxidativo^(45, 46).



Há evidências, entretanto, que apontam em outra direção. Perry e colaboradores propõem que a deposição da proteína β -amilóide seja uma resposta do organismo ao estresse oxidativo, isto é, seria um mecanismo de defesa adotado pelo cérebro, buscando a manutenção ou a recuperação das funções prejudicadas^(45, 47).

O envolvimento de metais de transição na DA já foi previamente descrito^(48, 49). A literatura destaca o ferro como um importante causador de estresse oxidativo, uma vez que é encontrado em quantidades consideráveis no cérebro de indivíduos com DA e possui a capacidade de gerar radicais hidroxil^(8, 44, 45, 50). Além disso, trabalhos mostraram que íons ferro são capazes de promover a deposição da proteína β -amilóide⁽⁵¹⁾. Huang e colaboradores (2004) mostraram evidências que zinco, cobre e ferro são indutores do processo de sedimentação e oligomerização da β -amilóide, fator determinante na caracterização da DA⁽⁵²⁾.

2.4.3 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP), formalmente descrita pela primeira vez em 1817 pelo médico inglês James Parkinson, é uma desordem neurodegenerativa caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos na *substantia nigra*⁽⁴³⁾. Caracteriza-se também pela formação de agregados protéicos intracelulares denominados corpúsculos de Lewy (do inglês, Lewy Bodies), cuja principal proteína é a α -sinucleína⁽⁵³⁾.

A causa da morte seletiva dos neurônios dopaminérgicos na *substantia nigra* ainda não foi totalmente esclarecida. Sabe-se, entretanto, que a produção excessiva de radicais livres pode levar à ocorrência desses sintomas^(15, 45). Diversos trabalhos mostraram alterações nos marcadores de estresse oxidativo na DP, tais como aumento nos níveis de hidroperóxidos lipídicos, aumento na oxidação do DNA, diminuição na atividade da enzima superóxido dismutase, diminuição nos níveis de GSH e, principalmente, aumento nos níveis de ferro^(54, 55). Por outro lado, há evidências que mostram que o aumento nos níveis de ferro na *substantia nigra* é um efeito secundário, ocorrendo após o aparecimento de alguns sintomas⁽⁴⁵⁾.

Um fato curioso se encontra no tratamento desta patologia, que é feito administrando-se o precursor da dopamina, o L-Dopa (3,4-dihidroxi-fenilalanina ou também conhecido com levodopa). Inicialmente, os efeitos do tratamento são benéficos, sendo capaz de reverter alguns sintomas. Por outro lado, a dopamina é capaz de formar H_2O_2 via monoamino oxidase B. A presença de H_2O_2 e dos altos níveis de ferro encontrados na DP pode gerar radicais $\cdot OH$ via reação de Fenton, levando ao aumento dos níveis de estresse oxidativo e à piora no quadro clínico do paciente⁽⁴⁵⁾.

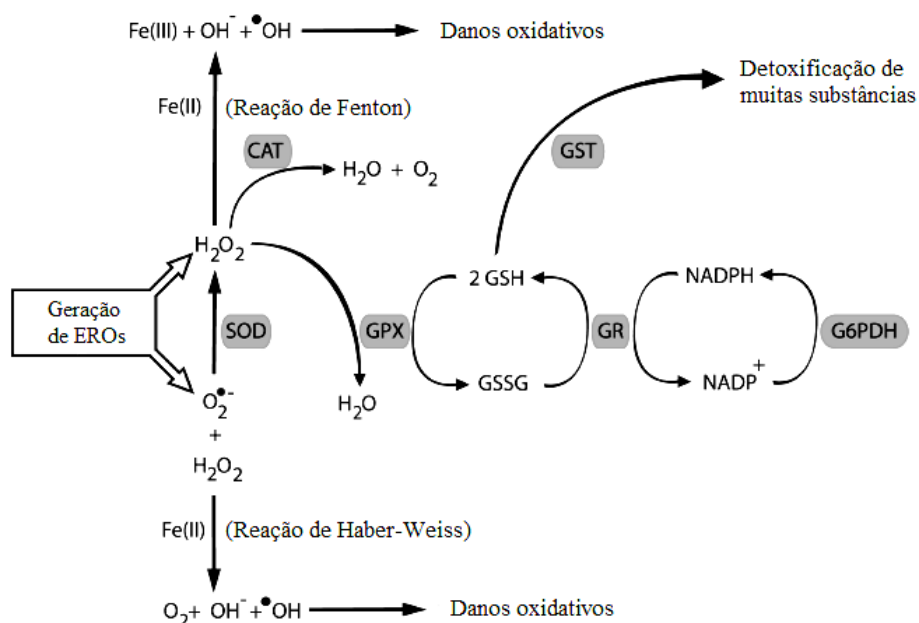
2.5 Defesas Antioxidantes

Levando em consideração os efeitos tóxicos do O_2 e das EROs no metabolismo de seres aeróbios, é razoável assumir que estes organismos possuam um sistema para se defenderem dos efeitos tóxicos causados por estas espécies. A este mecanismo de defesa é dado o nome de sistema de defesa antioxidante, cuja presença é de crucial importância para a manutenção do atual modo de vida de seres aeróbios. Este sistema se divide em duas grandes categorias, a enzimática e a não enzimática. Dentre os compostos não enzimáticos, existem os que são produzidos endogenamente (exemplos de compostos do sistema de defesa enzimático e não enzimático estão demonstrados na **Tabela 2**).

Tabela 2. Exemplos de compostos dos sistemas de defesa enzimático e não enzimático.

Enzimáticos	Não Enzimáticos
Superóxido Dismutase (SOD)	Ácido Úrico
Catalase (CAT)	Glutathiona (GSH)
Glutathiona Peroxidase (GPx)	Coenzima Q
Glutathiona Redutase (GR)	α -tocoferol (Vitamina E)
Glutathiona – S – Transferase (GST)	β -caroteno
Glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH)	Flavonóides
	Polifenóis

A SOD catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em O_2 e H_2O_2 (vide **esquema 5**). A catalase remove H_2O_2 convertendo-o em H_2O e O_2 . De maneira semelhante à catalase, a GPx remove H_2O_2 utilizando como substrato o peptídeo glutathiona (na sua forma reduzida - GSH). A GST é uma enzima responsável pela detoxificação de xenobióticos (compostos estranhos ao organismo), utilizando também como o substrato a GSH. A GR é a enzima responsável pela reciclagem da glutathiona, reduzindo-a da forma oxidada (GSSG) para a forma reduzida (GSH). Para esta atividade, a GR utiliza NADPH (proveniente da via das pentoses) como substrato, oxidando-o a forma $NADP^+$. A G6PDH é a enzima responsável pela reciclagem de $NADP^+$ a NADPH.

**Esquema 5.** Mecanismo de defesa antioxidante enzimático. Adaptado de Hermes-Lima (2004)⁽¹⁵⁾. Retirado de Dalvi (2008)⁽⁵⁶⁾.

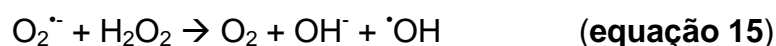
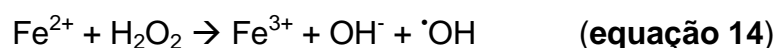
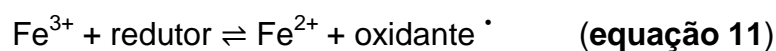
2.6 Ferro

O ferro, quarto elemento em abundância na crosta terrestre, é um metal amplamente utilizado na sociedade. Relatos de historiadores afirmam que este metal já era utilizado há cerca de 6.000 anos, onde eram colocados nas pontas de lanças para auxiliar na caça. Ganhou imensa importância durante a idade do ferro. No princípio, utilizava-se carvão vegetal como fonte de calor para extrair o metal de seus minerais. No século XVIII, com a forte crise de carvão vegetal sofrida pela Inglaterra, Abraham Darby utilizou, pela primeira vez, o coque (combustível derivado do carvão) para tal obtenção. Com a revolução industrial e o advento do aço (liga metálica composta principalmente por Fe e C) este metal ganhou inúmeras aplicações e tornou-se o mais utilizado dos metais.

O ferro está localizado no grupo 8 e no quarto período da tabela periódica. Possui número atômico 26 e configuração eletrônica $[\text{Ar}]3d^64s^2$. Seus estados de oxidação podem variar de II a VI⁽⁵⁷⁾, sendo os estados II (íon ferroso), III (íon férrico) e IV (íon ferril) os biologicamente mais relevantes⁽³⁾. Os estados V e VI são altamente instáveis, e são encontrados somente em condições específicas⁽⁵⁷⁾. Íons ferrosos ($[\text{Ar}]3d^6$) quando coordenados a ligantes de campo forte (CN^- , CO ou a o-fenantrolina) possuem todos os elétrons emparelhados em seus orbitais t_{2g} , sendo, desta maneira, diamagnéticos. Estes complexos possuem alta energia de estabilização do campo cristalino e são, portanto, muito estáveis. Por outro lado, quando coordenados a ligantes de campo fraco (haletos, H_2O , EDTA ou a piridina) possuem quatro elétrons em seus orbitais t_{2g} e dois elétrons em seus orbitais e_g , sendo, desta maneira, paramagnéticos. Estes complexos, por sua vez, possuem baixa energia de estabilização do campo cristalino e são instáveis, podendo ser facilmente oxidados⁽⁵⁷⁾. A idéia descrita neste parágrafo pode ser aplicada (com modificações) para íons férricos ($[\text{Ar}]3d^5$). Além disso, íons férricos serão paramagnéticos, independente do ligante ao qual estão coordenados⁽⁵⁷⁾.

A capacidade dos metais de transição em doar e receber elétrons torna sua química redox importante em sistemas biológicos, permitindo a eles

participar em diversos processos metabólicos. O ferro pode ser encontrado no organismo em concentrações que variam entre 35 e 50 mg/kg, valores que variam conforme as características de cada indivíduo⁽¹⁵⁾. Ele possui um papel importante na síntese de DNA, no transporte de elétrons, no transporte de oxigênio e é um componente essencial na estrutura de diversas proteínas e enzimas incluindo a hemoglobina, a mioglobina, a catalase, as peroxidases, os citocromos e a óxido nítrico sintase. Além disso, influencia na expressão de proteínas que respondem diretamente a concentração de ferro no organismo⁽¹⁵⁾. A sua capacidade de doar e receber elétrons também pode ser prejudicial, pois participa diretamente na formação de radicais livres (em especial o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$)) mediando as reações de Fenton e autoxidação do Fe(II) (**esquema 6**)^(15, 23, 25). Na sua forma férrica é também capaz de formar o $\cdot\text{OH}$ mas, para isso, necessita da presença de um agente redutor (i.e. ascorbato, glutathione, o $\text{O}_2^{\cdot-}$, etc), (**equação 11**). O Fe(II) formado após a redução, sofre o processo da autoxidação que, em sua última etapa, forma $\cdot\text{OH}$.



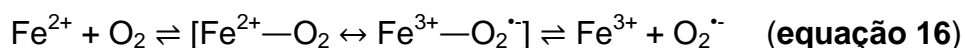
Esquema 6. Esquema ilustrando a participação do ferro nas reações da autoxidação do Fe(II). A **equação 14** representa a reação de Fenton e a **equação 15** representa a reação de Haber-Weiss.

2.6.1 Fenton e a Autoxidação do ferro

As reações de Fenton e autoxidação do Fe(II) são consideradas importantes fontes de radicais livres em sistemas biológicos^(3, 15, 35). Autores afirmam que a autoxidação tem um papel mais importante na formação de EROs quando comparada à reação de Fenton. Devido à razão $[\text{O}_2]/[\text{H}_2\text{O}_2] \geq 10^3$ em condições fisiológicas, Qian e Buettner (1999) sugerem que a reação de Fenton com H_2O_2 pré-existente seja apenas uma pequena contribuição na

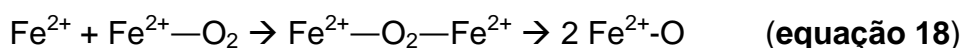
formação de radicais $\cdot\text{OH}$. Sugerem ainda que a reação de íons ferrosos com O_2 possa levar, além da formação de $\cdot\text{OH}$, a espécies com potencial oxidante similar ao próprio $\cdot\text{OH}$ ⁽¹³⁾.

Ainda no início da década de 1980, trabalhos apontaram a possível existência de espécies com potenciais oxidantes similares ao $\cdot\text{OH}$ ⁽⁵⁸⁾. Rush e Koppenol, em 1986, apresentaram evidências da formação de um intermediário na reação do complexo Fe(II)-EDTA com H_2O_2 ⁽⁵⁹⁾. A exata natureza deste intermediário era desconhecida, mas sabia-se que era capaz de oxidar o ferrocitocromo C, capaz de iniciar peroxidação lipídica, mas incapaz de oxidar alguns compostos conhecidos como *scavengers* (seqüestradores) de $\cdot\text{OH}$ (i.e. benzoato, acetato, *t*-butanol e arginina). A incapacidade de oxidar tais *scavengers* são características incompatíveis com a natureza do $\cdot\text{OH}$. Estas observações levaram os autores a conclusão que o intermediário na reação do Fe(II)-EDTA com o H_2O_2 pode ser o complexo ferril-EDTA (Fe(IV) ou FeO^{2+})⁽⁵⁹⁾. Em consonância com este trabalho, está o clássico estudo de Qian e Buettner (1999)⁽¹³⁾. Segundo eles, os danos biológicos causados pelas reações de Fenton e/ou autooxidação do Fe(II), como a peroxidação lipídica, não são necessariamente iniciados por radicais $\cdot\text{OH}$, mas sim por oxidantes como os íons perferril e ferril. O íon perferril é um intermediário formado via reações $\text{Fe}^{2+}/\text{O}_2$ ou $\text{Fe}^{3+}/\text{O}_2^{\cdot-}$, conforme ilustrado na **equação 16**⁽¹³⁾.



Íon Perferril

O íon ferril, por sua vez, pode ser formado via reação do Fe(II) com o H_2O_2 (**equação 17**) (conforme mostrado por Rush e Koppenol⁽⁵⁹⁾) ou via reação do íon perferril com outro íon Fe(II) (**equação 18**), conforme ilustrado abaixo.



Íon Perferril

Íon Ferril

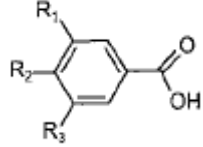
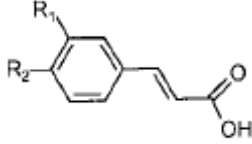
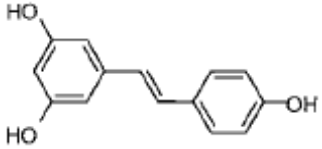
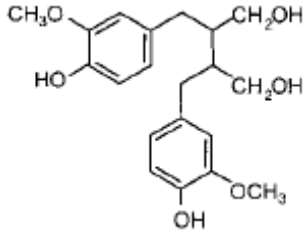
Qian e Buettner mostraram também que a adição das enzimas SOD e catalase não inibem completamente as oxidações mediadas por Fe(II) e O₂, o que ilustra a parcial independência destas reações do O₂^{•-} e H₂O₂⁽¹³⁾.

2.7 Polifenóis

Os fenóis e polifenóis são compostos naturalmente produzidos no metabolismo secundário das plantas⁽⁶⁰⁾. O metabolismo secundário das plantas surgiu ao longo do processo evolutivo como um mecanismo de defesa, protegendo-as contra diversos tipos de patógenos, contra a radiação ultravioleta e auxiliando no processo de polinização, uma vez que contribuem para a coloração da planta⁽⁶¹⁾.

Além de contribuírem para o mecanismo de defesa no reino vegetal, diversos estudos mostraram que polifenóis possuem ação protetora contra doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes Mellitus, e diversos tipos de câncer em humanos^(60, 62, 63). Segundo Halliwell (2007), a presença de polifenóis na dieta é de extrema importância, uma vez que podem diminuir a absorção excessiva de metais (como Fe e Cu) e proteger contra os danos oxidativos a eles associados^(60, 63).

Os polifenóis podem ser classificados em quatro grandes categorias, assim divididas: i) ácidos fenólicos; ii) flavonóides; iii) estilbenos; e iv) lignanos. Exemplos de compostos e estruturas de cada categoria podem ser visualizados na **tabela 3**⁽⁶⁴⁾.

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

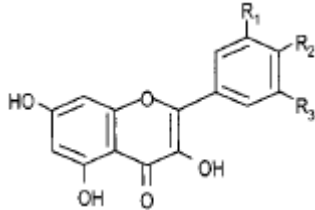
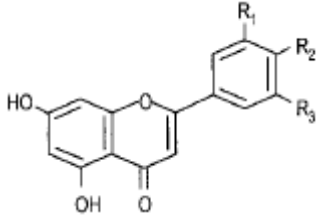
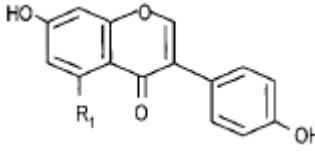
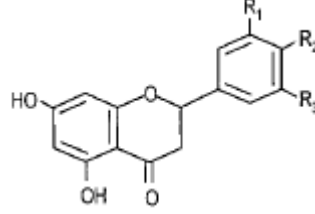
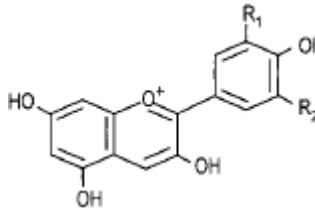
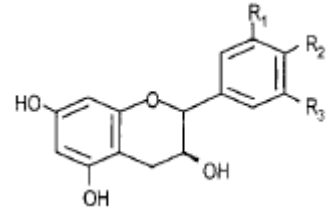
Flavonóides			
• Flavonóis	Kaempferol ($R_2=OH$; $R_1=R_3=H$)	Cebola, brócolis, tomate	
	Quercetina ($R_1=R_2=OH$; $R_3=H$)	cereja, alho poró	
• Flavonas	Luteolina ($R_1=R_2=OH$)	Salsa, aipo	
	Apigenina ($R_1=H$; $R_2=OH$)		
• Isoflavonas	Daidzeína ($R_1=H$)	Soja	
	Genisteína ($R_1=OH$)		
• Flavanonas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

Tabela 3. Classes de polifenóis. Adaptado de Manach e colaboradores (2004)⁽⁶⁴⁾. Retirado de Dalvi (2008)⁽⁵⁶⁾.

2.7.1 Ácido Tânico

O ácido tânico (AT) é um polifenol com fórmula molecular $C_{76}H_{52}O_{46}$, composto por uma molécula de glicose central. Ligados a essa glicose, existem cinco cadeias compostas por duas moléculas de ácido gálico ligadas por esterificação (**figura 2**).

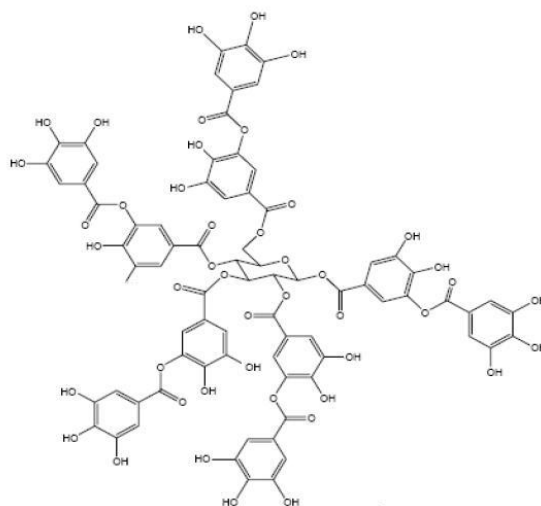


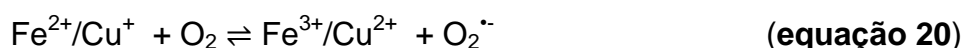
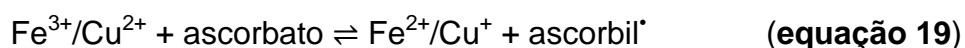
Figura 2. Fórmula estrutural do AT.

O AT é produzido pelo metabolismo secundário das plantas e pertence à grande categoria dos ácidos fenólicos. É um tanino hidrolisável encontrado em diversos alimentos tais como, uvas, lentilhas, chocolate, vinho tinto, cerveja, café, chá preto e chá verde^(65, 66).

Diversos estudos mostraram vários efeitos antioxidantes⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾, anticarcinogênicos^(70, 71), antimicrobianos e antimutagênicos⁽⁶⁵⁾ do AT em ratos. Stocks (1970) reportou uma correlação inversa entre a ingestão de chás (que contém altas concentrações de taninos, em especial, o AT) e a incidência de câncer estomacal em seres humanos⁽⁷²⁾. Estudos mostraram que o consumo de chá verde em grandes quantidades estaria relacionado à menor incidência de câncer⁽⁷³⁾. Segundo King-Thom e colaboradores (1998), os efeitos benéficos reportados para o chá verde podem estar, em grande parte, associados aos taninos ali presentes⁽⁶⁵⁾. Dentre os efeitos benéficos do AT, inclui-se a capacidade em diminuir o perfil lipídico e níveis de lipoperóxidos no sangue de ratos hipertensos⁽⁶⁸⁾.

Além das propriedades antioxidantes *in vivo*, diversos trabalhos mostraram a atividade antioxidante do AT *in vitro* ⁽⁷⁴⁻⁷⁶⁾. Estes trabalhos mostraram que o AT pode quelar íons Cu e Fe, prevenindo a formação do H₂O₂ e também do radical hidroxil. Khan e colaboradores (2000) mostraram que baixas concentrações de AT (poucos micromolares) protegem, por um mecanismo de desativação, o DNA dos danos causados por oxigênio singlete⁽⁷⁷⁾.

Há cerca de dez anos, foi iniciado, em nosso laboratório, o estudo acerca das propriedades antioxidantes do ácido tânico⁽⁷⁵⁾. Lopes e colaboradores (1999) estudaram os efeitos do AT em sistemas contendo reagentes de Fenton (Fe(II) + H₂O₂). Os autores observaram, por meio de experimentos espectrofotométricos, que o AT complexava íons ferro e propuseram que o seu mecanismo antioxidante (ao inibir a degradação oxidativa da 2-desoxirribose (2-DR)) estaria relacionado à formação do complexo, o qual inibiria a reação de Fenton e a formação do radical hidroxil⁽⁷⁵⁾. Poucos anos depois, Andrade Jr. e colaboradores (2005) mostraram que o AT inibiu a degradação oxidativa da 2-DR em sistemas contendo Cu(II) e ascorbato⁽²⁴⁾. Os autores mostraram evidências da formação de um complexo AT-Cu(II) que seria capaz de inibir o consumo de ascorbato (por meio da redução do Cu(II) a Cu(I)), o consumo de oxigênio e, conseqüentemente, a formação do radical hidroxil via reação tipo Fenton (**equações 19 a 22**). No ano seguinte, Andrade Jr. e colaboradores (2006) mostraram que o AT inibiu a degradação oxidativa da 2-DR em sistemas contendo Fe(III) e ascorbato⁽⁷⁴⁾. Semelhantemente ao estudo anterior, o AT diminuiu a velocidade do consumo de ascorbato, do consumo de oxigênio e também a formação do radical hidroxil via reação de Fenton (**equações 19 a 22**).



2.7.2 Ácido Caféico

O ácido caféico (AC) é um composto fenólico também produzido pelo metabolismo secundário de plantas. Possui fórmula molécula $C_9H_8O_4$ e é o principal representante dos ácidos hidroxicinâmicos na dieta (**figura 3**)⁽⁷⁸⁾.

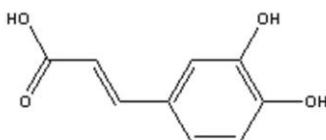


Figura 3. Fórmula estrutural do AC.

O AC é um composto comumente encontrado no café, maçã, pêra e uvas⁽⁷⁸⁾. Segundo Manach (2004), a absorção deste composto fenólico em seres humanos varia conforme a quantidade de café consumida⁽⁶⁴⁾. Indivíduos que consomem uma alta quantidade de café poderão ingerir de 500 a 800 mg/dia de ácidos hidroxicinâmicos, enquanto aqueles que não consomem café poderão ingerir quantidades inferiores a 25 mg/dia desses compostos⁽⁷⁹⁾.

Muito se discute acerca da absorção destes compostos fenólicos pelo intestino. Entretanto, alguns mecanismos de absorção de ácidos cinâmicos já foram descritos em intestino de ratos⁽⁸⁰⁾. Olthof e colaboradores (2000) testaram a absorção de ácido caféico em humanos por meio da administração oral do composto. Os autores mostraram que 95% da quantidade total de AC ingerida são absorvidos no intestino⁽⁸¹⁾. Outros trabalhos mostraram que a concentração plasmática de polifenóis – incluindo o AC – pode variar de 0,3 a 1,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em seres humanos⁽⁸²⁻⁸⁵⁾.

Diversos estudos mostraram propriedades antioxidantes do AC⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾. Nardini e colaboradores (1995) mostraram que o AC inibiu, de maneira dose-dependente, a peroxidação lipídica induzida por íons cúpricos⁽⁸⁹⁾. Neste mesmo estudo os autores mostraram que o AC é capaz de reduzir radicais lipoperoxil (ROO^{\bullet}) (por meio da doação de um hidrogênio) e impedir a propagação da

peroxidação lipídica. Outros estudos mostraram que o AC apresenta propriedades antiinflamatórias⁽⁹⁰⁾, antimutagênicas⁽⁹¹⁾, antibacterianas⁽⁹²⁾ e anticarcinogênicas⁽⁹³⁾.

Diversos foram realizados mostrando os efeitos do AC em sistemas contendo íons metálicos⁽⁹⁴⁻⁹⁶⁾. O estudo acerca dos mecanismos da atividade antioxidante do AC já foi iniciado em nosso grupo de pesquisa. Maurício (2006), em sua dissertação de mestrado⁽⁹⁷⁾, estudou a complexação de íons Fe(II) pelo AC – por meio de experimentos espectrofotométricos – bem como a sua atividade antioxidante frente a reação de Fenton – pela metodologia da degradação oxidativa da 2-DR. O autor mostrou que a complexação de Fe(II) pelo AC é favorecida com o aumento no pH do meio. Em pHs mais ácidos não foi observada a formação do complexo AC-Fe(II); à medida que o pH do meio é elevado (para 5,5 ou 7,2), a complexação entre o Fe(II) e o AC ocorre. Observou também que a velocidade de complexação é dependente dos valores de pH, ocorrendo mais rapidamente em pH fisiológico (pH 7,2). Além disso, foi mostrado que a atividade antioxidante do AC é diretamente proporcional ao pH do meio, sendo mais eficiente ao inibir a degradação oxidativa da 2-DR em pHs fisiológicos (protegendo apenas 36% em pH 5,5 e 86% em pH 7,2)⁽⁹⁷⁾.

3 - Materiais e Métodos

3.1 Reagentes

Os reagentes ácido caféico (AC), ácido tânico (AT), ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), ácido tiobarbitúrico (TBA), sulfato ferroso amoniacal (FeSO_4), brometo de etídeo, 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO), 2-desoxi-D-ribose (2-DR), fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4), fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4) foram de padrão analítico adquiridos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO). Os demais reagentes utilizados foram adquiridos de outras empresas e possuem padrão analítico.

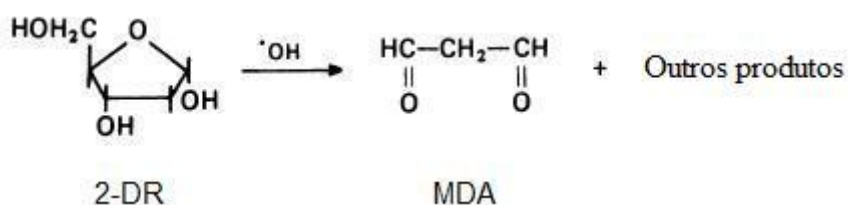
A solução de AC foi preparada, diariamente, adicionando-se 4,5 mg de AC em 50 mL de água deionizada. Devido à baixa solubilidade do AC em água (Merck Index, 12th ed., pag. 1673), a solução era aquecida, sob agitação, a 50

°C até a completa solubilização. A solução estoque apresentava concentração de $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ e era feita minutos antes do experimento.

A solução de 2-DR foi preparada em água deionizada e em seguida conservada em geladeira para futuras utilizações. As soluções de AT e Fe(II) foram preparadas em água deionizada minutos antes da realização de cada experimento. A solução de Fe(III) foi preparada diariamente em HCl 10 mmol.L^{-1} . O DNA plasmidial pUC18 foi cedido, gentilmente, pelo grupo de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília coordenado pelo prof. Dr. Marcelo Brígido (IB-CEL), e preparado com auxílio do protocolo de Midiprep do kit da Qiagen[®] (25).

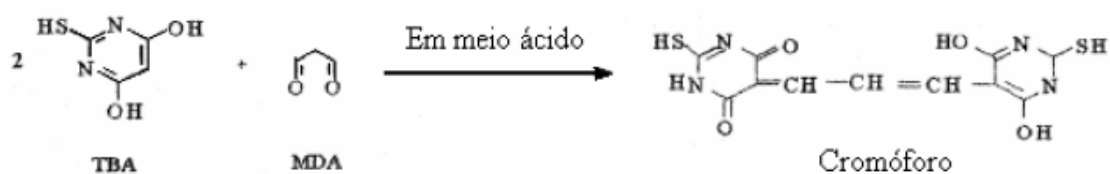
3.2 Degradação Oxidativa da 2-Desoxi-D-ribose

No início dos anos 80, existia uma considerável preocupação em desenvolver novas metodologias que permitissem o estudo da química radicalar em sistemas biológicos. Tendo em vista esta preocupação, Gutteridge, em 1981, desenvolveu a metodologia da degradação oxidativa da 2-desoxi-D-ribose (2-DR)⁽⁹⁸⁾. Este ensaio baseia-se na quantificação do principal produto desta degradação, o malonildialdeído (MDA), um composto de três carbonos formado a partir do ataque do radical hidroxil à pentose 2-DR⁽⁹⁹⁾, ilustrado no **esquema 7**.



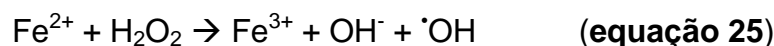
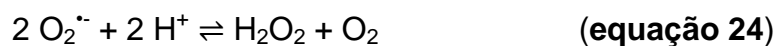
Esquema 7. Degradação oxidativa da 2-DR mediada pelo radical hidroxil. Adaptado de Cheeseman et al, 2008⁽⁹⁹⁾.

O MDA, formado a partir da degradação da 2-DR, é detectado e quantificado espectrofotometricamente em meio ácido por meio da adição de ácido tiobarbitúrico (TBA) que, após aquecimento, forma um cromóforo (MDA-TBA₂) com pico de absorção em 532 nm e coeficiente de absorvidade molar (ϵ) $14.900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ^(3, 98), ilustrado no **esquema 8**.



Esquema 8: Formação do cromóforo a partir da reação do TBA com MDA. Adaptado de Gomes, 2005⁽¹⁰⁰⁾.

O radical hidroxil foi formado a partir de dois sistemas geradores: **i)** a autoxidação do Fe(II) (**equações 23 a 25**) e **ii)** a clássica reação de Fenton (**equação 25**).

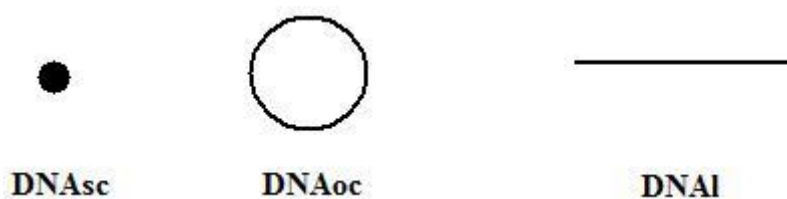


O meio reacional era composto por tampão fosfato (KPi) 10 mmol.L⁻¹ (pH 7,2), 2-DR 5 mmol.L⁻¹ (exceto nos ensaios onde sua concentração foi variada), Fe(II), H₂O₂ (exceto nos ensaios onde foi estudada a autoxidação do Fe(II)) e água deionizada, quando necessário para completar o volume. Os compostos fenólicos AT e AC estão presentes quando indicados nas legendas das figuras. A reação foi conduzida em volume reacional de 0,5 mL em tubos plásticos do tipo Eppendorf à temperatura ambiente (25 ± 1 °C) por 10 minutos (exceto quando o tempo de incubação foi variado). A reação foi então interrompida com a adição de 0,5 mL de H₃PO₄ (4% v/v) e 0,5 mL de TBA (1% p/v em NaOH 50 mmol.L⁻¹). Em seguida, foi levada à fervura (~ 98 °C) por 15 minutos e, após retornar à temperatura ambiente, foi quantificada em 532 nm em espectrofotômetro modelo Hitachi –U2001.

Como branco ou controle negativo dos pontos experimentais foi utilizado o branco baseado na reação do Fe(III) com a 2-DR, que consiste em um ponto experimental onde o Fe(II) foi substituído por Fe(III) nas mesmas concentrações e condições experimentais (para maiores detalhes desse procedimento vide capítulo 1 desta dissertação). Os valores de absorvância obtidos nessa condição foram descontados para obtenção do valor final.

3.3 Degradação Oxidativa de DNA plasmidial

Com o objetivo de estudar a capacidade dos compostos fenólicos AC e AT em proteger os danos radicalares ao DNA, foram desenvolvidos os ensaios de degradação oxidativa de DNA plasmidial utilizando o plasmídeo pUC 18. Nesta metodologia, o radical hidroxil foi gerado por meio da reação de Fenton ou da autoxidação do Fe(II). Inicialmente, isto é, antes de sofrer danos radicalares, o DNA se encontra em sua forma super-enovelada (do inglês super-coiled DNA – DNAsc) (**esquema 9**). O radical hidroxil é então gerado e ataca o DNAsc presente no meio reacional, promovendo danos que são diretamente proporcionais à quantidade de radicais livres gerados. Se poucos radicais livres forem gerados, ocorrerá pouco dano ao DNAsc e este passará à forma circular aberta (do inglês open-circle DNA – DNAoc) (**esquema 9**). Por outro lado, se uma quantidade maior de radicais livres for gerada, ocorrerá mais dano ao DNAsc e este passará para a forma linear (do inglês linear DNA – DNAI) (**esquema 9**). Estas três diferentes formas de DNA podem ser facilmente separadas e detectadas por meio de eletroforese em gel de agarose.



Esquema 9. Diferença de tamanho entre as três formas de DNA.

A eletroforese é uma técnica analítica que foi desenvolvida na década de 1930 pelo químico sueco Arne Tiselius durante um estudo com proteínas de soro sanguíneo. Por este trabalho, ele recebeu o Prêmio Nobel em 1948. A eletroforese é um método de separação que se baseia na migração de espécies carregadas quando submetidas a um campo elétrico (DDP) de corrente contínua⁽¹⁰¹⁾. A separação é baseada na diferença de velocidade de

migração das espécies ao longo do gel de agarose. Para tal utilizam-se parâmetros físicos como tamanho, peso molecular e carga do composto. A velocidade de migração de um íon (v) quando submetido a um campo elétrico é igual ao produto da intensidade do campo (E) pela mobilidade eletroforética (μ_e), conforme a **equação 26**.

$$v = \mu_e \cdot E \quad \text{(equação 26)}$$

em que v é expressa em $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$, E em $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ e μ_e em $\text{cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$.

A mobilidade eletroforética, por sua vez, é diretamente proporcional à carga das espécies que estão sendo separadas e inversamente aos chamados fatores de atrito (tamanho, peso molecular e forma do íon)⁽¹⁰¹⁾. Outro fator que influencia na velocidade de migração é a concentração da agarose para o preparo do gel que será descrito detalhadamente mais adiante.

A agarose é um polímero linear extraído de algas marinhas, e o gel é formado a partir de uma complexa rede desse polímero⁽¹⁰²⁾. Para formação do gel de agarose adiciona-se a quantidade desejada a uma solução tampão (normalmente composta por tampão TRIS, ácido bórico e EDTA) e, em seguida, submete-se esta suspensão a aquecimento. Quando a temperatura atingir aproximadamente 60 °C ocorrerá a fusão da agarose e a suspensão passará a ser uma solução transparente e homogênea. Esta solução é então colocada na cuba de eletroforese e os pentes são devidamente posicionados. Após o resfriamento e conseqüentemente a gelificação, aplicam-se as amostras contendo o DNA e submete-se à DDP e corrente desejadas pelo tempo necessário. A visualização das bandas contendo DNA depende da adição de um agente intercalante, como por exemplo, brometo de etídeo (**figura 4**)⁽¹⁰²⁾. O brometo de etídeo é uma molécula plana com grande número de conjugações π . Devido à sua estrutura química pode se intercalar entre moléculas de DNA ou RNA e, ao ser submetido à luz ultravioleta, emite fluorescência. Esta emissão torna possível a visualização e quantificação das bandas de DNA.

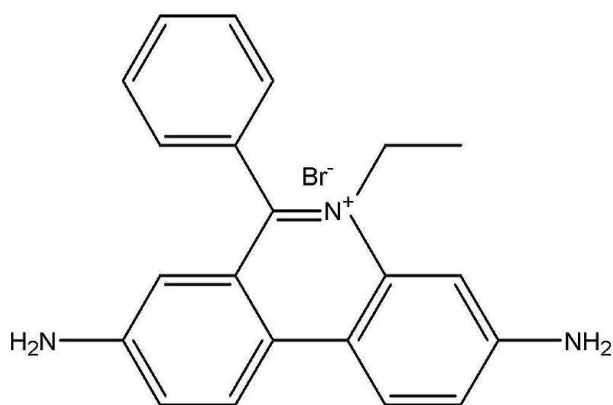
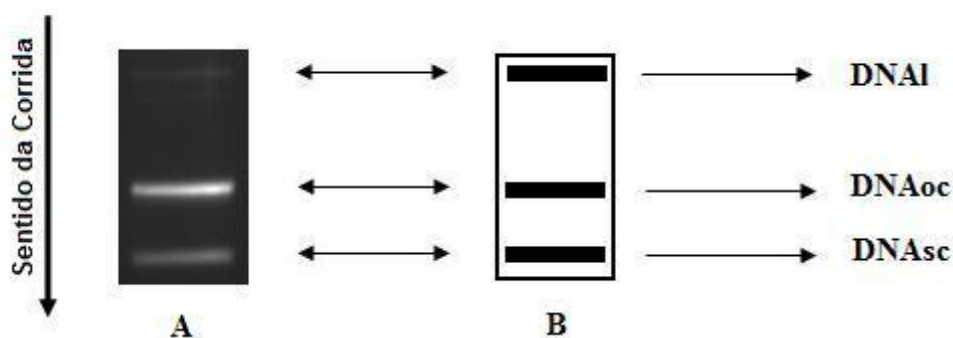


Figura 4. Fórmula estrutural do brometo de etídeo.

O DNA após sofrer o ataque dos radicais livres pode assumir três conformações (**esquema 9**), e cada conformação possui um tamanho diferente e característico. O DNAsc, por possuir um tamanho menor, sofre menos resistência ao gel de agarose e, portanto, caminha mais no gel. O DNAoc, por ser de um tamanho intermediário, sofre mais resistência que o DNAsc e menos resistência que o DNAI e, portanto, encontra-se em um estado intermediário no gel de agarose. O DNAI por possuir maior superfície de contato com o gel de agarose, sofre maior resistência ao gel de agarose e caminha pouco no gel⁽¹⁰²⁾. Logo, a análise e quantificação do dano ao DNA podem ser feitas quantificando a luminosidade emitida de cada uma das bandas geradas no gel e correlacionando-as à quantidade de radicais livres gerados (vide **esquema 10**).



Esquema 10. (A) foto de um gel de agarose mostrando a intensidade das três bandas geradas; (B) ilustração das três bandas a serem observadas em um típico gel de agarose.

Ao longo deste estudo o meio reacional era composto por tampão fosfato (KPi) 10 mmol.L⁻¹ (pH 7,2), DNA plasmidial 10 ng/μL, Fe(II), H₂O₂ (exceto quando o sistema gerador era a autoxidação do Fe(II)) e água deionizada quando necessária para completar o volume. Os compostos fenólicos AT e AC estão presentes quando indicados nas legendas das figuras. A reação foi conduzida a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) em volumes de 30 μL em tubos plásticos do tipo Eppendorf com capacidade para 0,5 mL. O gel de agarose era composto de 0,8% p/v de agarose solubilizado em TEB 1X (tris-base 0,89 mol.L⁻¹, ácido bórico 0,89 mol.L⁻¹ e EDTA 0,08 mol.L⁻¹ ajustado para pH 8,4) contendo 0,5 μg/mL de brometo de etídeo (utilizado como agente intercalante) dissolvido em PBS 1X. A reação foi iniciada com a adição de Fe(II) (tanto no sistema Fenton como na autoxidação do Fe(II)) e incubada por 10 minutos. Após esse tempo retirava-se uma alíquota de 20 μL e à esta adicionavam-se 2 μL de tampão de amostra de DNA (azul de bromofenol 0,25% (p/v), sacarose 50% (v/v), TEB 6X 50% (v/v)) que era responsável por interromper a reação. Em seguida aplicava-se 20 μL ao gel de agarose ao qual foi aplicada uma DDP de 50 V com 70 mA de corrente durante 60 minutos. Em seguida o gel foi colocado em um transiluminador com lâmpada de UV onde foi fotografado e depois, com o auxílio do software *PhotoCaptMw*[®] versão 10.1 para Windows[®], cada fração de DNA foi quantificada. Os resultados foram expressos em percentual de DNAsc remanescente utilizando a relação matemática ilustrada abaixo⁽¹⁰³⁾:

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

SC = porção de DNA na forma super-enovelada;

OC = porção de DNA na forma circular-aberta;

L = porção de DNA na forma linear;

1,4 = fator de calibração;

Para o cálculo do percentual de proteção foi utilizada a relação descrita por Hermes-Lima e colaboradores (1998)⁽¹⁰³⁾, ilustrada abaixo:

[1 - (SC controle - SC com quelante)/SC controle - SC sem quelante]] x 100

SC controle = poço contendo somente DNA;

SC com quelante = poço contendo DNA + Fe(II) + quelante

SC sem quelante = poço contendo DNA + Fe(II)

3.4 Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

O fenômeno da técnica de ressonância paramagnética eletrônica (do inglês *Electron Paramagnetic Resonance* – EPR) surgiu ao final da segunda guerra mundial, quando havia uma enorme preocupação em desenvolver técnicas de radar que possibilitassem a detecção de aviões e bombas inimigas. O desenvolvimento das técnicas de microondas utilizadas nos radares possibilitou a realização do primeiro experimento com a técnica onde, em 1945, Zavoisky e colaboradores mediram o primeiro sinal de EPR proveniente de um complexo de cobre divalente⁽¹⁰⁴⁾.

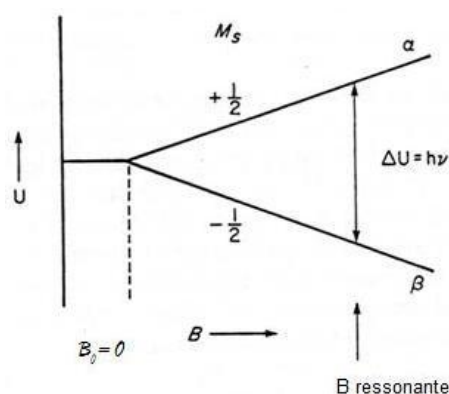
A espectroscopia de EPR, também conhecida de Ressonância de Spin Eletrônico (do inglês *Electron Spin Resonance* - ESR), é uma técnica não destrutiva que consiste na absorção ressonante de microondas por amostras paramagnéticas quando submetidas a um campo magnético⁽¹⁰⁴⁾. Qualquer amostra que possua um ou mais elétrons desemparelhados e, conseqüentemente, momento magnético de spin, ao ser submetida a um campo magnético efetivo interagirá com este provocando o chamado efeito Zeeman. A ocorrência desse efeito é o que possibilita a existência da técnica de EPR.

Podem existir na natureza, de maneira geral, materiais diamagnéticos, paramagnéticos e ferromagnéticos^(57, 104). Essa característica é intrínseca a cada material e está associada à capacidade de uma amostra se magnetizar quando submetida a um campo magnético. A propriedade que relaciona a magnetização de uma amostra com o campo magnético aplicado chama-se susceptibilidade magnética.

Materiais diamagnéticos possuem uma susceptibilidade magnética muito pequena e, portanto, não podem ser estudados por meio da técnica de EPR. Já

materiais paramagnéticos possuem maior susceptibilidade magnética e existem momentos magnéticos que podem ser provenientes de elétrons desemparelhados ou de núcleos atômicos com spin nuclear diferente de zero ($I \neq 0$).

Na espectroscopia de ressonância magnética a degenerescência é quebrada pela aplicação de um campo magnético estático \mathbf{B}_0 . Ao se colocar uma amostra hipotética, com spin nuclear $I = 0$ e spin eletrônico $\mathbf{S} = \frac{1}{2}$, na câmara de ressonância sob influência de um campo magnético quebra-se a sua degenerescência e são formados dois níveis de energia⁽¹⁰⁵⁾, conforme ilustrado no **esquema 11**.



Esquema 11. Níveis de energia para spin eletrônico $S = \frac{1}{2}$ sob influência do campo magnético \mathbf{B}_0 . Adaptado de Weil e colaboradores (2007)⁽¹⁰⁵⁾.

À medida que se aumenta a intensidade do campo externo oscilante aplicado (\mathbf{B}_0) aumenta-se a diferença de energia entre os estados α (possui momento magnético que se soma ao campo aplicado) e β (possui momento magnético que se subtrai ao campo aplicado)⁽¹⁰⁵⁾ até que a energia do campo aplicado seja igual à energia de ressonância da amostra em estudo, ou seja, a diferença entre os níveis α e β . Quando isso ocorrer haverá uma grande absorção de energia e será observado o sinal da ressonância, conforme ilustrado na **figura 5**. O sinal da ressonância é observado quando é atingida a chamada condição de ressonância, que é dada pela **equação 27** a seguir:

$$h \cdot \nu = g \cdot \beta \cdot B \quad (\text{equação 27})$$

em que h é a constante de Planck; ν é a frequência da microonda; g é o chamado fator g , é uma constante intrínseca a cada substância (para um elétron livre $g = 2,0023$); β é magnéton de Bohr; e B é a intensidade do vetor indução campo magnético (dado em Gauss ou Tesla) em que ocorreu a ressonância^(104, 105).

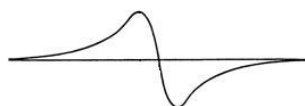


Figura 5. Primeira derivada do sinal absorptivo de uma amostra com spin nuclear $I = 0$ e spin eletrônico $S = \frac{1}{2}$.

O sinal observado na tela do espectrômetro é normalmente a derivada primeira do sinal absorptivo de ressonância (vide **figura 5**). O sinal absorptivo pode ser calculado, por conseguinte, fazendo a integração do sinal obtido experimentalmente. Uma exemplificação é mostrada na **figura 6**.

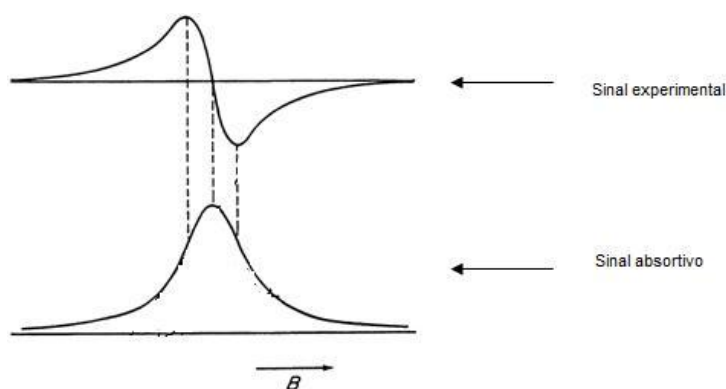


Figura 6. Demonstração da obtenção do sinal absorptivo de EPR a partir do sinal experimental.

Como a amostra hipotética em estudo possui spin nuclear $I = 0$ e spin eletrônico $S = \frac{1}{2}$, o sinal observado é um singleto, pois não existe interação entre o elétron desemparelhado e o núcleo da amostra^(104, 105).

O estudo de materiais com spin nuclear diferente de zero ($I \neq 0$) torna mais complexo o espectro obtido. A existência de um momento magnético

nuclear provoca o acoplamento hiperfino, isto é, a interação do elétron desemparelhado com o núcleo magnético do átomo em questão. O número de linhas resultantes no espectro será dado pela regra de multiplicidade ($2(I + \frac{1}{2})$), ou seja, quando $I = 0$ aparecerá somente uma linha no espectro, quando $I = \frac{1}{2}$ aparecerão duas linhas e assim sucessivamente. Um exemplo das possíveis interações do elétron com os diferentes valores de spins nucleares é dado na **figura 7**.

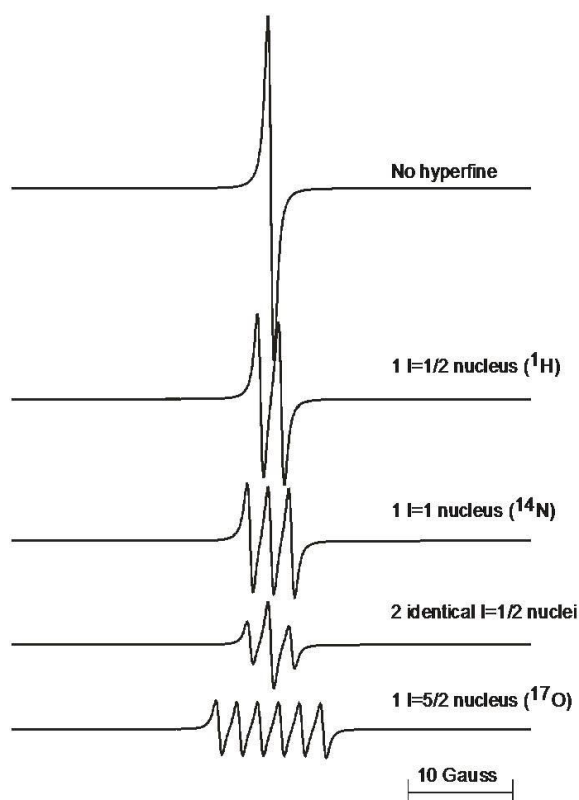
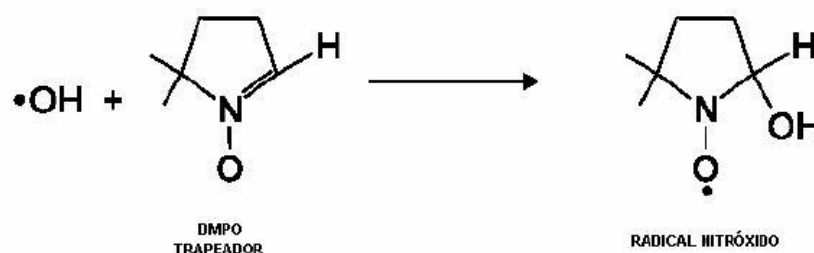


Figura 7. Simulação do sinal de EPR quando o elétron interage com diferentes núcleos. Adaptado de Weil e colaboradores (2007)⁽¹⁰⁵⁾.

3.4.1 EPR do DMPO/•OH

Neste trabalho a técnica de EPR foi bastante utilizada para observar, qualitativamente, a atividade antioxidante dos compostos fenólicos AC e AT frente ao radical hidroxil. Entretanto, a detecção direta do sinal de EPR do radical hidroxil é praticamente impossível devido à sua alta reatividade ($t_{1/2} \cong 10^{-9}$ s)⁽¹⁰⁶⁾. Nessas situações utilizam-se os chamados trapeadores (do inglês *spin*

trapping) como, por exemplo, o DMPO (5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido), para produzir um aduto estável com sinal característico^(107, 108). O uso do trapeador é necessário nesse tipo de ensaio para estabilizar radicais altamente reativos dando a eles um tempo de vida mais longo e, permitindo assim, a sua detecção via EPR. O trapeador geralmente é utilizado em maior concentração que os demais reagentes presentes no meio reacional. Isso garante que os radicais $\cdot\text{OH}$ gerados reajam preferencialmente com ele formando o aduto DMPO/ $\cdot\text{OH}$ (denominado aduto nitróxido). O espectro de EPR do aduto nitróxido (**figura 8**) consiste em um quarteto resultante do acoplamento hiperfino do elétron livre do grupo nitróxido com o hidrogênio β e também com o próprio núcleo do nitrogênio do anel pirrólico, estando as linhas na proporção de 1:2:2:1 ($A_N \cong A_{\beta\text{H}} = 15 \text{ G}$)⁽¹⁰⁷⁾. A reação é ilustrada no **esquema 12** a seguir:



Esquema 12. Reação do radical hidroxil com o DMPO. Adaptado de Barr (1998)⁽¹⁰⁷⁾.

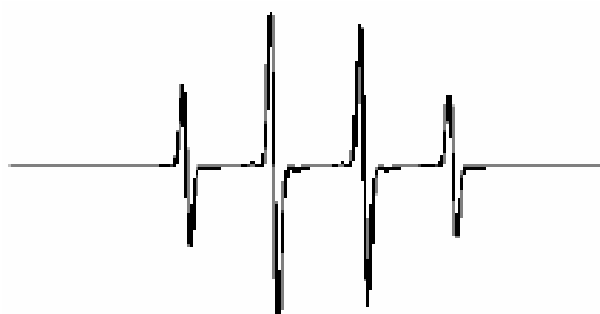


Figura 8. Sinal característico do aduto DMPO/ $\cdot\text{OH}$. Retirado de Gomes (2005)⁽¹⁰⁰⁾.

Os experimentos utilizando o trapeador DMPO foram feitos em um espectrômetro Bruker ESP 300 em colaboração com o prof. Dr. Antonio Alonso do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás (IF – UFG). As condições instrumentais utilizadas para realização dos experimentos foram:

frequência de microonda de 9,81 GHz, frequência de modulação de 100 KHz, amplitude de modulação de 0,359 G, potência de 0,2 mW e ganho de 1×10^5 . Foram feitos somatórios de três varreduras para as reações utilizando reagentes de Fenton e cinco varreduras para o sistema da autooxidação.

O meio reacional era composto de tampão fosfato (KPi) 10 mmol.L^{-1} (pH 7,2), DMPO 20 mmol.L^{-1} (Fenton) e 40 mmol.L^{-1} (autooxidação do Fe(II)), etanol 0,5% v/v ($\sim 86 \text{ mmol.L}^{-1}$) somente nos ensaios da autooxidação do Fe(II), H_2O_2 (nos ensaios utilizando o sistema Fenton), Fe(II), AC, AT e água deionizada quando necessário. As concentrações utilizadas estão descritas nas legendas das figuras.

O etanol foi utilizado nos experimentos da autooxidação do Fe(II) para possibilitar a visualização do sinal. O etanol, quando presente em excesso no meio, reage com o radical hidroxil formando o radical hidroxietil ($\cdot\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$) que, ao reagir em uma etapa posterior com o DMPO produz um sinal característico de seis linhas (sexteto), conforme **figura 9**.

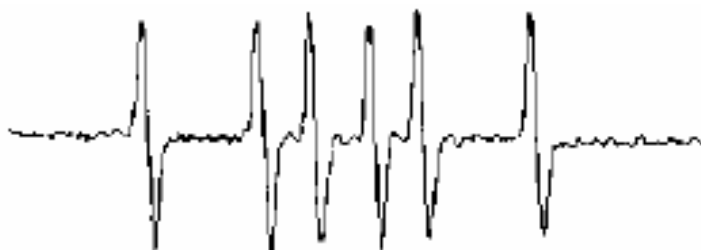


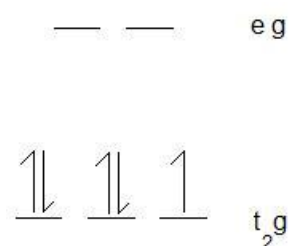
Figura 9. Sinal característico do aduto DMPO/ $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$. Retirado de Gomes (2005)⁽¹⁰⁰⁾.

A reação foi conduzida em volume de 0,150 mL a temperatura ambiente ($25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) em tubos plásticos do tipo Eppendorf com capacidade para 1,5 mL. A reação foi disparada com a adição de Fe(II) e, após 1,5 minutos, foi retirada uma alíquota com tubo capilar e colocada no espectrômetro para início das leituras.

Os espectros obtidos foram analisados com o auxílio do software WINEPR[®] para sistema operacional Windows[®]. As análises foram feitas em unidades arbitrárias (UA) medindo-se a intensidade da segunda linha de campo baixo (linha mais intensa).

3.4.2 EPR do sinal do Fe(III)

A técnica de EPR também foi utilizada para observar a capacidade redutora dos compostos fenólicos AC e AT. O ferro com estado de oxidação +3 possui configuração eletrônica $3d^5$. Com tal configuração os elétrons podem se arranjar de duas possíveis maneiras, spin alto ou spin baixo, que varia de acordo com o ligante ao qual está coordenado. Se for um ligante de campo fraco, este assumirá a forma de spin alto. Por outro lado, se for um ligante de campo forte, este assumirá a forma de spin baixo⁽⁵⁷⁾. Neste estudo foi utilizado FeCl_3 em meio contendo $\text{HCl } 10 \text{ mmol.L}^{-1}$. Isto garante que o ferro está coordenado, inicialmente, a moléculas de água ou a íons cloreto. Ambos (cloreto e água) caracterizam ligantes do tipo campo forte e, dessa maneira, todos os elétrons do Fe(III) se encontram nos orbitais t_{2g} (spin baixo)⁽⁵⁷⁾. Com tal configuração, o íon Fe(III) apresenta somente um elétron desemparelhado caracterizando um sistema $S = \frac{1}{2}$ (vide **esquema 13**).



Esquema 13. Configuração eletrônica do Fe(III) na forma spin baixo. Observa-se um elétron desemparelhado no orbital t_{2g} .

Tendo em vista que o ^{56}Fe possui spin nuclear $I = 0$, o sinal observado no EPR é um singleto. O principal objetivo destes experimentos é estudar a capacidade do AC e AT em reduzir o Fe(III) a Fe(II). Caso ocorra esta redução monoelétrica, não será observado sinal algum no EPR, uma vez que todos os elétrons do Fe(II) estariam emparelhados.

Os experimentos foram realizados em colaboração o prof. Dr. Daniel Rettori do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Bandeirante de São Paulo (ICS-UNIBAN) no laboratório da prof. Dr. Ohara Augusto do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São

Paulo (IQ-USP). As medidas foram feitas em um espectrômetro Bruker EMX equipado com um ressonador retangular padrão (ER4102) operando em modo TE₁₀₂ com as seguintes condições instrumentais: frequência de microonda de 9,707 GHz, frequência de modulação de 100 kHz, potência de microonda de 20 mW, amplitude de modulação de 2 G e ganho de 1×10^5 . Foram feitos somatórios de nove varreduras. Os experimentos foram conduzidos em volumes reacionais de 1,0 mL a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) em tubos plásticos do tipo Eppendorf com capacidade para 1,5 mL. Em seguida, foram transferidos 0,2 mL para uma *flat cell* de quartzo que foi colocada no espectrômetro para o início da análise.

O meio reacional foi composto por Fe(III) nas concentrações de 9, 10 ou 18 mmol.L⁻¹ solubilizado em HCl 10 mM. Foram feitos experimentos controle na ausência dos antioxidantes para obtenção do sinal do Fe(III) e, em seguida, foram feitos experimentos na presença de 5 mmol.L⁻¹ de AT (com 10 mmol.L⁻¹ de Fe(III)) ou 9 mmol.L⁻¹ de AC (com 9 mmol.L⁻¹ de Fe(III)).

Os espectros obtidos foram analisados com o auxílio do software WINEPR para sistema operacional Windows[®]. As análises foram feitas observando-se, qualitativamente, o desaparecimento do sinal do Fe(III).

3.5 Peroxidação Lipídica em homogenato de fígado de rato *in vitro*

Nesta metodologia foi estudada a capacidade dos compostos fenólicos AT e AC em prevenir a peroxidação lipídica mediada por íons metálicos, em particular o Fe(II). O Fe(II), como previamente citado, forma [•]OH em meios contendo O₂ ou H₂O₂ (**equações 23 a 25**). Para mais detalhes acerca do processo da peroxidação lipídica vide seção 2.3.1 na revisão bibliográfica.

Esta metodologia baseia-se na detecção indireta de aldeídos, principalmente o MDA. Analogamente ao método da degradação oxidativa da 2-DR (seção 3.2), adiciona-se ácido tiobarbitúrico (TBA) que, em pH ácido e submetido a elevadas temperaturas (~98 °C), forma um aduto MDA-TBA (1:2) de coloração rósea com pico de absorção em 532 nm.

Para a realização destes experimentos foi utilizado um rato macho, adulto, da linhagem Wistar que aparentava estar saudável e que foi cedido pelo biotério do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília dois dias antes de

ser sacrificado. O rato foi mantido no laboratório em uma sala com foto período (12 horas com luz e 12 horas sem luz) com temperatura controlada (25 ± 1 °C) e foi alimentado com água e ração padrão para ratos, ambos sem restrição. Após o período de dois dias, o rato foi sacrificado por deslocamento cervical, seu fígado retirado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido. A preparação do homogenato foi feita diariamente macerando-se o fígado em tampão de homogenato (composto por tampão fosfato 50 mmol.L^{-1} e KCl 125 mmol.L^{-1}) na proporção de 1:4 p/v. Para esta preparação foi utilizado um homogeneizador de vidro com capacidade para 3 mL imerso em gelo. Em seguida, o homogeneizado foi transferido para um tubo plástico do tipo Eppendorf e submetido à centrifugação a 1.000 g por 15 minutos a temperatura de 6 °C. O sobrenadante obtido após a centrifugação foi conservado em gelo e utilizado nos experimentos do dia.

Os experimentos foram realizados em meio contendo tampão fosfato (KPi) 10 mmol.L^{-1} (pH 7,2), homogenato de fígado de rato 5% v/v, KCl 125 mmol.L^{-1} , citrato de sódio $200 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, Fe(II), H_2O_2 (exceto nos ensaios onde foi estudada a autooxidação do Fe(II)) e água deionizada, quando necessário completar o volume. Os compostos fenólicos AT e AC estão presentes quando indicados nas legendas das figuras. A reação foi conduzida em volume reacional de 0,2 mL em tubos plásticos do tipo Eppendorf à temperatura ambiente (25 ± 1 °C) por até quatro horas. A reação foi então interrompida com a adição de 0,1 mL de H_3PO_4 (7% v/v) e 0,2 mL de TBA (1% p/v em NaOH 50 mmol.L^{-1}). Em seguida, foi levada a fervura (~ 98 °C) por 15 minutos e, após retornar a temperatura ambiente, quantificada em 532 nm em espectrofotômetro modelo Hitachi - 1000. Os resultados são mostrados em termos dos valores de absorbância obtidos nas leituras.

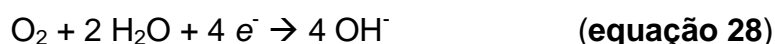
3.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A quantificação do MDA, principal produto da degradação oxidativa da 2-DR, pode ser feita tanto espectrofotometricamente (seção 3.2) como por HPLC. A técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography* – HPLC) é uma técnica analítica que permite a separação de compostos semelhantes em misturas complexas⁽¹⁰¹⁾.

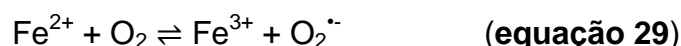
Os experimentos foram realizados nas mesmas condições dos experimentos utilizando a técnica da degradação oxidativa da 2-DR. Os experimentos foram realizados em duas condições com esta técnica: **i)** utilizando o sistema gerador com reagentes de Fenton onde o meio reacional era composto por tampão fosfato (KPi) 10 mmol.L^{-1} (pH 7,2), 2-DR 5 mmol.L^{-1} , Fe(II), H_2O_2 e água deionizada, quando necessário completar o volume; **ii)** utilizando o sistema Fe(III)-2-DR onde o meio reacional era composto por tampão fosfato (KPi) 10 mmol.L^{-1} (a pH 7,2), 2-DR 5 mmol.L^{-1} , Fe(III) e água deionizada, quando necessário completar o volume. As reações foram conduzidas em volumes reacionais de 0,5 mL em tubos plásticos do tipo Eppendorf à temperatura ambiente ($25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) por 10 minutos. As reações foram então interrompidas com a adição de 0,5 mL de H_3PO_4 (4% v/v) e 0,5 mL de TBA (1% p/v em NaOH 50 mmol.L^{-1}). Em seguida, foram levadas a fervura ($\sim 98 \text{ }^\circ\text{C}$) por 15 minutos e, após retornarem a temperatura ambiente, foram quantificadas em 532 nm em espectrofotômetro modelo Hitachi -1000. Após a leitura no espectrofotômetro as amostras foram levadas a um HPLC modelo Class-VP (Shimadzu Co.) equipado com um auto-injetor (SIL-10AD VP, Shimadzu Co.), bomba (LC-10AD VP, Shimadzu Co.), forno para coluna (CTO-10AS VP, Shimadzu Co.) e um detector de fluorescência (RF-551, Shimadzu Co.). Uma coluna Shim-pack CLC-ODS (M) (Shimadzu Co. C18 4,6 mm x 25 cm) foi utilizada para as separações. O fluxo foi ajustado para 0,6 mL/min e como volume de injeção selecionou-se 20 μL . A pressão máxima foi de 250 Kg/cm^2 . Os comprimentos de onda do detector de fluorescência foram ajustados para 532 nm (excitação) e 553 nm (emissão). Como fase móvel (eluente) foi utilizado metanol:tampão fosfato (60:40% v/v) ajustada para pH 6,8. Inicialmente, foi feita uma curva de calibração utilizando diferentes concentrações do aduto MDA-TBA₂ e, em seguida, foram corridas as amostras. Os picos obtidos nos cromatogramas experimentais foram comparados com os obtidos na curva de calibração para confirmação da nossa hipótese (vide capítulo 1 para mais detalhes). Os cromatogramas são mostrados em função do tempo de retenção (t_R) de cada amostra (em minutos) e as intensidades são dadas em unidades arbitrárias.

3.7 Consumo de Oxigênio (oximetria)

Ao final da década de 1950, o pesquisador Clark desenvolveu um eletrodo compacto capaz de medir a concentração de oxigênio presente em meio aquoso. Este eletrodo foi denominado eletrodo do tipo Clark. Em sua essência, eletrodos do tipo Clark consistem em um catodo de platina, ouro ou ródio e um anodo de prata, que são conectados eletricamente por meio de uma solução eletrolítica de KCl⁽¹⁰⁹⁾. A este sistema uma diferença de potencial de 0,6 V é aplicada. O oxigênio dissolvido no meio difunde através de uma membrana de Teflon (seletiva a oxigênio) e é reduzido no catodo em um processo envolvendo quatro elétrons (**equação 28**). Esta reação eletroquímica gera uma corrente que é diretamente proporcional a concentração de oxigênio no meio⁽¹⁰⁹⁾.



Os experimentos foram realizados em um oxígrafo modelo YSI 5300 (*Yellow Springs Instruments Co.*) baseado no eletrodo de Clark. Foram estudados os efeitos do AT e AC na primeira reação da autoxidação do Fe(II) (**equação 29**), ilustrada abaixo:



Inicialmente a concentração de oxigênio dissolvido era de 220 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (valor adotado como 100%), o que corresponde aos valores encontrados a 25 °C a 1000 metros acima do nível do mar⁽¹¹⁰⁾.

As reações foram conduzidas em volume reacional de 3 mL a temperatura ambiente (25 ± 1 °C). O meio reacional era composto de uma solução aquosa contendo 10 mmol.L^{-1} de tampão fosfato (KPi) (pH 7,2) e Fe(II) ou Fe(III) (200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Os compostos fenólicos AT e AC estão presentes quando indicados nas legendas das figuras. Os resultados foram apresentados em termos da velocidade do consumo de oxigênio na fase linear da reação (os primeiros 30 segundos) e expressos em $\text{nmol.L}^{-1}/\text{min}$. A velocidade do

consumo de oxigênio foi obtida utilizando-se o coeficiente angular da equação da melhor reta obtida.

3.8 Método do Radical ABTS

Método baseado na quantificação espectrofotométrica do radical do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (denominado aqui de ABTS^{•+}). Inicialmente, em pH 7,2, o ABTS (mostrado na **figura 10**) se encontra na forma desprotonada e possui duas cargas negativas (ABTS²⁻). Nessa forma a solução é incolor e não absorve na região do visível. Entretanto, após sofrer oxidação de um elétron, fica com coloração azulada e possui um pico de absorção em 734 nm⁽¹¹¹⁾. Neste comprimento de onda o radical ABTS^{•+} possui um coeficiente de absorvidade molar (ϵ) de 15.000 M⁻¹ cm⁻¹.

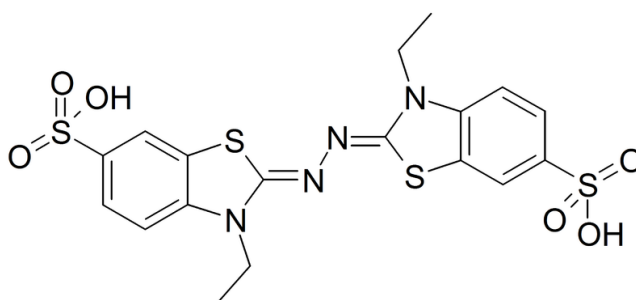
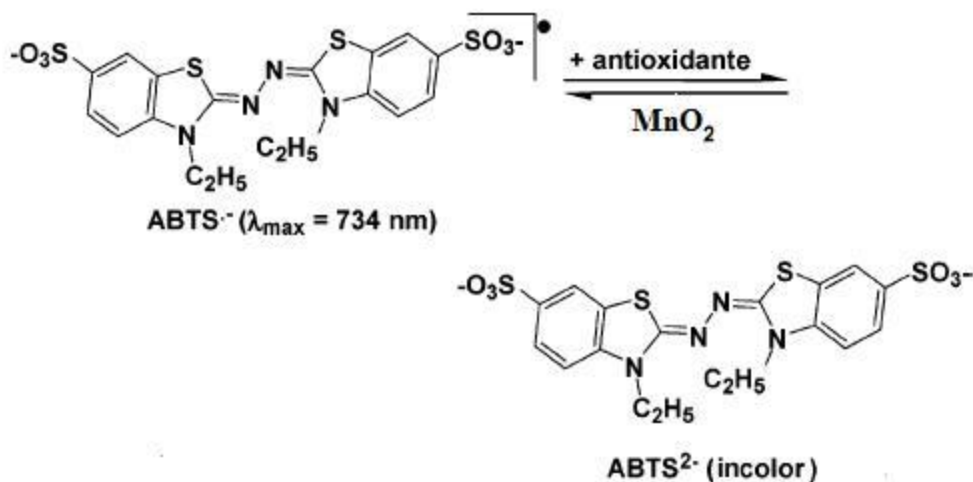


Figura 10. Fórmula estrutural do ABTS.

Neste trabalho, seguiu-se a adaptação proposta por Schlesier e colaboradores (2002)⁽¹¹²⁾. Inicialmente foi preparada uma solução de 2 mmol.L⁻¹ de ABTS²⁻ em água deionizada. Em seguida fez-se uma diluição 1:20 em tampão fosfato 20 mmol.L⁻¹. A 5 mL desta solução adicionou-se 20 mg de MnO₂. O dióxido de manganês reage com o ABTS²⁻ e o oxida em um elétron, conforme **esquema 14**. Após esta etapa a solução foi centrifugada e o sobrenadante retirado e filtrado em filtro de 0,22 μ m. A amostra foi então armazenada a 7 °C para futuras análises. Antes do início das análises, foi feita uma curva de calibração com a solução do ABTS^{•+}.



Esquema 14. Esquema da redução e oxidação do $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Adaptado de Huang e colaboradores (2005)⁽¹¹³⁾.

Os resultados obtidos para os compostos fenólicos AT e AC foram comparados com o Trolox para a obtenção do TEAC (do inglês, *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*). Para essas análises foi feita uma curva de calibração utilizando concentrações conhecidas de Trolox (**figura 56** no anexo II desta dissertação).

Os estudos foram realizados em colaboração com o prof. Daniel Rettori no Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Bandeirante de São Paulo. Os experimentos foram conduzidos a temperatura ambiente ($25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) em cubetas de plástico com volume final de 2 mL. Primeiramente, foi feito um estudo cinético do decaimento do pico em 734 nm induzido pelo AC e pelo AT. Em seguida, foi feito um estudo da influência de diferentes concentrações destes compostos fenólicos no sinal do $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Nesta segunda etapa, as medidas foram feitas após 3 minutos de reação, tempo necessário para o estabelecimento do equilíbrio. O cálculo do TEAC para os compostos fenólicos estudados foi feito da seguinte maneira:

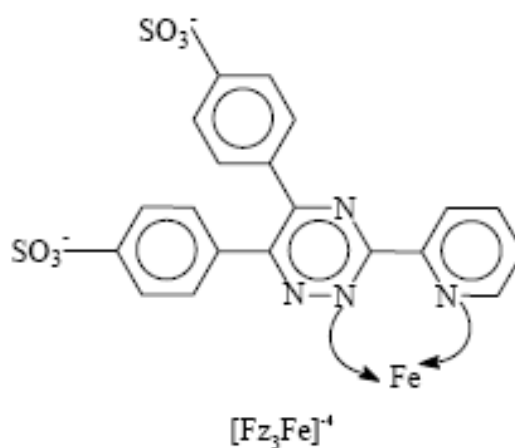
$$\text{TEAC} = I_{50} \text{ do Trolox} / I_{50} \text{ da amostra estudada}$$

onde, I_{50} é a concentração suficiente para diminuir em 50% a absorbância do $\text{ABTS}^{\bullet+}$.

Nota-se, da equação acima, que o TEAC é um valor adimensional e, sendo assim, permite a comparação entre os diversos compostos estudados na literatura. Os resultados foram analisados de maneira que quanto maior o valor do TEAC, maior a capacidade antioxidante do composto estudado.

3.9 Método da Ferrozina

Trata-se de um método espectrofotométrico que quantifica a concentração de Fe(II) presente no meio reacional por meio da adição de um agente complexante, a Ferrozina (Fz). A Ferrozina (neste caso o sal dissódico do ácido 3-(2-Piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina-4',4''-dissulfônico) reage com íons ferrosos para formar um complexo de coloração roxa altamente solúvel em água⁽¹¹⁴⁾. Este complexo, de estequiometria 1:3 (Fe:Fz), possui pico de absorção máximo em 562 nm e, neste comprimento de onda, coeficiente de absorvidade molar (ϵ) $27.900 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. A complexação do Fe(II) pela ferrozina ocorre pelo nitrogênio do grupo piridina e pelo nitrogênio 2- do grupo triazina, conforme ilustração abaixo⁽¹¹⁴⁾.



É importante ressaltar que a completa complexação do Fe(II) pela Ferrozina é obtida em valores de pH próximos ao neutro⁽¹¹⁵⁾, tornando ainda mais importante a utilização do tampão.

No estudo da reação da autooxidação do Fe(II), as reações foram conduzidas tubos plásticos do tipo Eppendorf em volume reacional de 1,0 mL a

temperatura ambiente (25 ± 1 °C) por 10 minutos. O meio reacional era composto de tampão fosfato (KPi) 10 mmol.L^{-1} (pH 7,2), Fe(II) $50 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ e Ferrozina 10 mmol.L^{-1} .

No estudo da interferência do Fe(III) na metodologia da degradação oxidativa da 2-DR, reações foram conduzidas as reações foram conduzidas tubos plásticos do tipo Eppendorf em volume reacional de 1,0 mL a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) por até 15 minutos. O meio reacional era composto de tampão fosfato (KPi) 10 mmol.L^{-1} , Fe(III) $50 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, 2-DR 5 mmol.L^{-1} , H_3PO_4 4% v/v, TBA 1% m/v solubilizado em NaOH 50 mmol.L^{-1} e Ferrozina 1 mmol.L^{-1} . As leituras dos valores de absorbância foram feitas em espectrofotômetro modelo Hitachi-U2001.

3.10 Análises estatísticas

As análises estatísticas, quando necessárias, foram realizadas com o auxílio do software MYNOVA[®] para DOS. Foram realizadas tais análises somente nos pontos onde a diferença estatística era importante para a interpretação dos resultados. Nestes pontos foram aplicados os testes ANOVA e, caso a diferença fosse significativa, o Student Newman Keuls (SNK) para comparação entre dois ou mais pontos.

4 - Capítulo 01 - A interferência do íon Fe(III) na metodologia da degradação oxidativa da 2-Desoxi-D-ribose (2-DR)

4.1 Introdução e Objetivos

A metodologia da degradação oxidativa da 2-Desoxirribose gera discussões na literatura quanto à sua validade e aplicabilidade há vários anos. Desde a sua criação, no começo da década de 1980, não foi definido um branco apropriado da reação que possibilitasse a sua correta reprodutibilidade. Vários trabalhos reportam análises utilizando o branco sem a molécula da 2-DR ou sem o ácido tiobarbitúrico (TBA), o que produz um valor pequeno na absorbância em 532 nm. Este pequeno valor de absorbância (0,001-0,010) é explicado por não ocorrer a formação de malonildialdeído (MDA) (nos brancos realizados sem a molécula da 2-DR) ou por não ocorrer a formação do cromóforo com o TBA (nos brancos realizados sem o TBA). Entretanto, observamos que o Fe(III), produto das reações de Fenton e da autooxidação do Fe(II), é capaz de reagir com a molécula da 2-DR, aumentando os valores de absorbância em 532 nm (A_{532})⁽¹¹⁶⁾. Esta reação foi observada por Ginani (2005) em sua dissertação de mestrado. Nessa ocasião, Ginani estudava o mecanismo de ação antioxidante do ácido elágico (AE), uma molécula com hidroxilas fenólicas capaz de complexar ferro, em sistemas contendo Fe(III) e ascorbato. Notou-se que a incubação de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de Fe(III) e 5 mmol.L^{-1} de 2-DR em meio contendo tampão fosfato (pH 7,2), resultou em valores de 0,070 a 0,100 de A_{532} , valor correspondente a ~ 30% da absorbância total quando 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de Fe(II), 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de H_2O_2 e 5 mmol.L^{-1} de 2-DR são incubados por 10 minutos. Quando a 2-DR é incubada somente com tampão fosfato a A_{532} atinge valores menores (A_{532} 0,010 a 0,025). No sistema contendo apenas Fe(III) e 2-DR, a possível formação de MDA a partir da degradação da 2-DR parecia estar sendo causada pelo ferro e não pelo radical hidroxil, o que consistiria em um artefato metodológico. Sendo assim, este capítulo tem como objetivo geral estudar a reação entre o Fe(III) e a 2-DR, onde destacam-se os seguintes objetivos específicos:

- 1) Caracterizar o produto da reação entre o Fe(III) e a 2-DR;
- 2) Elucidar o mecanismo da reação entre o Fe(III) e a molécula da 2-DR, assim como os fatores que o afetam;
- 3) Propor um novo branco para a metodologia da degradação oxidativa da 2-DR.

4.2 Metodologias Utilizadas

- Degradação oxidativa da 2-Desoxirribose (vide seção 3.2)
- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (vide seção 3.6)
- Método da Ferrozina (vide seção 3.9)

4.3 Resultados e Discussões

Uma vez observada a reação entre o Fe(III) e a 2-DR, objetivou-se, inicialmente, caracterizar o produto dessa reação. Nesse sentido, foram realizados experimentos com a técnica de HPLC. Nesses experimentos, ilustrados nas **figuras 11A, 11B e 11C**, observou-se o aparecimento dos picos cromatográficos do aduto MDA-TBA₂ em diferentes condições.

A **figura 11A** ilustra o cromatograma do aduto MDA-TBA₂ formado a partir da reação de MDA puro (0,67 nmol.mL⁻¹) com o TBA, onde é possível observar o aparecimento de um pico com tempo de retenção de 3,5 minutos. A **figura 11B** mostra o cromatograma no qual o MDA foi formado a partir do ataque do radical hidroxil (formado via reação de Fenton) à molécula de 2-DR. Observa-se o aparecimento de um pico com o mesmo tempo de retenção observado para o MDA puro, confirmando as observações de Halliwell e colaboradores (1987)^(99, 117) e Cheeseman e colaboradores (1988)⁽⁹⁹⁾. Na **figura 11C** nota-se o aparecimento de um pico com o mesmo tempo de retenção (3,5 minutos) das **figuras 11A e 11B**.

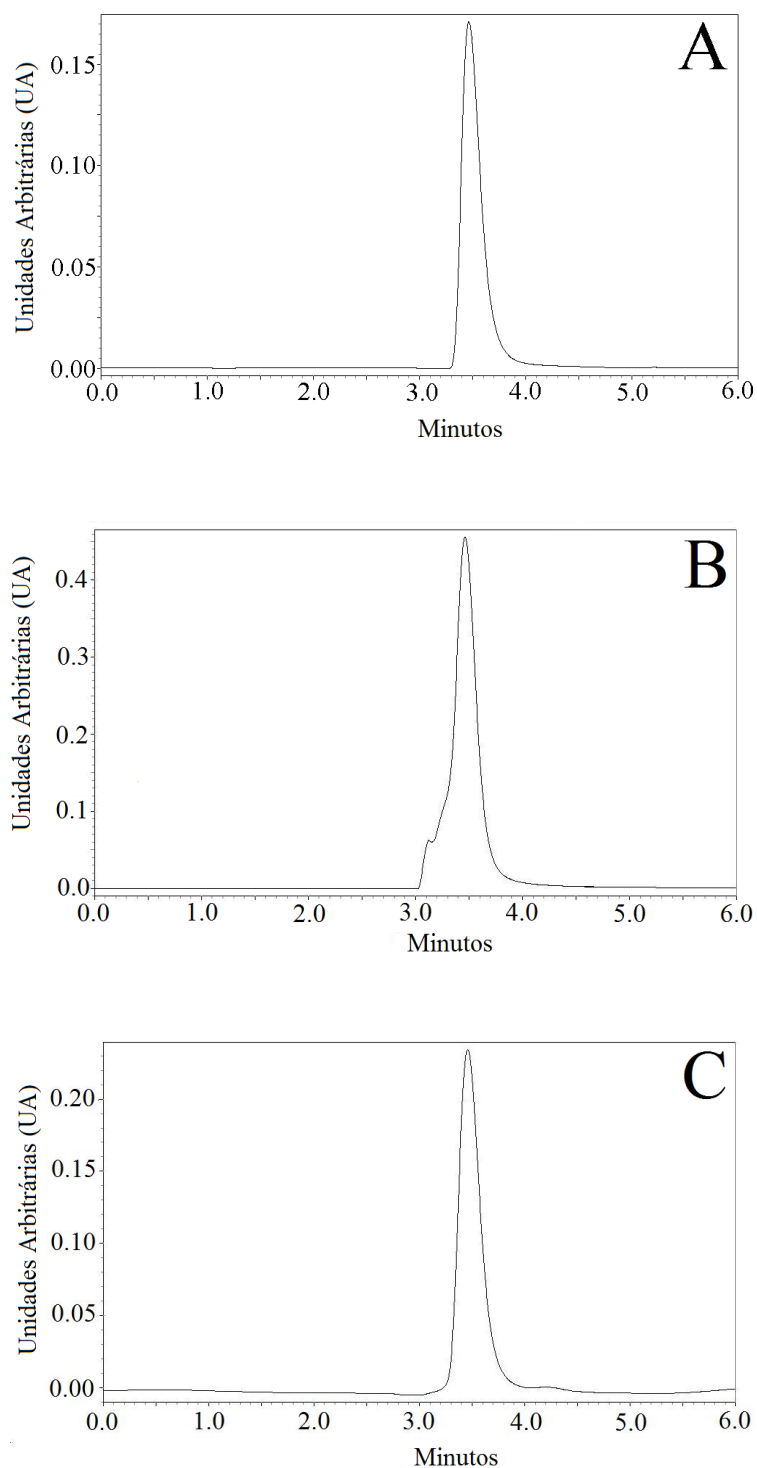


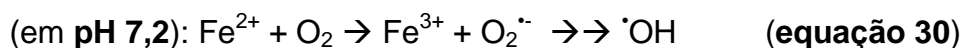
Figura 11. Cromatogramas do aduto MDA-TBA₂ formados por diferentes maneiras: **(11A)** a partir de 0,67 nmol/mL de MDA puro; **(11B)** formado a partir da reação de Fenton em meio reacional contendo 10 mmol.L⁻¹ de KPi, 5 mmol.L⁻¹ de 2-DR, 50 μmol.L⁻¹ de Fe(II), 100 μmol.L⁻¹ de H₂O₂; **(11C)** a partir da reação direta do Fe(III) com a 2-DR em meio contendo 10 mmol.L⁻¹ de KPi, 5 mmol.L⁻¹ de 2-DR, 50 μmol.L⁻¹ de Fe(III). O tempo reacional foi de 10 minutos. Os cromatogramas mostrados são representativos de 3 repetições.

Este resultado evidencia a formação de MDA em um sistema contendo somente 2-DR e Fe(III). Tal observação sugere que existe uma reação entre o íon Fe(III) e a molécula de 2-DR que leva à formação de MDA. Aruoma e colaboradores (1987) mostraram que íons férricos podem se complexar com a 2-DR⁽¹¹⁸⁾, mas nenhuma evidência havia sido apontada que esta complexação levava, após a acidificação do meio e aquecimento por 15 minutos, à formação de MDA.

Com o intuito de caracterizar o mecanismo da reação entre íons férricos e a molécula da 2-DR, foram realizados diferentes experimentos. Os experimentos foram feitos tanto na presença de Fe(II) como na presença de Fe(III).

Inicialmente, havia a hipótese de que a reação entre o Fe(III) e a 2-DR fosse um processo radicalar. Para estudar tal hipótese foram testados os antioxidantes tiouréia e catalase, um sequestrador de radicais livres e uma enzima responsável pelo desproporcionamento do H₂O₂, respectivamente. Os resultados são mostrados na **tabela 4**.

O dano à 2-DR causado pelo sistema da autooxidação do Fe(II) levou a um valor médio de absorvância de 0,307, conforme evidenciado no ensaio **A1**. A adição do Fe(II) após a interrupção da reação (com a acidificação do meio) levou a um valor médio de absorvância de 0,027 (ensaio **A3**), sugerindo que a reação de autooxidação do Fe(II) não ocorre em meio ácido e, conseqüentemente, o radical hidroxil não é formado. No ensaio **A3** fica evidente que a oxidação da 2-DR mediada por Fe(II) + O₂ só atinge valores significativos quando o Fe(II) é adicionado antes da acidificação do meio, onde o pH é 7,2 (vide **esquema 15** e **equação 83** na página 141).



Esquema 15. Ilustração simplificada reação de autooxidação em pH 7,2 e 1,3.

Tabela 4. Efeito de antioxidantes na oxidação da 2-DR mediada por Fe(II) e Fe(III).

Condições Experimentais	A ₅₃₂ Média ± D.P.	Ensaio
Efeito do ferro		
Fe(II)	0,307 ± 0,011	A1
Fe(III)	0,077 ± 0,010	A2
Fe(II) [#]	0,027 ± 0,009	A3
Fe(III) [#]	0,074 ± 0,012	A4
Efeito de antioxidantes		
Fe(II) + catalase	0,122 ± 0,023*	A5
Fe(III) + catalase	0,079 ± 0,011*	A6
Fe(II) + tiouréia	0,077 ± 0,013	A7
Fe(III) + tiouréia	0,073 ± 0,014	A8

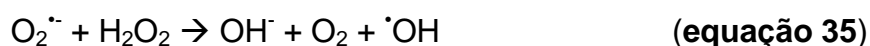
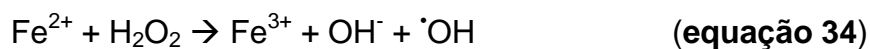
O Meio reacional era composto por KPi 10 mmol.L⁻¹ (pH = 7,2), 2-DR 5 mmol.L⁻¹ e Fe(II) ou Fe(III) 50 µmol.L⁻¹. A catalase, quando presente, estava na concentração de 2.000 U/mL e a tiouréia na concentração de 100 mmol.L⁻¹. Ambos antioxidantes foram adicionados ao meio reacional imediatamente antes da adição do ferro. Os valores correspondem à média e ao desvio padrão de 7 ou 8 repetições. As reações foram incubadas por 10 minutos após a adição do ferro.

[#]Nestes pontos os íons ferro foram adicionados após a acidificação do meio.

*Nestes valores foram feitas as subtrações pelo ponto contendo somente KPi, catalase e 2-DR.

Por outro lado, quando o mesmo ensaio foi realizado substituindo-se Fe(II) por Fe(III) observou-se um valor médio de absorvância de 0,077 (representado no ensaio **A2**). E, além disso, quando o Fe(III) foi adicionado após a acidificação do meio (ensaio **A4**) o valor médio de absorvância foi significativamente o mesmo que no ensaio **A2**. Esta observação nos sugere que a reação do Fe(III) com a 2-DR ocorre somente após a acidificação do meio reacional. A adição de 2.000 U/mL de catalase ao meio contendo Fe(II) provocou uma diminuição de 61% na degradação da 2-DR (ensaio **A5**). Essa diminuição na presença de catalase já era esperada, uma vez que o H₂O₂ é formado em uma das etapas da reação de autooxidação do Fe(II) (**equação 33**) e é essencial para a formação do radical [•]OH via reação de Fenton (**equação 34**) ou reação de Haber-Weiss (**equação 35**).





Por outro lado, a adição de catalase ao meio contendo Fe(III) (ensaio **A6**) não provocou nenhum efeito, mostrando que o H_2O_2 não participa deste mecanismo. A adição de 100 mmol.L^{-1} de tiouréia ao meio reacional contendo Fe(II) e H_2O_2 (ensaio **A7**) provocou uma inibição de 75% na degradação da 2-DR, uma vez que esta atua como sequestradora de radicais hidroxil. A adição da mesma quantidade de tiouréia ao sistema contendo Fe(III) (ensaio **A8**) não teve efeito na degradação da 2-DR, mostrando que radicais hidroxil não participam deste mecanismo.

Evidenciado o não envolvimento de radicais livres no mecanismo de degradação da 2-DR induzido pelo Fe(III), partimos para o estudo mais detalhado deste mecanismo. **A tabela 5** ilustra o efeito de diferentes tampões (KPi, HEPES, TRIS e MOPS), comumente utilizados na literatura, na reação de Fenton, na autooxidação do Fe(II) e na reação do Fe(III) com a 2-DR.

Observa-se na **tabela 5** que diferentes concentrações dos tampões influenciaram tanto a reação de Fenton como a autooxidação. Observa-se também que a reação da autooxidação do Fe(II) ocorre de maneira significativa somente em tampão fosfato, fato que está de acordo com o observado por Welch e colaboradores (2002)⁽¹¹⁹⁾ (a autooxidação do Fe(II) será abordada em tópico específico no capítulo 03). Entretanto, a variação nas concentrações dos tampões bem como a mudança do meio tamponante não tiveram efeito na reação do Fe(III) com a 2-DR, uma vez que os valores de absorvância não foram alterados.

Tabela 5. Efeito de diferentes tampões nas reações de Fenton, autooxidação do Fe(II) e na reação do Fe(III) com a 2-DR.

Tampões	Meio reacional			% Interferência do Fe(III)
	A ₅₃₂ Autooxidação do Fe(II)	A ₅₃₂ Reação de Fenton	A ₅₃₂ Fe(III)	
KPi				
5 mmol.L ⁻¹	0,288 ± 0,008	0,349 ± 0,015	0,115 ± 0,017	33%
10 mmol.L ⁻¹	0,270 ± 0,013	0,337 ± 0,006	0,108 ± 0,010	32%
20 mmol.L ⁻¹	0,270 ± 0,022	0,319 ± 0,011	0,106 ± 0,012	33%
40 mmol.L ⁻¹	0,253 ± 0,009	0,311 ± 0,011	0,103 ± 0,016	33%
50 mmol.L ⁻¹	0,260 ± 0,006	0,302 ± 0,007	0,100 ± 0,015	33%
Hepes				
10 mmol.L ⁻¹	0,053 ± 0,011	0,734 ± 0,032	0,109 ± 0,007	15%
40 mmol.L ⁻¹	0,054 ± 0,011	0,382 ± 0,014	0,109 ± 0,006	29%
TRIS				
10 mmol.L ⁻¹	0,043 ± 0,007	0,230 ± 0,015	0,111 ± 0,009	48%
40 mmol.L ⁻¹	0,072 ± 0,005	0,175 ± 0,018	0,118 ± 0,006	67%
MOPS				
10 mmol.L ⁻¹	0,067 ± 0,009	1,128 ± 0,078	0,108 ± 0,007	10%
40 mmol.L ⁻¹	0,071 ± 0,017	1,047 ± 0,125	0,113 ± 0,006	11%

Todos os tampões estavam ajustados para pH 7,2. Na reação de Fenton o meio era composto por 5 mmol.L⁻¹ de 2-DR, 50 µmol.L⁻¹ de Fe(II) e 100 µmol.L⁻¹ de H₂O₂. Na autooxidação o meio era composto por 5 mmol.L⁻¹ de 2-DR e 50 µmol.L⁻¹ de Fe(II). Na reação do Fe(III) com a 2-DR o meio era composto por 5 mmol.L⁻¹ de 2-DR e 50 µmol.L⁻¹ de Fe(III). Todas as reações foram incubadas por 10 minutos antes da adição de H₃PO₄ e TBA. O percentual de interferência do Fe(III) (mostrado na 5ª coluna) foi calculado referente à reação de Fenton. Os valores correspondem à média e desvio padrão de 5-7 repetições. As reações foram iniciadas no momento da adição de ferro (Fe(II) ou Fe(III)).

Os percentuais de interferência do Fe(III) têm grande variação entre os tampões e também entre concentrações crescentes de alguns tampões. Crescentes concentrações de KPi (variando de 5 a 50 mmol.L⁻¹) não influenciaram o percentual de interferência do Fe(III), permanecendo constante em 32-33%. O mesmo comportamento foi observado para as diferentes

concentrações de tampão MOPS (10 ou 40 mmol.L⁻¹), onde o percentual de interferência permaneceu inalterado (valores de 10-11%). Variações evidentes no percentual de interferência do Fe(III) foram observadas quando diferentes concentrações (10 ou 40 mmol.L⁻¹) dos tampões Hepes e TRIS foram utilizadas. O aumento de 10 para 40 mmol.L⁻¹ de Hepes provocou uma diminuição de 48% (de 0,734 para 0,382) na absorvância da reação de Fenton e, conseqüentemente, um aumento de 15 para 29% da interferência do Fe(III). O mesmo perfil pode ser observado quando o TRIS foi utilizado, onde houve uma redução de 24% (de 0,230 para 0,175) na absorvância da reação de Fenton e um aumento de 48 para 67% no percentual de interferência do Fe(III).

Tais observações podem ser explicadas por uma possível atividade sequestradora de radicais livres dos tampões Hepes e TRIS⁽¹²⁰⁾, fato que não seria observado nos outros tampões utilizados. O aumento nas concentrações dos tampões “antioxidantes” aumentaria a probabilidade de ocorrência da reação do radical hidroxil com os mesmos e, conseqüentemente, diminuiria a ocorrência da reação do radical hidroxil com a molécula da 2-DR.

Os experimentos realizados ao longo deste trabalho foram feitos em KPi, uma vez que a reação de autoxidação somente atinge valores significativos neste tampão e se trata de um tampão presente no organismo. Além disso, crescentes concentrações de KPi não provocaram alteração no percentual de interferência do Fe(III), colaborando ainda mais para sua escolha.

A inalterabilidade dos valores de absorvância da reação do Fe(III) com a 2-DR nos diversos tampões pode ser explicada pelo fato de que o Fe(III), em valores de pH neutros, possui uma solubilidade muito limitada ($K_{ps} = 2,0 \times 10^{-39}$)⁽¹⁰¹⁾ e, portanto, precipita na forma de Fe(OH)₃. Como todos os tampões foram ajustados para pH 7,2, o Fe(III) está fora de solução durante os 10 minutos de incubação. Por outro lado, a adição dos ácidos fosfórico e tiobarbitúrico (após os 10 minutos de incubação) provoca uma forte acidificação do meio reacional, baixando o pH para 1,3, e acarretando no retorno dos íons férricos para solução. Este fato nos levou à hipótese de que a reação do Fe(III) com a 2-DR poderia ocorrer na fase analítica do método, ou seja, após a acidificação e durante o processo de fervura.

Para testar esta hipótese, foram realizados os experimentos ilustrados nas **figuras 12 e 13**.

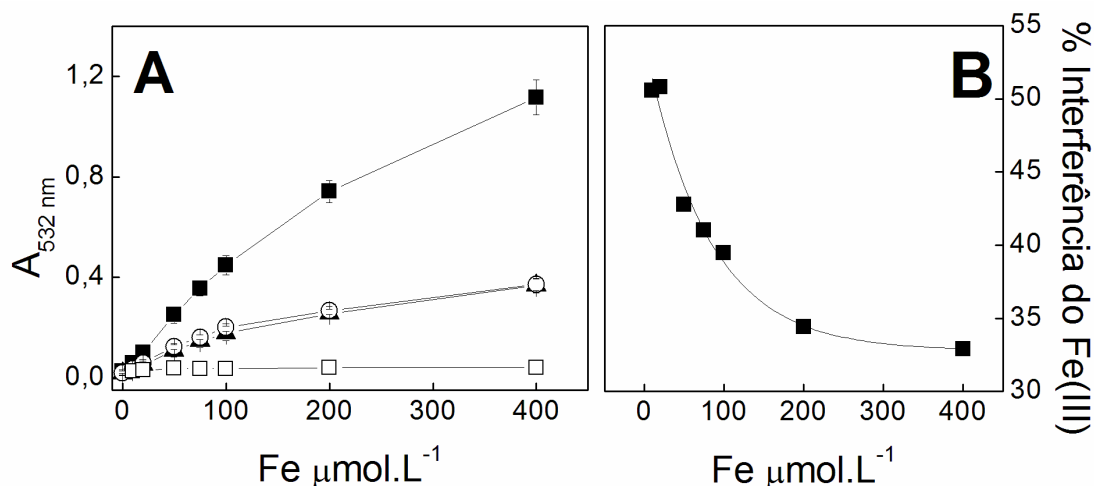


Figura 12. Efeito da concentração de íons ferro na degradação da 2-DR induzida pelo sistema da autoxidação do Fe(II). **(12A)** O meio reacional era composto por KPi 10 mmol.L⁻¹, 2-DR 5 mmol.L⁻¹; (■) + Fe(II) 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; (○) + Fe(III) 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; (▲) + Fe(III) 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ adicionado depois do TBA; e (□) + Fe(II) 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ adicionado depois do TBA. **(12B)** Percentual de interferência do Fe(III) na autoxidação do Fe(II). A linha contínua representa um decaimento exponencial de primeira ordem ($R^2=0,982$). O primeiro ponto na **figura 12B** representa o ponto com 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de ferro. O gráfico representa a média e o desvio padrão de 6 repetições.

A **figura 12** ilustra o efeito de crescentes concentrações de Fe(II) ou Fe(III) no dano a 2-DR induzido pelo sistema da autoxidação do Fe(II) (Fe(II) + O₂), representado pelas **equações 32 a 35**. Espera-se que o aumento da concentração de Fe(II) no meio acarrete maior formação de radicais hidroxil e, conseqüentemente, uma maior degradação da 2-DR. Nota-se que, de fato, concentrações crescentes de Fe(II) provocam um aumento na degradação da 2-DR (evidenciado pelo aumento da A₅₃₂ na curva representada por ■). A curva representada por quadrados brancos (□) demonstra o efeito da adição de crescentes concentrações de Fe(II) após a adição de H₃PO₄ e TBA ao meio reacional, ou seja, após a interrupção da reação. Neste ponto é mostrado o efeito da autoxidação do Fe(II) durante a fase de fervura do método. Observa-se que crescentes concentrações de Fe(II) não geraram uma elevação nos valores de absorvância, evidenciando que a reação de autoxidação do Fe(II) não acontece durante esta etapa. Segundo Morgan e Lahav (2007), a velocidade da reação de autoxidação do Fe(II) é diretamente proporcional à concentração de OH⁻, ou seja, quanto mais alcalino o meio reacional, maior a velocidade de conversão do Fe(II) em Fe(III)⁽¹²¹⁾. Logo, após a acidificação do

meio, o pH é 1,3 e a concentração de OH^- é muito baixa ($[\text{OH}^-] \sim 1,99 \times 10^{-13}$), impossibilitando que a reação de autooxidação aconteça. Além disso, trabalhos sugerem a necessidade de um catalisador para a reação de autooxidação como, por exemplo, o íon fosfato (PO_4^{3-})⁽¹¹⁹⁾. Segundo os autores, ocorre uma complexação entre o Fe(II) e o PO_4^{3-} que favorece a transferência eletrônica do Fe(II) para o O_2 .

Assumindo que esta explicação seja válida e sabendo-se que o pKa do primeiro hidrogênio do ácido fosfórico é 2,15, pode-se concluir que em pH 1,3 o íon fosfato se encontra completamente protonado (na forma de H_3PO_4) e, sendo assim, a reação de autooxidação não aconteceria.

O efeito de crescentes concentrações de Fe(III) adicionado antes ou depois do H_3PO_4 e TBA é mostrado nas curvas com círculo branco (\circ) e triângulo preto (\blacktriangle), respectivamente. Observa-se nessas curvas que o aumento na concentração de Fe(III) provoca um aumento na degradação oxidativa da 2-DR, evidenciado pelo aumento nos valores de absorvância. Nota-se também que não existe diferença nos valores de absorvância quando o Fe(III) é adicionado antes ou depois dos ácidos. Estes resultados sugerem que a reação entre o Fe(III) e a molécula da 2-DR ocorre durante o processo de fervura em pHs ácidos.

Um fato curioso encontra-se na análise da **figura 12B**. Ela ilustra o percentual de interferência do Fe(III) na reação de autooxidação em função da concentração de ferro (Fe(II) e Fe(III)). Nota-se que, em pequenas concentrações de ferro ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$), a interferência do Fe(III) atinge valores elevados (aproximadamente 50%). À medida que aumentam as concentrações de ferro no meio reacional, o percentual de interferência diminui (assumindo valores próximos a 33% com $400 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de ferro). A análise dos dados (com auxílio do software Origin[®] versão 7.0) mostra que a curva da **figura 12B** possui um decaimento exponencial de primeira ordem. Duas hipóteses para essa observação podem ser levantadas: **1)** o potencial oxidante do radical hidroxil é significativamente maior que o do Fe(III); **2)** as constantes das velocidades das reações em que o radical hidroxil oxida a 2-DR são significativamente maiores do que a constante de velocidade da reação entre o Fe(III) e a molécula da 2-DR.

O mesmo comportamento observado na **figura 12** é visto na **figura 13** onde não se verifica diferença no dano entre a condição do Fe(III) adicionado antes ou depois da acidificação do meio reacional. A **figura 13** ilustra o efeito de crescentes concentrações de Fe(II) ou Fe(III) no dano a 2-DR induzido por reagentes de Fenton (ferro e H₂O₂).

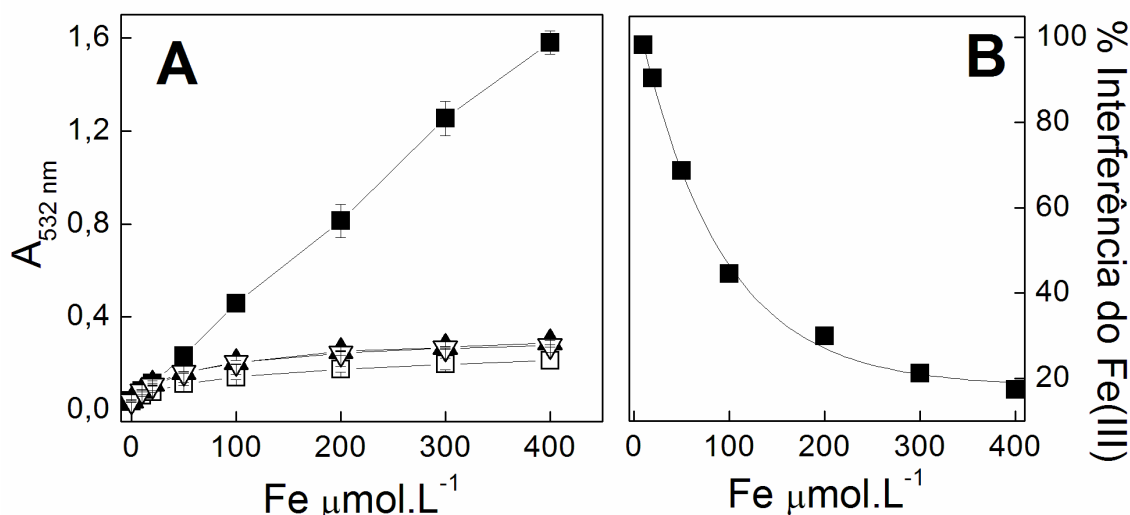
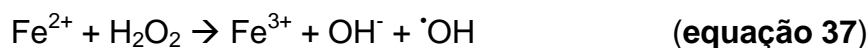
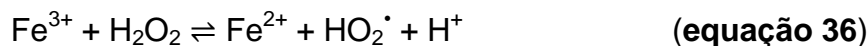


Figura 13. Efeito da concentração de íons ferro na degradação da 2-DR induzida por reagentes de Fenton. **(13A)** O meio reacional era composto por KPi 10 mmol.L⁻¹, 2-DR 5 mmol.L⁻¹ e H₂O₂ 500 μmol.L⁻¹; (■) + Fe(II) 50 μmol.L⁻¹; (▽) + Fe(III) 50 μmol.L⁻¹; (▲) + Fe(III) 50 μmol.L⁻¹ adicionado depois do TBA; e (□) + Fe(II) 50 μmol.L⁻¹ adicionado depois do TBA. **(13B)** Percentual de interferência do Fe(III) na autoxidação do Fe(II). A linha contínua representa um decaimento exponencial de primeira ordem (R²=0,998). O primeiro ponto na **figura 13B** representa o ponto com 10 μmol.L⁻¹ de ferro. O gráfico representa a média e o desvio padrão de 6 repetições.

Observa-se na **figura 13** que o dano à 2-DR é diretamente proporcional à concentração de Fe(II) no meio (representado pelo quadrado preto (■)). A adição de Fe(II) depois da acidificação do meio reacional (representado pelo quadrado branco (□)) provocou um ligeiro aumento na absorbância, mas foi insignificante quando comparado à condição onde o Fe(II) era adicionado antes da acidificação. Por outro lado, os íons Fe(III) apresentaram o mesmo comportamento tanto na presença como na ausência de H₂O₂. Nota-se que a adição do Fe(III) antes (▽) ou depois (▲) do TBA não influencia na degradação da 2-DR. Além disso, o H₂O₂ parece possuir um efeito pequeno na reação do Fe(III) com a 2-DR, uma vez que a adição do H₂O₂ levou a um aumento de aproximadamente 30% nos valores de absorbância (aumentando de 0,100 para

0,128 quando comparado à curva representada pelo quadrado branco (\square) na **figura 12**).

Trabalhos anteriores mostraram que o radical hidroxil pode ser gerado via reação do Fe(III) com o H_2O_2 ^(122, 123), segundo as **equações 36 e 37**.



Logo, o aumento de 30% nos valores de absorbância da reação do Fe(III) com o H_2O_2 pode ser explicado pela reação de Fenton mediada por Fe(III). Para testar essa hipótese foram feitos os experimentos ilustrados nas **figuras 14 e 15** e na **tabela 6**.

A **figura 14** mostra o efeito do H_2O_2 em crescentes concentrações de Fe(III) no dano à 2-DR.

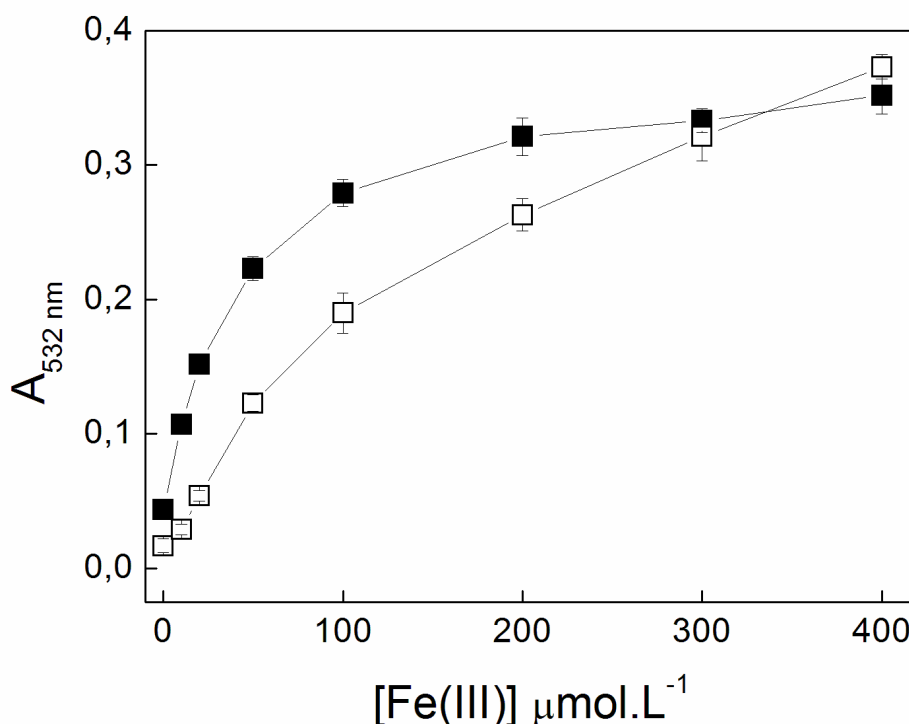


Figura 14. Efeito da concentração de Fe(III) no dano à 2-DR na presença e na ausência de H_2O_2 . O meio reacional contém KPi 10 mmol.L^{-1} , 2-DR 5 mmol.L^{-1} , Fe(III) 0 a $400 \mu\text{mol.L}^{-1}$ na ausência (\square) e na presença de $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de H_2O_2 (\blacksquare). A reação foi incubada por 10 minutos. O gráfico representa a média e o desvio padrão de 6 repetições.

Observa-se que em baixas concentrações de Fe(III) (entre 10 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) o H_2O_2 provocou um aumento de aproximadamente 1,8 vezes na degradação oxidativa de 2-DR. À medida que a concentração de Fe(III) no meio reacional é aumentada, ocorre uma diminuição da interferência do H_2O_2 . Este fato é evidenciado quando a concentração de Fe(III) atinge 300 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, onde não existe diferença entre o ponto com ou sem H_2O_2 .

A **figura 15** ilustra o efeito de crescentes concentrações de H_2O_2 no dano à 2-DR induzido por Fe(II) ou Fe(III).

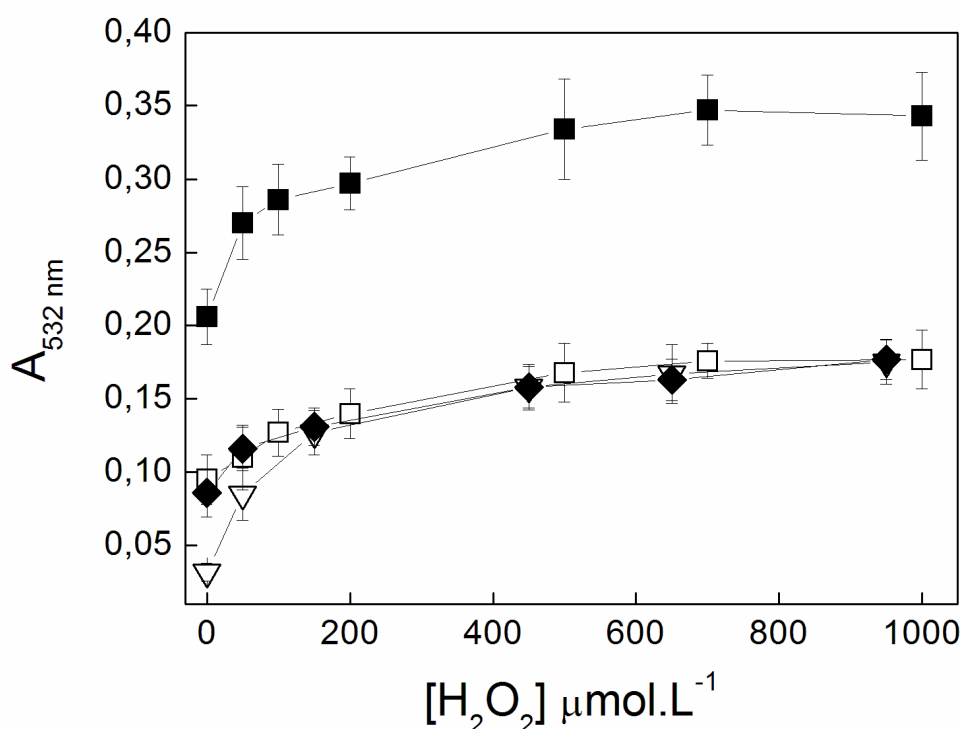


Figura 15. Efeito de crescentes concentrações de H_2O_2 no dano oxidativo à 2-DR induzido por Fe(II) ou Fe(III). O meio reacional era composto por KPi 10 mmol.L^{-1} , 2-DR 5 mmol.L^{-1} , Fe(II) ou Fe(III) 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e H_2O_2 0 a 1 mmol.L^{-1} . (■) + Fe(II); (□) + Fe(III); (▽) + Fe(II) após a acidificação do meio; (◆) + Fe(III) após a acidificação do meio. A reação foi incubada por 10 minutos. O gráfico representa a média e o desvio padrão de 10 repetições.

Observa-se na **figura 15** que a adição de H_2O_2 provocou um aumento nos valores de absorvância em todas as condições estudadas. Entretanto, nos sistemas contendo Fe(II) adicionado antes (■) e após (▽) a acidificação do meio, o efeito da adição de H_2O_2 foi mais significativo que quando comparado com os sistemas contendo Fe(III). Nestas curvas, o aumento deve-se à maior produção de radicais hidroxil por meio da reação de Fenton, o que não ocorre

quando H_2O_2 é adicionado ao meio contendo Fe(III) (curvas \square e \blacklozenge). Nas curvas contendo Fe(III) – adicionado antes ou depois da acidificação do meio – a adição de crescentes concentrações de H_2O_2 teve apenas pequeno efeito, sugerindo que este não influencia de maneira significativa na reação do Fe(III) com a 2-DR.

Para elucidar a participação do H_2O_2 na reação do Fe(III) com a 2-DR foi realizado o experimento cujos resultados são apresentados na **tabela 6**.

Tabela 6. Efeito do H_2O_2 no dano a 2-DR na ausência ou presença de Fe(III) (adicionado após a acidificação do meio reacional).

	A₅₃₂ Média ± D.P.	Δ-A₅₃₂[*]
Reações sem Fe(III)		
H ₂ O ₂ zero	0,019 ± 0,003	-
H ₂ O ₂ 0,1 mmol.L ⁻¹	0,031 ± 0,004	-
H ₂ O ₂ 0,2 mmol.L ⁻¹	0,035 ± 0,005	-
H ₂ O ₂ 0,5 mmol.L ⁻¹	0,045 ± 0,007	0,026 ± 0,008
Com 50 μmol.L⁻¹ Fe(III) (adicionado depois da acidificação)		
H ₂ O ₂ zero	0,113 ± 0,009	-
H ₂ O ₂ 0,1 mmol.L ⁻¹	0,139 ± 0,010	-
H ₂ O ₂ 0,2 mmol.L ⁻¹	0,146 ± 0,005	-
H ₂ O ₂ 0,5 mmol.L ⁻¹	0,145 ± 0,005	0,032 ± 0,010

O meio reacional era composto por KPi 10 mmol.L⁻¹, 2-DR 5 mmol.L⁻¹, H_2O_2 0 a 0,5 mmol.L⁻¹ na ausência ou presença de Fe(III) 50 μmol.L⁻¹. * A 3ª coluna (Δ-A₅₃₂) representa a subtração do ponto com 0,5 mmol.L⁻¹ de H_2O_2 pelo ponto sem H_2O_2 . A reação foi incubada por 10 minutos. Os valores correspondem à média e ao desvio padrão de 6 a 8 repetições.

A adição de crescentes concentrações de H_2O_2 ao meio reacional na ausência de Fe(III) (representado na parte superior da tabela) levou ao aumento de 0,03 nos valores de absorvância. Curiosamente, o mesmo valor foi observado quando o experimento foi feito na presença de Fe(III) (representado por Δ-A₅₃₂). Logo, este resultado exclui a participação do H_2O_2 na reação do Fe(III) com a 2-DR.

Hermes-Lima e colaboradores (1994) mostraram que pequenas concentrações de Fe(III) ($0,35 \mu\text{mol.L}^{-1}$) podem ser encontradas como contaminantes e que estes metais poderiam participar de reações formadoras de radicais livres⁽¹²⁴⁾. O aumento nos valores de absorvância quando o H_2O_2 é adicionado ao meio reacional (observado nas **figuras 14 e 15** e na **tabela 6**) pode ser explicado pela presença de tais metais contaminantes ou pela oxidação direta da 2-DR proporcionada pelo H_2O_2 .

Os experimentos ilustrados nas **figuras 14 e 15**, na **tabela 4** (ensaio **A6**) e na **tabela 6** demonstram, de maneira clara, que o H_2O_2 não influencia na reação do Fe(III) com a 2-DR. Sendo assim, nas análises futuras o H_2O_2 não foi utilizado na reação do Fe(III) com a 2-DR.

Os resultados obtidos até agora mostram que a reação do Fe(III) com a 2-DR somente é afetado pela concentração de Fe(III) (figuras 3 e 4). Ao que parece, somente estes dois reagentes participam dessa reação. Sendo assim, foi testado o efeito de crescentes concentrações de 2-DR em sistemas contendo Fe(II) (com e sem H_2O_2) e Fe(III), experimento ilustrado na **figura 16**.

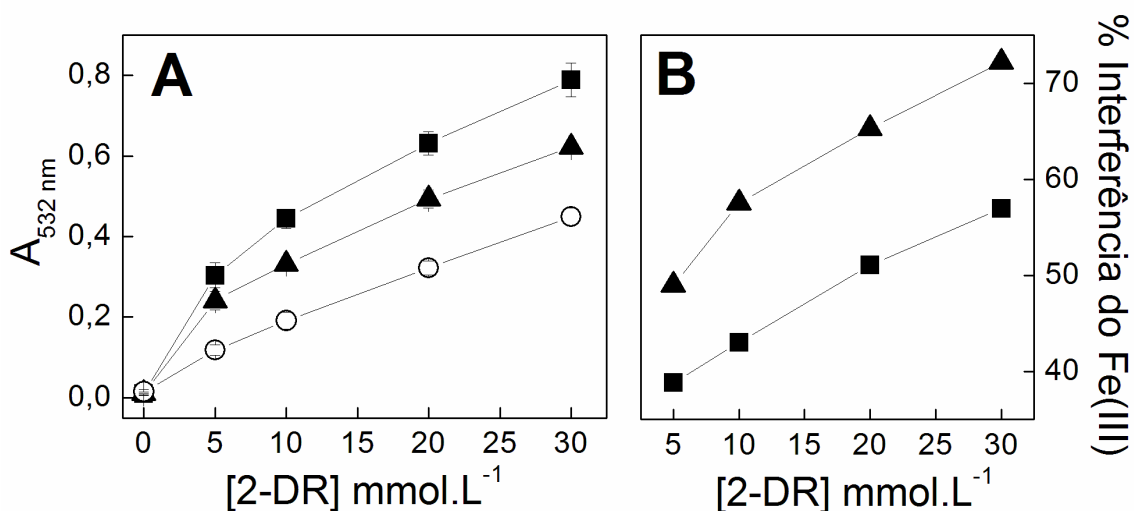


Figura 16. Efeito da concentração de 2-DR em sistemas contendo Fe(II) e Fe(III). (**16A**) O meio reacional era composto por KPi 10 mmol.L^{-1} , 2-DR 0 a 30 mmol.L^{-1} e: Fe(II) $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ + H_2O_2 $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (■); Fe(II) $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (▲) e Fe(III) $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (○). A reação foi incubada por 10 minutos após a adição do ferro. (**16B**) Os percentuais de interferência do Fe(III) na autoxidação do Fe(II) (▲) e na reação de Fenton (■) foram calculados a partir de 5 mmol.L^{-1} de 2-DR. O gráfico representa a média e o desvio padrão de 9 repetições.

Verifica-se na **figura 16** que a adição de crescentes concentrações de 2-DR provocou um crescente incremento nos valores de absorvância dos 3 sistemas testados. O aumento da 2-DR permite uma maior probabilidade de choque do oxidante (seja o radical hidroxil ou o íon Fe(III)) com a molécula de 2-DR. Esta figura evidencia que a reação entre o Fe(III) e a 2-DR, além de ser afetada pela concentração de Fe(III), também é afetada pela concentração de 2-DR, sugerindo uma cinética de segunda ordem para esta reação. A **figura 16B** mostra o percentual de interferência do Fe(III) em função da concentração de 2-DR. Nota-se que este percentual apresenta um perfil de crescimento quase linear (com $R^2 = 0,965$) passando de 49 para 72% no sistema da autooxidação do Fe(II) e de 38 para 56% na reação de Fenton (com $R^2 = 0,994$). Além disso, as curvas mostradas na **figura 16B** apresentam coeficientes angulares próximo (0,88 (▲) e 0,73 (■)) o que indica que a interferência do Fe(III) é similar nas duas curvas, ou seja, é indiferente à presença do H_2O_2 .

O ensaio de variação da concentração de 2-DR é amplamente utilizado na literatura para estudar o mecanismo de ação antioxidante de vários compostos^(74, 75, 125, 126). Este ensaio permite a diferenciação entre o mecanismo de quelação de íons metálicos e o mecanismo sequestrador de radicais livres. Entretanto, a reação do Fe(III) com a 2-DR (representada por ○ na **figura 16**) interfere de maneira significativa no ensaio e, conseqüentemente, na avaliação do mecanismo do antioxidante estudado.

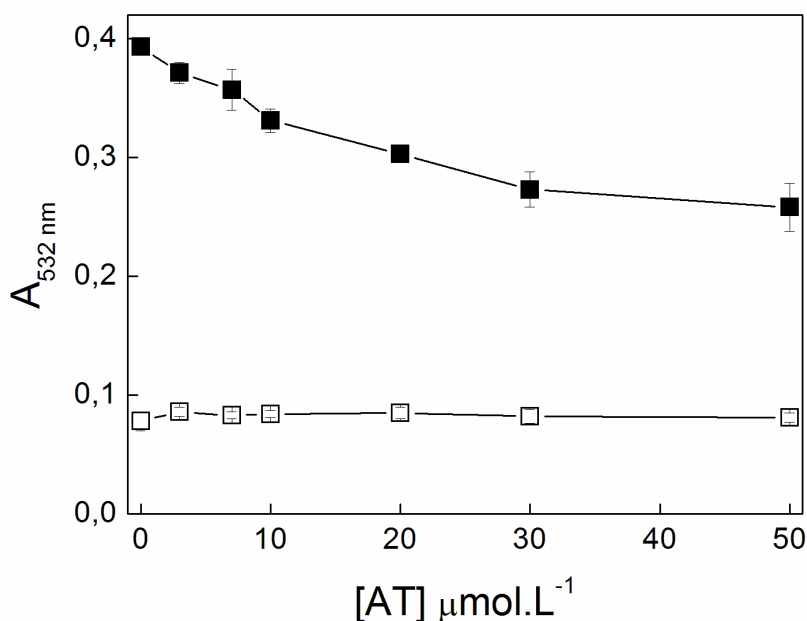


Figura 17. Efeito da concentração de AT na degradação da 2-DR induzida por ferro. O meio reacional era composto por KPi 10 mmol.L^{-1} (pH = 7,2), 2-DR 5 mmol.L^{-1} , AT 0 a 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e: (■) Fe(II) 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ + H_2O_2 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; (□) Fe(III) 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. A reação foi incubada por 10 minutos após a adição de ferro. O gráfico representa a média e o desvio padrão de 3 repetições.

A influência de antioxidantes estudados em nosso laboratório na reação do Fe(III) com a 2-DR também foi verificada. A **figura 17** e a **tabela 7** mostram o efeito de diferentes compostos, com conhecida capacidade de quelar íons ferro, contra a oxidação da 2-DR mediada por Fe(II) ou Fe(III).

Nota-se na **figura 17** que crescentes concentrações de AT promoveram uma inibição dose-dependente na reação de Fenton (■) e não tiveram nenhum efeito na reação entre o Fe(III) e a 2-DR (□). O mesmo pode ser observado na **tabela 7**, onde foram testados os antioxidantes piridoxal isonicotinoil hidrazona (PIH), desferroxamina (DFO), AT, AC, ácido elágico (AE) e o extrato aquoso da fruta do caqui (*Diospyros kaki*)⁽⁵⁶⁾.

Tabela 7. Efeito de quelantes de ferro nas reações de Fenton, autoxidação do Fe(II) e na reação do Fe(III) com a 2-DR.

Antioxidantes	Meio reacional		
	A ₅₃₂ Fenton	A ₅₃₂ Autoxidação do Fe(II)	A ₅₃₂ Fe(III)
Controle	0,321 ± 0,011	0,247 ± 0,009	0,112 ± 0,006
PIH 100 µmol.L ⁻¹	0,252 ± 0,002	0,168 ± 0,007	0,112 ± 0,008
DFO 50 µmol.L ⁻¹	0,323 ± 0,007	0,203 ± 0,016	0,126 ± 0,013
AT 50 µmol.L ⁻¹	0,217 ± 0,007	0,143 ± 0,004	0,107 ± 0,010
AC 200 µmol.L ⁻¹	0,275 ± 0,005	0,180 ± 0,007	0,106 ± 0,006
AE 30 µmol.L ⁻¹	0,278 ± 0,010	0,191 ± 0,018	0,105 ± 0,015
Caqui 2,0 mg/mL	0,236 ± 0,012	0,163 ± 0,013	0,121 ± 0,011

O meio reacional era composto por KPi 10 mmol.L⁻¹ (pH 7,2), 2-DR 5 mmol.L⁻¹, Fe(II) 50 µmol.L⁻¹, H₂O₂ 100 µmol.L⁻¹ (presente somente na reação de Fenton), Fe(III) 50 µmol.L⁻¹ e as concentrações indicadas de cada antioxidante. A reação foi incubada por 10 minutos após a adição do ferro. Os valores correspondem à média e ao desvio padrão de 6 repetições. As concentrações dos quelantes de ferro utilizadas neste experimento foram previamente estabelecidas e correspondem a concentrações com a atividades antioxidantes ideais.

A adição de diferentes antioxidantes produziu uma diminuição nos valores de absorvância tanto da reação de Fenton como da autoxidação do Fe(II), evidenciado na 2^a e 3^a colunas da **tabela 7**. Entretanto, não produziram nenhum efeito na reação do Fe(III) com a 2-DR, evidenciado na 4^a coluna da mesma tabela. Fica claro, a partir dos resultados desta tabela e da **figura 17**, que a reação do Fe(III) com a 2-DR não é influenciada pela presença de quelantes de ferro. Como acreditamos que esta reação ocorre após a acidificação do meio, estes quelantes não teriam nenhum efeito, conforme foi observado.

Os compostos testados nestes experimentos complexam os íons ferro pelos grupos catecol (caso do AT, AC e AE) que, em pH 7,2, estão desprotonados. Isto é, a complexação efetiva ocorre somente em pHs neutros ou alcalinos. O DFO (**figura 18**) e o PIH (**figura 19**) são compostos que complexam íons metálicos por elétrons não ligantes dos átomos de oxigênio e nitrogênio presentes em sua estrutura.

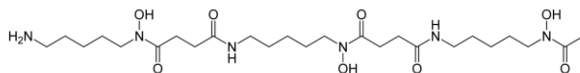


Figura 18. Molécula do DFO.

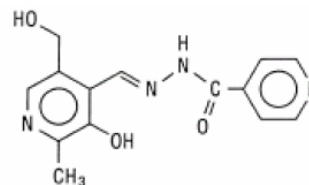


Figura 19. Molécula do PIH.

Com a acidificação do meio – levando o pH para 1,3 – todos os oxigênios fenólicos são protonados, o que impossibilita a complexação dos íons ferro. Da mesma forma, os pares de elétrons não ligantes dos átomos de nitrogênio, que participam da complexação, também se encontram protonados e, conseqüentemente, a complexação não ocorre. Este fato explica a atividade antioxidante dos compostos utilizados nas reações de Fenton e autoxidação do Fe(II), pois nelas a reação de degradação da 2-DR ocorre em pH 7,2 onde ocorre a melhor complexação dos íons ferro. Por outro lado, como a reação entre o Fe(III) e a 2-DR acontece em pH 1,3, a presença destes complexantes não influencia em nada. A mesma ideia utilizada para explicar o fenômeno observado com as moléculas pode ser aplicada para o extrato do caqui, uma vez que os compostos antioxidantes nele presentes são taninos, flavonóides, carotenóides e açúcares⁽⁵⁶⁾.

Outra evidência de que a reação entre o Fe(III) e a 2-DR ocorre após a acidificação e durante a fase de fervura é dada na **figura 20**.

Nota-se na **figura 20** que com um aumento no tempo de fervura ocorre um aumento nos valores de absorbância da reação do Fe(III) com a 2-DR (■). Curiosamente, o mesmo perfil de crescimento é observado quando a 2-DR é levada à fervura sozinha. Isto indica que além da reação do Fe(III) com a 2-DR existe uma degradação térmica do açúcar durante a fase de fervura (evidenciado na curva representada por ▲). A reação do Fe(III) com a 2-DR corresponde à diferença entre a curva contendo Fe(III) e a curva sem Fe(III), representada pela curva ○. Observa-se que a reação entre o Fe(III) e a 2-DR é independente do tempo de fervura, uma vez que atinge a saturação entre 5 e 10 minutos. Além disso, o resultado sugere que essa reação possui uma alta energia de ativação, uma vez que ela não ocorre quando o sistema não é levado à fervura (ponto de 0 minuto na **figura 20**). Em outras palavras, a

reação entre o Fe(III) e a 2-DR possui uma barreira energética que não pode ser rompida em temperatura ambiente, necessitando de aquecimento para sua ocorrência.

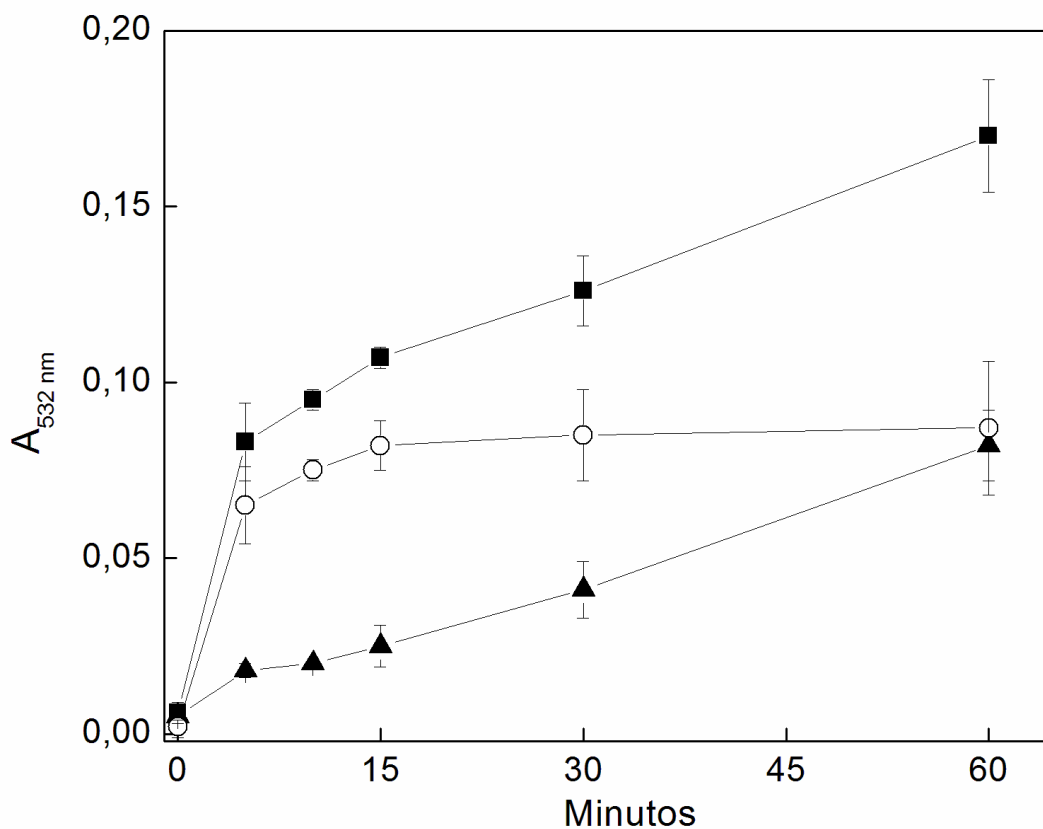


Figura 20. Efeito do tempo de fervura na reação do Fe(III) com a 2-DR. O meio reacional era composto por KPi 10 mmol.L⁻¹ (pH = 7,2), 2-DR 5 mmol.L⁻¹ na ausência (▲) e na presença de Fe(III) 50 μmol.L⁻¹ (■). A curva (○) representa a subtração da (■) pela (▲), isto é da curva contendo Fe(III) pela curva sem Fe(III). A reação foi incubada por 10 minutos após a adição de Fe(III). O gráfico representa a média e o desvio padrão de 6 repetições.

Mais uma evidência que a reação do Fe(III) com a 2-DR ocorre durante a fase analítica do método é apresentada na **figura 21**. Essa figura representa uma variação do tempo de incubação antes da acidificação do meio reacional.

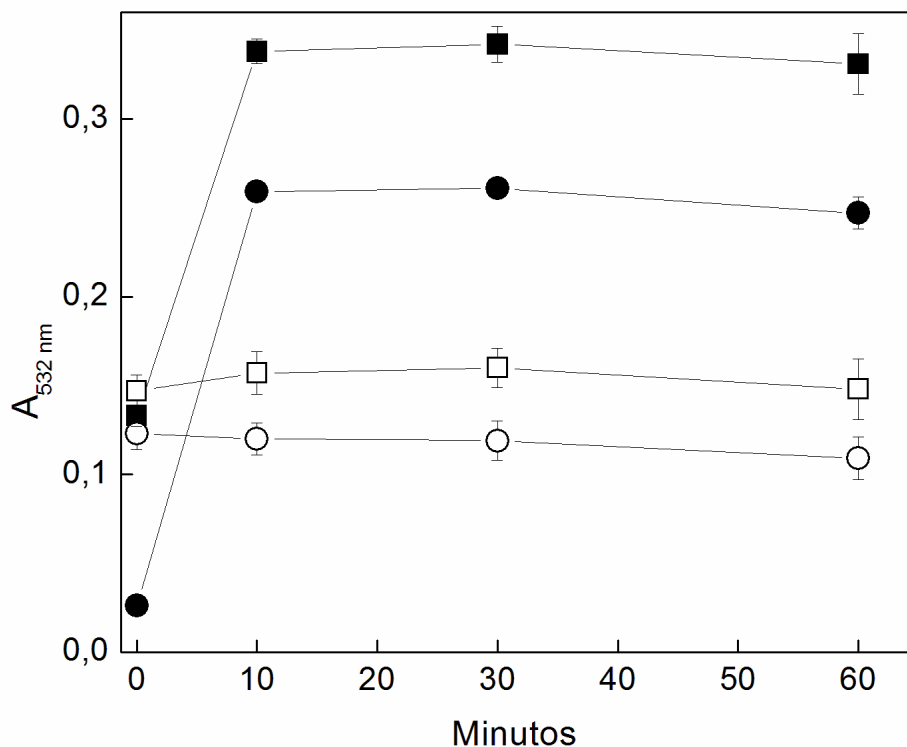


Figura 21. Efeito do tempo de incubação na degradação oxidativa induzida por Fe(II) ou Fe(III). O meio reacional era composto por KPi 10 mmol.L^{-1} , 2-DR 5 mmol.L^{-1} e: (■) Fe(II) 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ + H_2O_2 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; (●) Fe(II) 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ sem H_2O_2 ; (□) Fe(III) 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ + H_2O_2 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; e (○) Fe(III) 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ sem H_2O_2 . As reações foram incubadas por 10, 30 e 60 minutos após a adição de ferro ao meio reacional. No tempo 0 minuto o ferro foi adicionado após a acidificação do meio reacional. O gráfico representa a média e o desvio padrão de 6 repetições.

Observa-se na **figura 21** que existe um aumento significativo nos valores de absorvância entre os tempos 0 e 10 minutos nas reações de Fenton e autoxidação do Fe(II), permanecendo praticamente inalterados por até 60 minutos. Por outro lado, não existe diferença significativa entre os tempos 0 a 60 minutos quando o Fe(III) é incubado na presença ou ausência de H_2O_2 . Esses resultados sugerem, em consonância com os apresentados até aqui, que a reação do Fe(III) com a 2-DR ocorre na fase analítica do método. Além disso, esse resultado também mostra que a formação do radical hidroxil a partir da reação do Fe(III) com o H_2O_2 não é observada nas nossas condições de trabalho, pois não há alteração nos valores de absorvância quando estes reagentes são incubados por até 60 minutos.

Assumindo que o mecanismo pelo qual Fe(III) oxida a 2-DR seja uma reação direta entre os dois, seria esperado o aparecimento de Fe(II) como produto, conforme **equação 38**.



Para testar esta hipótese foi realizado o experimento mostrado na **figura 22**.

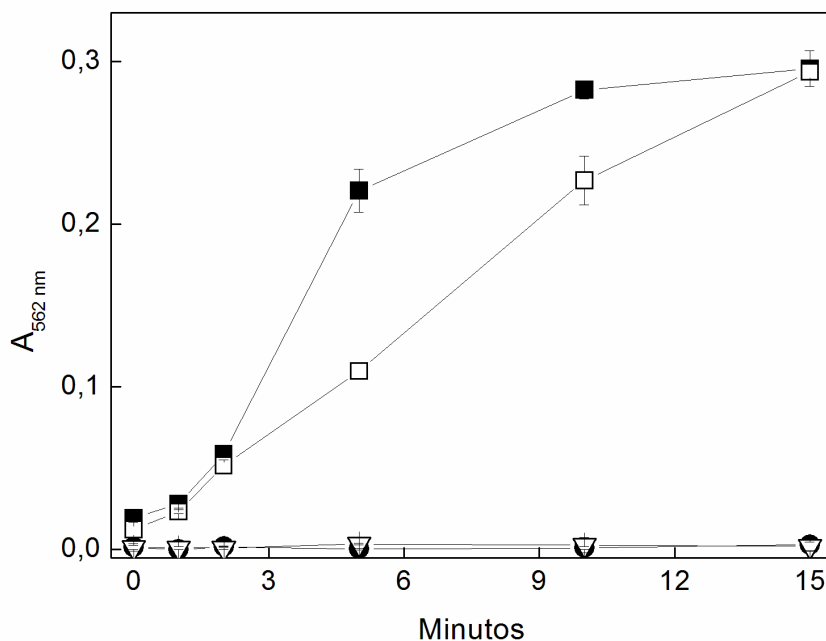


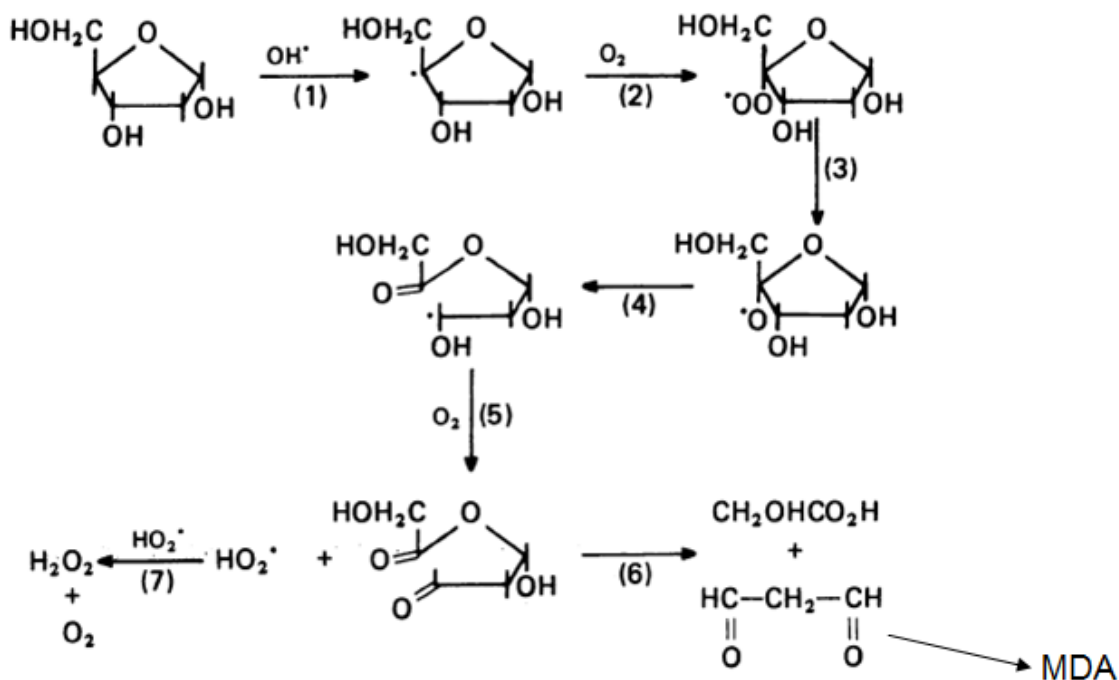
Figura 22. Efeito do tempo de fervura na redução de Fe(III) a partir dos reagentes presentes no meio reacional da reação entre o Fe(III) e a 2-DR. Meio reacional contendo KPi 10 mmol.L-1, 2-DR 5, Fe(III) 50 μ mol.L-1, H₃PO₄ 4% v/v, TBA 1% em NaOH 50 mmol.L-1 e Ferrozina 1 mmol.L-1 (■); sistema sem ferrozina (●); sistema sem TBA (▽) e; sistema sem 2-DR (□). O tempo de reação foi de 10 minutos. O gráfico representa a média e o desvio padrão de 3 repetições.

Na **figura 22** os valores de absorvância em 562 nm são devidos à complexação entre a ferrozina e o Fe(II). Cabe lembrar que a ferrozina é um ligante específico de íons ferrosos e, dessa maneira, o aumento na absorvância em 562 nm é devido à presença de Fe(II) (para maiores detalhes vide seção 3.9). Além disso, é importante ressaltar que a ferrozina não reduz Fe(III) a Fe(II)⁽¹¹⁴⁾. A condição ilustrada por quadrados pretos (■) representa o sistema contendo todos os reagentes presentes na reação entre o Fe(III) e a 2-DR durante a fase de fervura (KPi, 2-DR, Fe(III), H₃PO₄ e TBA) e a ferrozina.

Verifica-se um aumento significativo na absorvância em 562 nm (0,295 após 15 minutos de fervura), indicando que houve redução de $10,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Fe(III) (21% do ferro total presente no meio reacional). Vale ressaltar que, embora a complexação de Fe(II) pela ferrozina seja mais efetiva em pH neutro, a complexação ocorre em meio ácido^(114, 115). Quando a 2-DR é retirada do meio reacional (\square) verifica-se uma diminuição na velocidade de redução do Fe(III) a Fe(II), mas o mesmo valor de absorvância é alcançado após 15 minutos de fervura. Esse resultado sugere que, de alguma maneira, a 2-DR influencia na redução de Fe(III) a Fe(II) pelo sistema, alterando, possivelmente, a cinética da reação. Quando a ferrozina é retirada do meio reacional (\bullet) não é constatado aumento nos valores de absorvância, como já era esperado, uma vez que a ferrozina funciona como “detector indireto de Fe(II)”. Um fato inesperado foi observado quando o TBA foi retirado do meio reacional (∇). A ausência deste ácido acarretou a não redução do Fe(III) a Fe(II), evidenciado pela permanência dos valores de absorvância próximos a zero. Este resultado sugere que o TBA é um composto essencial para que a redução de Fe(III) a Fe(II) ocorra. Welch e colaboradores (2002) relataram que compostos contendo enxofre são capazes de reduzir Fe(III) a Fe(II)⁽¹¹⁹⁾, observações que estão de acordo com o observado na **figura 22**.

4.4 Conclusões do Capítulo 1

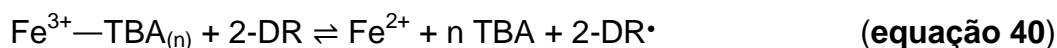
Os resultados apresentados mostram que o íon Fe(III) é capaz de reagir com a molécula da 2-DR e oxidá-la. Esta oxidação leva à formação de MDA, conforme ilustrado nos experimentos de HPLC. Cheeseman e colaboradores (1988) propuseram o mecanismo pelo qual o radical hidroxil reage com a 2-DR e leva à formação de MDA⁽⁹⁹⁾. Esse mecanismo envolve, possivelmente, um ataque do radical hidroxil ao carbono C4 da 2-DR (**etapa 1**), liberando H_2O e formando radical de carbono secundário, conforme ilustrado no **esquema 16**.



Esquema 16. Mecanismo da formação de MDA a partir do ataque do radical hidroxil a molécula da 2-DR. Adaptado de Cheeseman e colaboradores (1988)⁽⁹⁹⁾.

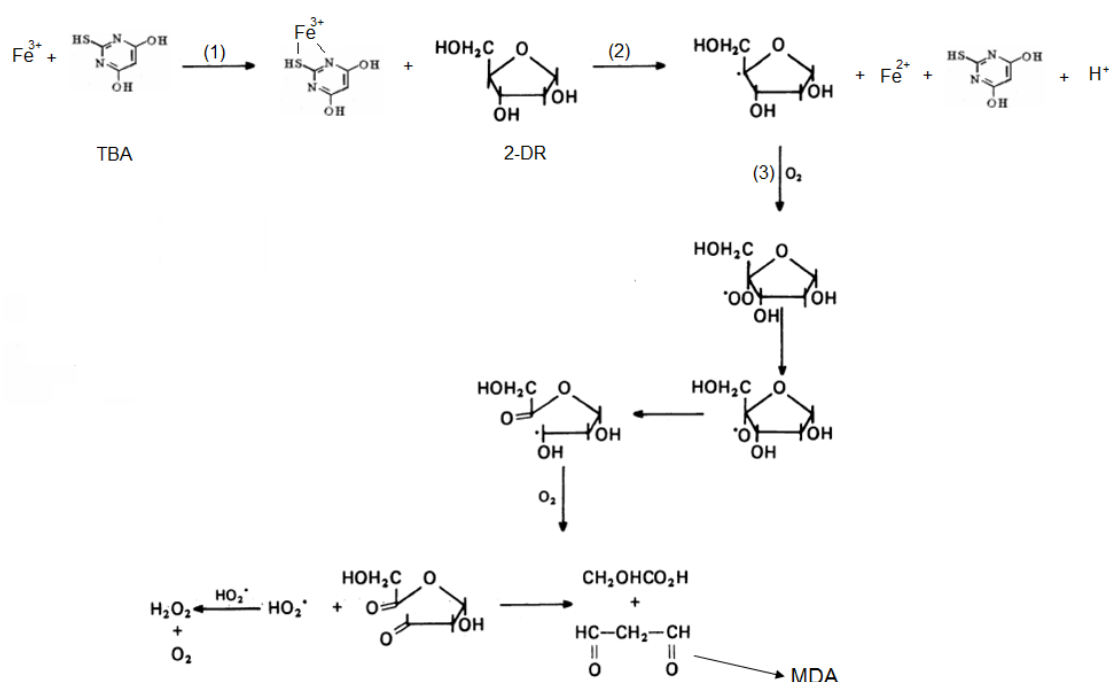
Na etapa seguinte (**etapa 2**), este radical de carbono reage com o O_2 presente no meio reacional, formando um radical peroxil que sofre redução para um radical alcoxil na **etapa 3**. Este radical alcoxil sofre um rearranjo e ocorre a abertura do anel (**etapa 4**), formando um radical de carbono primário altamente instável. Este radical de carbono reage novamente com o oxigênio presente no meio formando um aldeído e liberando HO_2^\cdot (ânion radical superóxido protonado). O composto de 5 carbonos formado durante a **etapa 5** sofre um novo rearranjo e fragmentação, formando como produto principal, o MDA.

A formação de MDA a partir da reação do Fe(III) com a 2-DR pode ter um mecanismo similar ao proposto por Cheeseman e colaboradores (1988)⁽⁹⁹⁾. Os dados experimentais sugerem que, em nossas condições experimentais, a redução de Fe(III) a Fe(II) não ocorre na ausência de TBA. Essa hipótese é ilustrada pelas **equações 39 a 41 (esquema 17)**.



Esquema 17. Formação de MDA a partir da reação do Fe(III) com a 2-DR.

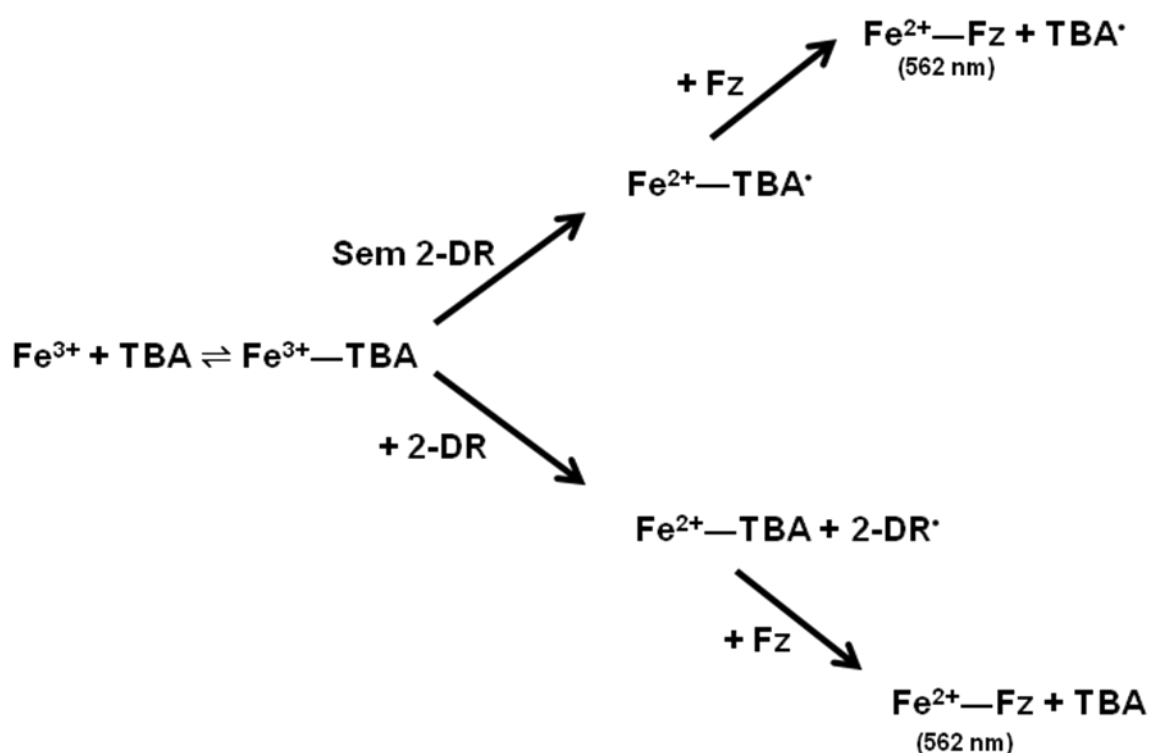
Uma hipótese a respeito do mecanismo das **equações 39 a 41** está ilustrada no **esquema 18**.



Esquema 18. Possível mecanismo de oxidação da 2-DR pelo Fe(III).

Compostos sulfurados, como o TBA, possuem a capacidade de aumentar o potencial de redução do Fe(III)⁽¹¹⁹⁾, facilitando a oxidação da 2-DR pelo Fe(III). Na **figura 22** é ilustrado o experimento mostrando a redução do Fe(III) durante a fase de fervura, ou seja, após a adição de H_3PO_4 e TBA. O aumento no tempo de fervura (de 0 a 15 minutos) resulta no aparecimento de Fe(II) quando somente Fe(III), TBA, H_3PO_4 e ferrozina estão presentes no meio reacional (□ na **figura 22**). Após a possível reação de complexação entre o Fe(III) e o TBA, ocorreria uma transferência eletrônica do segundo para o

primeiro, formando uma espécie radicalar do TBA (TBA^\bullet) e o íon ferroso. Esse íon reage com a ferrozina para formar um complexo com pico de absorção em 562 nm. Quando a 2-DR está presente no meio reacional (condição representada pelo ■ na **figura 22**) ocorre uma alteração na velocidade de formação do Fe(II) (evidenciado pelo maior coeficiente angular da curva), apontando para a participação da 2-DR na reação. O **esquema 19** ilustra, de maneira mais simplificada, os possíveis mecanismos pelos quais Fe(III), TBA e a 2-DR levam à formação de MDA.



Esquema 19. Esquema pelo qual o TBA reduz Fe(III) na presença e ausência de 2-DR. Fz representa a ferrozina, molécula que permite a detecção de Fe(II).

Segundo a proposta descrita no **esquema 18**, o Fe(III) poderia se complexar à molécula do TBA pelo par de elétrons livres do enxofre (**etapa 1**). Em seguida, o complexo Fe(III)-TBA_(n) reage com a molécula da 2-DR. Nessa reação, o Fe(III) abstrai um hidrogênio do carbono C4 da molécula da 2-DR (**etapa 2**). Tal abstração ocorre devido ao carbono C4 estar deficiente em elétrons, uma vez está ligado a grupos eletronegativos. A existência desses grupos funcionais altamente eletronegativos provoca uma diminuição na densidade eletrônica sobre o carbono C4, favorecendo a perda do hidrogênio.

Sendo assim, a reação do Fe(III) com a 2-DR, catalisada pelo TBA, leva à formação de Fe(II) e à liberação de um H⁺ que, segundo o mecanismo descrito por Cheeseman e colaboradores (**etapa 3** em diante), leva à formação de MDA. Estudos mais detalhados no sentido de estabelecer a estequiometria de complexação entre o Fe(III) e o TBA serão realizados no futuro.

Os dados obtidos ao longo deste trabalho mostraram que nenhum dos reagentes presentes no meio reacional influencia na reação do Fe(III) com a 2-DR, com exceção do TBA. Após a acidificação do meio (adição de H₃PO₄ e TBA), o tampão perde seu efeito e as suas capacidades complexantes (pois está completamente protonado) e então não deveria influenciar nesta reação, o que foi observado na **tabela 5**. Uma explicação similar pode ser dada para os complexantes de ferro aqui testados. Em pHs ácidos estes perdem o seu poder complexante e, dessa maneira, não influenciam na reação do Fe(III) com a 2-DR. A adição de antioxidantes como a catalase e a tiouréia também não deveria influenciar nesta reação, uma vez que seria uma reação direta entre o íon e o açúcar, independente de radicais livres ou H₂O₂.

A metodologia da degradação oxidativa da 2-DR é largamente utilizada para o estudo da atividade anti ou pró-oxidante de moléculas isoladas ou extratos vegetais frente ao poder oxidante de radicais livres, como o radical hidroxil. Todos os trabalhos feitos até hoje partem do princípio que todo o dano ao açúcar é proveniente do ataque de radicais livres, o que não é verdade quando o sistema gerador de radicais livres é baseado na reação de autooxidação do Fe(II) ou da reação Fenton. Isto porque nesses sistemas o Fe(III) é um produto que, ao reagir com a 2-DR, leva à produção de MDA. Esta reação gera um artefato metodológico que causou subestimação de capacidade antioxidante e, pior ainda, interpretações erradas a respeito do mecanismo de ação antioxidante de vários compostos. Neste trabalho propomos a utilização de um novo branco de reação – baseado no uso do Fe(III) – cuja utilização descontará a formação de MDA a partir da reação entre o Fe(III) e a 2-DR. Um exemplo do efeito deste branco de reação é apresentado na **tabela 8**.

Tabela 8. Efeito de quelantes de ferro na reação de Fenton.

Antioxidantes	A_{532}	% de	$A_{532}^{\#}$	% de [#]
	Média ± D.P.	Proteção	Média	Proteção
	Sem correção		Com correção	Corrigido
Fe(II) 6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	0,355 ± 0,008	---	0,305 ± 0,008	---
Fe(III) 6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	---	---	0,050	---
Complexantes				
de Fe (10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$)				
AT	0,161 ± 0,010	55%	0,111 ± 0,010	64%
PIH	0,326 ± 0,004	8%	0,276 ± 0,004	9,5%
DFO	0,284 ± 0,004	20%	0,234 ± 0,004	23%
o-fenantrolina	0,216 ± 0,003	39%	0,166 ± 0,003	46%

O meio reacional era composto por KPi 20 mmol.L^{-1} , 2-DR 5 mmol.L^{-1} , Fe(II) 6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e H_2O_2 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Tabela retirada de Lopes e colaboradores (1999)⁽⁷⁵⁾. [#]Todos os valores de absorbância foram subtraídos pelo ponto contendo Fe(III) 6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, ou seja, do valor 0,050 (mostrado na 4ª coluna). O experimento não foi completamente refeito e, para esses cálculos, foi utilizado o valor médio aproximado dos valores atuais. Essas aproximações não invalidam a nossa proposta, uma vez que o desejado aqui é somente mostrar o efeito do novo branco de reação.

A **tabela 8** mostra tanto o percentual de proteção observado por Lopes e colaboradores sem a utilização do branco de reação proposto aqui (2ª e 3ª colunas) como também os dados subtraídos da reação do Fe(III) com a 2-DR, ou seja, do novo branco (4ª e 5ª colunas).

Observa-se na **tabela 8** que houve um aumento significativo nos percentuais de proteção de todos os antioxidantes testados quando o novo branco foi utilizado. Os percentuais de proteção observados na **tabela 8** seriam os valores reais de inibição da degradação oxidativa da 2-DR mediada somente por radicais livres, uma vez que o artefato gerado pela reação do Fe(III) com a 2-DR foi descontado.

A interferência do Fe(III) no método da 2-DR provoca também uma interpretação incorreta dos mecanismos de atividade antioxidante dos compostos estudados. Um exemplo encontra-se no estudo da atividade antioxidante do ácido caféico (AC) frente à reação de Fenton realizado por Maurício (2006)⁽⁹⁷⁾. Utilizando o ensaio da variação da concentração da 2-DR,

pode-se inferir se o mecanismo de ação antioxidante do composto é quelante de metais ou sequestrador de radicais hidroxil. Quando o percentual de proteção permanece constante à medida que se aumenta a concentração da molécula alvo (no caso, a 2-DR), o antioxidante é do tipo quelante, isto é, ele se complexa ao metal e inibe formação do radical hidroxil. Quando o percentual de proteção diminui à medida que se aumenta a concentração da 2-DR, o antioxidante é do tipo sequestrador, pois está competindo com a molécula alvo pelo radical hidroxil. Logo, com o aumento da molécula alvo ocorre uma diminuição no percentual de proteção.

A **tabela 9** ilustra um experimento feito por Ângelo Q. Maurício em sua dissertação de mestrado⁽⁹⁷⁾.

Tabela 9. Efeito de crescentes concentrações de 2-DR na presença e ausência de AC.

	A₅₃₂ Média ± D.P.	A₅₃₂ Média ± D.P.	% de
	Sem AC	Com AC	Proteção
[2-DR]			
0 mmol.L ⁻¹	0	0	---
5 mmol.L ⁻¹	0,236	0,210	11%
10 mmol.L ⁻¹	0,369	0,339	8%
20 mmol.L ⁻¹	0,573	0,535	6%

O meio reacional era composto por KPi 20 mmol.L⁻¹ (pH = 7,2), Fe(II) 30 µmol.L⁻¹, H₂O₂ 100 µmol.L⁻¹, AC 200 µmol.L⁻¹ e 2-DR 0 a 20 mmol.L⁻¹. A reação foi incubada por 10 minutos após a adição do Fe(II). Os valores correspondem à média e ao desvio padrão de 6 repetições.

Nota-se na 4^a coluna da **tabela 9** que, à medida que aumenta a concentração de 2-DR no meio, ocorre uma diminuição significativa no percentual de proteção. Estes resultados sugerem que o AC possui um mecanismo antioxidante do tipo sequestrador. A **tabela 10**, por sua vez, mostra um experimento realizado utilizando o branco de reação proposto aqui.

Observa-se na **tabela 10** que, diferentemente da **tabela 9**, os percentuais de proteção permanecem constantes com o aumento na concentração da 2-DR. Esses resultados, corrigidos da interferência do Fe(III), sugerem que o mecanismo de ação antioxidante do AC, em sistema aquoso, é

do tipo quelante, e não sequestrador de radicais livres como se acreditava anteriormente.

Tabela 10. Efeito de crescentes concentrações de 2-DR na presença e ausência de AC.

	A₅₃₂ Média ± D.P. Sem AC	A₅₃₂ Média ± D.P. Com AC	% de Proteção
[2-DR]			
0 mmol.L ⁻¹	0	0	---
5 mmol.L ⁻¹	0,125	0,100	21%
10 mmol.L ⁻¹	0,158	0,127	19%
20 mmol.L ⁻¹	0,173	0,135	22%

O meio reacional era composto por KPi 10 mmol.L⁻¹ (pH = 7,2), Fe(II) ou Fe(III) 30 µmol.L⁻¹, H₂O₂ 100 µmol.L⁻¹, AC 200 µmol.L⁻¹ e 2-DR 0 a 20 mmol.L⁻¹. A reação foi incubada por 10 minutos após a adição do Fe(II). Os valores correspondem à média e ao desvio padrão de 6 repetições.

Observações semelhantes foram reportadas por Bicalho (2008) ao estudar os efeitos antioxidantes do extrato aquoso da capuchinha (*Tropaeolum Majus L.*)⁽¹³⁷⁾. A autora observou que os percentuais de proteção conferidos pela planta foram subestimados quando não corrigidos da interferência do Fe(III), alcançando valores de 30-40%. Por outro lado, quando corrigidos desta interferência a atividade antioxidante da planta aumentou em 1,5 vezes (alcançando valores de 43-60% de proteção).

Estas observações evidenciam a importância dos resultados apresentados neste capítulo. A inobservância desta reação levou a várias interpretações erradas desde a criação desta técnica. Sendo assim, propomos um novo branco de reação que deve ser realizado das seguintes maneiras:

1) Em estudos utilizando a reação de Fenton como sistema gerador de radicais livres, um ensaio paralelo deve ser feito substituindo-se o Fe(II) por Fe(III) nas mesmas concentrações. Como foi descrito aqui, não existe a necessidade da utilização de H₂O₂ e este deve ser omitido. O valor de absorvância obtido nessa condição (ensaio contendo Fe(III)) deve ser descontado do valor de absorvância obtido na condição contendo Fe(II).

2) Em estudos utilizando a autooxidação do Fe(II) como sistema gerador de radicais livres, um ensaio paralelo deve ser feito substituindo-se o Fe(II) por Fe(III) nas mesmas concentrações. O valor de absorvância obtido nessa condição (ensaio contendo Fe(III)) deve ser descontado do valor de absorvância obtido na condição contendo Fe(II).

Hermes-Lima e colaboradores (1994) mostraram que a técnica da degradação da 2-DR possui o limite de detecção (LD) mais baixo dentre as técnicas de detecção de oxi-radicais baseadas na formação de cor (possuindo $LD = 0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de ferro)⁽¹²⁴⁾. O uso do branco de reação proposto aqui deve ser feito em quaisquer concentrações de Fe(II) utilizadas, pois quaisquer que sejam essas concentrações o Fe(III) provocará o aparecimento de um artefato caso não seja corretamente descontado. Além disso, quanto menores as concentrações de Fe(II) utilizadas, maior a necessidade da aplicação desse branco de reação, uma vez que os dados nos mostram que quanto menor a concentração de ferro maior é a interferência.

Experimentos realizados recentemente em nosso laboratório para testar a atividade antioxidante dos açúcares frutose, glicose, sacarose e galactose revelaram resultados interessantes para este trabalho. Os resultados mostraram que a presença de frutose, sacarose e galactose alteraram os valores de absorvância da reação de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ Fe(III) com 5mmol.L^{-1} de 2-DR (Dalvi, L.T, comunicação pessoal). A adição de frutose ao meio reacional provocou um aumento de 2 vezes no valor de absorvância da reação do Fe(III) com a 2-DR (passando de 0,100 para 0,200). A adição de sacarose provocou um aumento de 1,8 vezes de A_{532} . A galactose provocou um aumento na absorvância inferior ao provocado pela frutose e a sacarose, aumentando em apenas 40% o valor de A_{532} . A glicose não provocou nenhum efeito na reação do Fe(III) com a 2-DR.

Se observarmos a estrutura dos 4 açúcares testados e compararmos com a estrutura da 2-DR, surge uma possível interpretação para a interferência desses açúcares no método da 2-DR (**figura 23**).

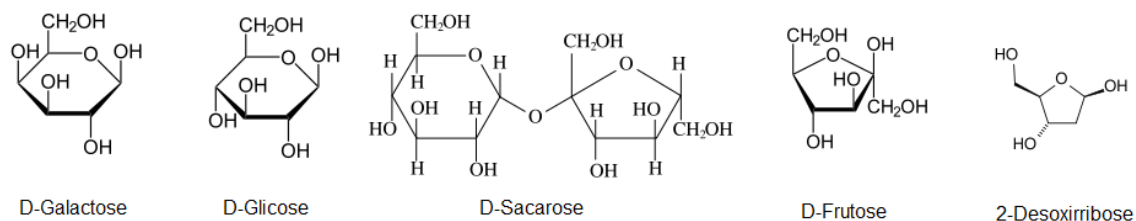


Figura 23. Fórmulas estruturais dos 4 açúcares testados e da 2-DR.

Assim como a 2-DR, a frutose possui um anel de 5 membros (sendo 4 átomos de carbono e 1 átomo de oxigênio). A sacarose possui, além de um anel de 6 membros (glicose), um anel de 5 membros (frutose). A galactose e a glicose são açúcares que possuem, unicamente, um anel de 6 membros. Os açúcares que afetaram de maneira mais significativa a reação do Fe(III) com a 2-DR foram a frutose e a sacarose. Logo, podemos inferir que a interferência na reação do Fe(III) com a 2-DR pode estar associada à estrutura molecular desses açúcares e, principalmente, com o anel de 5 membros comum à frutose, sacarose e 2-DR. Cheeseman e colaboradores (1988)⁽⁹⁹⁾ sugerem que a formação de MDA a partir do ataque do radical hidroxil a 2-DR se deve a um ataque sítio específico com subsequente degradação da estrutura do açúcar até a formação de MDA. Em outras palavras, os autores sugerem que a formação de MDA a partir 2-DR ocorre, em parte, devido à estrutura do açúcar ser favorável à reação com o radical hidroxil. A explicação sugerida por esses autores pode nos ajudar a entender a interferência da frutose e sacarose na reação do Fe(III) com a 2-DR e também na metodologia como um todo. É possível que o aumento nos valores de absorbância na presença desses açúcares seja devido à formação de MDA a partir da sua degradação.

Experimentos com o intuito de elucidar os mecanismos da interferência provocada por esses açúcares na metodologia da 2-DR estão sendo conduzidos em nosso laboratório.

5 - Capítulo 02 - Atividade antioxidante do ácido caféico, em comparação com o ácido tânico, frente à reação de Fenton.

5.1 Introdução e Objetivos

O estudo acerca dos mecanismos de atividade antioxidante dos compostos fenólicos ácido caféico (AC) e ácido tânico (AT) foi iniciado em nosso grupo há alguns anos. Lopes e colaboradores (1999) discutiram a atividade antioxidante do AT em sistemas contendo Fe(II) e H₂O₂⁽⁷⁵⁾. Andrade Jr. e colaboradores estudaram a atividade antioxidante do AT em sistemas contendo Cu(II) e ascorbato⁽²⁴⁾ e em sistemas contendo Fe(III) e ascorbato⁽⁷⁴⁾. Nesses estudos foi destacada a propriedade quelante deste polifenol atuando como antioxidante ao inibir a degradação oxidativa da 2-DR. Maurício (2006) dissertou em seu mestrado acerca da atividade antioxidante do AC em sistemas contendo Fe(II) e H₂O₂⁽⁹⁷⁾. Foi feito um estudo detalhado da complexação do Fe(II) pelo AC em diferentes condições. As **figuras 24, 25 e 27** ilustram alguns experimentos feitos e discutidos por Ângelo Maurício.

A **figura 24**, retirada da dissertação de Maurício (2006), ilustra uma ampliação da varredura espectrofotométrica do AC na presença de Fe(II) em diferentes pHs. O gráfico consiste em 3 espectros diferenciais, “lidos” contra AC puro.

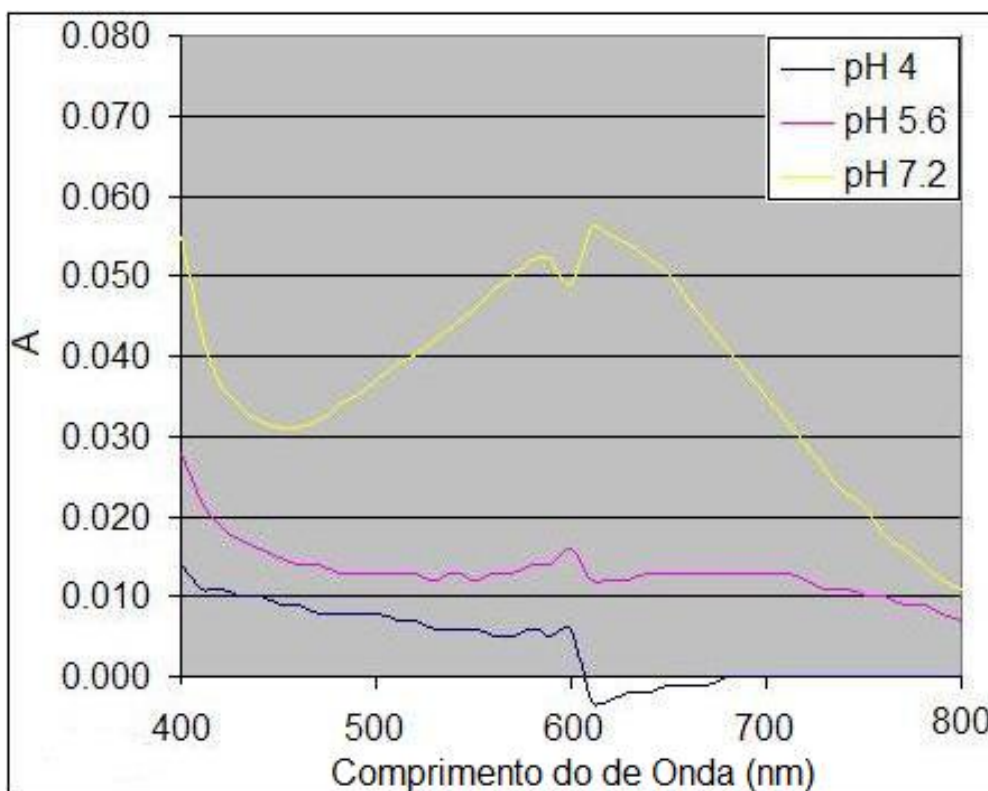


Figura 24. Varredura espectrofotométrica do AC na presença de Fe(II) em diferentes pHs. O meio reacional era composto por HEPES/MES 8 mmol.L^{-1} (ajustado para pHs 4,0, 5,6 e 7,2) Fe(II) $8 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ e AC $80 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$. Os sistemas foram incubados por 90 minutos após a adição do Fe(II). Essa figura foi retirada da página 53 da dissertação de mestrado Maurício (2006)⁽⁹⁷⁾. As linhas azul, rosa e amarela representam, respectivamente, os experimentos em pHs 4,0, 5,6 e 7,2.

Nota-se na **figura 24** que a complexação é diretamente proporcional ao pH do meio reacional. Em pHs ácidos (i.e. pH 4,0) a formação do complexo AC-Fe(II) não é observada. À medida que o pH do meio reacional aumenta, é observado um aumento na absorbância do pico em 600 nm que fica evidente em pH 7,2. De maneira similar, Garcia e colaboradores (1996) observaram que a adição de íons ferrosos a um sistema contendo AC levou a um aumento na absorbância em 600 nm⁽¹²⁷⁾. Shindo e Huang (1984) sugeriram que o aparecimento deste pico em 600 nm se deve à formação de um complexo Fe-catecol que, de acordo com a **figura 24**, somente ocorre de maneira significativa em pHs neutros⁽¹²⁸⁾.

O experimento ilustrado na **figura 25** mostra a cinética da formação do complexo AC-Fe(II) nos três valores de pH testados.

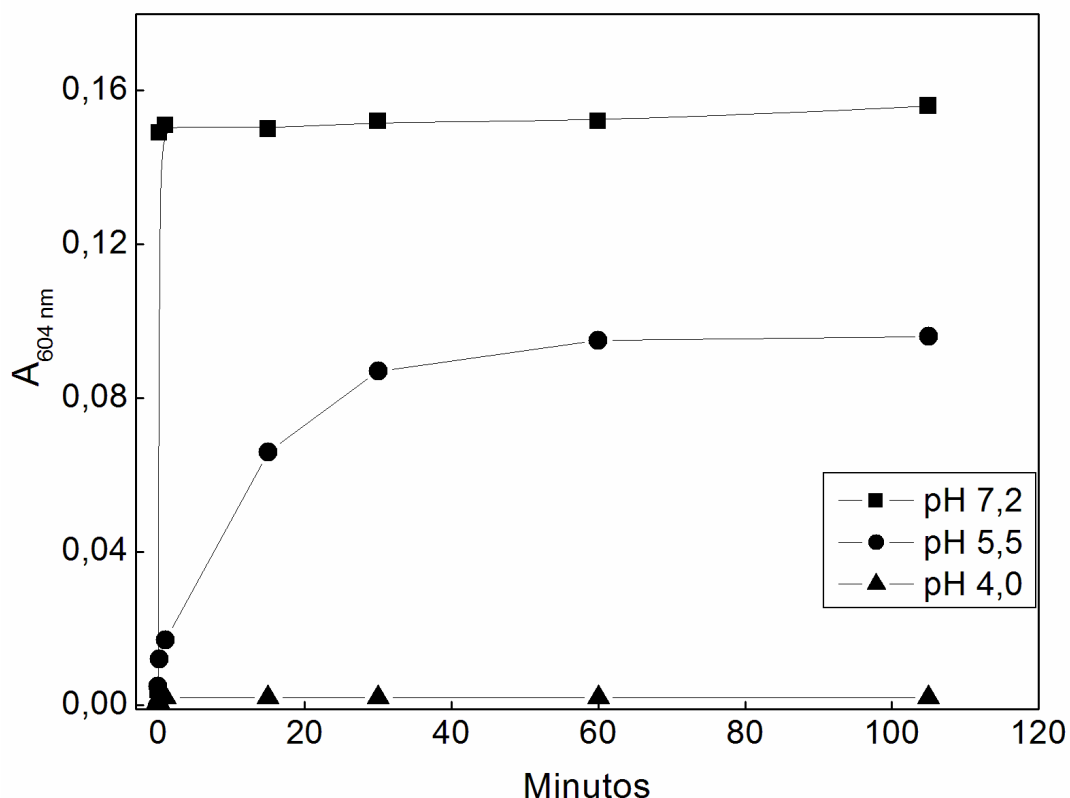


Figura 25. Curso temporal da formação do complexo AC-Fe(II). O meio reacional era composto por Hepes/MES 20 mmol.L⁻¹, Fe(II) 30 μmol.L⁻¹ e AC 200 μmol.L⁻¹. Essa figura foi retirada da página 54 da dissertação de mestrado de Maurício (2006)⁽⁹⁷⁾.

A **figura 25** mostra, em consonância com a **figura 24**, que a formação do complexo é dependente do pH do meio reacional. Em pH 4,0 a formação do complexo não é observada em até 105 minutos, uma vez que não ocorre aumento nos valores de absorbância em 604 nm (representada por ▲). Em pH 5,6 uma crescente formação do complexo AC-Fe(II) é observada após 1 minuto de incubação, atingindo o máximo após 30-40 minutos (representada por ●). Já em pH 7,2 uma completa complexação é observada após 10 segundos de incubação, permanecendo inalterada por até 105 minutos (representada por ■). Nota-se também que a velocidade de complexação é fortemente influenciada pelo pH do meio, uma vez que é significativamente maior em pH 7,2. Silva e colaboradores (2000) mostraram que os valores de pKa dos hidrogênios fenólicos do AC são 4,36 e 8,48⁽¹²⁹⁾. Isso sugere que em pH 4,0 nenhuma hidroxila fenólica foi desprotonada, impossibilitando a complexação com íons ferro. Já em pHs 5,5 e 7,2 uma das hidroxilas fenólicas se encontra

parcialmente desprotonada, o que possibilita a formação do complexo. Além disso, o aumento do pH, com consequente desprotonação das hidroxilas fenólicas, provoca um aumento na densidade eletrônica do anel aromático que, na eventual ocorrência de complexação, aumentaria a estabilização do complexo AC-Fe(II)⁽¹²⁶⁾. Pardo-Andreu e colaboradores (2006) sugerem que a formação do complexo entre um fenolato e o íon metálico provocaria uma diminuição no pKa do hidrogênio da segunda hidroxila fenólica e, com isso, favoreceria a completa complexação Fe-catecol (**figura 26**)⁽¹²⁶⁾.

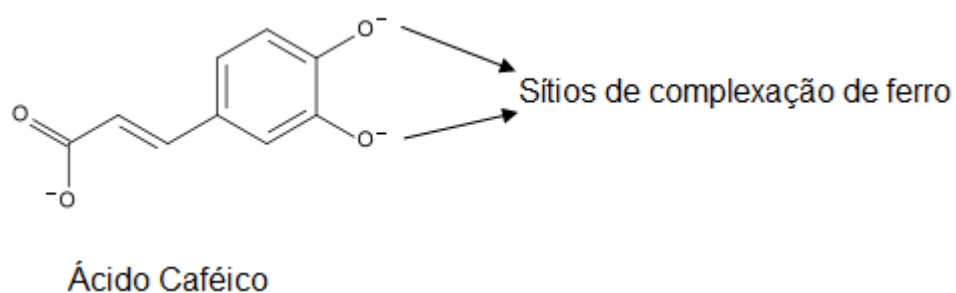


Figura 26. Ilustração dos possíveis sítios de complexação do AC.

Após comprovada a formação do complexo entre o Fe(II) e o AC, Maurício (2006) testou a capacidade antioxidante deste composto fenólico por meio da degradação oxidativa da 2-DR. A **figura 27** ilustra esse experimento.

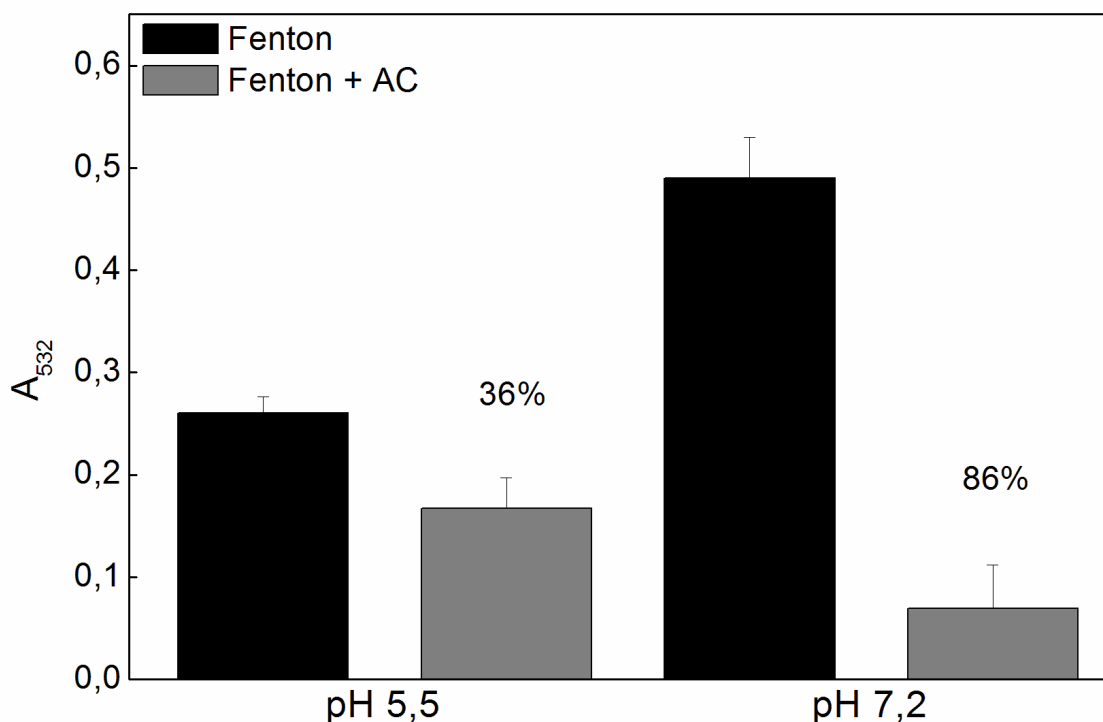


Figura 27. Efeito do AC na degradação oxidativa da 2-DR induzida por reagentes de Fenton em 2 pHs. O meio reacional era composto por Hepes/MES 20 mmol.L⁻¹ (pHs 5,6 e 7,2), 2-DR 10 mmol.L⁻¹, Fe(II) 30 μmol.L⁻¹ e H₂O₂ 100 μmol.L⁻¹. O H₂O₂ foi adicionado após 15 minutos de pré-incubação do AC com Fe(II) à temperatura ambiente. Após a adição do H₂O₂, todo o sistema foi incubado a 37 °C por 20 minutos. Essa figura foi retirada da página 48 da dissertação de mestrado de Maurício (2006)⁽⁹⁷⁾. Os valores foram corrigidos com o novo branco proposto no capítulo 1, subtraindo-se das condições experimentais a A_{532} média da reação do Fe(III) com a 2-DR ($A_{532} = 0,100$).

Observa-se na **figura 27** que o AC é capaz de inibir a degradação oxidativa da 2-DR mediada por Fe(II) e H₂O₂. Esta inibição é dependente do pH do meio reacional, pois em pH 5,6 o AC protegeu somente 36% contra a degradação da 2-DR. Já em pH 7,2, a mesma concentração de AC foi capaz de proteger 86% contra a degradação da 2-DR. Nota-se a existência de uma possível correlação entre formação do complexo AC-Fe(II) (**figuras 24 e 25**) e atividade antioxidante (**figura 27**). Este resultado sugere que a propriedade antioxidante do AC pode estar associada à sua capacidade de formar um complexo com Fe(II) que, de alguma forma, impede a reação entre o radical hidroxil e a molécula da 2-DR. Sendo assim, o presente capítulo tem como

principal objetivo estudar o mecanismo da atividade antioxidante do AC em sistemas contendo reagentes de Fenton, destacando-se os seguintes objetivos específicos:

- 1) Estudar o potencial antioxidante do AC na degradação da 2-DR;
- 2) Analisar o potencial antioxidante do AC na degradação oxidativa de DNA plasmidial;
- 3) Verificar a atividade antioxidante do AC na peroxidação lipídica de homogenato de fígado de rato;
- 4) Estudar o efeito do AC na formação do aduto radicalar DMPO/·OH;
- 5) Verificar o poder redutor do AC frente ao radical ABTS^{•+};
- 6) Comparar, quando possível, o mecanismo antioxidante do AC com o AT nas diversas metodologias utilizadas.

5.2 Metodologias Utilizadas

- Degradação oxidativa da 2-Desoxirribose (vide seção 3.2);
- Degradação oxidativa de DNA plasmidial (vide seção 3.3);
- Ressonância Paramagnética Eletrônica (vide seção 3.4 e subseção 3.4.1);
- Peroxidação Lipídica em homogenato de fígado de rato *in vitro* (vide seção 3.5);
- Método do radical ABTS (vide seção 3.8);

5.3 Resultados e Discussões

Com o objetivo de comparar as atividades antioxidantes do AC e AT, foi feito, inicialmente, o ensaio de redução do radical ABTS^{•+}. O ABTS^{•+} é um radical estável de coloração azulada que possui um pico de absorção em 734 nm. Em geral, este ensaio mede a capacidade do antioxidante em sequestrar radicais livres, por meio da doação de um elétron para o ABTS^{•+}, reduzindo-o a

ABTS²⁻. Esta redução em um elétron provoca a descoloração da solução e, conseqüentemente, uma diminuição na absorvância em 734 nm. Quanto maior o decaimento da absorvância, maior a capacidade antioxidante do composto estudado.

Primeiramente, foi feito um estudo cinético da redução do ABTS⁺⁺ pelos compostos fenólicos em estudo. Verificou-se que as reações entre os compostos fenólicos e o ABTS⁺⁺ atingiam o equilíbrio em aproximadamente 2 minutos (**figuras 57 e 58** no anexo II desta dissertação).

Depois de estabelecido o tempo necessário para que a reação alcançasse o equilíbrio, foi feito um estudo das concentrações do AC e AT. A **figura 28** ilustra o efeito de crescentes concentrações de AC (esquerda) e AT (direita) na redução do ABTS⁺⁺.

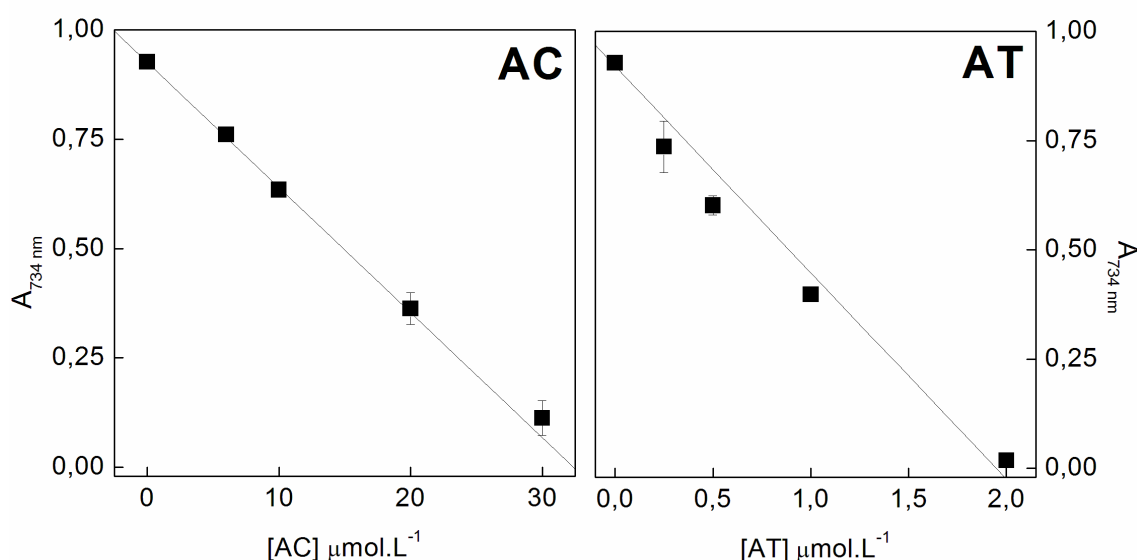


Figura 28. Efeito de crescentes concentrações do AC na redução do ABTS⁺⁺. O meio reacional era composto por KPi 20 mmol.L⁻¹, ABTS⁺⁺ 60 μmol.L⁻¹, AC 0 a 30 μmol.L⁻¹ (**esquerda**) e AT 0 a 2 μmol.L⁻¹ (**direita**). As leituras das absorvâncias foram feitas após 3 minutos de incubação. As linhas representam um decaimento linear com $R^2 = 0,999$ (AC) e $R^2 = 0,984$ (AT). O I_{50} observado foi de 16,73 μmol.L⁻¹ de AC e 0,92 μmol.L⁻¹ de AT.

Observa-se na **figura 28** que crescentes concentrações de AC provocaram uma diminuição linear da absorvância em 734 nm, evidenciando a reação direta entre o antioxidante e ABTS⁺⁺. Nota-se também que o I_{50} (concentração suficiente para inibir em 50%) dessa reação é de 16,73 μmol.L⁻¹ de AC. Calculando-se o valor de TEAC do AC nessas condições de trabalho,

obtém-se 0,94 (este cálculo foi feito com base na curva padrão do Trolox – vide **figura 56** no anexo II desta dissertação). Tal resultado nos mostra que o AC possui uma atividade antioxidante total apenas 6% menor que a do Trolox. Re e colaboradores (1999) alcançaram um valor de TEAC de $0,99 \pm 0,06$, que é estatisticamente igual ao obtido na presente dissertação⁽¹¹¹⁾.

O perfil do gráfico obtido para o AT foi bastante semelhante ao obtido para o AC. Entretanto, o valor de I_{50} observado para o AT ($I_{50} = 0,92 \mu\text{mol.L}^{-1}$) foi significativamente menor que o obtido para o AC, o que concede a ele uma capacidade antioxidante maior. O TEAC calculado para o AT foi de 17,08, isto é, ele possui uma capacidade antioxidante total 17 vezes maior que a do Trolox e 18 vezes maior que a do AC.

A maior capacidade antioxidante do AT comparado ao AC já era esperada, uma vez que o AT possui 25 hidroxilas fenólicas (o AC possui apenas duas) e um extenso sistema π -conjugado em sua estrutura, o que possibilita uma excelente estabilização de elétrons desemparelhados (**figura 29**).

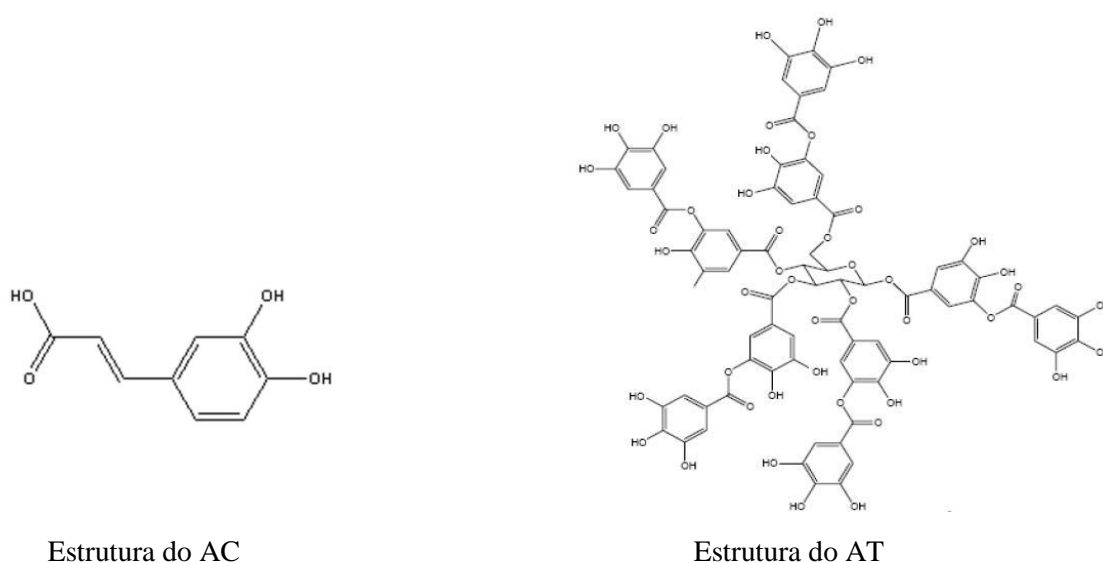


Figura 29. Fórmulas estruturais do AC e AT.

Re e colaboradores (1999) fizeram um estudo criterioso utilizando diversos antioxidantes, que variam de carotenóides, flavonóides a compostos fenólicos⁽¹¹¹⁾. Nesse estudo a maior atividade antioxidante observada foi da quercetina, um composto com 4 hidroxilas fenólicas pertencente à classe dos

flavonóides, que teve um valor de TEAC de 4,72. A segunda maior atividade antioxidante observada pelos autores foi da delfinidina, um composto com 5 hidroxilas fenólicas pertencente à classe das antocianidinas, que teve um valor de TEAC de 4,44. O TEAC obtido para o AT (vide **figura 30**) foi cerca de 3 a 4 vezes maior que o observado para a quercetina e a delfinidina no estudo de Re e colaboradores (1999) (**figura 30**). Esses dados sugerem que a capacidade de antioxidantes atuarem como sequestradores de radicais livres está intimamente ligada à quantidade de hidroxilas fenólicas e à presença de uma estrutura π -conjugada que permita a estabilização por ressonância do elétron desemparelhado. O AC, ao que parece, não possui uma atividade sequestradora de radicais livres significativa, podendo ter o seu principal mecanismo antioxidante do tipo quelante⁽⁷⁵⁾, ou seja, complexando metais e impedindo a formação do radical hidroxil.

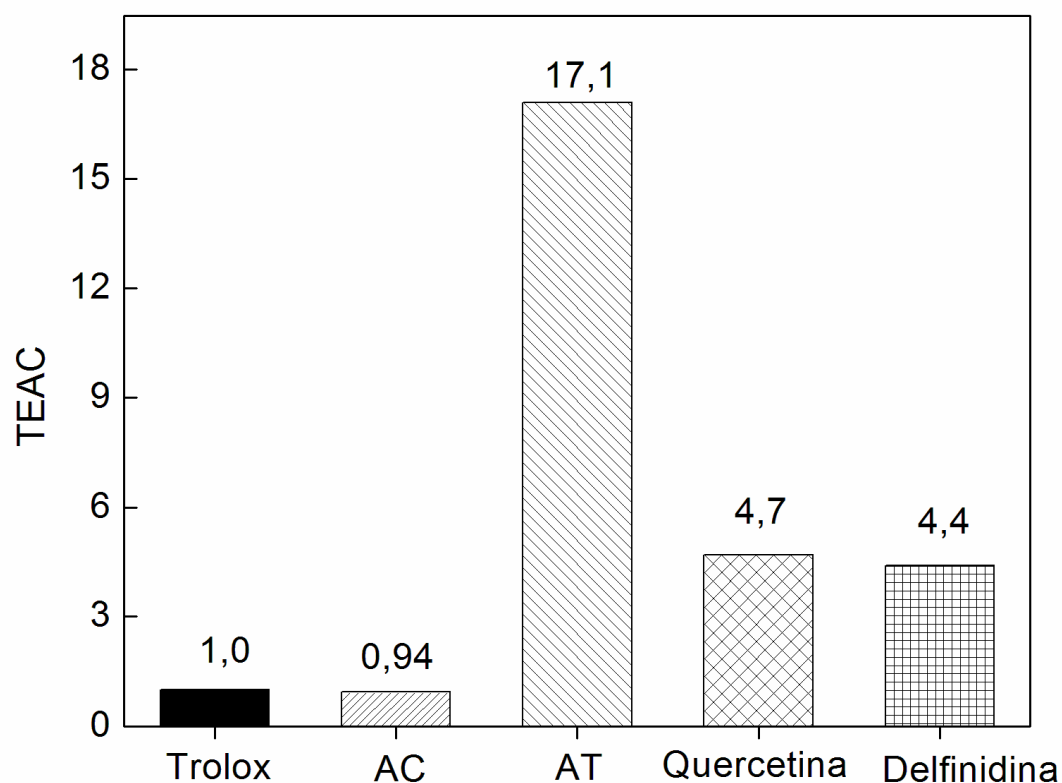


Figura 30. Comparação entre os valores de TEAC obtidos para o AC e AT em comparação com os obtidos por Re e colaboradores (1999) para a quercetina e a delfinidina⁽¹¹¹⁾.

Para estudar com mais detalhes a atividade antioxidante do AC ao inibir a degradação da 2-DR induzida por reagentes de Fenton (**figura 27**) foi feito

um experimento variando a concentração da 2-DR, que é mostrado na **tabela 11**.

Tabela 11. Variação da concentração da 2-DR na presença e ausência de AC.

[2-DR] mmol.L ⁻¹	Condições Experimentais		
	A ₅₃₂ Sem AC	A ₅₃₂ Com AC	% de proteção
0	0,002 ± 0,004	0,000 ± 0,003	---
5	0,125 ± 0,028	0,100 ± 0,031	20,00%
10	0,158 ± 0,040	0,127 ± 0,034	19,62%
20	0,173 ± 0,030	0,135 ± 0,041	21,96%

O meio reacional era composto por KPi 10 mmol.L⁻¹, Fe(II) 30 µmol.L⁻¹, H₂O₂ 100 µmol.L⁻¹, AC 200 µmol.L⁻¹ e 2-DR 0 a 20 mmol.L⁻¹. A reação foi incubada por 10 minutos após a adição do Fe(II). Os valores correspondem à média e ao desvio padrão de 5-6 repetições. Os valores foram subtraídos do branco contendo Fe(III) 30 µmol.L⁻¹ e 2-DR 0 a 20 mmol.L⁻¹. Os valores foram corrigidos com o novo branco proposto no capítulo 1, subtraindo-se das condições experimentais a A₅₃₂ média da reação do Fe(III) com a 2-DR (A₅₃₂ = 0,100).

Este ensaio indica, de maneira simples e clara, se o mecanismo antioxidante é do tipo quelante ou do tipo sequestrador de radicais livres. Um antioxidante do tipo quelante impede, de alguma maneira, que o radical hidroxil alcance o seio da solução (mecanismo que será discutido na conclusão deste capítulo). Por outro lado, um antioxidante do tipo sequestrador de radicais livres atua impedindo a reação do radical hidroxil com a molécula alvo, nesse caso, a 2-DR. Logo, mantendo a concentração do antioxidante constante e aumentando a concentração da molécula alvo, haveria maior probabilidade de reação entre o radical hidroxil e o alvo, acarretando em uma diminuição no percentual de proteção. Se o aumento na concentração da molécula alvo não provocar alterações significativas no percentual de proteção, o antioxidante em estudo possui um mecanismo do tipo quelante^(125, 126, 130).

Verifica-se na **tabela 11** que o aumento na concentração da 2-DR provocou um aumento na absorvância em 532 nm (de 0,002 para 0,173). Um aumento também foi observado quando 200 µmol.L⁻¹ de AC foram adicionados

ao meio reacional (de 0 a 0,135). Entretanto, o percentual de proteção observado na presença de AC não sofreu alterações significativas com o aumento da 2-DR, sugerindo que o mecanismo antioxidante desse composto fenólico é do tipo quelante. Além disso, Maurício (2006) observou em sua dissertação que o AC apresentou valores de I_{50} para um sistema contendo reagentes de Fenton em concentrações micromolares⁽⁹⁷⁾. Segundo Hermes-Lima e colaboradores (2000), compostos que apresentam valores de I_{50} em concentrações micromolares são quelantes característicos e, por outro lado, compostos que apresentam valores de I_{50} em concentrações milimolares são sequestradores característicos⁽¹³⁰⁾. As explicações para essas observações são **i)** metais mediadores de reações formadores de radicais livres estão sempre presentes em concentrações micromolares, logo, um antioxidante do tipo quelante precisa estar presente em concentrações micromolares para exercer sua atividade; **ii)** os alvos do radical hidroxil (i.e. 2-DR) estão presentes em concentrações milimolares, logo, um antioxidante do tipo sequestrador precisa estar presente em concentrações semelhantes para que possa se tornar um “alvo” e exercer sua atividade.

Ainda nesse trabalho, Hermes-Lima e colaboradores (2000) mostraram que compostos como DMSO, salicilato e formato possuíam valores de I_{50} entre 20 e 60 mmol.L^{-1} (na presença de Fe(III) 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e ascorbato 2 mmol.L^{-1}), apresentando, dessa maneira, um mecanismo do tipo sequestrador. O piridoxal isonicotinoil hidrazona (PIH) apresentou valor de I_{50} de aproximadamente 400 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, possuindo um mecanismo do tipo quelante de íons ferro⁽¹³⁰⁾.

Uma análise acerca do mecanismo antioxidante do AT na metodologia da 2-DR, mostrou que o valor de I_{50} desse polifenol – na presença de Fe(II) 6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e H_2O_2 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ – é de 13 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ⁽⁷⁵⁾. Este resultado sugere um mecanismo antioxidante do tipo quelante para o AT. A presença desse mecanismo quelante não exclui a componente do tipo sequestradora de radicais livres do AT, fato que foi evidenciado por Andrade Jr. e colaboradores (2006) também pela metodologia da degradação oxidativa da 2-DR⁽⁷⁴⁾.

Após a verificação da atividade antioxidante do AC na metodologia da degradação da 2-DR, foram feitas análises observando a formação do radical hidroxil em EPR via formação do aduto DMPO/OH . As **figuras 31 e 32** ilustram

o experimento da variação da concentração do AC em meio contendo Fe(II) e H_2O_2 .

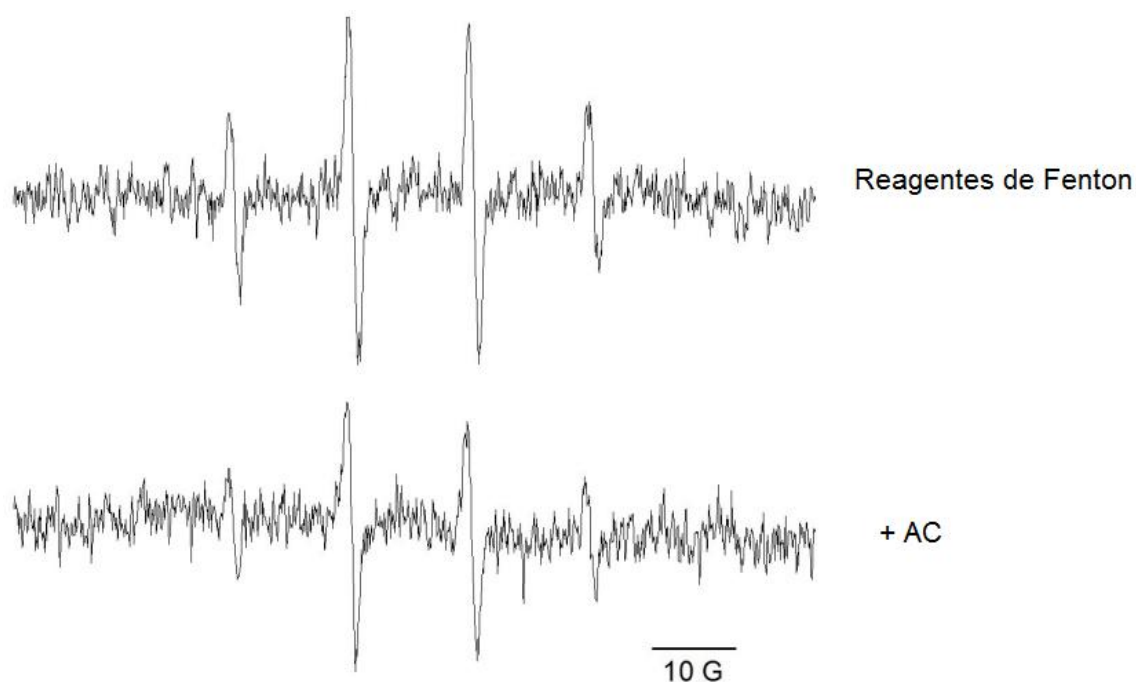


Figura 31. Efeito do AC no sinal do DMPO/ OH . O meio reacional era composto por KPi 10 mmol.L^{-1} (pH 7,2), DMPO 20 mmol.L^{-1} , H_2O_2 $100 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$, Fe(II) $50 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ (**controle**) e na presença de AC $300 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ (+AC). A reação foi incubada por 3 minutos após a adição de Fe(II). O espectro é representativo de 3 repetições.

Observa-se na **figura 31** que a presença de $300 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ de AC provocou uma diminuição na intensidade do sinal do aduto DMPO/ OH . Um estudo mais detalhado é mostrado na **figura 32**, onde foi feita a variação da concentração de AC nas mesmas condições experimentais.

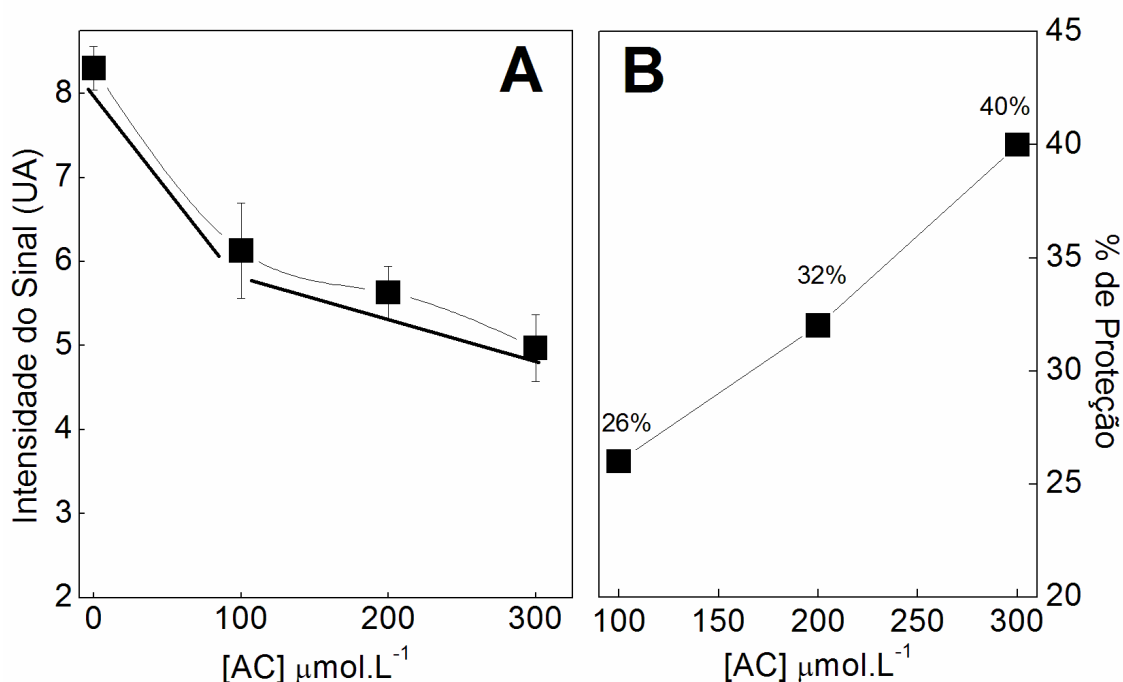


Figura 32. Efeito da concentração de AC na formação do aduto radicalar DMPO/OH via reação de Fenton. O meio reacional era composto por KPi 10 mmol.L^{-1} (pH 7,2), DMPO 20 mmol.L^{-1} , Fe(II) 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, H_2O_2 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e AC 0 a 300 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. A reação foi incubada por 3 minutos após a adição de Fe(II). O gráfico representa a média e o desvio padrão de 3 repetições. **A figura 32B** mostra o percentual de proteção conferido pelo AC. O primeiro ponto na **figura 32B** é referente a 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de AC.

Observa-se na **figura 32** que crescentes concentrações de AC provocaram uma diminuição significativa na intensidade do sinal do aduto DMPO/OH. Entretanto, a maior queda na intensidade do sinal foi observada quando 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de AC estavam presentes (na presença de Fe(II) 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Concentrações superiores de AC (200 e 300 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) provocaram um aumento no percentual de inibição da formação do aduto radicalar (**figura 32B**). Embora o percentual de proteção aumente, há uma mudança no perfil de inibição (evidenciado pelas linhas retas grossas na **figura 32**). Esta mudança de perfil poderia estar associada à complexação do Fe(II) pelo AC. Maurício (2006) observou o mesmo comportamento quando variou-se a concentração de AC na presença de reagentes de Fenton na metodologia da degradação oxidativa da 2-DR⁽⁹⁷⁾. Na presença de Fe(II) 30 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ observou-se uma maior

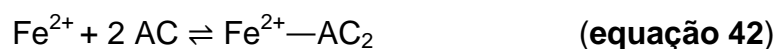
proteção da 2-DR com concentrações de até $60 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AC. A inclinação da curva com concentrações superiores de AC diminuiu, apresentando comportamento semelhante ao observado na **figura 32**. Pode-se inferir, com base na **figura 32** e nas observações de Maurício (2006), que a razão estequiométrica da complexação do Fe(II) pelo AC poderia ser de 1:2 Fe(II):AC.

Kunsági-Máté e colaboradores (2008) observaram a formação, termodinamicamente favorecida ($\Delta G^0 = -18,6 \text{ kJ.mol}^{-1}$), de um complexo AC:Fe(II) em pH 3,2⁽¹³¹⁾. Segundo os autores, nesse pH a complexação ocorreria pelo carboxilato presente na molécula do AC, levando a estequiometria de 1:1 Fe(II):AC. Curiosamente, nesses valores de pH não observamos nenhum tipo de complexação entre o Fe(II) e AC. Diversos trabalhos mostraram que a complexação é dependente do pH do meio reacional, de modo que, em pHs mais ácidos, a complexação é menos efetiva que pHs alcalinos^(27, 126, 132). A divergência a respeito da complexação em pH ácido pode estar associada a uma diferença na metodologia utilizada para caracterização dos complexos.

Embora os dados termodinâmicos observados por Kunsági-Máté e colaboradores (2008) dêem evidência da formação de um complexo 1:1 Fe(II)-AC, a formação do complexo com estequiometria 1:2 não deve ser descartada. O incremento no pH do meio favoreceria a desprotonação das hidroxilas fenólicas e, conseqüentemente, a complexação do Fe(II) pelo grupo catecol^(126, 132). Como o ferro possui seis sítios de coordenação, estequiometrias de 1:2 (Fe:AC) ou de 1:3 poderiam ser observadas⁽⁵⁷⁾. Nesta linha de raciocínio encontra-se o trabalho de Khvan e colaboradores (2001)⁽¹³³⁾. Os autores mostraram a ocorrência de diferentes razões estequiométricas entre íons metálicos (Cu(II) e Zn(II)) e o AC, sendo os complexos com razão 1:2 metal:AC os mais estáveis. Embora este não estudo tenha sido realizado com íons ferro, os resultados sugerem que a formação de complexos 1:2 metal:AC pode ser bastante favorecida^(27, 133).

Uma possível explicação para o fato observado na **figura 32** é que o aumento na concentração do AC no meio reacional acarreta na maior formação do complexo AC-Fe que, de alguma forma, pode inibir a formação do radical hidroxil via reação de Fenton. Assumindo que a estequiometria de

complexação entre o Fe(II) e o AC seja de 1:2, o equilíbrio dessa reação é descrito pela **equação 42**.



A **equação 42** possui uma constante de equilíbrio em função das concentrações (K_c) descrita conforme a **equação 43**.

$$K_c = \frac{[\text{Fe}^{2+}\text{—AC}_2]}{[\text{Fe}^{2+}] \cdot [\text{AC}]^2} \quad (\text{equação 43})$$

O princípio de Le Chatelier afirma que o aumento na concentração de um componente do sistema é seguido por um consumo desse componente com o objetivo de se alcançar um novo equilíbrio⁽¹³⁴⁾. Aplicando-se esse princípio na **equação 43**, em virtude de um aumento na concentração do AC, verificar-se-á uma diminuição nas concentrações de Fe(II) e AC livres, bem como um aumento na concentração do complexo Fe(II)-AC, tendo em vista a manutenção do equilíbrio químico. A observação direta desse princípio por meio da **equação 42** seria o deslocamento do equilíbrio no sentido da formação do complexo AC-Fe(II). Logo, a **figura 32** pode ser, de fato, explicada pela diminuição da concentração de Fe(II) livre com conseqüente aumento na formação do complexo AC-Fe(II) que, de alguma forma, inibe a reação do radical hidroxil com o DMPO, diminuindo a intensidade do sinal.

Um estudo similar foi desenvolvido para o AT na presença de íons ferrosos e H₂O₂. Observou-se o efeito de crescentes concentrações de AT na hidroxilação do DMPO. Esse experimento é mostrado nas **figuras 33 e 34**.

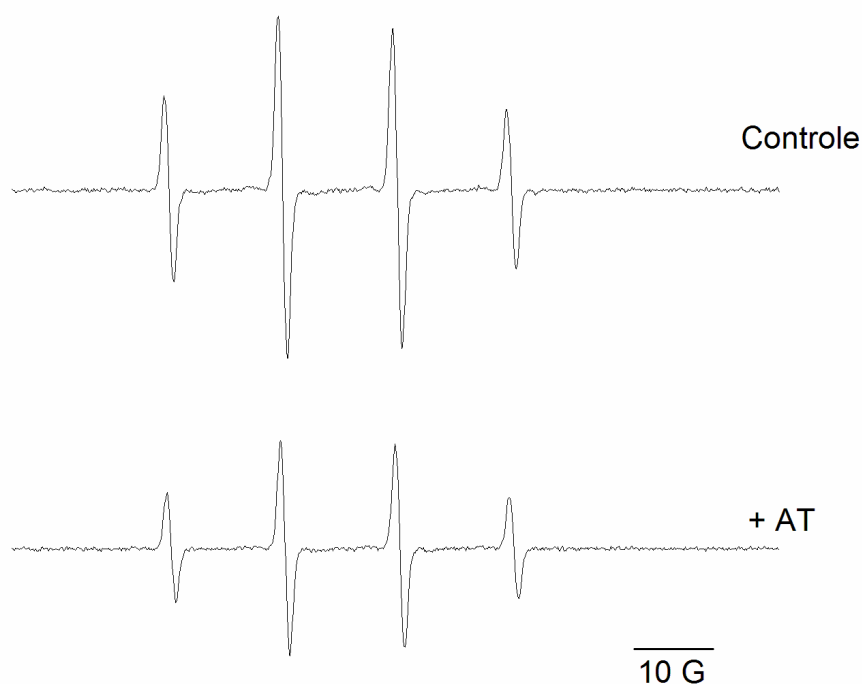


Figura 33. Efeito do AT no sinal do DMPO/•OH. O meio reacional era composto por KPi 0,1 mmol.L⁻¹ (ajustado para pH 7,2), DMPO 50 mmol.L⁻¹, H₂O₂ 100 µmol.L⁻¹, Fe(II) 120 µmol.L⁻¹ (**controle**) e na presença de AT 20 µmol.L⁻¹ (**+AT**). A reação foi incubada por 3 minutos após a adição de Fe(II).

Nota-se na **figura 33** que a presença de AT 20 µmol.L⁻¹ provocou uma diminuição significativa do sinal do DMPO/•OH. Uma investigação mais detalhada desse fenômeno foi feita e é mostrada na **figura 34**.

Nota de rodapé 01: Os experimentos ilustrados nas **figuras 31 e 33** foram realizados em condições experimentais distintas, fato que explica a diferença na intensidade entre os sinais de EPR mostrados. Na **figura 31** os experimentos foram conduzidos na presença de KPi 10 mmol.L⁻¹, Fe(II) 50 µmol.L⁻¹, H₂O₂ 100 µmol.L⁻¹ e DMPO 20 mmol.L⁻¹ em capilares com volumes de 30 µL. Na **figura 33** os experimentos foram conduzidos na presença de KPi 0,1 mmol.L⁻¹, Fe(II) 120 µmol.L⁻¹, H₂O₂ 100 µmol.L⁻¹ e DMPO 50 mmol.L⁻¹ em uma *flat cell* com volume de 200 µL. Essas diferenças podem ter acarretado em uma maior intensidade no sinal de EPR observado na **figura 33** em relação ao observado na **figura 31**.

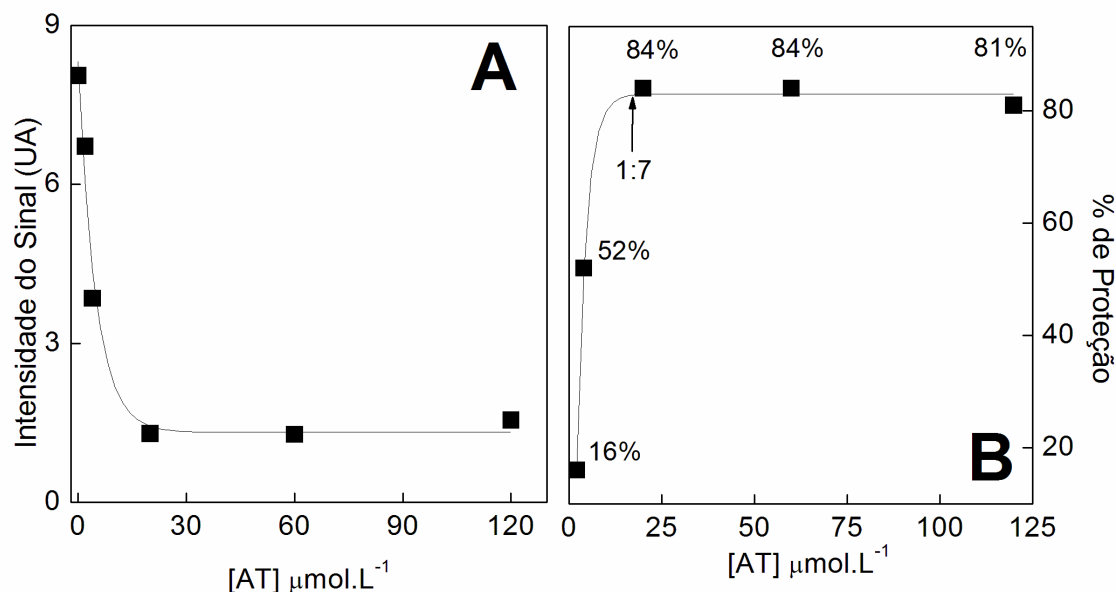


Figura 34. Efeito da concentração de AT na formação do aduto radicalar DMPO/ $\cdot\text{OH}$ via reação de Fenton. O meio reacional era composto por KPi $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ (ajustado para pH 7,2), DMPO 50 mmol.L^{-1} , Fe(II) $120 \mu\text{mol.L}^{-1}$, H_2O_2 $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e AT 0 a $120 \mu\text{mol.L}^{-1}$. A reação foi incubada por 3 minutos após a adição de Fe(II). O gráfico representa a média e o desvio padrão de 3 repetições. **A figura 34B** mostra o percentual de proteção conferido pelo AT. O primeiro ponto na **figura 11B** é referente a $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AT.

Observa-se na **figura 34** que crescentes concentrações de AT provocaram uma significativa diminuição na intensidade do sinal do aduto DMPO/ $\cdot\text{OH}$. Quando a concentração de AT atingiu $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ o percentual de proteção observado (**figura 34B**) foi máximo (84%), permanecendo constante até $120 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AT. O ponto marcado com a seta na **figura 34B** foi obtido com o auxílio do software Origin[®] versão 7.0 para Windows[®] e mostra o exato ponto onde a curva torna-se linear e constante. Este ponto corresponde à concentração de $17 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AT. Ao dividir a concentração de Fe(II) utilizada no experimento ($120 \mu\text{mol.L}^{-1}$) pela concentração de AT no ponto indicado pela seta, teremos a relação estequiométrica AT:Fe(II) que foi capaz de inibir mais significativamente a formação do aduto DMPO/ $\cdot\text{OH}$. A relação estequiométrica, de acordo com esses cálculos, é de 1:7 (AT:Fe(II)). Vale ressaltar que essa relação foi obtida indiretamente, com base na diminuição da intensidade do radical hidroxil. Logo, a estequiometria aqui mostrada está diretamente associada à capacidade do AT em diminuir a hidroxilação do DMPO, ou seja,

está associada à sua capacidade antioxidante. Lopes e colaboradores sugerem que o AT forma um complexo de estequiometria 1:10 (AT:Fe(II)), valor próximo ao obtido pela aproximação supracitada⁽⁷⁵⁾. Sungur e Usar (2008), por outro lado, sugerem que o AT complexa íons férricos com estequiometria 1:4 (AT:Fe(II)) em valores de pH superiores a 7,0, mostrando que ainda existem divergências a esse respeito⁽¹³⁵⁾. Assumindo a estequiometria de complexação sugerida em nosso trabalho (1:7 AT:Fe(II)), o equilíbrio de complexação pode ser dado, simplificadamente, segundo a **equação 44**.



A **equação 44** possui uma constante de equilíbrio em função das concentrações (K_c) descrita conforme a **equação 45**.

$$K_c = \frac{[(\text{Fe}^{2+})_7\text{---AT}]}{[\text{Fe}^{2+}]^7 \cdot [\text{AT}]} \quad (\text{equação 45})$$

A explicação dada para os resultados obtidos na **figura 32** pode ser aplicada aos resultados mostrados na **figura 34**. O aumento na concentração de AT provoca um deslocamento do equilíbrio no sentido de formação do complexo Fe(II)₇-AT que, de alguma forma, inibe a reação do radical hidroxil com o DMPO.

O efeito de crescentes concentrações de Fe(II) na hidroxilação do DMPO na presença e ausência de AC e AT também foi estudado e é mostrado na **figura 35**.

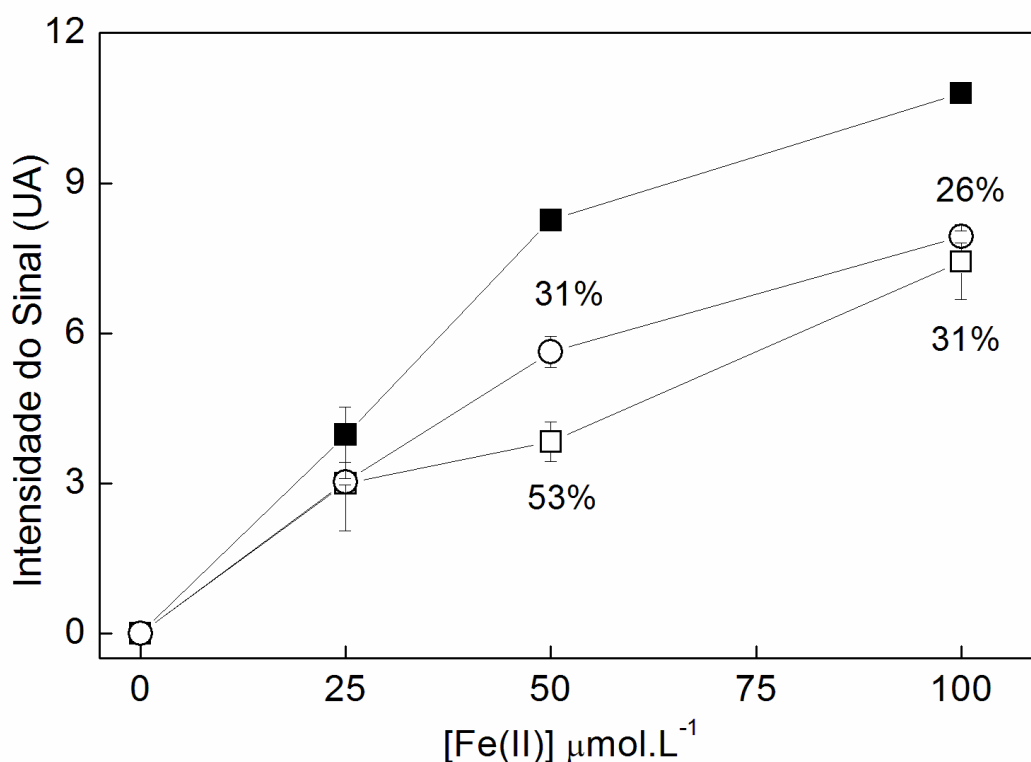


Figura 35. Efeito de crescentes concentrações de Fe(II) na hidroxilação do DMPO na presença e ausência de AC e AT. O meio reacional era composto por KPi 10 mmol.L⁻¹ (ajustado para pH 7,2), DMPO 20 mmol.L⁻¹, H₂O₂ 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, Fe(II) 0 a 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; + AC 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (○); + AT 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (□). A reação foi incubada por 3 minutos após a adição de Fe(II). O gráfico representa a média e o desvio padrão de 3 repetições.

Observa-se na **figura 35** que crescentes concentrações de Fe(II) levaram a um aumento na intensidade do sinal do DMPO/•OH (representado pelo ■). A adição de 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de AC ao meio reacional provocou uma diminuição na intensidade do sinal (representado pelo ○). Entretanto o aumento na concentração de Fe(II) provocou uma pequena diminuição no percentual de proteção conferido pelo AC (de 31 para 26% de inibição). A presença de 50 de $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AT provocou também uma diminuição na intensidade do sinal observado e o mesmo comportamento (diminuição no percentual de proteção) foi observado quando a concentração de Fe(II) foi aumentada (de 53 para 31% de inibição). Ao que parece, o mecanismo antioxidante desses compostos fenólicos (AC e AT) é do tipo quelante e, sendo

assim, a maior atividade antioxidante seria do composto capaz de complexar mais íons metálicos. Embora presente em concentração 4 vezes menor, o AT inibiu mais significativamente a formação do aduto DMPO/·OH, fato que pode estar associado à sua maior capacidade de complexar íons ferro.

Uma diminuição no percentual de proteção com o incremento na concentração de Fe(II) é esperado para moléculas quelantes^(75, 125). Se uma nova análise das **equações 43 e 45** for realizada, onde a concentração de Fe(II) é aumentada, será observado um novo estado de equilíbrio. Esse novo estado de equilíbrio consistirá em maiores concentrações de Fe(II) livre quando comparado ao estado inicial (com pouco ferro) e também com maior concentração do complexo. O saldo líquido desse novo equilíbrio será um aumento nas concentrações de Fe(II) livre, que provocará uma diminuição no percentual de proteção conferido pelo antioxidante, fato que é observado experimentalmente.

O mesmo comportamento observado para o AC e o AT nesses experimentos foi verificado por Lopes e colaboradores (1999)⁽⁷⁵⁾ e Ginani (2005)⁽¹¹⁶⁾ quando estudavam, respectivamente, a atividade antioxidante do AT e do ácido elágico (AE) em sistemas contendo íons ferro. A conclusão obtida por esses autores foi que os compostos analisados possuíam atividade antioxidante do tipo quelante, o que está de acordo com as nossas conclusões para o mecanismo do AC.

Após a caracterização do mecanismo antioxidante do AC, foram feitos ensaios testando a sua capacidade em prevenir a peroxidação lipídica em homogenato de fígado de rato. Foi determinado um curso temporal da peroxidação lipídica (induzida por reagentes de Fenton) contendo diferentes concentrações de AC. Esse resultado é mostrado na **figura 36**.

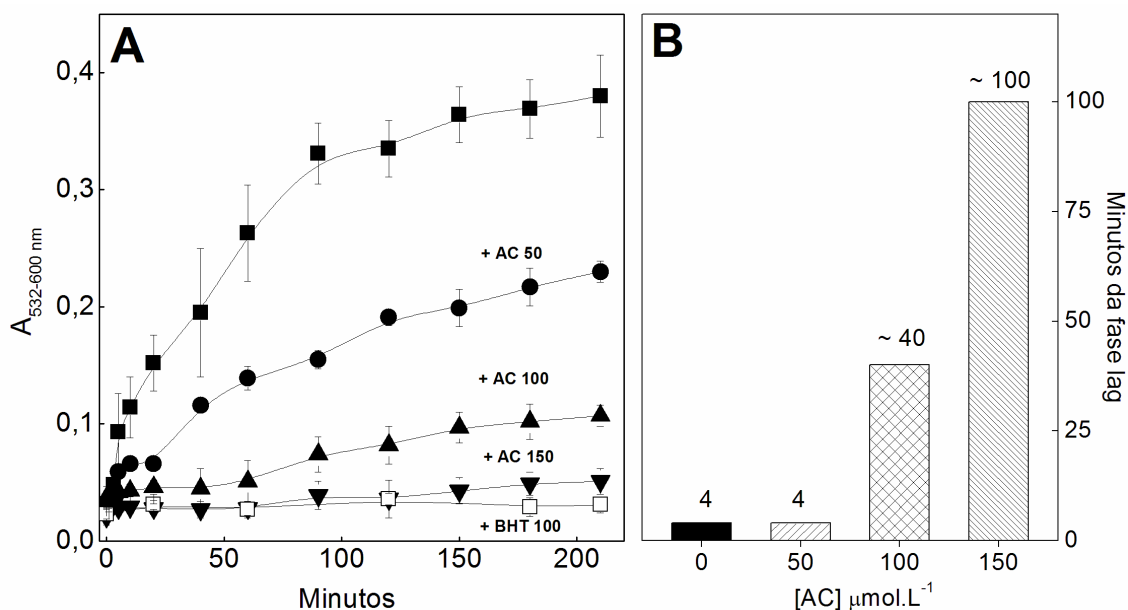
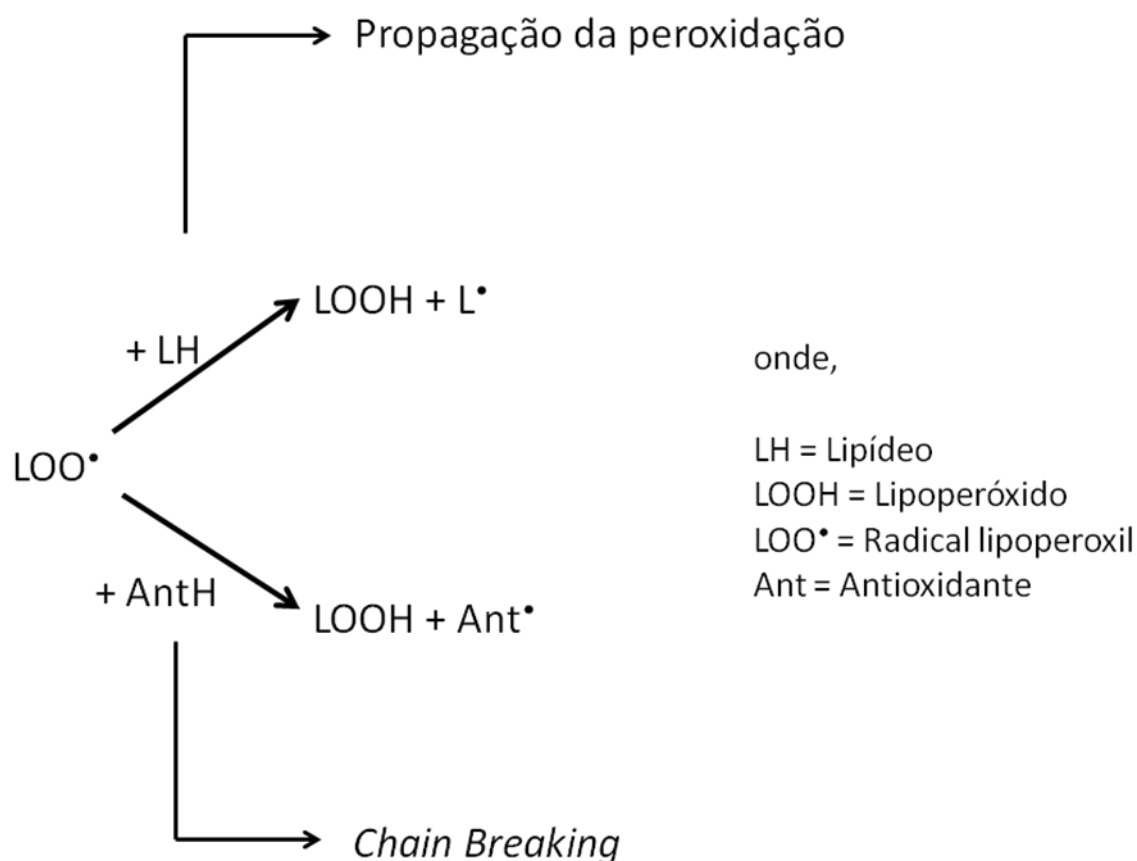


Figura 36. Efeito do AC na peroxidação lipídica de homogenato de fígado de rato induzida por reagentes de Fenton. O meio reacional era composto por KPi 10 mmol.L⁻¹, KCl 125 mmol.L⁻¹, homogenato de fígado de rato 5% v/v, citrato de sódio 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, Fe(II) 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, H₂O₂ 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (■); + AC 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (●); + AC 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (▲); + AC 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (▼); + BHT 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (□). O tempo de incubação foi iniciado após a adição de Fe(II) ao meio reacional. O gráfico representa a média e o desvio padrão de 3 a 12 repetições. **Figura 36B.** Efeito de crescentes concentrações de AC na fase lag (iniciação) da peroxidação lipídica.

Observa-se na **figura 36** que a fase log (ou fase de propagação) da peroxidação lipídica começou, nessas condições experimentais, após 5 minutos de reação (vide curva representada por ■). A presença do BHT, um antioxidante clássico capaz de inibir a propagação da reação em cadeia da peroxidação (atividade conhecida como *chain breaking*), prolongou a fase de lag (ou fase de iniciação) da peroxidação lipídica pelos 210 minutos observados nesse experimento. Esse efeito observado para o BHT evidencia que o dano observado nessa membrana é, de fato, devido à peroxidação lipídica. Crescentes concentrações de AC provocaram, de maneira dose dependente, um prolongamento da fase lag da peroxidação (**figura 36B**), sugerindo que o AC tenha um mecanismo *chain breaker*, ou seja, capaz de prolongar a fase lag da peroxidação lipídica. Esse mecanismo é dado pela redução do radical lipoperoxil pelo antioxidante (**esquema 20**).



Esquema 20. Ilustração da atividade antioxidante na fase de iniciação da peroxidação.

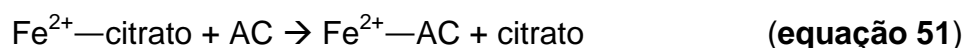
O radical lipoperoxil (LOO^\bullet) é um dos responsáveis pela propagação da peroxidação lipídica, uma vez que ele é capaz de abstrair um hidrogênio do lipídeo e gerar um novo radical lipídico. Ao prolongar a fase de iniciação da peroxidação lipídica, o antioxidante está evitando o início da fase de propagação, ou seja, está bloqueando a cascata de reações que envolvem o processo de peroxidação. Nesse resultado (**figura 36B**) fica claro que o AC possui uma componente sequestradora de radicais livres em meio lipofílico, uma vez que está reduzindo o lipoperóxido formado e prolongando a fase de iniciação da peroxidação. Este resultado está de acordo com o observado pela metodologia de redução do radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ (**figura 28**), onde foi possível visualizar a componente sequestradora de radicais livres do AC.

Além de participarem da fase de iniciação da peroxidação lipídica (via formação de radicais hidroxil), os íons metálicos, como o ferro, têm um papel importante na fase de propagação da peroxidação. Quando complexados a

ligantes como citrato (utilizado em nosso modelo experimental), o ferro tem a capacidade de reagir com o lipoperóxido (LOOH) e formar um radical alcoxil (LO[•]) (**equação 46**) ou um radical lipoperoxil (LOO[•]) (**equação 48**)⁽¹⁵⁾. Estes radicais (LOO[•] e LO[•]) podem reagir com outro lipídeo (LH) e abstrair um hidrogênio, formando um radical lipídico (L[•]) e dando início à fase de propagação da peroxidação (**equações 47, 49 e 50**).



Se um antioxidante (i.e. o AC) for capaz de diminuir a velocidade de propagação da peroxidação lipídica, este antioxidante terá uma componente quelante em seu mecanismo. Ao complexar metais de transição, esses antioxidantes impedem a reação do íon metálico com o lipoperóxido e, dessa maneira, diminuem a velocidade de propagação da peroxidação (**equações 51 a 54**).



Tendo em vista as explicações supracitadas, foram feitas as análises da influência do AC na velocidade de propagação da peroxidação lipídica. Observou-se que crescentes concentrações de AC também provocaram uma diminuição na velocidade da fase log da peroxidação (ou fase de propagação) de maneira dose dependente. A velocidade da fase log (calculada para o intervalo de 5 a 90 minutos) na ausência de AC foi de $2,7 \times 10^{-3}$ A/min e na

presença de 50, 100 e 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de AC foi, respectivamente, $1,1 \times 10^{-3}$, $0,5 \times 10^{-3}$ e $0,1 \times 10^{-3}$ A/min (**figura 37**).

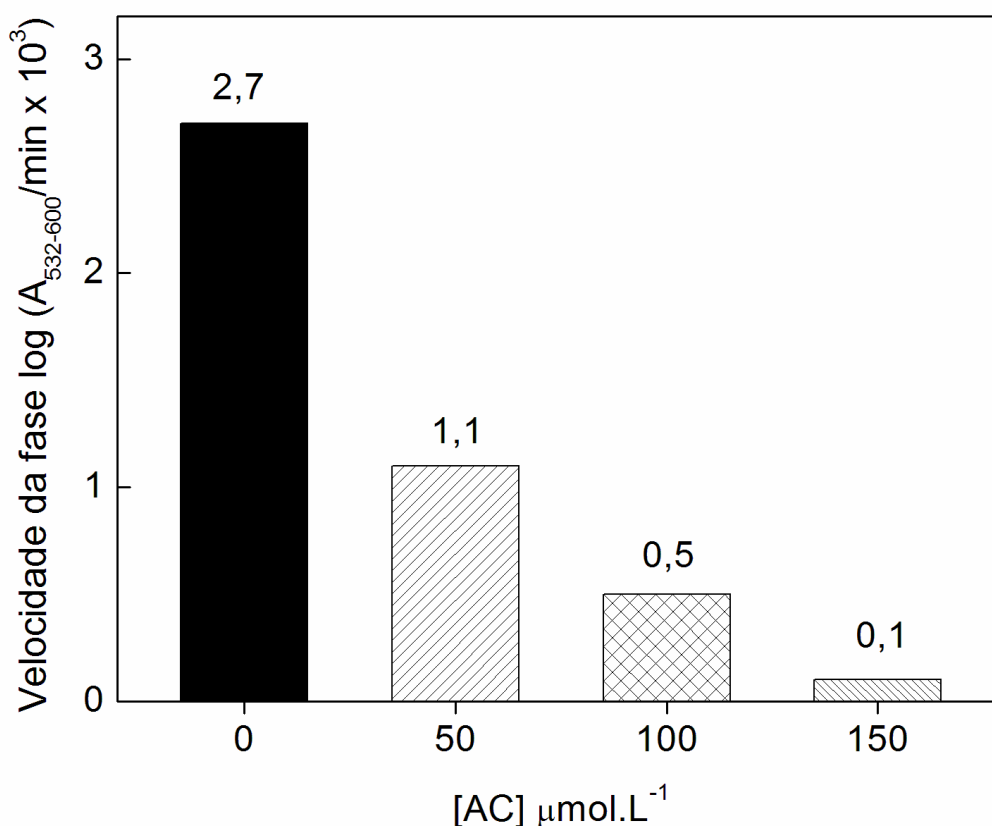


Figura 37. Efeito de crescentes concentrações de AC na velocidade de propagação (fase log) da peroxidação lipídica. As condições experimentais são exatamente as mesmas da **figura 13**. Velocidade calculada para o intervalo de 5 a 90 minutos (intervalo da fase log).

Cheng e colaboradores observaram um mecanismo similar para a buteína, um flavonóide extraído da *Dalbergia odorifera*. Os autores monitoraram a formação de dienos conjugados (em 234 nm) de LDL e mostraram que este flavonóide foi capaz de prolongar a fase lag da peroxidação lipídica de maneira dose dependente, bem como uma ligeira diminuição da velocidade da fase log⁽¹³⁶⁾. Mecanismo similar ao observado para o AC foi relatado por Bicalho (2008) ao estudar a atividade antioxidante da folha e flor da *Tropaeolum majus L* na peroxidação lipídica de fígado de rato induzida por reagentes de Fenton⁽¹³⁷⁾. A autora mostrou que a folha e flor da planta foram capazes de prolongar a fase lag da peroxidação bem como diminuir a velocidade da fase log. Sabe-se que a flor e a folha dessa planta são

ricas em substâncias quelantes que podem estar relacionada às suas propriedades antioxidantes e anticoagulantes^(138, 139).

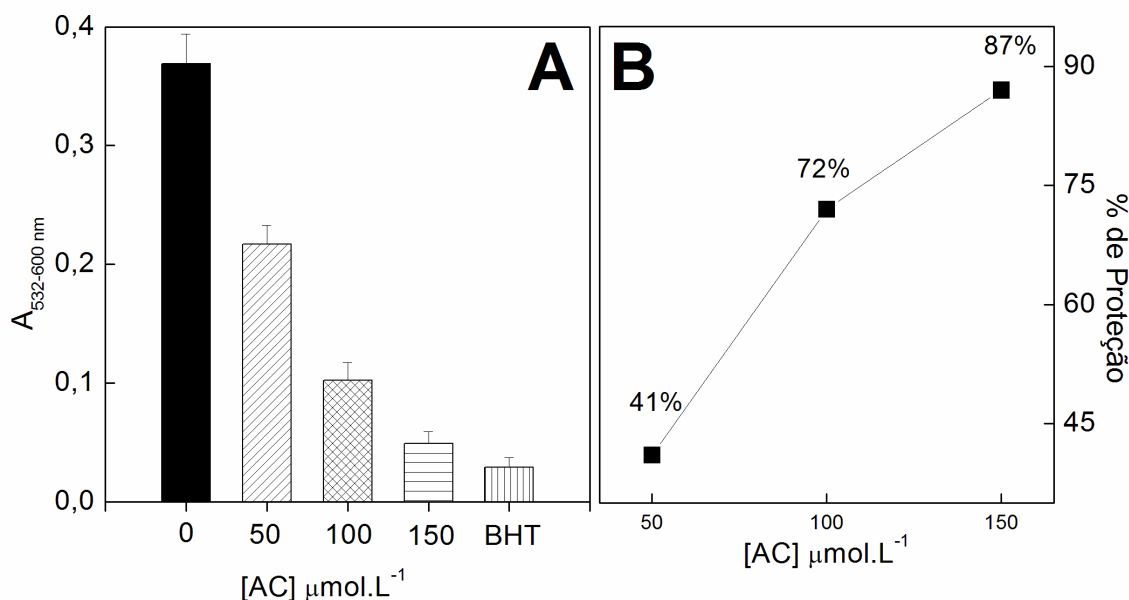


Figura 38. Efeito da concentração do AC na peroxidação lipídica induzida por reagentes de Fenton. Essa figura representa a condição experimental do tempo de 180 minutos na **figura 36**, portanto as condições experimentais são exatamente as mesmas.

A **figura 38** mostra o efeito de crescentes concentrações de AC e seus respectivos percentuais de proteção na peroxidação lipídica após 3 horas de reação. Nota-se que o percentual de inibição da peroxidação lipídica aumenta com o incremento nas concentrações de AC. O valor de I_{50} observado para o AC nesse ensaio foi de aproximadamente $60 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Curiosamente, o AC apresentou I_{50} calculado de aproximadamente $400 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ao inibir a hidroxilação do DMPO, quantificada por EPR. Comparando-se os valores de I_{50} obtidos na metodologia do EPR (meio aquoso) com a metodologia da peroxidação lipídica (meio lipídico), observar-se-á que o AC apresentou valor inferior na segunda metodologia. Esta observação pode estar associada à maior solubilidade do AC em meio lipofílico (Merck Index, 12th ed., pag. 1673), ambiente que possibilita uma maior interação do antioxidante com o alvo da oxidação (neste caso a membrana celular) e, dessa maneira, uma maior atividade antioxidante.

A capacidade do AC em inibir a degradação oxidativa de DNA plasmidial também foi analisada. Os resultados do efeito da variação da concentração do Fe(II) e da variação da concentração de AC no dano ao DNA pode ser observado nas **figura 39A e 39B**, respectivamente.

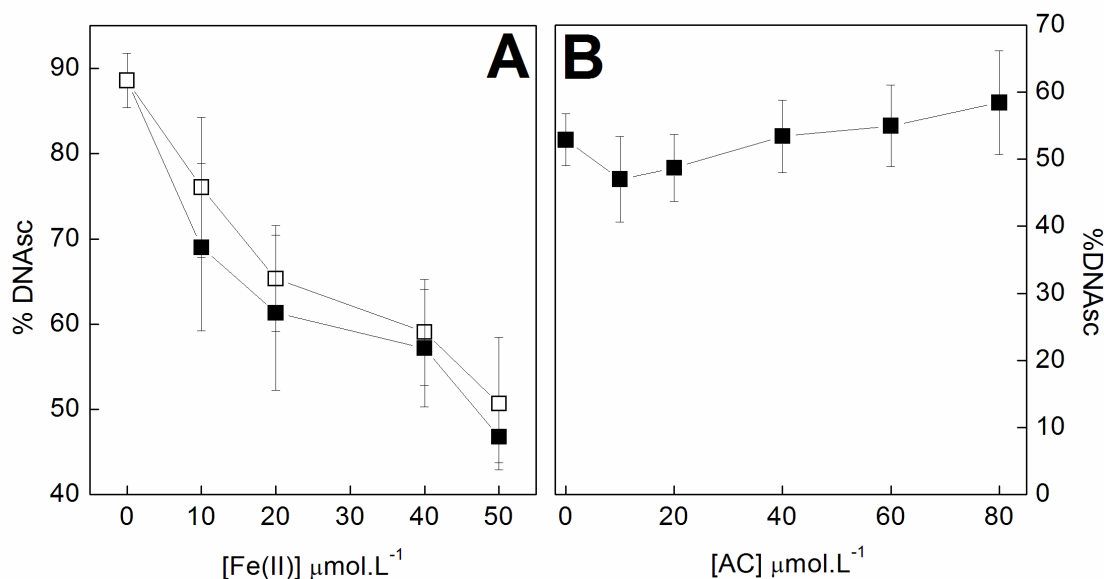
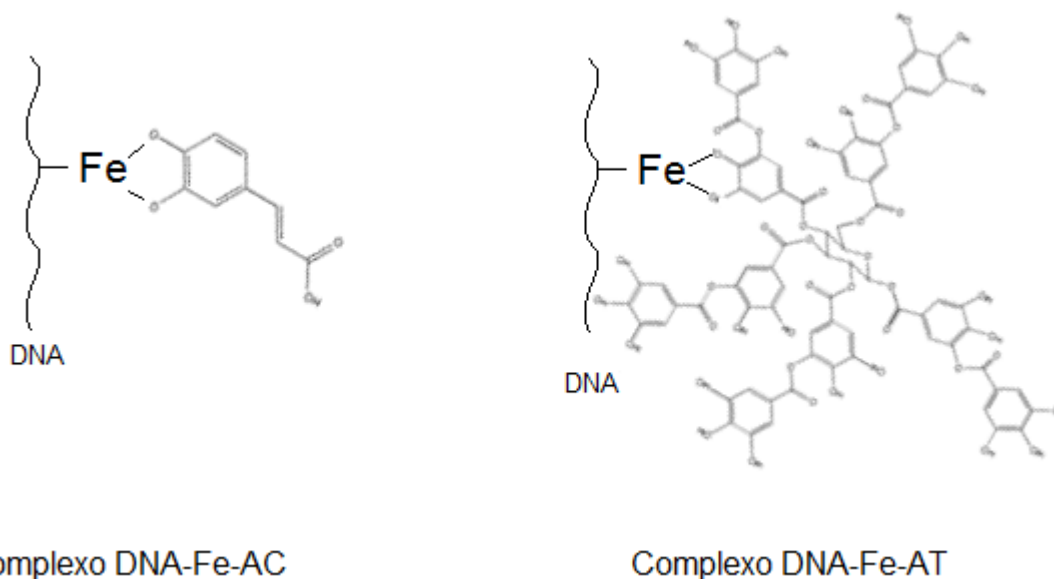


Figura 39. Efeito da concentração de Fe(II) no dano ao DNA na presença e ausência de AC.

Figura 39A. O meio reacional era composto por KPi 10 mmol.L⁻¹, DNA 10 ng/mL, H₂O₂ 50 μmol.L⁻¹ e Fe(II) 0 a 50 μmol.L⁻¹ (■); + AC 80 μmol.L⁻¹ (□). A reação foi incubada por 10 minutos após a adição do Fe(II). O gráfico representa a média e o desvio padrão de 9 repetições.

Figura 39B. Efeito da concentração de AC no dano ao DNA. O meio reacional era composto por KPi 10 mmol.L⁻¹, DNA 10 ng/mL, Fe(II) 20 μmol.L⁻¹, H₂O₂ 40 μmol.L⁻¹ e AC 0 a 80 μmol.L⁻¹. A reação foi incubada por 10 minutos após a adição do Fe(II). O gráfico representa a média e o desvio padrão de 9 repetições.

Observa-se nas **figuras 39A e 39B** que o AC, nessas condições experimentais, não teve efeito na degradação oxidativa do DNA induzida por reagentes de Fenton. Supõe-se que a ausência de atividade anti/pró-oxidante do AC observada na degradação do DNA seja devido à formação de um complexo envolvendo o Fe(II), o AC e o DNA, conforme ilustrado no **esquema 21**.



Esquema 21. Ilustração mostrando, simplificada, o possível complexo entre: **i)** o Fe(II), o AC e o DNA (**esquerda**); **ii)** Fe(II), AT e o DNA (**direita**).

Nesse complexo, o radical hidroxil, formado via reação de Fenton, tem maior probabilidade de reagir com o DNA do que com o complexo do AC-Fe(II) (vide **esquema 21** para mais detalhes a respeito da reação entre o $\cdot\text{OH}$ e o complexo). Esse modelo explica, ao menos em parte, a ausência de atividade antioxidante do AC observada na metodologia do DNA. O AT, por sua vez, foi capaz de inibir a degradação do DNA induzida por reagentes de Fenton de maneira dose dependente ($\text{Fe(II)}\ 40\ \mu\text{mol.L}^{-1}$, $\text{H}_2\text{O}_2\ 300\ \mu\text{mol.L}^{-1}$ e AT 0 a $10\ \mu\text{mol.L}^{-1}$)⁽¹⁴⁰⁾. A diferença de atividade antioxidante observada entre esses 2 compostos fenólicos (AT e AC) no DNA pode estar associada à estrutura do composto em si. A estrutura do complexo Fe(II)-AT possui um volume maior que a estrutura do complexo Fe(II)-AC, e, dessa maneira, o radical hidroxil tem maior probabilidade de reagir com o complexo Fe(II)-AT do que com o complexo Fe(II)-AC (**esquema 21**). Experimentos utilizando maiores concentrações de AC (100 , 200 e $300\ \mu\text{mol.L}^{-1}$) na degradação oxidativa de DNA induzida por reagentes de Fenton serão realizados no futuro.

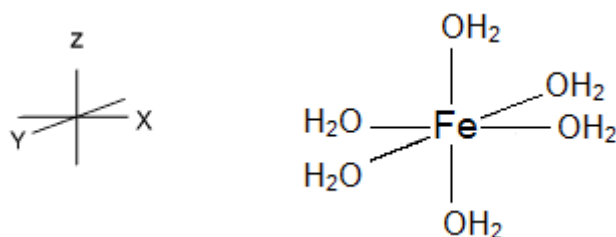
É importante ressaltar que, além dos aspectos termodinâmicos e cinéticos, devemos nos preocupar com os aspectos estéricos (espaciais) envolvendo as reações químicas. Estudos em colaboração com o grupo de modelagem molecular, coordenado pela profa. Dra. Antonia Tavares do

Amaral, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP) estão sendo conduzidos em nosso laboratório. Estes estudos visam verificar, por meio de abordagens teóricas, as estequiometrias de complexação do Fe(II) com o AC e com o AT e também a viabilidade da reação do Fe-AC/Fe-AT com o H_2O_2 . Estamos tentando encontrar a estequiometria mais estável para os complexos propostos e também verificar se o ferro, complexado a esses antioxidantes, é capaz de mediar a reação de Fenton.

5.4 Conclusões do Capítulo 2

Os resultados descritos nesse capítulo mostram que o AC possui uma capacidade antioxidante significativa em todas as metodologias e situações testadas, com exceção da metodologia de degradação oxidativa do DNA. Os resultados também sugerem que a atividade antioxidante do AC é devida, principalmente, ao mecanismo quelante desse composto. Levantou-se a hipótese da formação de um complexo de estequiometria 1:2 (Fe(II):AC) ao qual poderia ser atribuída a sua atividade antioxidante.

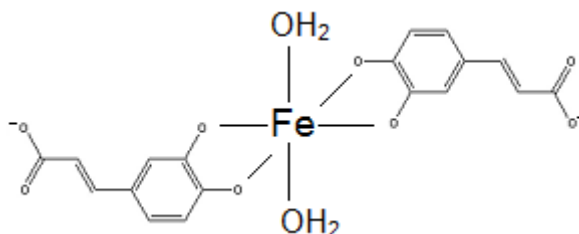
O ferro possui seis sítios de coordenação que, em solução aquosa, podem estar ocupados por moléculas de H_2O ou até mesmo íons OH^- , conforme demonstrado no **esquema 22**.



Esquema 22. Ilustração do complexo $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ orientado no plano cartesiano.

Após a adição de AC ao meio e a consequente formação do complexo, supostamente com estequiometria 1:2 Fe(II):AC, uma nova esfera de coordenação do ferro seria observada. As moléculas de AC poderiam se coordenar, por meio dos átomos de oxigênio do grupo catecol, nos sítios do Fe(II) localizados ao longo dos eixos X e Y, formando um complexo quadrado

planar (no plano X-Y). Os dois sítios situados ao longo do eixo Z poderiam estar ocupados, por exemplo, por moléculas de H₂O, formando um complexo octaédrico. Esta hipótese é ilustrada no **esquema 23**.



Esquema 23. Possível estrutura do complexo Fe(II)-AC₂.

Analisando o efeito do AC nas equações envolvidas nos processos oxidativos mediados pela reação de Fenton (**equações 55 e 56**), surgem duas hipóteses que explicam esse efeito antioxidante do AC.



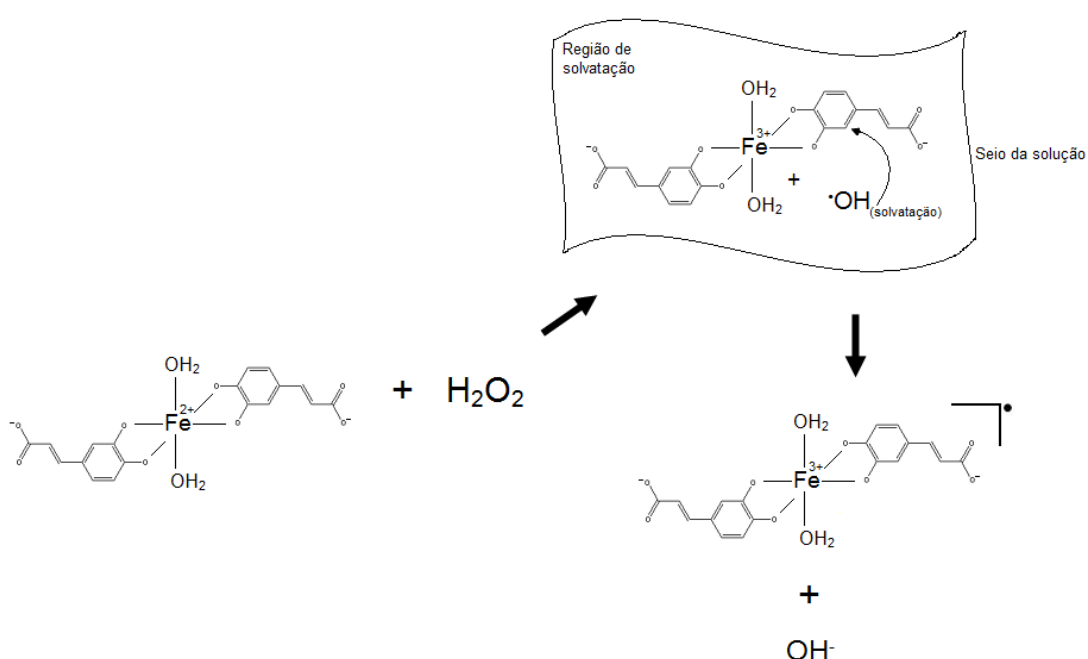
Hipótese 1: O AC forma um complexo estável com o Fe(II) com estequiometria 1:2 (Fe(II)-AC) que impede a reação desse íon com o H₂O₂ e, conseqüentemente, impede a formação do radical hidroxil via reação de Fenton (vide **equação 57**).



Essa hipótese foi anteriormente levantada por Lopes e colaboradores para explicar o mecanismo antioxidante do AT frente à reação de Fenton⁽⁷⁵⁾. Perez e colaboradores (2009) descreveram um mecanismo de atividade antioxidante semelhante para a baicaleína e a baicalina, substâncias encontradas na erva medicinal chinesa *Scutellaria baicalensis* Georgi, à qual já foram atribuídas propriedades anti-inflamatórias e anticarcinogênicas⁽¹⁴¹⁾. Segundo os autores, a atividade antioxidante dessas duas moléculas estaria

associada a um mecanismo quelante, onde elas bloqueariam a reação de Fenton e inibiriam a formação do radical hidroxil⁽¹⁴¹⁾.

Hipótese 2: O complexo de estequiometria 1:2 (Fe(II)-AC) reage com o H_2O_2 presente no meio reacional e gera o radical hidroxil via reação de Fenton. Esse $\cdot\text{OH}$ gerado é incapaz de abandonar a região de solvatação (região muito próxima ao complexo) e chegar ao seio da solução onde seria capaz de provocar danos às biomoléculas (i.e. 2-DR e membrana celular). A reação entre o $\cdot\text{OH}$ e o complexo levaria à oxidação do complexo (formando um complexo oxidado) e à formação do ânion OH^- , conforme ilustrado no **esquema 24**.



Esquema 24. Hipótese do mecanismo parcial de ação antioxidante do AC baseado na reação entre o complexo e o radical hidroxil na região de solvatação ($\cdot\text{OH}_{(\text{solvatação})}$).

Um mecanismo similar ao mostrado no **esquema 29** foi discutido por Andrade Jr. e colaboradores (2006). Os autores propõem que a atividade antioxidante do AT está associada à reação entre o complexo Fe(III)-AT e o radical hidroxil ainda na região de solvatação⁽⁷⁴⁾.

As duas hipóteses levantadas para explicar o mecanismo antioxidante do AC em sistemas contendo reagentes de Fenton são contraditórias e, por conseguinte, apenas uma delas está correta. Atualmente, acreditamos que o AC possui o mesmo mecanismo proposto por Andrade Jr. e colaboradores (2006), onde o AC estaria atuando conforme a **hipótese 2**, impedindo que o

radical hidroxil alcançasse o seio da solução e oxidasse as biomoléculas⁽⁷⁴⁾. Isso porque compostos fenólicos, como o AC e AT, ao se complexarem a íons Fe(II), diminuem o seu potencial de redução. Essa diminuição no potencial de redução favoreceria, ao menos do ponto de vista termodinâmico, a reação de Fenton, o que torna a **hipótese 2** mais razoável. Um experimento para esclarecer essa dúvida deve ser feito em um futuro próximo. Tal experimento consiste em medir o consumo de H₂O₂ pelo Fe(II) na presença e ausência dos compostos fenólicos AC e AT. Se os antioxidantes diminuïrem a velocidade de consumo do H₂O₂, a **hipótese 1** está correta. Caso eles aumentem a velocidade de consumo do H₂O₂, a **hipótese 2** está correta. Experimentos preliminares mostraram que, em nossas condições experimentais, é impossível se medir, com precisão, a velocidade da reação entre o Fe(II) e H₂O₂ utilizando um espectrofotômetro tradicional. Isso porque a reação entre o Fe(II) e o H₂O₂ ocorre em uma escala de tempo menor que a resolução desse equipamento. Sendo assim, este experimento deveria ser conduzido em *stopped-flow*, um equipamento que permite determinar a cinética de reações com resolução de poucos micro-segundos⁽¹⁴²⁾, como a do Fe(II) com o H₂O₂.

Sabe-se que a solubilidade do AC em solução aquosa é razoavelmente limitada, caracterizando uma molécula altamente lipofílica (Merck Index, 12th ed., pag. 1673). Verificou-se nesse estudo que o AC possuiu uma atividade antioxidante significativamente maior (em condições experimentais bem semelhantes) no ensaio da peroxidação lipídica (meio lipofílico) quando comparado ao ensaio da 2-DR (meio aquoso). Na peroxidação lipídica, 100 µmol.L⁻¹ de AC inibiu cerca de 50% do dano causado por Fe(II) 50 µmol.L⁻¹ e H₂O₂ 100 µmol.L⁻¹. No ensaio da 2-DR, por sua vez, 200 µmol.L⁻¹ de AC inibiu apenas 15% do dano causado nas mesmas condições da peroxidação. Este resultado, em consonância com a sua solubilidade limitada em solução aquosa, indica que o AC atua de maneira mais eficiente em sistemas lipofílicos. Sendo assim, um estudo mais detalhado da atividade antioxidante desse composto fenólico em sistemas contendo membranas celulares deve ser feito. Esses futuros estudos ajudarão, ao menos em parte, a entender o complexo mecanismo antioxidante que o AC desempenha *in vivo*.

6 - Capítulo 03 - Atividade antioxidante dos ácidos caféico e tânico frente à autooxidação do Fe(II).

6.1 Introdução e Objetivos

Segundo alguns autores, a geração de radicais hidroxil *in vivo* estaria associada, principalmente, com a reação do íon Fe(II) com o H₂O₂ por meio da conhecida reação de Fenton. Entretanto, levando-se em consideração que as concentrações de H₂O₂ e O₂ no organismo são da ordem de 10⁻⁸ mol.L⁻¹ e 10⁻⁵ mol.L⁻¹, respectivamente, a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) por meio da reação da autooxidação do Fe(II) (Fe(II) + O₂) pode ter maior relevância biológica que a reação de Fenton⁽¹⁴⁾. Dados experimentais mostram que as constantes de velocidade (em pH 7,2) das reações do Fe(II) com o H₂O₂ e com o O₂ são, respectivamente, 6,0 x 10¹ M⁻¹.s⁻¹ e 6,0 x 10² M⁻¹.s⁻¹, conferindo à reação de autooxidação do Fe(II) um papel importante na formação de radicais livres⁽¹⁴⁾. Levando em consideração as concentrações de O₂ (10⁻⁵ mol.L⁻¹) e H₂O₂ (10⁻⁸ mol.L⁻¹) celulares, e assumindo a mesma concentração de um possível substrato oxidável, a reação de autooxidação do Fe(II) seria de 10⁶ a 10⁸ vezes mais rápida que a reação de Fenton⁽¹⁴⁾. Qian e Buettner (1999) mostraram que em sistemas onde a [O₂] / [H₂O₂] < 10, a reação de Fenton é a principal responsável pela oxidação de DNA, lipídeos e proteína. Por outro lado, os autores mostraram que quando a [O₂] / [H₂O₂] ≥ 100, a reação de autooxidação do Fe(II) é a principal responsável pela oxidação das biomoléculas⁽¹³⁾. No organismo de mamíferos, a razão encontrada é O₂ / H₂O₂ ≥ 100, o que pode conferir à reação entre o Fe(II) e o O₂ um papel mais importante que a reação de Fenton^(14, 19).

Pouco se sabe a respeito do efeito e das implicações biológicas de antioxidantes nos danos causados pela reação de autooxidação do Fe(II). Este trabalho se insere nessa perspectiva, sendo o primeiro a investigar os efeitos do AC, em comparação com o AT, na reação do Fe(II) com o O₂. Vale lembrar que no capítulo 2 investigamos, de maneira similar, os efeitos antioxidantes do AC (em comparação com AT) somente na reação de Fenton. Tendo em vista as observações supracitadas, destacamos como objetivos específicos:

- 1) Estudar os potenciais antioxidantes do AC e do AT na degradação oxidativa da 2-DR;
- 2) Estudar os potenciais antioxidantes do AC e do AT na degradação oxidativa do DNA plasmidial;
- 3) Verificar os potenciais antioxidantes do AC e do AT na peroxidação lipídica de homogenato de fígado de rato;
- 4) Analisar o efeito do AC e do AT na formação do aduto radicalar DMPO/C₂H₅O[•];
- 5) Verificar a influência do AC e do AT no consumo de oxigênio;
- 6) Verificar a capacidade do AC e do AT em reduzir Fe(III) a Fe(II);
- 7) Estudar a cinética da oxidação do Fe(II) a Fe(III) e a influência do AC e do AT nessa oxidação;
- 8) Propor um mecanismo pelo qual o AC e o AT exerçam a atividade antioxidante.

6.2 Metodologias Utilizadas

- Degradação oxidativa da 2-Desoxirribose (vide seção 3.2);
- Degradação oxidativa de DNA plasmidial (vide seção 3.3);
- Ressonância Paramagnética Eletrônica (vide seção 3.4; subseções 3.4.1 e 3.4.2);
- Peroxidação Lipídica em homogenato de fígado de rato *in vitro* (vide seção 3.5);
- Consumo de oxigênio (oximetria) (vide seção 3.7);

6.3 Resultados e Discussões

Com o objetivo de estudar os efeitos do AC e do AT na reação de autooxidação, foram feitos, inicialmente, três experimentos com a metodologia

da degradação oxidativa da 2-DR, que estão mostrados nas **figuras 40 e 41** e na **tabela 12**. A **figura 40** ilustra o efeito de crescentes concentrações dos compostos fenólicos na degradação da 2-DR.

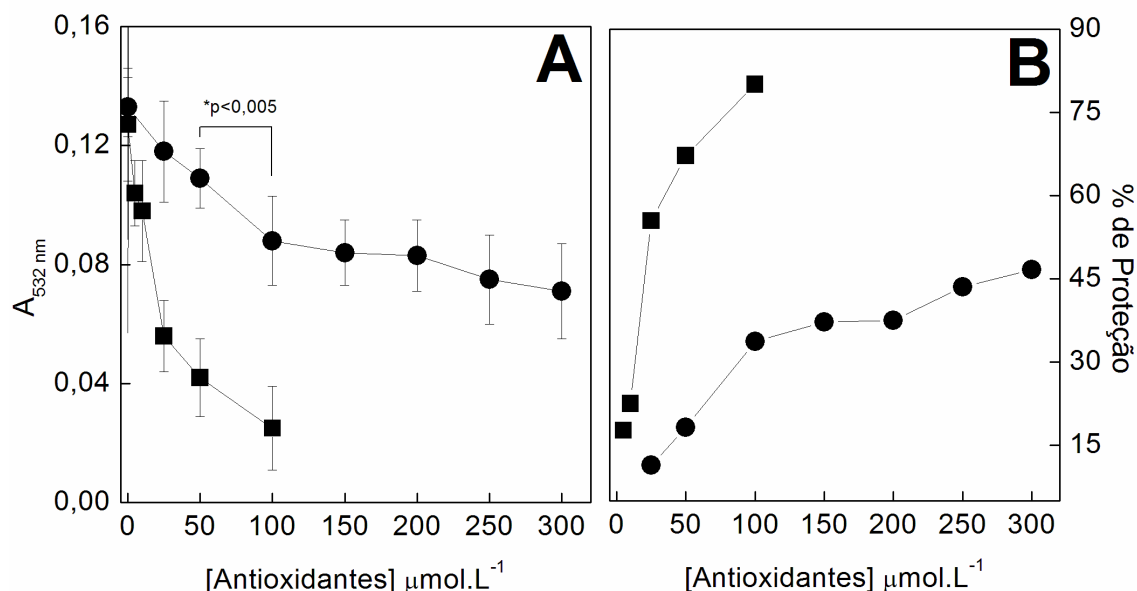


Figura 40. Efeito de crescentes concentrações de AT e AC na degradação da 2-DR induzida pela reação de autooxidação do Fe(II). O meio reacional era composto por KPi 10 mmol.L^{-1} (pH 7,2), 2-DR 5 mmol.L^{-1} , Fe(II) 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; + AC 0 a 300 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (\bullet); + AT 0 a 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (\blacksquare). A reação foi incubada por 10 minutos após a adição de Fe(II). O gráfico representa a média e o desvio padrão de 9 repetições. *Os pontos marcados são estatisticamente diferentes entre si com $p < 0,005$. A **figura 40B** representa o percentual de proteção conferido pelo AT e AC à 2-DR. A primeira condição experimental nessa figura é referente à 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de AT (\blacksquare) e 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de AC (\bullet). Os valores foram corrigidos com o novo branco proposto no capítulo 1, subtraindo-se das condições experimentais a A_{532} média da reação do Fe(III) com a 2-DR ($A_{532} = 0,100$).

Observa-se na **figura 40** que crescentes concentrações de AT provocaram uma diminuição dose dependente na degradação da 2-DR, atingindo 80% de proteção com 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de AT. O AC, por outro lado, provocou uma inibição dose dependente significativa somente até 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, permanecendo estatisticamente inalterado com concentrações superiores. Esse resultado está de acordo com o obtido quando o sistema gerador de radicais livres era baseado na reação de Fenton (vide **figura 32** do capítulo 2 desta dissertação). Com base nesse resultado pode-se inferir que a

estequiometria de complexação Fe(II):AC seja 1:2, uma vez que sua atividade antioxidante máxima foi observada com $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Fe(II) e $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AC.

A **figura 40** nos permite também calcular o valor de I_{50} (concentração suficiente para inibir 50%) do AC e AT nessas condições experimentais. O valor de I_{50} para o AT foi de aproximadamente $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ enquanto o valor calculado[#] para o AC foi de $420 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Nota-se, com base nesses cálculos, que a capacidade antioxidante do AT na degradação oxidativa da 2-DR é cerca de 20 vezes maior que a capacidade do AC. O ensaio da redução do radical ABTS^{•+} pelo AC e AT, ilustrado, respectivamente, na **figura 28** do capítulo 2 dessa dissertação, nos permite determinar, de maneira simples e direta, a capacidade antioxidante total dos compostos estudados. Esses experimentos mostraram que a capacidade antioxidante total do AT é 18 vezes maior que a do AC, valor próximo ao obtido pelo cálculo do valor de I_{50} no ensaio da 2-DR.

A análise do efeito de crescentes concentrações de Fe(II) no dano à 2-DR na presença e ausência do AT e AC também foi feita e está ilustrada na **figura 41**. Nota-se nessa figura que crescentes concentrações de Fe(II) provocaram um aumento significativo e linear no dano à 2-DR tanto na presença como na ausência dos antioxidantes. Entretanto, a presença dos antioxidantes provocou uma diminuição nos valores de absorbância, evidenciando o efeito protetor à 2-DR.

[#]**Nota de rodapé 2:** O valor de I_{50} calculado para o AC nesse experimento foi feito utilizando a equação obtida para a melhor reta entre os pontos 100 e $300 \mu\text{mol.L}^{-1}$ na **figura 40B**. A reta obtida para esse ponto tem $R^2 = 0,84$ e equação $y=0,0491x + 29,393$. Substituindo-se 50 (referente aos 50% de inibição) em y obtém-se um valor de $420 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AC.

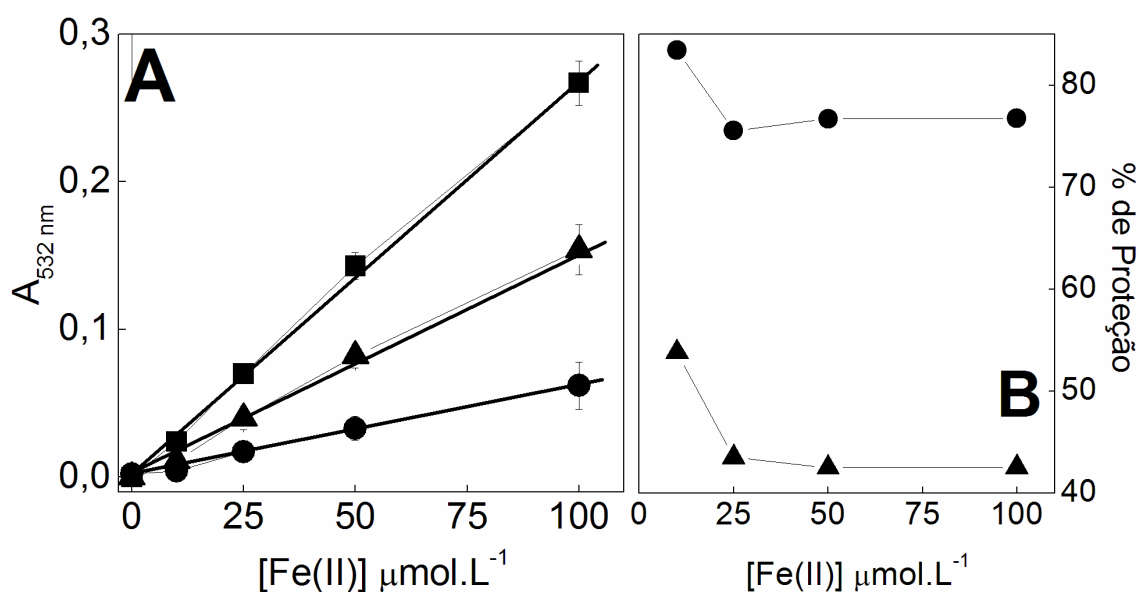
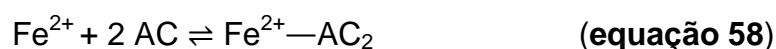


Figura 41. Efeito de crescentes concentrações de Fe(II) na degradação da 2-DR na presença e ausência de AT e AC. O meio reacional era composto por KPi 10 mmol.L^{-1} (ajustado para pH 7,2), 2-DR 5 mmol.L^{-1} , Fe(II) 0 a $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (\blacksquare); + AC $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (\blacktriangle); + AT $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (\bullet). A reação foi incubada por 10 minutos após a adição de Fe(II). O gráfico representa a média e o desvio padrão de 6 repetições. A curva \blacksquare possui $R^2 = 0,998$; a curva \blacktriangle possui $R^2 = 0,997$; e a curva \bullet possui $R^2 = 0,994$. A **figura 41B** representa o percentual de proteção conferido pelo AT (\bullet) e AC (\blacktriangle) à 2-DR. A primeira condição experimental nessa figura é referente à $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Fe(II). Os valores foram corrigidos com o novo branco proposto no capítulo 1, subtraindo-se das condições experimentais as A_{532} médias da reação de diferentes concentrações de Fe(III) com a 2-DR ($A_{532}(\text{Fe(III)} 10 \mu\text{mol.L}^{-1}) = 0,033$; $A_{532}(\text{Fe(III)} 25 \mu\text{mol.L}^{-1}) = 0,062$; $A_{532}(\text{Fe(III)} 50 \mu\text{mol.L}^{-1}) = 0,104$; $A_{532}(\text{Fe(III)} 100 \mu\text{mol.L}^{-1}) = 0,173$).

Verifica-se também que com $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Fe(II) a proteção conferida pelo AT e AC é, respectivamente, 84% e 54%. Após $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Fe(II) o percentual de proteção conferido pelos antioxidantes sofre um decaimento significativo e permanece constante em 76% para o AT e 43% para o AC. O decaimento no percentual em função do aumento da concentração de Fe(II) é um comportamento característico de moléculas com mecanismos antioxidantes do tipo quelante. Este comportamento foi observado por Lopes e colaboradores (1999) quando estudavam a atividade antioxidante do AT frente à reação de Fenton⁽⁷⁵⁾, por Andrade Jr. e colaboradores (2006) quando estudavam a

atividade antioxidante do AT em sistemas contendo Fe(III) e ascorbato⁽⁷⁴⁾, por Ginani (2005) quando estudava a capacidade antioxidante do ácido elágico em sistemas contendo reagentes de Fenton e em sistemas contendo Fe(III) e ascorbato⁽¹¹⁶⁾, por Dalvi (2008) quando estudava a capacidade antioxidante do ácido elágico em sistemas contendo Cu(II) e ascorbato⁽⁵⁶⁾ e por Pardo-Andreu e colaboradores (2006) quando estudavam a capacidade antioxidante da mangiferrina em sistemas contendo Fe(III) e ascorbato⁽¹²⁵⁾. Assumindo as estequiometrias de complexação obtidas no capítulo 2 para o AC (Fe(II):AC 1:2) e para o AT (Fe(II):AT 7:1) podemos descrever os equilíbrios conforme as **equações 58 e 59**, previamente demonstradas.



O pequeno decaimento no percentual de proteção observado com pequenas concentrações de Fe(II) em função do aumento na concentração de Fe(II) pode ser explicado pelas **equações 58 e 59**. O aumento na concentração de Fe(II) provoca um deslocamento do equilíbrio para a direita, acarretando maior formação do complexo e diminuição na concentração do antioxidante livre. À medida que a concentração de Fe(II) aumenta no sistema, a concentração do antioxidante passaria a ser limitante e, dessa maneira, a quantidade de Fe(II) “livre” começa a aumentar no meio reacional. O íon metálico “livre” em solução passa a mediar reações formadoras de radicais hidroxil e, sendo assim, gera maior degradação da 2-DR, provocando uma diminuição no percentual de proteção. Uma queda mais acentuada seria observada em concentrações superiores de Fe(II) (acima de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), uma vez que este se encontraria mais na forma livre do que na forma complexada, promovendo assim, mais danos oxidativos a 2-DR.

Com o objetivo de identificar se o mecanismo antioxidante do AT e do AC é do tipo quelante de metais ou do tipo sequestrador de radicais livres, foi feito o experimento da variação da concentração da 2-DR. Neste experimento moléculas com mecanismos do tipo quelante não apresentariam alterações

significativas no seu percentual de proteção, uma vez que estariam atuando na formação do radical livre. Por outro lado, moléculas com mecanismo antioxidante do tipo sequestrador de radicais livres apresentariam uma diminuição significativa no percentual de proteção, pois atuariam impedindo a reação do radical livre com a molécula alvo. Sendo assim, à medida que a concentração da 2-DR fosse aumentada no meio, existiria maior probabilidade do radical livre reagir com ela e não com o antioxidante (uma vez que as constantes de velocidade destas reações são semelhantes)⁽¹³⁰⁾. Os experimentos da variação da 2-DR na presença de AC e AT são ilustrados na **tabela 12**.

Tabela 12. Efeito de crescentes concentrações de 2-DR na presença de AC.

[2-DR] (mmol.L ⁻¹)	Condições Experimentais				
	Sem Antioxidante	Com AC	% de proteção (AC)	Com AT	% de proteção (AT)
0	0,000 ± 0,005	0,000 ± 0,006	---	0,001 ± 0,003	---
5	0,137 ± 0,010	0,074 ± 0,009	46,23%	0,031 ± 0,010	77,13%
10	0,157 ± 0,010	0,087 ± 0,010	44,85%	0,044 ± 0,010	72,26%
15	0,169 ± 0,012	0,101 ± 0,011	40,02%	0,058 ± 0,010	65,81%
20	0,173 ± 0,009	0,099 ± 0,041	42,53%	0,059 ± 0,010	66,15%

O meio reacional era composto por KPi 10 mmol.L⁻¹ (pH 7,2), 2-DR 0 a 20 mmol.L⁻¹, Fe(II) 50 µmol.L⁻¹, AC 200 µmol.L⁻¹ (**3ª coluna**) e AT 50 µmol.L⁻¹ (**5ª coluna**). A reação foi incubada por 10 minutos após a adição do Fe(II). Os valores correspondem à média e ao desvio padrão de 6 repetições. Os valores foram corrigidos com o novo branco proposto no capítulo 1, subtraindo-se das condições experimentais as A₅₃₂ médias da reação de diferentes concentrações de 2-DR com o Fe(III) (A₅₃₂ (5 mmol.L⁻¹) = 0,118; A₅₃₂ (10 µmol.L⁻¹) = 0,204; A₅₃₂ (15 µmol.L⁻¹) = 0,268; A₅₃₂ (20 µmol.L⁻¹) = 0,330).

Nota-se na **tabela 12** que crescentes concentrações de 2-DR provocaram um aumento dose dependente nos valores de absorvância tanto na presença como na ausência de AC. Entretanto, o percentual de proteção conferido pelo AC não sofreu diminuição significativa, evidenciando o

mecanismo do tipo quelante dessa molécula. Esse comportamento foi bastante similar ao observado no capítulo 2 dessa dissertação (vide **tabela 11**). Pardo-Andreu e colaboradores observaram que um aumento de 10 vezes na concentração da 2-DR (de 1,5 para 15 mmol.L⁻¹) não provocou alteração significativa no percentual de proteção conferido pela mangiferrina⁽¹²⁵⁾. Nesse mesmo trabalho os autores testaram os compostos DMSO (na concentração de 20 mmol.L⁻¹) e salicilato (na concentração de 20 mmol.L⁻¹) com as mesmas duas concentrações de 2-DR (1,5 e 15 mmol.L⁻¹) e observaram uma diminuição no percentual de proteção conferido por essas moléculas (DMSO de 80 para 70% e salicilato de 50 para 40%), observação similar à relatada por Hermes-Lima e colaboradores (2000)⁽¹³⁰⁾.

Crescentes concentrações de 2-DR provocaram um aumento nos valores de absorvância na presença de AT (**tabela 12**), perfil similar ao observado quando foi utilizado o AC. Diferentemente do comportamento observado para o AC, o percentual de proteção na presença de AT sofreu uma queda significativa (de 77 para 66%) em função do aumento na concentração da 2-DR (de 5 para 20 mmol.L⁻¹). Esse resultado sugere que o AT tenha uma componente sequestradora de radicais livres. Sabe-se, entretanto, que o AT é capaz de complexar íons ferro em solução aquosa e que possui um mecanismo antioxidante do tipo quelante^(24, 74, 75). Sendo assim, esse polifenol pode ter o seu mecanismo antioxidante tanto quelante como seqüestrador de radicais livres. Em outras palavras, o AT complexaria os íons metálicos e esse complexo poderia atuar como sequestrador de radicais livres. Esse mecanismo foi sugerido por Andrade Jr. e colaboradores (2006) para explicar a atividade do AT em sistemas contendo reagentes de Fenton⁽⁷⁴⁾. Pardo-Andreu e colaboradores mostraram que a mangiferrina tem a sua capacidade sequestradora de radicais livres “melhorada” quando complexada a íons férricos⁽¹²⁶⁾. Afanas’ev e colaboradores (2001) mostraram que a atividade antioxidante e anti-inflamatória da rutina, um composto da classe dos flavonóides, é melhorada quando está complexada a íons metálicos⁽¹⁴³⁾. A atividade sequestradora de complexos polifenol-metais também já foi estudada com detalhes por Mahal e colaboradores (2005)⁽¹⁴⁴⁾. Nesse estudo os autores mostram que complexos de Mn(II), Fe(II) e Cu(II) com compostos fenólicos são capazes de sequestrar o O₂^{•-} mimetizando a atividade da enzima SOD. Essa

melhor atividade sequestradora de radicais livres dos complexos comparada ao polifenol sozinho pode estar associada à capacidade do metal de transição em fazer transferência de esfera interna metal-polifenol-metal e melhor estabilizar os elétrons desemparelhados. Esse tipo de estabilização não ocorre na ausência do metal.

Depois de caracterizada a atividade antioxidante do AT e AC pela metodologia da 2-DR, estudamos a influência desses compostos fenólicos na peroxidação lipídica em fígado de rato induzida pela reação de autoxidação do Fe(II). Foi determinado o curso temporal da peroxidação lipídica na presença e ausência de AC e AT, o que é mostrado na **figura 42**.

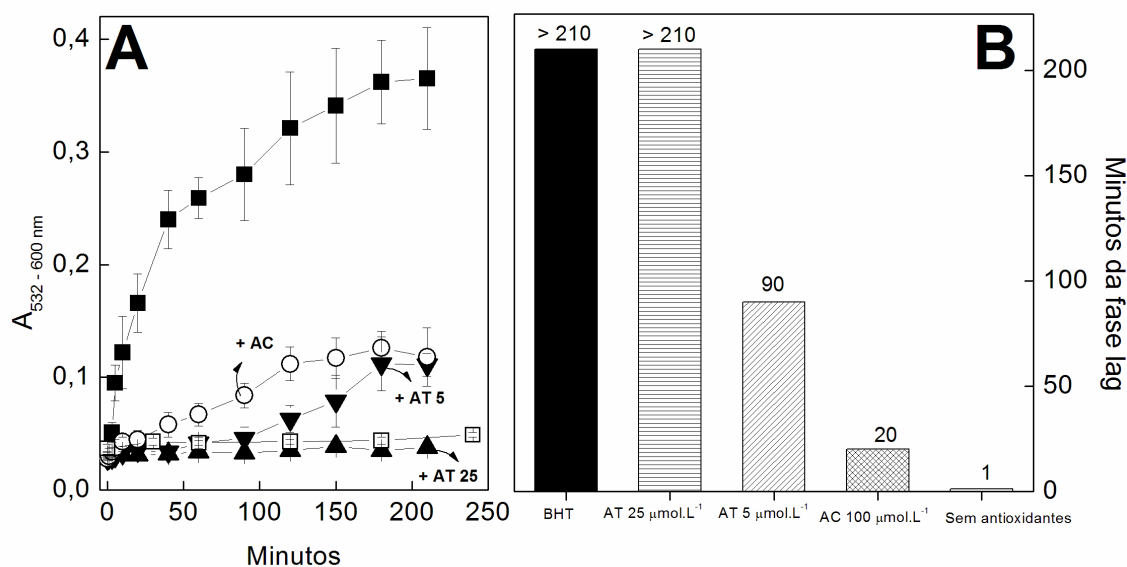
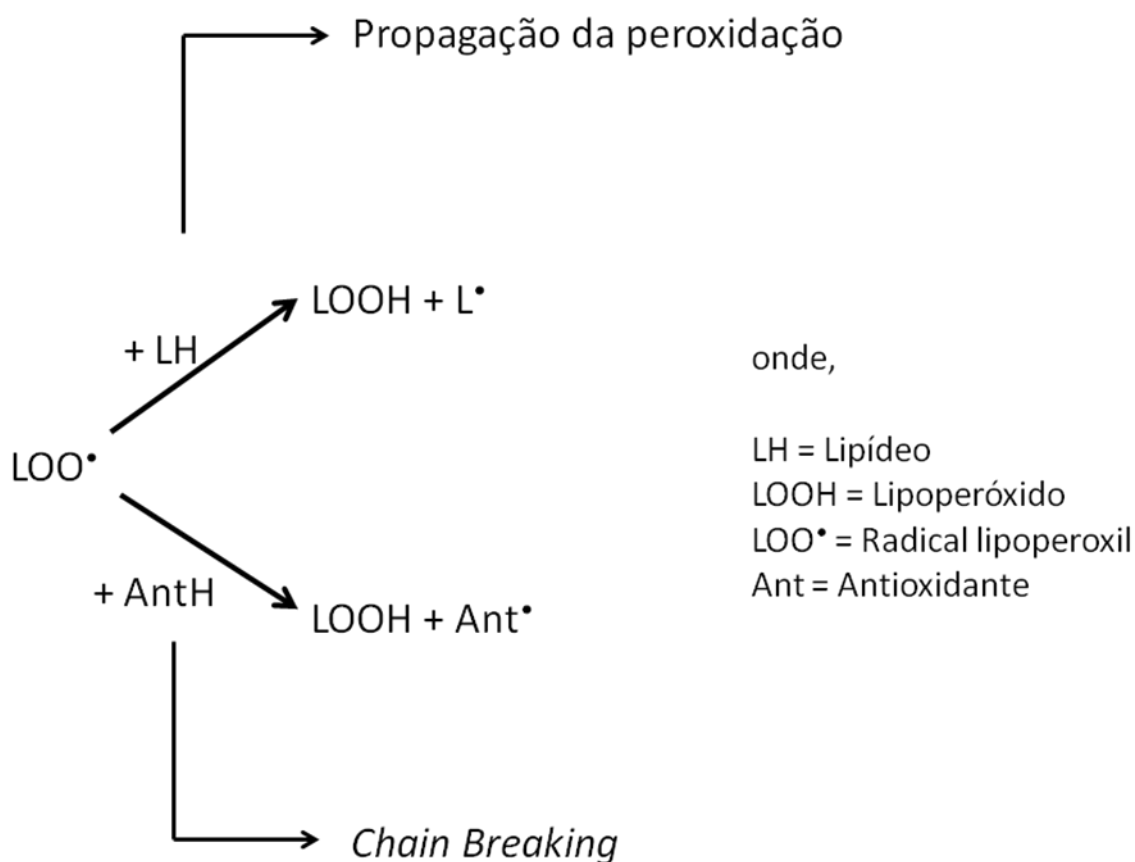


Figura 42. Efeito do AT e AC no curso temporal da peroxidação lipídica induzida pela reação da autoxidação do Fe(II). O meio reacional era composto por KPi 10 mmol.L⁻¹ (pH 7,2), homogenato de fígado de rato 5% v/v, KCl 125 mmol.L⁻¹, citrato de sódio 200 μmol.L⁻¹ e Fe(II) 50 μmol.L⁻¹ (■); + AC 100 μmol.L⁻¹ (○); + AT 5 μmol.L⁻¹ (▼); + AT 25 μmol.L⁻¹ (▲); + BHT 100 μmol.L⁻¹ (□). A reação foi incubada por até 240 minutos após a adição do Fe(II). O gráfico representa a média e o desvio padrão de 3 a 9 repetições. A **figura 42B** representa o tempo da fase lag (iniciação) na presença de diferentes antioxidantes.

Observa-se na **figura 42** que a presença de AC e AT no meio reacional inibiu significativamente a peroxidação lipídica induzida pela reação de autoxidação do Fe(II), evidenciado pela diminuição nos valores de absorbância quando comparado ao controle (curva representada por ■). Na **figura 42B** é

possível se verificar o tempo da fase de iniciação da peroxidação lipídica. Esse prolongamento estaria associado à presença do AC e do AT no meio reacional. O antioxidante capaz de prolongar a fase de iniciação da peroxidação e, conseqüentemente impedir a propagação em cadeia é denominado *chain breaker* (“quebra” da cadeia da peroxidação). Esse impedimento é devido a uma atividade “sequestradora” de radicais livres do AC e do AT, no qual estariam reduzindo o radical lipoperoxil (LOO^\bullet) por meio da doação de um hidrogênio (vide **esquema 25**).

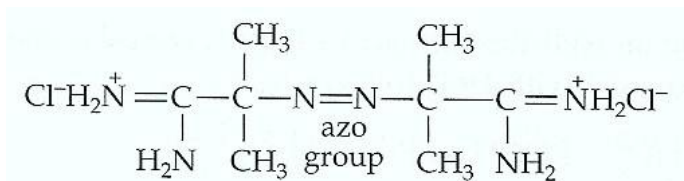


Esquema 25. Ilustração da atividade antioxidante na fase de iniciação da peroxidação.

Sendo assim, a fase de propagação da peroxidação lipídica começaria somente após todo o antioxidante ser consumido, isto é, quando a sua capacidade de reduzir o LOO^\bullet acabar⁽¹⁵⁾. Um antioxidante clássico com esse comportamento é o BHT. A adição de BHT (\square) ao meio reacional inibiu completamente a peroxidação lipídica durante o tempo de reação estudado, fato evidenciado pelo não aparecimento da fase log (propagação). A presença

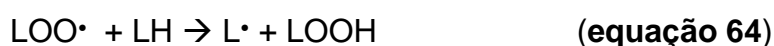
de 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de AT provocou um prolongamento similar ao proporcionado pelo BHT, onde foi capaz de inibir completamente a peroxidação lipídica. Quando apenas 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de AT estavam presentes no meio reacional, a fase lag foi prolongada por até 90 minutos, evidenciando a capacidade *chain breaker* desse antioxidante. A presença de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de AC provocou um menor prolongamento da fase lag que o proporcionado por 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de AT, sendo capaz de se estender por apenas 20 minutos. Esses resultados indicam que os compostos fenólicos em estudo (o AC e o AT) possuem uma componente sequestradora de radicais livres em seu mecanismo antioxidante. Essa proposta já havia sido indicada pela capacidade do AC e do AT em reduzir o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, mostrado na **figura 28**, capítulo 2 dessa dissertação.

Outra maneira de estudar a peroxidação lipídica é por meio da metodologia do 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH), cuja estrutura está mostrada abaixo..



Fórmula estrutural do AAPH.

O AAPH é um azo composto capaz de iniciar a peroxidação lipídica por um mecanismo radicalar independente de metais de transição (**equações 60 a 64**)⁽³⁾.



O AAPH é um composto lipossolúvel que se decompõe dando origem a um radical de carbono (denominado aqui R^{\bullet}) (**equação 60**). O radical R^{\bullet} reage com

o O_2 e leva a formação de um radical lipoperoxil (ROO^\bullet) (**equação 61**). Este radical lipoperoxil pode reagir com a membrana lipídica (LH) e abstrair um hidrogênio, levando à formação de radical lipídico (L^\bullet) (**equação 62**). Este radical lipídico pode reagir com o O_2 e dar início a reação em cadeia da peroxidação lipídica (**equações 63 e 64**)⁽³⁾. Se o composto estudado for capaz de inibir a peroxidação lipídica no sistema do AAPH, ele possui, de fato, um mecanismo sequestrador de radicais livres, o que não exclui um mecanismo “paralelo” do tipo quelante de metais. Lapenna e colaboradores (2002) mostraram que o ácido ursodesoxicólico foi capaz de inibir a peroxidação lipídica induzida por AAPH⁽¹⁴⁵⁾. O estudo do AC e do AT utilizando a metodologia do AAPH será desenvolvido em breve em nosso laboratório.

Outra análise pode ser feita utilizando os dados obtidos no experimento mostrado na **figura 42**. Sabe-se que íons Fe(II) e Fe(III), quando complexados a ligantes como citrato (utilizado em nosso modelo experimental), podem oxidar o hidroperóxido e aumentar a velocidade de propagação da peroxidação (**equações 65 a 69**)⁽¹⁵⁾.



Sabe-se também que antioxidantes do tipo quelante são capazes de diminuir a velocidade da fase de propagação da peroxidação lipídica, pois se complexariam ao Fe(II) ou ao Fe(III) e inibiriam a oxidação do hidroperóxido lipídico (LOOH) (**equações 70 a 73**).



Ao inibirem a oxidação do LOOH, estariam diminuindo a formação do radical alcóxil (LO^\bullet) e o radical lipoperoxil (LOO^\bullet) e, conseqüentemente, diminuindo a velocidade de propagação da peroxidação.

Com o intuito de estudar a componente quelante do AC e do AT na peroxidação lipídica, foi feito um estudo de seus efeitos na velocidade de propagação da peroxidação lipídica, ilustrado na **figura 43**.

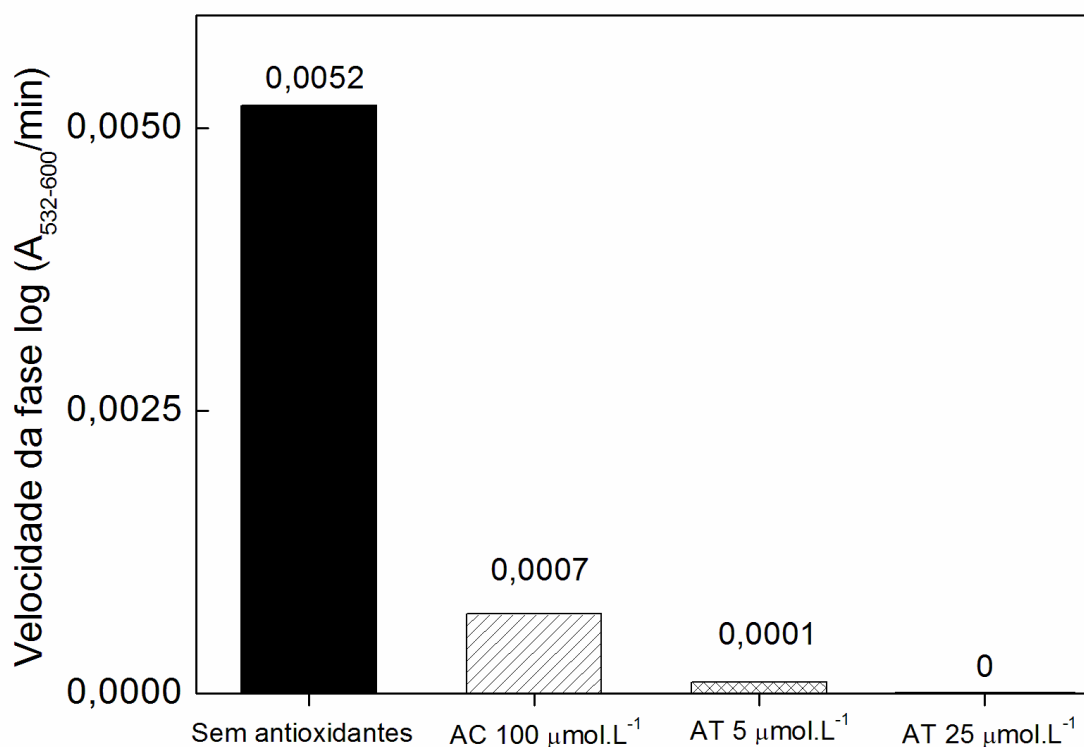


Figura 43. Efeito dos antioxidantes na velocidade da fase log da peroxidação lipídica induzida pela reação da autoxidação. As condições experimentais são exatamente as mesmas que as mostradas na **figura 42**. A velocidade calculada corresponde ao intervalo entre 1 e 40 minutos de incubação, durante a fase log.

Nota-se na **figura 43** que a presença de AC e AT provocou uma diminuição significativa da velocidade da fase de propagação da peroxidação lipídica. O sistema sem a presença de antioxidantes possui uma velocidade de $5,2 \times 10^{-3} A_{532-600} \cdot \text{min}^{-1}$. As velocidades da fase de propagação na presença de AC $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, AT $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e AT $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ foram, respectivamente, $0,7 \times 10^{-3} A_{532-600} \cdot \text{min}^{-1}$, $0,1 \times 10^{-3} A_{532-600} \cdot \text{min}^{-1}$ e 0 (zero) $A_{532-600} \cdot \text{min}^{-1}$. Esses

resultados sugerem que os compostos AT e AC também têm uma componente quelante em seu mecanismo antioxidante na peroxidação lipídica, uma vez que diminuem a velocidade de propagação da peroxidação. Esse mesmo comportamento foi observado por Lapenna e colaboradores (2002) para o ácido ursodesoxicólico. Os autores observaram que esse composto era capaz de inibir a peroxidação lipídica induzida por Fe(III)-EDTA, ascorbato e H₂O₂⁽¹⁴⁵⁾. Eles concluíram que o ácido ursodesoxicólico possui um mecanismo duplo (tanto quelante como sequestrador de radicais livres), mecanismo semelhante ao proposto para o AC e AT. Moon e Terao mostraram que tanto o ácido caféico como o ácido dihidrocaféico são capazes de prolongar a fase lag da peroxidação lipídica de LDL humana (*low density lipoprotein*) induzida por Cu(II) *in vitro*⁽¹⁴⁶⁾. Além disso, os autores observaram que o AC provoca uma pequena diminuição da velocidade da fase log da peroxidação, estando de acordo com as nossas observações. Em um estudo mais detalhado, Nardini e colaboradores testaram três compostos derivados do ácido cinâmico, dentre eles o AC, na peroxidação lipídica de LDL *in vitro* induzida por AAPH e por Cu(II) + ascorbato⁽⁸⁹⁾. Os autores mostraram que crescentes concentrações de AC prolongam, de maneira dose dependente, a fase lag da peroxidação lipídica induzida tanto por Cu(II) como por AAPH. Por outro lado, os autores não observaram uma diminuição da velocidade de propagação da peroxidação lipídica induzida por Cu(II), mostrando que a atividade antioxidante se deve, principalmente, ao mecanismo *chain breaker* (ou seqüestrador de radicais livres) do AC⁽⁸⁹⁾. Vale lembrar que o estudo de Nardini e colaboradores (1995) foi feito utilizando íons Cu(II), metal diferente do utilizado nesta dissertação). Portanto, esta diferença observada entre os mecanismos pode estar associada ao metal utilizado para induzir a peroxidação (nós utilizamos Fe(II) e os autores Cu(II)). Para se entender melhor essa diferença, deve ser feito um estudo mais detalhado acerca da complexação AC-Cu(II) e da sua atividade antioxidante nesse sistema.

A atividade antioxidante do AT e do AC também foi testada na degradação oxidativa do DNA plasmidial. As **figuras 44, 45 e 46** mostram o efeito de crescentes concentrações dos antioxidantes na degradação do DNA induzida pela reação da autooxidação do Fe(II).

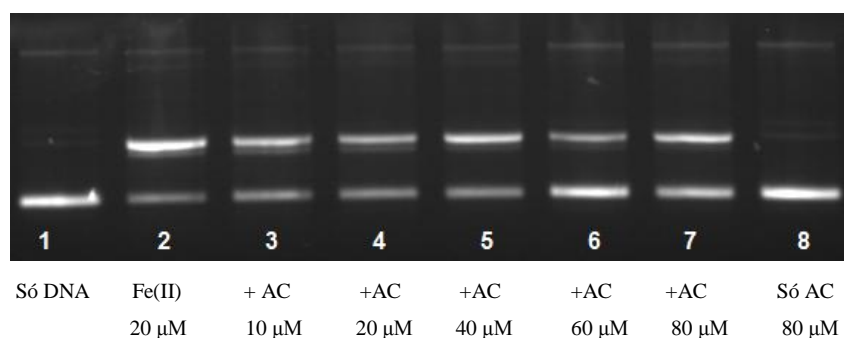


Figura 44. Foto do gel de agarose do dano ao DNA induzido pela reação de autoxidação do Fe(II) na presença de crescentes concentrações de AC. Todos os poços contém KPi 10 mmol.L⁻¹ e DNA 10 ng.mL⁻¹ (**Poço 1**). As condições experimentais eram Fe(II) 20 μmol.L⁻¹ e AC 0 a 80 μmol.L⁻¹, assim sendo: **Poço 2:** + Fe(II); **Poço 3:** + Fe(II) e AC 10 μmol.L⁻¹; **Poço 4:** + Fe(II) e AC 20 μmol.L⁻¹; **Poço 5:** Fe(II) e AC 40 μmol.L⁻¹; **Poço 6:** Fe(II) e AC 60 μmol.L⁻¹; **Poço 7:** Fe(II) e AC 80 μmol.L⁻¹; **Poço 8:** Só AC 80 μmol.L⁻¹. A reação foi incubada por 10 minutos após a adição do Fe(II). Esse gel é representativo de 6 repetições.

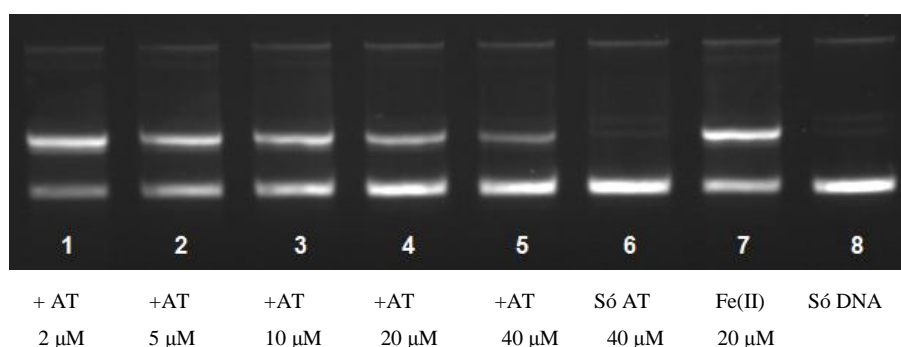


Figura 45. Foto do gel de agarose do dano ao DNA induzido pela reação de autoxidação do Fe(II) na presença de crescentes concentrações de AT. Todos os poços contém KPi 10 mmol.L⁻¹ e DNA 10 ng.mL⁻¹ (**Poço 8**). As condições experimentais eram Fe(II) 20 μmol.L⁻¹ e AT 0 a 40 μmol.L⁻¹, assim sendo: **Poço 7:** + Fe(II); **Poço 1:** + Fe(II) e AT 2 μmol.L⁻¹; **Poço 2:** + Fe(II) e AT 5 μmol.L⁻¹; **Poço 3:** Fe(II) e AT 10 μmol.L⁻¹; **Poço 4:** Fe(II) e AT 20 μmol.L⁻¹; **Poço 5:** Fe(II) e AT 40 μmol.L⁻¹; **Poço 6:** Só AT 40 μmol.L⁻¹. A reação foi incubada por 10 minutos após a adição do Fe(II). Esse gel é representativo de 6 repetições.

As **figuras 44 e 45** ilustram as fotos dos géis de agarose do experimento da variação do AC e AT, respectivamente. Nota-se que crescentes concentrações de AC (poços 3 a 7 na **figura 44**) promoveram uma diminuição da intensidade da banda do DNAoc e aumentaram a intensidade da banda do DNAsc. O mesmo comportamento foi observado para o AT (vide **figura 45**

poços 1 a 5). A partir das fotos dos géis de agarose foi feita a curva da variação da concentração desses antioxidantes no dano ao DNA, que está mostrada na **figura 46**.

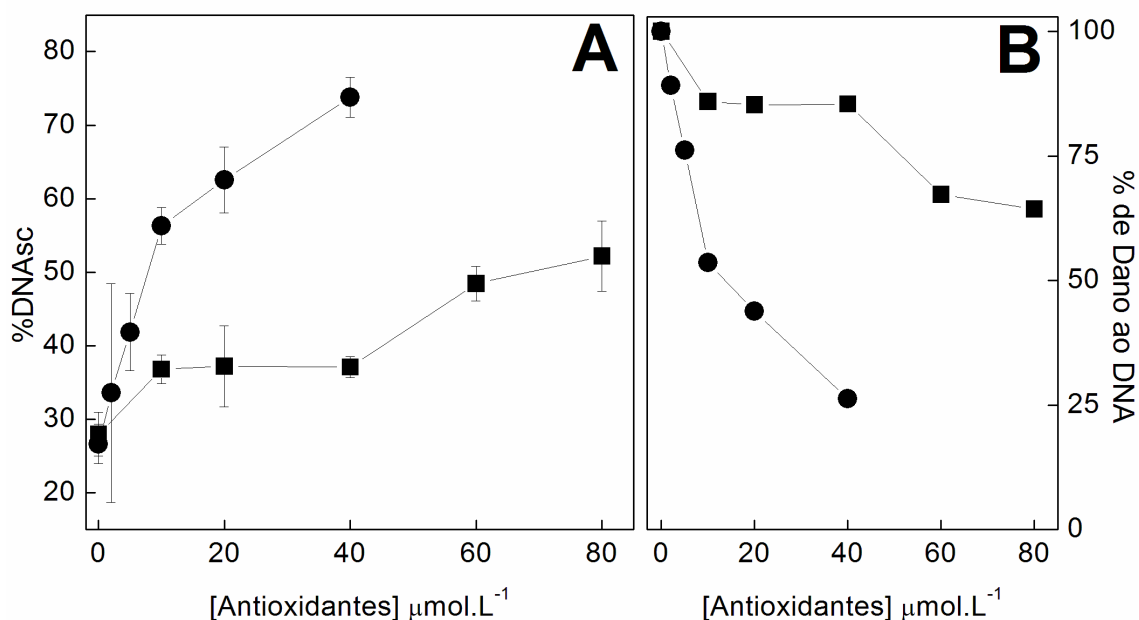


Figura 46. Efeito de crescentes concentrações de AT e AC na degradação oxidativa de DNA plasmidial induzida pela reação de autoxidação do Fe(II). O meio reacional era composto por KPi 10 mmol.L⁻¹, DNA 10 ng.mL⁻¹, Fe(II) 20 μmol.L⁻¹; + AC 0 a 80 μmol.L⁻¹ (■); + AT 0 a 40 μmol.L⁻¹ (●). As reações foram incubadas por 10 minutos após a adição de Fe(II). O gráfico representa a média e o desvio padrão de 6 repetições. A **figura 46B** representa o percentual de dano ao DNA na presença de AC (10 a 80 μmol.L⁻¹) (■) e de AT (2 a 40 μmol.L⁻¹) (●). O dano causado por Fe(II) 20 μmol.L⁻¹ foi dado como 100%.

Observa-se na **figura 46** que crescentes concentrações de AC e AT protegeram de maneira dose dependente o DNA, sendo que a proteção conferida pelo AT foi significativamente maior que a conferida pelo AC. O valor de I₅₀ observado para o AT nesse experimento foi de aproximadamente 15 μmol.L⁻¹, enquanto o valor para o AC foi superior a 80 μmol.L⁻¹. Ignatowicz e colaboradores (2003) estudaram o efeito do AT na formação de adutos covalentes de DMBA (7,12 dimetil-benzoantraceno) no DNA *in vitro*⁽¹⁴⁷⁾. Os autores mostraram que o AT foi capaz de inibir em 99% a formação destes adutos. Embora o estudo utilize outra metodologia para verificar o efeito do AT, os resultados indicam uma capacidade antioxidante do AT contra danos ao DNA, uma vez que o DMBA atua como um potente iniciador de câncer de

pele⁽¹⁴⁸⁾. Baer-Dubowska e colaboradores (1998) mostraram que o AT diminuiu a ligação do DMBA ao DNA em pele, pulmão e estômago de ratos⁽¹⁴⁸⁾. Andrade Jr. mostrou que o AT protege o DNA em sistemas contendo Fe(II) e H₂O₂. Por outro lado, mostrou também que o AT possui uma considerável capacidade pró-oxidante em sistemas contendo Cu(II) e ascorbato, onde potencializou a degradação do DNA em cerca de 66%⁽¹⁴⁰⁾.

O efeito de crescentes concentrações de Fe(II) no dano ao DNA na presença e na ausência dos antioxidantes também foi verificada. As **figuras 47, 48 e 49** ilustram este experimento.

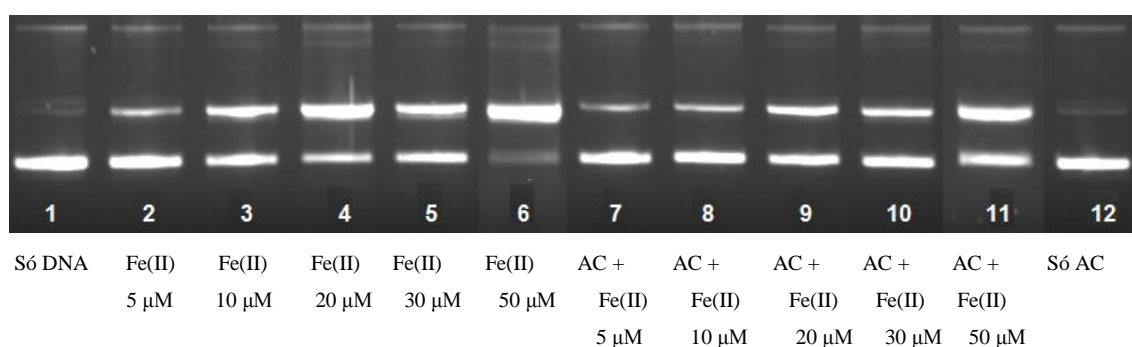


Figura 47. Foto do gel de agarose do dano ao DNA induzido pela reação de autoxidação do Fe(II) com crescentes concentrações de Fe na presença de AC. Todos os poços contém KPi 10 mmol.L⁻¹ e DNA 10 ng.mL⁻¹ (**Poço 1**). As condições experimentais eram AC 80 µmol.L⁻¹ e Fe(II) 0 a 50 µmol.L⁻¹, assim sendo: **Poço 2:** + Fe(II) 5 µmol.L⁻¹; **Poço 3:** + Fe(II) 10 µmol.L⁻¹; **Poço 4:** + Fe(II) 20 µmol.L⁻¹; **Poço 5:** + Fe(II) 30 µmol.L⁻¹; **Poço 6:** + Fe(II) 50 µmol.L⁻¹; **Poço 7:** AC + Fe(II) 5 µmol.L⁻¹; **Poço 8:** AC + Fe(II) 10 µmol.L⁻¹; **Poço 9:** AC + Fe(II) 20 µmol.L⁻¹; **Poço 10:** AC + Fe(II) 30 µmol.L⁻¹; **Poço 11:** AC + Fe(II) 50 µmol.L⁻¹; **Poço 12:** Somente AC. A reação foi incubada por 10 minutos após a adição do Fe(II). Esse gel é representativo de 6 repetições.

Verificamos que crescentes concentrações de Fe(II) promoveram maior quebra de DNA, evidenciado por uma diminuição na intensidade da banda relativa ao DNAsc e um aumento na intensidade da banda relativa ao DNAoc (**figuras 47 e 48**). A presença de 80 µmol.L⁻¹ de AC preservou a banda do DNAsc em relação ao controle (sem AC) (poços 7 a 11 da **figura 47**). Já a presença de 40 µmol.L⁻¹ de AT protegeu de maneira mais significativa o DNA comparado ao AC, fato que pode ser visualizado nos poços 7 a 11 da **figura**

48. Os dados obtidos a partir das figuras 47 e 48 foram utilizados para plotar o gráfico mostrado na figura 49.

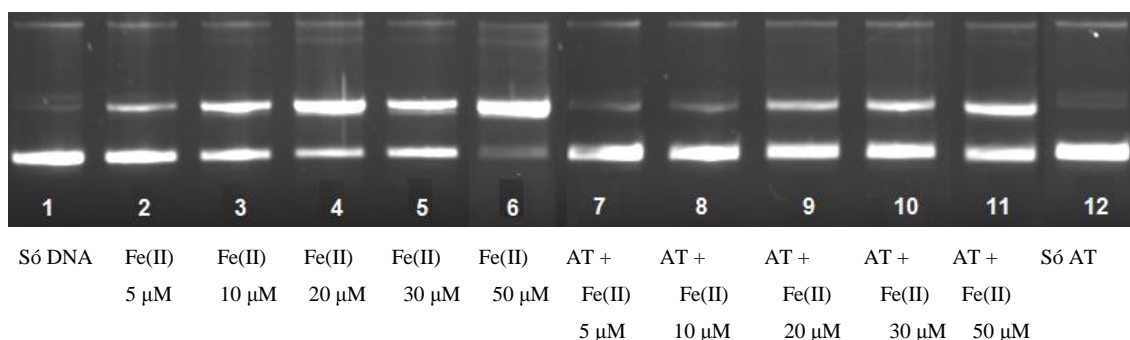


Figura 48. Foto do gel de agarose do dano ao DNA induzido pela reação de autoxidação do Fe(II) com crescentes concentrações de Fe na presença de AT. Todos os poços contém KPi 10 mmol.L⁻¹ e DNA 10 ng.mL⁻¹ (**Poço 1**). As condições experimentais eram AT 40 µmol.L⁻¹ e Fe(II) 0 a 50 µmol.L⁻¹, assim sendo: **Poço 2:** + Fe(II) 5 µmol.L⁻¹; **Poço 3:** + Fe(II) 10 µmol.L⁻¹; **Poço 4:** + Fe(II) 20 µmol.L⁻¹; **Poço 5:** + Fe(II) 30 µmol.L⁻¹; **Poço 6:** + Fe(II) 50 µmol.L⁻¹; **Poço 7:** AT + Fe(II) 5 µmol.L⁻¹; **Poço 8:** AT + Fe(II) 10 µmol.L⁻¹; **Poço 9:** AT + Fe(II) 20 µmol.L⁻¹; **Poço 10:** AT + Fe(II) 30 µmol.L⁻¹; **Poço 11:** AT + Fe(II) 50 µmol.L⁻¹; **Poço 12:** Somente AT. A reação foi incubada por 10 minutos após a adição do Fe(II). Esse gel é representativo de 6 repetições.

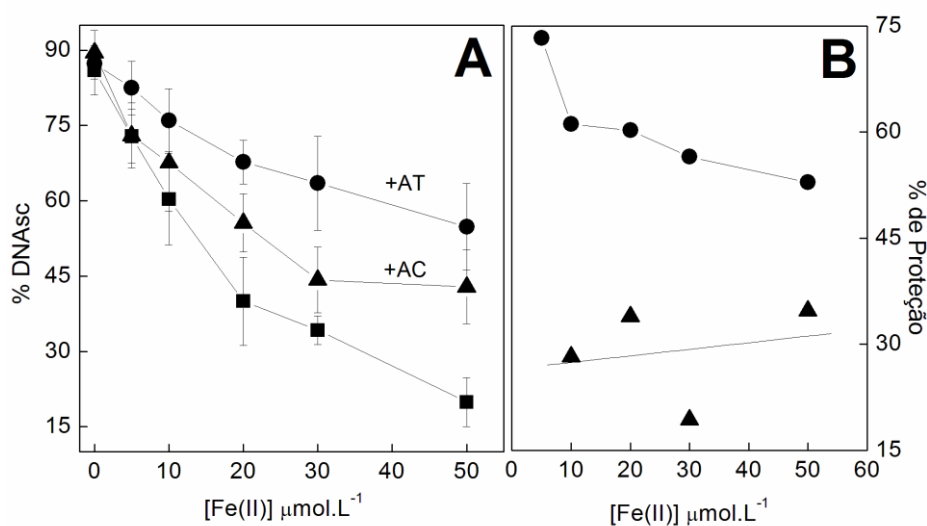


Figura 49. Efeito de crescentes concentrações de Fe(II) na degradação oxidativa de DNA plasmidial induzida pela reação de autoxidação do Fe(II). O meio reacional era composto por KPi 10 mmol.L⁻¹, DNA 10 ng.mL⁻¹, Fe(II) 0 a 50 µmol.L⁻¹; + AC 80 µmol.L⁻¹ (▲); + AT 40 µmol.L⁻¹ (●). As reações foram incubadas por 10 minutos após a adição de Fe(II). O gráfico representa a média e o desvio padrão de 6 repetições. A **figura 49B** representa o percentual de proteção conferido pelo AC (80 µmol.L⁻¹) (▲) e pelo AT (40 µmol.L⁻¹) (●).

Nota-se na **figura 49** que os antioxidantes foram capazes de inibir a degradação do DNA nessas condições experimentais. Na **figura 49B** é possível verificar o percentual de proteção conferido pelo AT (●) e AC (▲). O aumento na concentração de Fe(II) parece não influenciar o percentual de proteção conferido pelo AC, perfil que é diferente do observado para o AT. À medida que a concentração de Fe(II) aumenta no meio reacional, o percentual de proteção conferido pelo AT diminui (de 73 para 52%), comportamento que é característico de moléculas com mecanismo quelante⁽¹³⁰⁾. Estudos dos efeitos do AC nos danos causados ao DNA já foram relatados por outros autores. Inoue e colaboradores (1992) mostraram que o AC, após complexar íons férricos, possui uma pequena atividade antioxidante em sistemas contendo Fe(III) + H₂O₂⁽¹⁴⁹⁾. Ainda nesse trabalho os autores mostraram que o AC possui uma atividade pró-oxidante no DNA quando incubado com Cu(II) ou Mn(II). Os autores sugerem que esta atividade pró-oxidante pode estar associada à capacidade dos polifenóis em gerar H₂O₂ e, em uma etapa posterior, levar a formação do radical hidroxil⁽¹⁴⁹⁾.

Perron e Brumaghim (2009) discutem que a maioria dos polifenóis e flavonóides testados atuam como pró-oxidantes, potencializando o dano ao DNA mediado por íons metálicos. Segundo os autores, essa propriedade pró-oxidante pode estar associada à capacidade dos polifenóis de reduzir Fe(III) a Fe(II) que, na forma parcialmente reduzida, é capaz de levar a formação do radical hidroxil⁽²⁷⁾. Por outro lado, alguns trabalhos mostraram a atividade antioxidante de polifenóis e flavonóides no DNA. De Avellar e colaboradores mostraram que a o-fenantrolina, um complexante clássico de Fe(II), é capaz de inibir os danos ao DNA mediados por reagentes de Fenton⁽¹⁵⁰⁾. Perron e colaboradores (2008) mostraram que a epigallocatequina-3-galato (EGCG) inibiu o dano ao DNA induzido pelo sistema Cu(I) + H₂O₂. Mostraram ainda que a epicatequina-3-galato (ECG) atuou como pró-oxidante em baixas concentrações (0,1 a 4 µmol.L⁻¹) e como antioxidante em concentrações mais elevadas (10 a 1.000 µmol.L⁻¹) em sistemas contendo Cu(I) + H₂O₂⁽¹⁵¹⁾.

Com o intuito de elucidar o mecanismo pelo qual o AC e AT são antioxidantes frente à reação de autooxidação do Fe(II), foram feitos experimentos utilizando as técnicas de EPR e consumo de oxigênio. Inicialmente, tentou-se medir a intensidade do sinal de EPR do aduto radicalar

DMPO/·OH gerado via reação da autoxidação do Fe(II), conforme equações **74 a 77**.



Curiosamente, o sinal de EPR do aduto radicalar DMPO/·OH não foi observado com incubações de até 20 minutos de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de Fe(II) em meio contendo 10 mmol.L^{-1} de KPi. O aumento no tempo de incubação levaria à maior formação do aduto radicalar (DMPO/·OH), o que provocaria um aumento na intensidade do sinal de EPR, uma vez que o aduto tem razoável estabilidade⁽¹⁰⁷⁾. Reinke e colaboradores (1994) mostraram que em sistemas contendo tampão fosfato o sinal do DMPO/·OH formado via reação de autoxidação do Fe(II) não é observado⁽¹⁵²⁾. Entretanto, quando etanol (100 mmol.L^{-1}) era adicionado ao meio reacional um sinal de 6 linhas era observado. Esse sinal é completamente inibido quando O_2 é tirado do meio reacional (anóxia), mas é apenas parcialmente inibido (38%) quando catalase é adicionada^(13, 152). Considerando a **equação 75** mostrada acima, a adição de catalase (enzima capaz de dismutar o H_2O_2 em H_2O e O_2) acabaria com o H_2O_2 na solução. A ausência de H_2O_2 impossibilitaria a reação de Fenton (**equação 76**) e, conseqüentemente, a formação do radical hidroxil. Sendo assim, o sinal de 6 linhas observado pelos autores é, em parte, devido à outra espécie com potencial oxidante similar ao do radical hidroxil. Os autores sugeriram que esta espécie oxidante pode ser o íon Ferril ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}$)^(13, 152).

Tendo em vista as observações de Reinke e colaboradores (1994)⁽¹⁵²⁾, os experimentos de EPR realizados para testar a capacidade antioxidante do AC e do AT no sistema da autoxidação do Fe(II) foram feitos utilizando etanol e medindo a intensidade do aduto radicalar DMPO/ $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}^{\cdot}$ (vide **equações 78 e 79**). Estes experimentos estão ilustrados nas **figuras 50 e 51**.

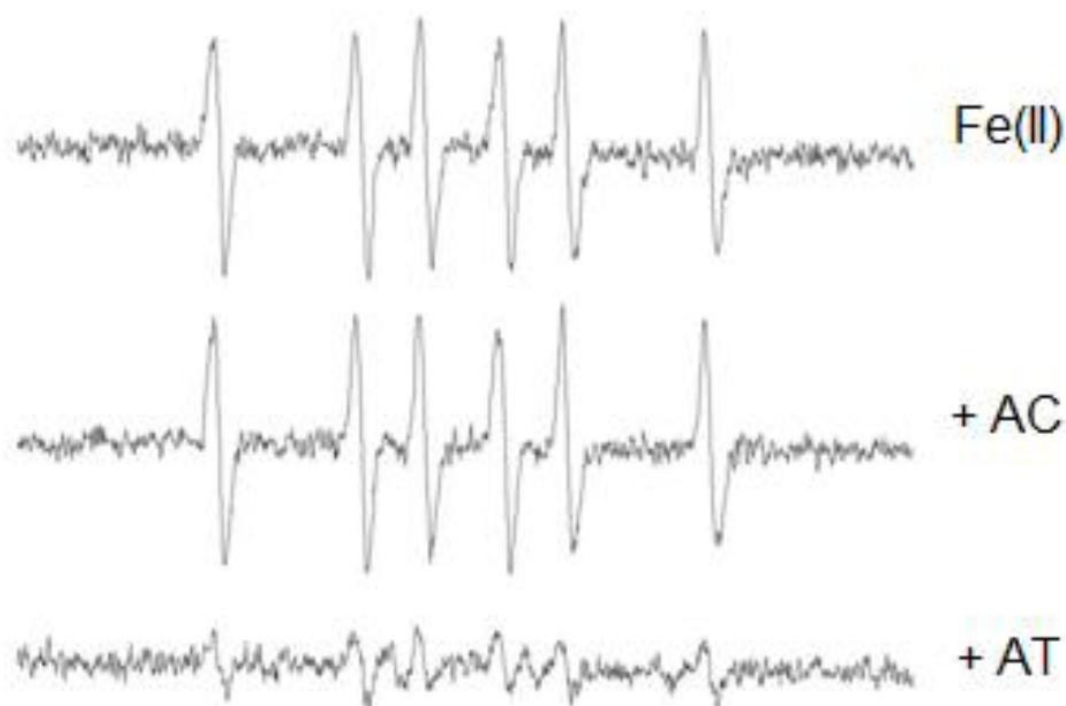
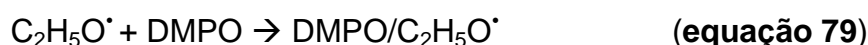


Figura 50. Efeito do AC e AT na intensidade do sinal de EPR do aduto radicalar DMPO/C₂H₅O[•]. O meio reacional era composto por KPi 10 mmol.L⁻¹, DMPO 40 mmol.L⁻¹, Fe(II) 100 μmol.L⁻¹, etanol 0,5% v/v (~140 mmol.L⁻¹), AC 200 μmol.L⁻¹ (+AC), AT 50 μmol.L⁻¹ (+AT). As varreduras foram feitas depois de 20 minutos de incubação (após a adição de Fe(II)). Os espectros são representativos de 3 repetições.

Observa-se na **figura 50** que a reação do Fe(II) com o oxigênio levou a formação do aduto radicalar DMPO/C₂H₅O[•], estando de acordo com as observações de Reinke e colaboradores (1994)⁽¹⁵²⁾. Esse sinal é, ao menos em parte, gerado conforme as equações **74 a 76, 78 e 79**.



Nota-se também que 200 μmol.L⁻¹ de AC não afetaram a intensidade do sinal do aduto quando comparado ao experimento controle (Fe(II)). Por outro lado, 50 μmol.L⁻¹ de AT promoveram uma significativa diminuição na intensidade do sinal do radical etanoil (C₂H₅O[•]). Para compreender melhor o efeito desses antioxidantes na reação de autoxidação foi feito um experimento onde se mediu a intensidade do sinal do DMPO/C₂H₅O[•] em função da concentração de Fe(II) (**figura 51**).

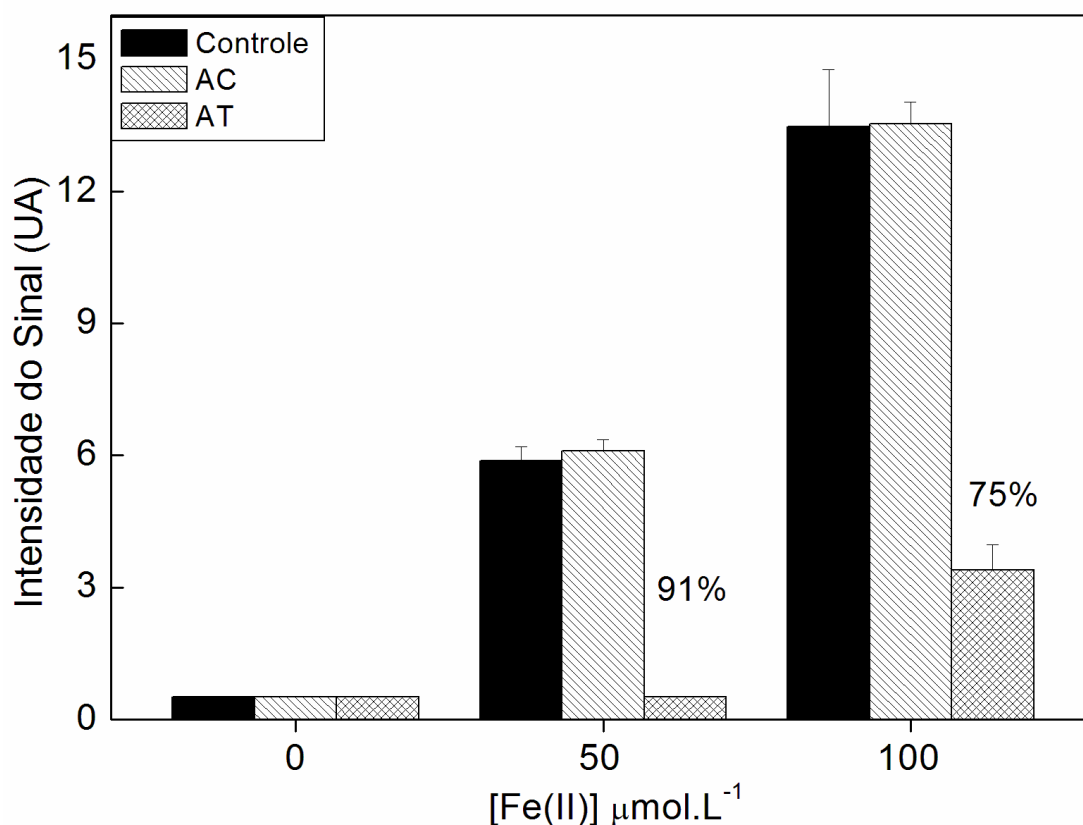


Figura 51. Efeito da variação do Fe(II) na intensidade do sinal de EPR do aduto radicalar DMPO/C₂H₅O[•]. O meio reacional era composto por KPi 10 mmol.L⁻¹, DMPO 40 mmol.L⁻¹, Fe(II) 0 a 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, etanol 0,5% v/v (~86 mmol.L⁻¹), AC 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, AT 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. As varreduras foram feitas depois de 20 minutos de incubação (após a adição de Fe(II)). O gráfico representa a média e o desvio padrão de 3 repetições.

Observa-se na **figura 51** que crescentes concentrações de Fe(II) levaram ao aumento na intensidade do sinal do aduto radicalar e a presença de AC no meio não influenciou a intensidade do sinal. Quando o AT estava presente no meio, houve uma queda de 91% e 75% na intensidade do sinal com 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de Fe(II), respectivamente. Este comportamento foi similar ao observado em outros experimentos em que foi feita a variação da concentração de Fe(II) (**figuras 35, 41 e 49** (nesta última somente a curva do AT)). Comportamento similar ao observado para o AT foi relatado por Gomez (2005) para o piridoxal isonicotinoil hidrazona (PIH). O autor mostrou que 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de PIH (composto capaz de complexar íons ferro) diminuíram a intensidade do sinal de EPR do aduto DMPO/C₂H₅O[•] induzido pela reação de autoxidação do Fe(II) (na presença de Fe(II) 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, etanol 0,5% e DMPO

50 mmol.L^{-1})⁽¹⁰⁰⁾. A presença do etanol no meio reacional auxilia a observação do mecanismo quelante dos compostos estudados. Se observarmos a relação etanol:AT neste sistema (**figura 51**), veremos que a concentração de etanol (86 mmol.L^{-1}) é 1700 vezes maior que a do AT ($50 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$). Assumindo que as constantes de velocidade do $\cdot\text{OH}$ com ambos os compostos (AT e etanol) tem a mesma ordem de grandeza ($10^9 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$)⁽¹⁰⁷⁾, a reação do $\cdot\text{OH}$ com etanol seria muito mais favorecida. Sendo assim, a proteção conferida pelo AT nessas condições estaria associada, principalmente, à sua componente quelante.

Com o objetivo de estudar a influência do AC e do AT na cinética da reação de autooxidação do Fe(II) (**equação 74**), foram feitos experimentos medindo a velocidade do consumo de oxigênio na presença e ausência do AT e AC. Esses experimentos estão ilustrados na **figura 52**.

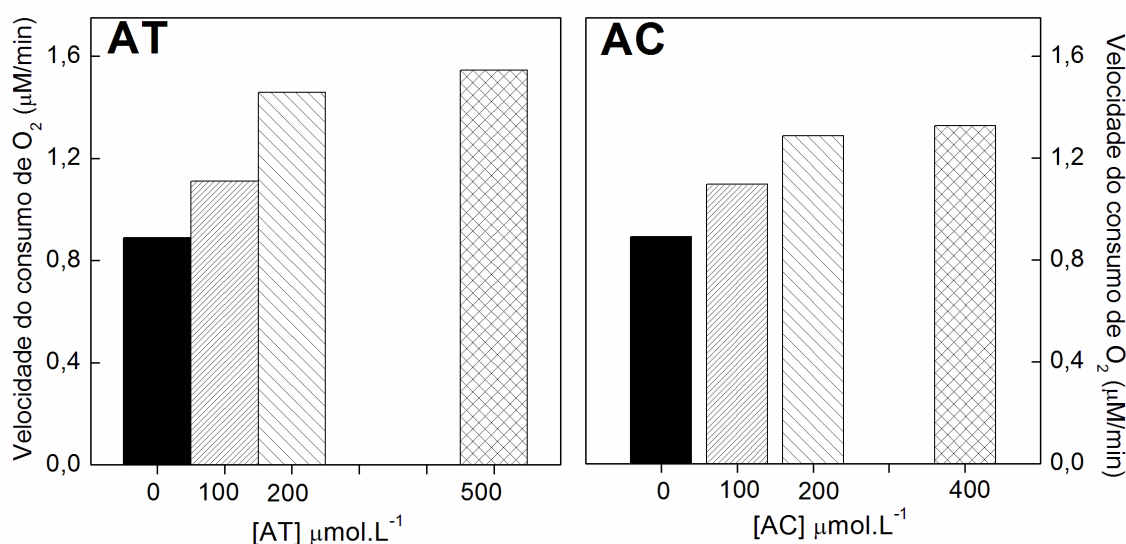


Figura 52. Efeito do AC e AT no consumo de O₂. O meio reacional era composto por KPi 10 mmol.L^{-1} , Fe(II) $200 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, AC 0 a $400 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ (AC), AT 0 a $500 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ (AT). O gráfico representa a média de 2 repetições independentes. As leituras foram iniciadas após a adição do Fe(II) e foram feitas até 2 minutos. Para conversão de porcentagem para concentração foi utilizada como 100% a $[\text{O}_2] = 220 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ (valor correspondente à $[\text{O}_2]$ a 1000 metros de altitude e temperatura ambiente ($25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$))⁽¹¹⁰⁾.

Nota-se na **figura 52** que crescentes concentrações de AC provocaram um aumento na velocidade do consumo de oxigênio da reação de autooxidação do Fe(II) (**equação 74**). Na ausência de antioxidantes a reação consumia $0,9 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}/\text{min}$ de O₂. A presença de $400 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AC provocou um aumento

de ~50% na velocidade do consumo de oxigênio, consumindo $1,3 \mu\text{mol.L}^{-1}/\text{min}$ de O_2 . Comportamento semelhante foi observado quando crescentes concentrações de AT foram adicionadas. Quando $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AT estavam presentes no meio reacional, houve um aumento de ~75% na velocidade do consumo de oxigênio, passando a consumir $1,6\% \mu\text{mol.L}^{-1}/\text{min}$ de O_2 . Andrade Jr. e colaboradores (2006) mostraram que o AT inibiu o consumo de O_2 na presença de Fe(III) e ascorbato⁽⁷⁴⁾. Entretanto, nesse sistema a reação entre o Fe(II) e o O_2 é subsequente à redução do Fe(III) pelo ascorbato, conforme as **equações 80 e 81**.



Os autores mostraram também que o AT inibiu a redução do Fe(III) pelo ascorbato (**equação 80**), reação responsável pela formação de Fe(II) no meio. Ao inibir a redução do Fe(III), o AT inibe também o consumo de oxigênio. Kipton e colaboradores (1982) mostraram que o ácido gálico (AG), um composto derivado do AT, acelera a autooxidação do Fe(II) de maneira diretamente proporcional ao pH do meio. Segundo os autores, em pHs ácidos o AG não complexa efetivamente o Fe(II) e, portanto, não acelera a sua oxidação a Fe(III). Por outro lado, com a alcalinização do meio, a complexação é favorecida, e os compostos fenólicos passam a influenciar a reação de autooxidação⁽¹⁵³⁾. Perron e Brumaghim (2009) sugerem que polifenóis com grupos galol (3 hidroxilas fenólicas, características no AT) aceleram de maneira mais significativa a reação de autooxidação do Fe(II) que polifenóis com grupos catecol (2 hidroxilas fenólicas, características no AC)⁽²⁷⁾. Isso acontece porque compostos com grupos galol promovem uma maior diminuição do potencial padrão de redução do Fe(II) quando comparados a compostos com grupos catecol^(27, 119). Além disso, compostos com grupos galol têm constantes de estabilidade com Fe(III) maiores que compostos com grupos catecol ($\log K_{\text{galol}} = 40-50$; $\log K_{\text{catecol}} = 35-40$), conferindo aos primeiros a capacidade de acelerar mais significativamente a reação de autooxidação do Fe(II)^(27, 154). A sugestão proposta por Perron e Brumaghim (2009) está de acordo com as nossas observações experimentais. A presença de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AT provocou um

aumento de 65% na velocidade do consumo de oxigênio, enquanto que a mesma concentração de AC provocou um aumento de apenas 45%. Para uma comparação mais precisa acerca da influência de diferentes grupos (catecol e galol) no consumo de oxigênio, deveria ser feito um estudo com o ácido gálico (possui um grupo galol e massa molecular similar à do AC), uma vez que o AT possui uma estrutura muito maior que a do AC (**figura 53**). Esses experimentos serão realizados em um futuro próximo.

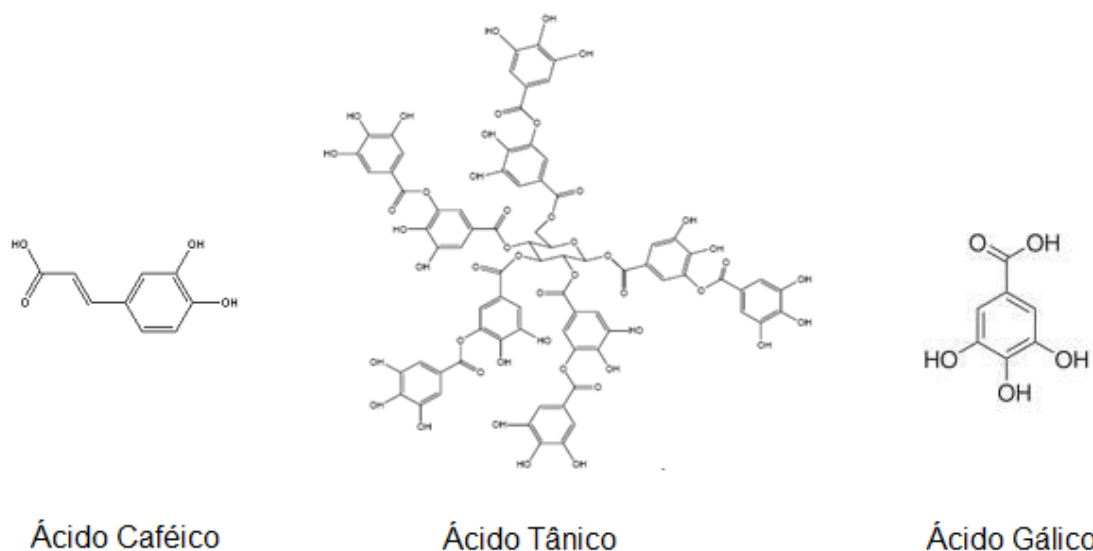


Figura 53. Fórmulas estruturais dos ácidos caféico, tânico e gálico.

O aumento na velocidade do consumo de oxigênio (**figura 52**) promovido pelo AC e AT não era esperado, uma vez que diversos trabalhos na literatura mostraram que polifenóis, inclusive o AT, reduzem íons Fe(III) a Fe(II)^(74, 155, 156). O resultado obtido no experimento de consumo de O₂ evidencia uma ação contrária à capacidade redutora do AT, uma vez que este acelerara a oxidação de Fe(II) a Fe(III). Sugeriu-se que esta capacidade estaria associada a uma diminuição no potencial padrão de redução do Fe(II), sugestão que não seria compatível com a capacidade redutora. Mais estudos serão elaborados com objetivo de compreender melhor tal mecanismo. Para testar a capacidade redutora de íons férricos do AC e do AT, foi feito um estudo utilizando a técnica de EPR, onde foi medido o sinal do Fe(III) em solução ácida (vide seção 3.4.2 desta dissertação). Os resultados obtidos estão mostrados na **figura 54**.

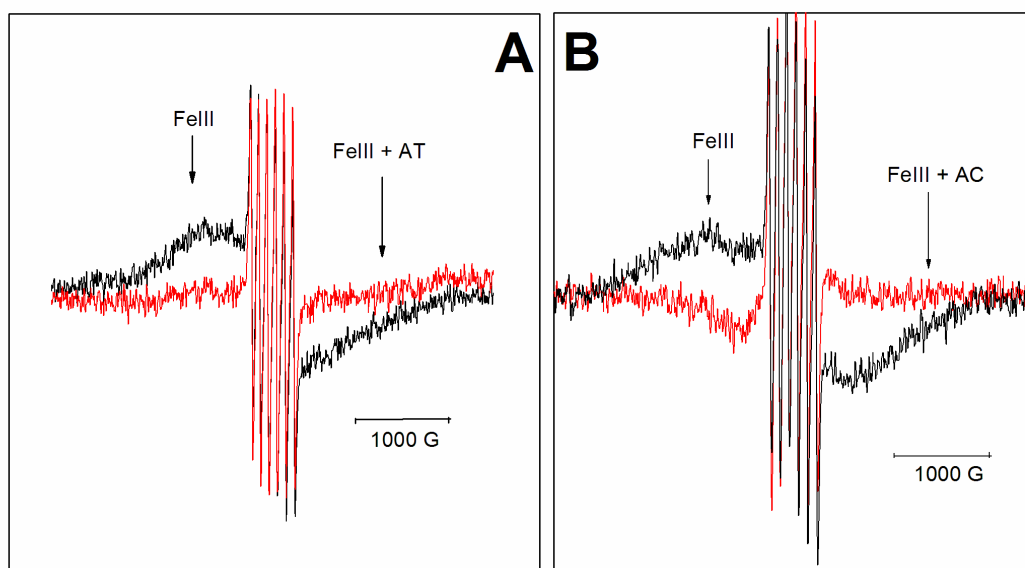
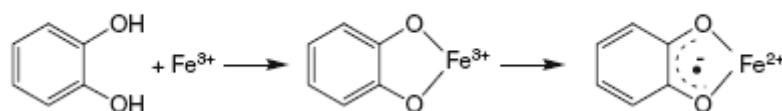


Figura 54. Efeito do AC e do AT no sinal de EPR do Fe(III). **(54A)** O meio reacional era composto por Fe(III) 10 mmol.L^{-1} solubilizado em HCl 10 mmol.L^{-1} (**linha preta**) + AT 5 mmol.L^{-1} (**linha vermelha**). **(54B)** O meio reacional era composto por Fe(III) 9 mmol.L^{-1} solubilizado em HCl 10 mmol.L^{-1} (**linha preta**) + AC 9 mmol.L^{-1} (**linha vermelha**). O pH do meio reacional era $\sim 1,0$. O experimento foi realizado a temperatura ambiente e as leituras foram iniciadas 5 minutos após a adição de Fe(III). As condições do aparelho de EPR eram: Frequência da microonda, $9,707 \text{ GHz}$; potência da microonda, 20 mW ; frequência de modulação, 100 kHz ; amplitude de modulação, 2 G ; ganho do detector, 1×10^5 ; velocidade de varredura, 120 G s^{-1} ; número de varreduras, 9. O sexteto observado na figura é devido à presença de Mn(II) no sal de ferro utilizado.

O sinal característico do Fe(III) observado nessas condições é um singlete com largura de linha de aproximadamente 3000 G . Esse sinal pode ser observado na linha preta nas **figuras 54A e 54B**. O sexteto observado nessas figuras é devido ao íon Mn(II), contaminação presente no sal de ferro utilizado. Observa-se que a adição de 10 mmol.L^{-1} de AT provocou o desaparecimento do sinal de EPR do Fe(III) (linha vermelha). Esse resultado pode ser explicado pela redução do Fe(III) a Fe(II) pelo AT. O Fe(II) possui configuração eletrônica $3d^6$ que, quando complexado a um ligante de campo forte, possui todos os elétrons desemparelhados e, conseqüentemente, nenhum sinal no EPR^(57, 105). O AT pode estar complexando o Fe(II) como a *o*-fenantrolina, aumentando a energia de estabilização do campo cristalino⁽⁵⁷⁾. Essas observações estão de

acordo com as relatadas por Andrade Jr. e colaboradores (2006), corroborando a capacidade redutora de Fe(III) do AT⁽⁷⁴⁾. O mesmo comportamento pode ser observado quando o AC é adicionado ao meio contendo Fe(III) (**figura 54B**), onde o sinal de EPR do Fe(III) desaparece. A redução do Fe(III) a Fe(II) leva, conseqüentemente, à oxidação do AT e do AC formando uma semiquinona, conforme **esquema 26**.



Esquema 26. Ilustração da redução do Fe(III) após a formação do complexo. O catecol foi oxidado em um elétron dando origem a uma semiquinona. Adaptado de Perron e Brumaghim, 2009⁽²⁷⁾.

Em um estudo acerca do mecanismo antioxidante de dois polifenóis, Ryan e colaboradores (2007) mostraram que a EGCG e a ECG são capazes de reduzir Fe(III) a Fe(II) e sugeriram que a atividade antioxidante desses compostos pode estar relacionada a isso⁽¹⁵⁶⁾. Semelhantemente ao estudo de Ryan e colaboradores, Pulido e colaboradores mostraram a capacidade redutora de diversos compostos fenólicos, inclusive do AT e do AC, por meio do método de FRAP (do inglês, Ferric Reducing Antioxidant Power)⁽¹⁵⁷⁾.

6.4 Conclusões do capítulo 3

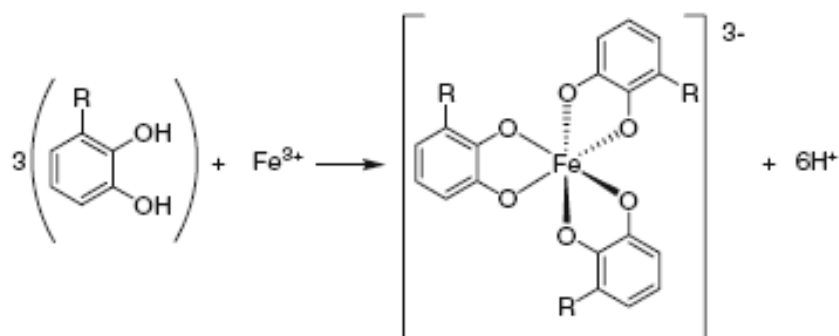
Os resultados obtidos nesse capítulo mostram que o AC e o AT possuem atividade antioxidante ao inibir a degradação oxidativa da 2-DR, a peroxidação lipídica em homogenato de fígado de rato e a degradação oxidativa do DNA em sistemas contendo Fe(II), oxigênio e tampão fosfato. Essa atividade antioxidante é devida, principalmente, à componente quelante desses compostos fenólicos e, de maneira menos expressiva, à capacidade de sequestrar radicais hidroxil.

Os resultados onde se variou a concentração de 2-DR (**tabela 12**) mostram, claramente, que o mecanismo antioxidante desses compostos fenólicos é do tipo quelante, uma vez que o percentual de proteção permaneceu inalterado com o aumento de 2-DR⁽¹³⁰⁾. Esse mesmo mecanismo

ficou também evidenciado quando a concentração de Fe(II) foi aumentada (**figura 41**). O aumento na concentração de Fe(II) provocou uma diminuição no percentual de proteção à 2-DR conferido pelo AT e AC, comportamento característico de moléculas quelantes.

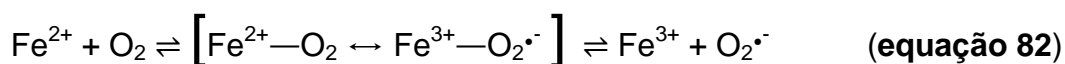
Esse mesmo mecanismo foi observado na metodologia da peroxidação lipídica de fígado de rato. A presença dos antioxidantes diminuiu a velocidade de propagação da peroxidação lipídica, comportamento também característico de quelantes⁽¹⁵⁾. O PIH teve uma atividade similar a do AT e do AC, sendo capaz de diminuir a velocidade de propagação da peroxidação lipídica de mitocôndrias em um sistema contendo reagentes de Fenton⁽¹⁵⁸⁾. Nessa metodologia verificou-se uma componente sequestradora de radicais livres (atuando como *chain breakers*), uma vez que os compostos atuaram prolongando a fase de iniciação da peroxidação, comportando como o α -tocoferol e o BHT^(3, 15).

A análise da variação da concentração dos polifenóis pelo método da degradação da 2-DR permitiu levantar a hipótese acerca da estequiometria de complexação antioxidante-ferro. Observou-se que em concentrações superiores a $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AC no sistema contendo $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Fe(II) não houve variação significativa nos percentuais de proteção conferido pelo AC (vide **figura 40**). Esses dados sugerem uma estequiometria 1:2 Fe(II):AC, estando de acordo com o valor proposto na conclusão do capítulo 2 desta dissertação. Pelo fato de formarem complexos octaédricos com íons ferro, outras estequiometrias de complexação podem ser observadas para compostos fenólicos dependendo das condições experimentais^(131, 159). Complementando este estudo, Perron e Brumaghim (2009) sugeriram que complexos com estequiometria 1:3 Fe(III):antioxidante (**esquema 27**) podem ser observados à medida que o pH do meio reacional é elevado (i.e. pHs superiores a 8)⁽²⁷⁾.



Esquema 27. Ilustração da formação do complexo Fe:catecol. R=H (catecol); R=OH (galol). Retirado de Perron e Brumaghim, 2009⁽²⁷⁾.

As formas desprotonadas do AC e do AT comportam-se como bases duras de Lewis (comportamento geral dos polifenóis), e ao reagirem com ácidos duros de Lewis, como o Fe(III), formam complexos com altas constantes de estabilidade ($\log k \sim 40-50$)⁽²⁷⁾. Devido a essa propriedade (de estabilizar Fe(III)) os polifenóis, como o AC e o AT, podem acelerar a oxidação do Fe(II) a Fe(III) pelo oxigênio. A análise do efeito do AT e do AC no consumo de oxigênio mediado pelo Fe(II) mostrou, de fato, que eles aceleraram o consumo de oxigênio (vide **figura 52**). Gomes (2005) também observou que o PIH acelerava o consumo de oxigênio em sistemas contendo íons ferrosos, uma vez que possui maior constante de estabilidade com Fe(III) (quando comparado ao Fe(II))⁽¹⁰⁰⁾. Segundo Qian e Buettner (1999), a reação de autoxidação do Fe(II) envolve um intermediário onde o Fe(II) está complexado ao O₂ (**equação 82**)⁽¹³⁾.



Nesse intermediário a densidade de carga negativa sobre o Fe(II) acelera a sua oxidação a Fe(III). Nessa linha de raciocínio, Morgan e Lahav (2007) mostraram que a reação entre o Fe(II) e o O₂ é mais rápida quanto mais alcalino for o meio reacional (vide **equação 83**)⁽¹²¹⁾. Segundo os autores, o ânion OH⁻ estaria formando um complexo com Fe(II), aumentando a densidade eletrônica sobre ele e acelerando a sua oxidação.

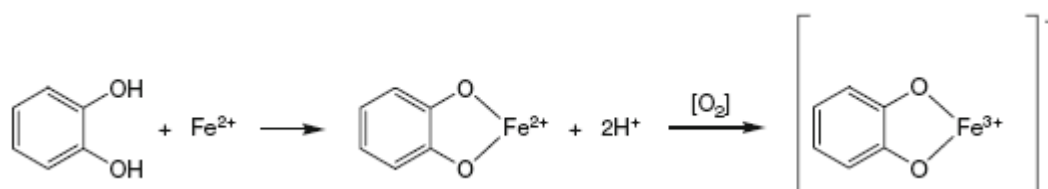
$$\frac{-d[\text{Fe}^{2+}]}{dt} = k \cdot [\text{Fe}^{2+}] \cdot [\text{OH}^-]^2 \cdot p\text{O}_2 \quad (\text{equação 83})$$

onde, k é a constante de velocidade da reação, t é o tempo e $p\text{O}_2$ é a pressão parcial do O_2 .

Comportamento similar ao descrito para o ânion hidroxila já foi descrito para íons cloreto⁽¹⁶⁰⁾, sulfato⁽¹⁶¹⁾, perclorato⁽¹⁶²⁾ e fosfato⁽¹¹⁹⁾. Welch e colaboradores (2002) mostraram que a velocidade da reação de autooxidação é influenciada pelo tampão utilizado, sendo que a velocidade da oxidação do Fe(II) pelo O_2 é maior quando o tampão fosfato (KPi) é utilizado, podendo estar associada à formação do complexo que estabiliza melhor o ferro na forma férrica⁽¹¹⁹⁾. Dessa maneira, a formação do complexo entre o antioxidante e o Fe(II) aumentaria mais ainda a sua velocidade de oxidação a Fe(III) (em relação ao KPi), sendo que esse aumento pode estar associado a uma diminuição no potencial de redução do ferro (vide **esquemas 28 e 29**).

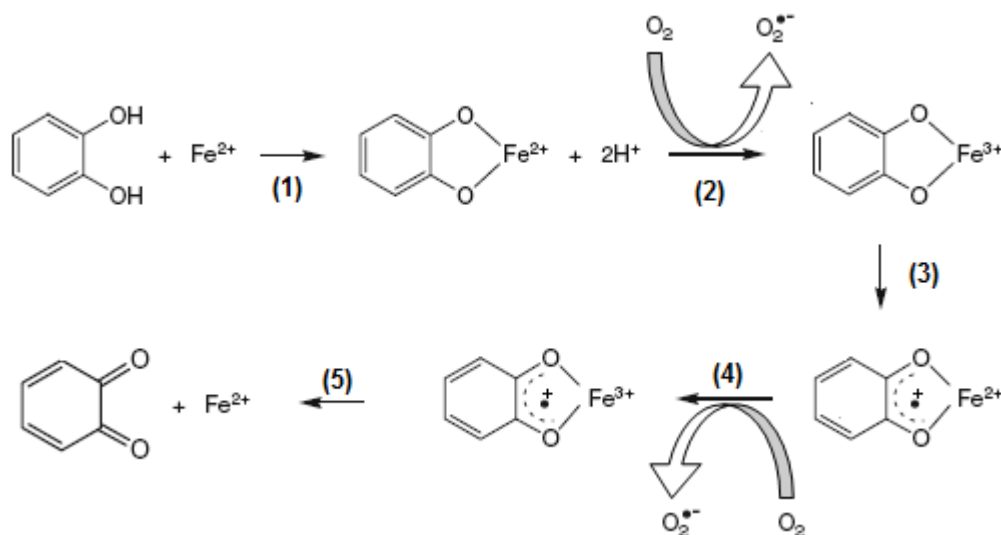


Esquema 28. Ilustração do mecanismo pelo qual o AC e AT aceleram o consumo de oxigênio. Pi = Fosfato; A = AC ou AT.



Esquema 29. Oxidação de íons ferrosos por compostos fenólicos. Adaptado de Perron e Brumaghim, 2009⁽²⁷⁾.

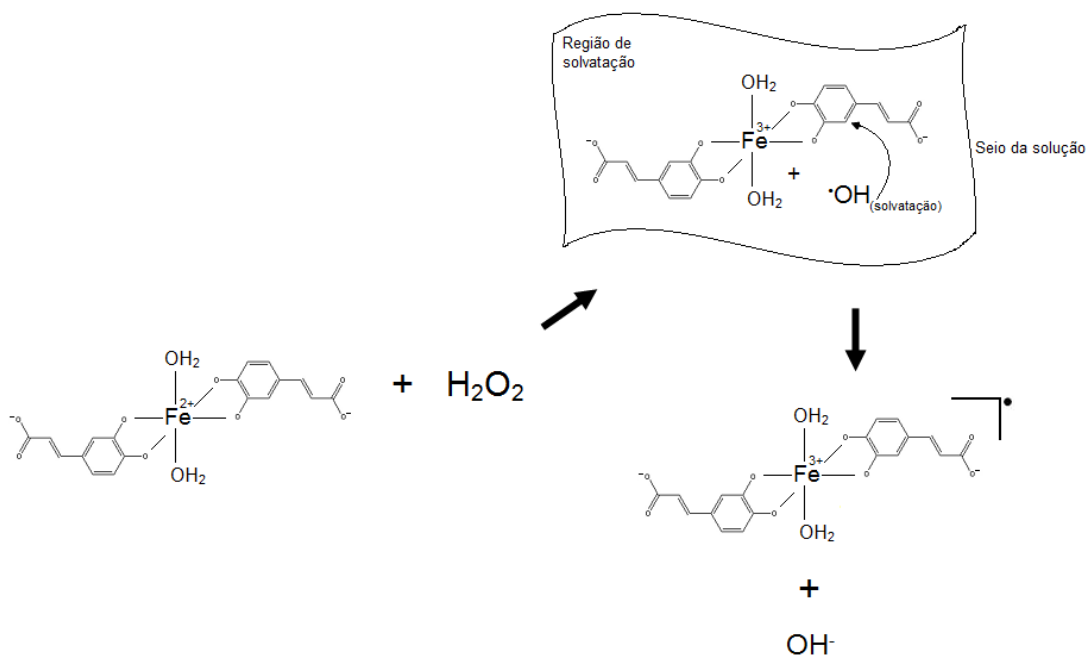
Outra possível explicação para o aumento na velocidade do consumo de O_2 proporcionado pelo AC e AT pode ser dada com base nos resultados mostrados na **figura 54**, onde é ilustrada a capacidade desses compostos fenólicos em reduzir Fe(III) a Fe(II). Após facilitar a oxidação do Fe(II) pelo O_2 (**etapa 2** no **esquema 30**), o composto fenólico reduz em um elétron o Fe(III) por uma transferência de esfera interna, formando uma semiquinona e o íon Fe(II) (**etapa 3**). Este Fe(II) formado, reagiria novamente com o O_2 (**etapa 4**) do meio estabelecendo um ciclo redox entre o ferro e o antioxidante, causando um aumento na velocidade do consumo de oxigênio (**esquema 30**). Na última etapa do ciclo (**etapa 5**), o antioxidante estaria oxidado em dois elétrons, formando uma quinona (que pode ou não estar complexada ao Fe(II)).



Esquema 30. Ilustração do ciclo redox entre o composto fenólico, Fe(II)/Fe(III) e O_2 .

O mecanismo pelo qual esses compostos fenólicos (AC e AT) são antioxidantes pode ser explicado de duas maneiras: **hipótese 1**) impedindo que o radical hidroxil alcance o seio da solução, conforme ilustrado no **esquema 31** (mesmo esquema mostrado no capítulo 2). O H_2O_2 , formado em uma das etapas da reação de autooxidação do Fe(II), (**equação 75**), reage com o complexo Fe(II)-antioxidante. A reação de Fenton pode ser favorecida pela formação do complexo, uma vez que o potencial de redução do Fe(II) seria menor quando este está complexado a polifenóis. O radical hidroxil possui constantes de velocidade que variam de $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ conforme as características do seu "alvo"^(15, 17, 18). Tais valores de constante conferem ao $\cdot OH$ a capacidade de reagir com a primeira molécula que

encontrar em sua frente⁽³⁾, reagindo com o próprio complexo na região de solvatação.



Esquema 31. Ilustração do possível mecanismo antioxidante do AC. O mecanismo proposto para o AT seria similar.

Hipótese 2) a velocidade de oxidação mediada por oxigênio (**esquema 29**) seria muito maior que a velocidade de redução de Fe(III) a Fe(II) pelo polifenol (**esquema 26**), deixando o ferro por mais tempo na forma férrica (forma incapaz de mediar reações de Fenton). Quanto mais tempo o ferro permanecer na forma férrica (forma incapaz de mediar a reação de Fenton), menos radicais hidroxil serão gerados e menores serão os danos oxidativos por ele causados. Esta hipótese poderia explicar o mecanismo antioxidante do AC e do AT na reação de autoxidação do Fe(II).

Gomes (2005) propôs um mecanismo similar para explicar os efeitos antioxidantes do PIH frente à reação de autoxidação do Fe(II). Segundo o autor, o PIH acelerava a oxidação do Fe(II) a Fe(III) e o estabilizava nesta forma. Sendo assim, restava pouco Fe(II) para reagir com o H_2O_2 – que seria forma do em uma etapa subsequente na cascata de reações da autoxidação do Fe(II) – levando a uma diminuição na quantidade de OH^\bullet formado⁽¹⁰⁰⁾.

Na peroxidação lipídica (meio lipofílico) os compostos apresentaram uma atividade significativamente maior que nas outras metodologias (meio

hidrofílico). A presença de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AC protegeu em 65% a peroxidação lipídica após 3 horas de incubação. Essa mesma concentração de AC protegeu cerca de 35% da degradação oxidativa da 2-DR nas mesmas condições experimentais. O mesmo comportamento foi observado para AT. A presença de apenas $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AT protegeu em 70% a peroxidação lipídica e apenas 17% da degradação oxidativa da 2-DR. Esses resultados sugerem que esses antioxidantes desempenham um papel antioxidante importante em sistemas lipofílicos.

Deve-se, no futuro, desenvolver experimentos testando a capacidade antioxidante desses compostos em cultura de células com o intuito de entender os seus mecanismos antioxidantes *in vivo*.

7 - Considerações Finais

A metodologia da degradação oxidativa da 2-DR foi muito importante na elucidação do mecanismo de ação do AT e do AC. Este ensaio é amplamente utilizado devido à sua simplicidade, baixo custo e eficiência na determinação da capacidade antioxidante de moléculas isoladas ou extratos vegetais. Entretanto, mostramos no primeiro capítulo deste trabalho que a não utilização de um branco adequado – baseado na reação entre o Fe(III) e a 2-DR – pode interferir na correta interpretação do mecanismo de ação antioxidante dos compostos estudados. Acreditamos que o novo branco proposto neste trabalho seja de extrema relevância para a comunidade científica, uma vez que a utilização desta metodologia cresce desde a sua criação (**figura 55**).

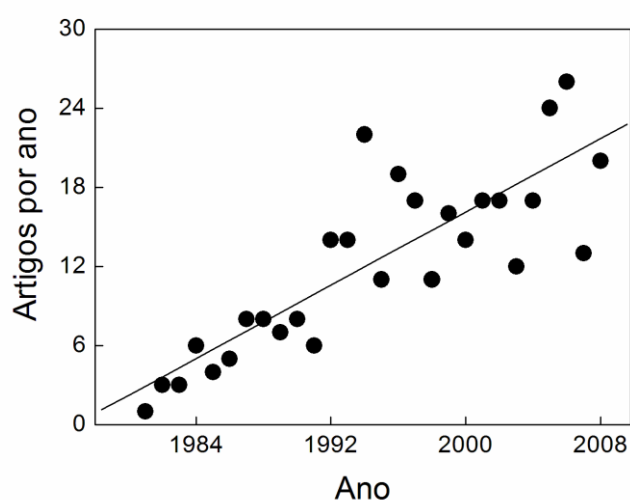


Figura 55. Artigos publicados por ano utilizando a metodologia da 2-DR.

Este trabalho também demonstrou que o ácido caféico, principal composto fenólico presente no café, apresenta considerável atividade antioxidante em sistemas geradores de radicais livres mediados por íons ferro. A atividade antioxidante do AC foi observada tanto em meio aquoso (ensaio da 2-DR) quanto em meio lipofílico (membrana celular), sendo mais pronunciada neste último. Verificamos também que a principal ação antioxidante do AC se deve, principalmente, ao mecanismo de quelação de íons ferro.

O elevado consumo de café pela sociedade moderna e a alta concentração de ácido caféico nesta bebida demonstram que este composto

fenólico pode representar uma parcela importante dos antioxidantes consumidos na dieta⁽⁶⁴⁾. Além disso, estudos mostraram que o AC é facilmente absorvido pelo organismo humano, fato que contribuiria para sua ação *in vivo*⁽⁸¹⁾. Estudos reportaram que o acúmulo de ferro nos tecidos pode contribuir para o desenvolvimento de quadros patológicos como Alzheimer, Parkinson, cirrose hepática, hemocromatose e diversos tipos de câncer^(3, 45, 163-165). Sendo assim, a presença de AC no organismo, aliada à sua capacidade em quelar ferro, poderia contribuir para a prevenção dos danos oxidativos causados por esse metal. Mais ainda, este trabalho indica que o AC pode ser um potencial candidato para uso farmacológico na terapia quelante. Entretanto, estudos *in situ* e *in vivo* deverão ser realizados para confirmar sua eficiência e toxicidade em meio biológico.

Ao contrário do AC, o AT não possui absorção intestinal relevante devido ao tamanho de sua estrutura, o que impossibilitaria a sua entrada no enterócito⁽¹⁶⁶⁾. O AT apresentou considerável capacidade antioxidante em sistemas geradores de radicais livres mediados por íons ferro. Verificamos que uma molécula de AT é capaz de complexar até sete íons ferro, fato que estaria relacionado à sua capacidade antioxidante. Devido à sua baixa absorção pelo organismo, a principal ação antioxidante do AT seria no trato gastrointestinal, onde são observadas altas concentrações de íons metálicos^(60, 76). O próprio organismo dispõe de mecanismos de regulação para impedir a excessiva absorção desses íons metálicos, o que faz com que boa parte desses íons seja excretada pelas fezes. Já se sabe que a alta concentração de íons metálicos no trato gastrointestinal estaria associada ao desenvolvimento de câncer de cólon de reto⁽⁴⁾. Sendo assim, o AT desenvolveria um papel de extrema importância ao complexar o excesso de íons metálicos nessa região, inibindo os processos oxidativos por eles mediados^(60, 76).

O estudo realizado nesta dissertação é de caráter inicial, onde mostramos os mecanismos de ação do AC e do AT *in vitro* em sistemas controlados e com poucas variáveis. Os próximos passos acerca desta pesquisa deverão ser dados a fim de estudar as suas propriedades em sistemas mais próximos do fisiológico, com maior complexidade que tubos de ensaio.

8 – Referências Bibliográficas

1. Strozyk D. Neurodegenerative Diseases and Metal Ions. A concluding overview. In: *Metal Ions In Life Science*. 1st ed. West Sussex: John Wiley and Sons; **2006**. p. 427-37.
2. Chaston TB, Richardson DR. Iron chelators for the treatment of iron overload disease: relationship between structure, redox activity, and toxicity. *Am J Hematol*. **2003** Jul;73(3):200-10.
3. Halliwell B, Gutteridge J. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. New York; **2007**.
4. Kawanishi S, Hiraku Y, Murata M, Oikawa S. The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. *Free Radic Biol Med*. **2002** May 1;32(9):822-32.
5. Ozyurek M, Bektasoglu B, Guclu K, Apak R. Hydroxyl radical scavenging assay of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method using catalase for hydrogen peroxide degradation. *Anal Chim Acta*. **2008** Jun 2;616(2):196-206.
6. Kaur R, Arora S, Singh B. Antioxidant activity of the phenol rich fractions of leaves of *Chukrasia tabularis* A. Juss. *Bioresour Technol*. **2008** Nov;99(16):7692-8.
7. Devanur LD, Neubert H, Hider RC. The fenton activity of iron(III) in the presence of deferiprone. *J Pharm Sci*. **2008** Apr;97(4):1454-67.
8. Moreira PI, Nunomura A, Nakamura M, Takeda A, Shenk JC, Aliev G, et al. Nucleic acid oxidation in Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med*. **2008** Apr 15;44(8):1493-505.
9. Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med*. **1995** Jun;18(6):1033-77.
10. Gutteridge JM. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS Lett*. **1986** Jun 9;201(2):291-5.
11. Stadtman ER, Berlett BS. Fenton chemistry. Amino acid oxidation. *J Biol Chem*. **1991** Sep 15;266(26):17201-11.
12. Stadtman ER, Berlett BS. Fenton chemistry revisited: amino acid oxidation. *Basic Life Sci*. **1988**;49:131-6.
13. Qian SY, Buettner GR. Iron and dioxygen chemistry is an important route to initiation of biological free radical oxidations: an electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Free Radic Biol Med*. **1999** Jun;26(11-12):1447-56.
14. Huang X, Dai J, Fournier J, Ali AM, Zhang Q, Frenkel K. Ferrous ion autoxidation and its chelation in iron-loaded human liver HepG2 cells. *Free Radic Biol Med*. **2002** Jan 1;32(1):84-92.

15. Hermes-Lima M. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. In: *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. 1st ed. New York: John Wiley & Sons; **2004**. p. 319-66.
16. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*. **1984** Apr 1;219(1):1-14.
17. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*. **2006** Jun;141(2):312-22.
18. Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal*. **2007** Sep;19(9):1807-19.
19. Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. **1999** Feb;26(3-4):463-71.
20. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*. **2000** Aug;29(3-4):222-30.
21. Fridovich I. Mitochondria: are they the seat of senescence? *Aging Cell*. **2004** Feb;3(1):13-6.
22. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*. **1969** Nov 25;244(22):6049-55.
23. Fenton H. The Oxidation of Tartaric Acid in the Presence of Iron. *J Chem Soc* **1894**;10:157-8.
24. Andrade RG, Jr., Dalvi LT, Silva JM, Jr., Lopes GK, Alonso A, Hermes-Lima M. The antioxidant effect of tannic acid on the in vitro copper-mediated formation of free radicals. *Arch Biochem Biophys*. **2005** May 1;437(1):1-9.
25. Haber F, Weiss J. On the catalysis of hydroperoxide. *Naturwissenschaften*. **1932**;20:948-50.
26. Koppenol WH. The Haber-Weiss cycle--70 years later. *Redox Rep*. **2001**;6(4):229-34.
27. Perron NR, Brumaghim JL. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys*. **2009**;53(2):75-100.
28. Augusto O. In: *Radicais Livres: bons, maus e naturais*. 1^a ed. São Paulo: Universidade de São Paulo; **2006**.
29. Rajewsky B. The limits of the target theory of the biological action of radiation. *Br J Radiol*. **1952** Oct;25(298):550-2.
30. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*. **1954** May 7;119(3097):623-6.
31. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. **2007**;39(1):44-84.
32. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. **1956** Jul;11(3):298-300.
33. Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett*. **1995** Aug 7;369(2-3):131-5.

34. Stocker R, Keane JF, Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* **2004** Oct;84(4):1381-478.
35. Azzi A, Davies KJ, Kelly F. Free radical biology - terminology and critical thinking. *FEBS Lett.* **2004** Jan 30;558(1-3):3-6.
36. Levine RL. Proteolysis induced by metal-catalyzed oxidation. *Revis Biol Celular.* **1989**;21:347-60.
37. Szweda LI, Stadtman ER. Iron-catalyzed oxidative modification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. Structural and functional changes. *J Biol Chem.* **1992** Feb 15;267(5):3096-100.
38. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **1990**;186:464-78.
39. Hervouet E, Godinot C. Mitochondrial disorders in renal tumors. *Mitochondrion.* **2006** Jun;6(3):105-17.
40. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* **2006** Mar 10;160(1):1-40.
41. Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* **2005** Jan 15;202(2):199-211.
42. Gaetke LM, Chow CK. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology.* **2003** Jul 15;189(1-2):147-63.
43. Guyton A, Hall J. In: *Tratado de Medicina Interna*. 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; **2000**.
44. Zhu X, Su B, Wang X, Smith MA, Perry G. Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Mol Life Sci.* **2007** Sep;64(17):2202-10.
45. Hermes-Lima M. Oxidative Stress and Medical Sciences. In: *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. 1st ed. New York: John Wiley & Sons; **2004**. p. 369-80.
46. Varadarajan S, Yatin S, Aksenova M, Butterfield DA. Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J Struct Biol.* **2000** Jun;130(2-3):184-208.
47. Perry G, Nunomura A, Raina AK, Smith MA. Amyloid-beta junkies. *Lancet.* **2000** Feb 26;355(9205):757.
48. Bartzokis G, Tishler TA, Lu PH, Villablanca P, Altshuler LL, Carter M, et al. Brain ferritin iron may influence age- and gender-related risks of neurodegeneration. *Neurobiol Aging.* **2007** Mar;28(3):414-23.
49. Bush AI. Metal complexing agents as therapies for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* **2002** Nov-Dec;23(6):1031-8.
50. Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci.* **1998** Jun 11;158(1):47-52.
51. Rogers JT, Randall JD, Cahill CM, Eder PS, Huang X, Gunshin H, et al. An iron-responsive element type II in the 5'-untranslated region of the

- Alzheimer's amyloid precursor protein transcript. *J Biol Chem.* **2002** Nov 22;277(47):45518-28.
52. Huang X, Moir RD, Tanzi RE, Bush AI, Rogers JT. Redox-active metals, oxidative stress, and Alzheimer's disease pathology. *Ann N Y Acad Sci.* **2004** Mar;1012:153-63.
53. Campbell BC, Li QX, Culvenor JG, Jakala P, Cappai R, Beyreuther K, et al. Accumulation of insoluble alpha-synuclein in dementia with Lewy bodies. *Neurobiol Dis.* **2000** Jun;7(3):192-200.
54. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science.* **1993** Oct 29;262(5134):689-95.
55. Barnham KJ, Bush AI. Metals in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Curr Opin Chem Biol.* **2008** Apr;12(2):222-8.
56. Dalvi L. Mecanismos de ação de antioxidantes de origem vegetal: estudo do polifenol ácido elágico e do extrato de caqui (*Diospyros kaki*). *Dissertação de Mestrado.* Brasília. Universidade de Brasília; **2008**.
57. Shriver, Atkins. In: *Química Inorgânica* 3^a ed. Porto Alegre: Bookman; **2003**.
58. Koppenol HW, Liebman JF. The oxidizing nature of hydroxyl radical - A comparison with the ferryl ion. *J Phys Chem.* **1984**;88:99-105.
59. Rush JD, Koppenol WH. Oxidizing intermediates in the reaction of ferrous EDTA with hydrogen peroxide. Reactions with organic molecules and ferrocyanochrome c. *J Biol Chem.* **1986** May 25;261(15):6730-3.
60. Halliwell B. Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovasc Res.* **2007** Jan 15;73(2):341-7.
61. Lattanzio V, Kroon PA, Quideau S, Treutter D. In: *Plant Phenolics - Secondary Metabolites with Diverse Functions. Recent Advances in Polyphenol Research.* 1st ed: Blackwell; **2008**.
62. McKay DL, Blumberg JB. The role of tea in human health: an update. *J Am Coll Nutr.* **2002** Feb;21(1):1-13.
63. Lodovici M, Guglielmi F, Meoni M, Dolara P. Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation in vitro. *Food Chem Toxicol.* **2001** Dec;39(12):1205-10.
64. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* **2004** May;79(5):727-47.
65. Chung KT, Wong TY, Wei CI, Huang YW, Lin Y. Tannins and human health: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **1998** Aug;38(6):421-64.
66. King A, Young G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J Am Diet Assoc.* **1999** Feb;99(2):213-8.
67. Kuppusamy UR, Das NP. Protective effects of tannic acid and related natural compounds on *Crotalus adamanteus* subcutaneous poisoning in mice. *Pharmacol Toxicol.* **1993** Apr-May;72(4-5):290-5.
68. Yugarani T, Tan BK, Das NP. The effects of tannic acid on serum lipid parameters and tissue lipid peroxides in the spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats. *Planta Med.* **1993** Feb;59(1):28-31.

69. Ong KC, Khoo HE, Das NP. Tannic acid inhibits insulin-stimulated lipogenesis in rat adipose tissue and insulin receptor function in vitro. *Experientia*. **1995** Jun 14;51(6):577-84.
70. Mukhtar H, Das M, Khan WA, Wang ZY, Bik DP, Bickers DR. Exceptional activity of tannic acid among naturally occurring plant phenols in protecting against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-, benzo(a)pyrene-, 3-methylcholanthrene-, and N-methyl-N-nitrosourea-induced skin tumorigenesis in mice. *Cancer Res*. **1988** May 1;48(9):2361-5.
71. Gali HU, Perchellet EM, Klish DS, Johnson JM, Perchellet JP. Hydrolyzable tannins: potent inhibitors of hydroperoxide production and tumor promotion in mouse skin treated with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in vivo. *Int J Cancer*. **1992** May 28;51(3):425-32.
72. Stocks P. Cancer mortality in relation to national consumption of cigarettes, solid fuel, tea and coffee. *Br J Cancer*. **1970** Jun;24(2):215-25.
73. Kono S, Ikeda M, Tokudome S, Kuratsune M. A case-control study of gastric cancer and diet in northern Kyushu, Japan. *Jpn J Cancer Res*. **1988** Oct;79(10):1067-74.
74. Andrade RG, Jr., Ginani JS, Lopes GK, Dutra F, Alonso A, Hermes-Lima M. Tannic acid inhibits in vitro iron-dependent free radical formation. *Biochimie*. **2006** Sep;88(9):1287-96.
75. Lopes GK, Schulman HM, Hermes-Lima M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochim Biophys Acta*. **1999** Oct 18;1472(1-2):142-52.
76. South PK, Miller DD. Iron binding by tannic acid: effect of selected ligands. *Food Chemistry*. **1998**;63:167-72.
77. Khan NS, Ahmad A, Hadi SM. Anti-oxidant, pro-oxidant properties of tannic acid and its binding to DNA. *Chem Biol Interact*. **2000** Mar 15;125(3):177-89.
78. Shi J, Yu J, Pohorly JE, Kakuda Y. Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality. *J Med Food*. **2003** Winter;6(4):291-9.
79. Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism *J Sci Food Agric*. **2000**;80:1033-43.
80. Ader P, Grenacher B, Langguth P, Scharrer E, Wolfram S. Cinnamate uptake by rat small intestine: transport kinetics and transepithelial transfer. *Exp Physiol*. **1996** Nov;81(6):943-55.
81. Olthof MR, Hollman PC, Katan MB. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr*. **2001** Jan;131(1):66-71.
82. Graefe EU, Wittig J, Mueller S, Riethling AK, Uehleke B, Drewelow B, et al. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol*. **2001** May;41(5):492-9.
83. Hollman PC, van Trijp JM, Buysman MN, van der Gaag MS, Mengelers MJ, de Vries JH, et al. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett*. **1997** Nov 24;418(1-2):152-6.

84. Manach C, Morand C, Crespy V, Demigne C, Texier O, Regerat F, et al. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett.* **1998** Apr 24;426(3):331-6.
85. Lee MJ, Wang ZY, Li H, Chen L, Sun Y, Gobbo S, et al. Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **1995** Jun;4(4):393-9.
86. Amorati R, Pedulli GF, Cabrini L, Zambonin L, Landi L. Solvent and pH effects on the antioxidant activity of caffeic and other phenolic acids. *J Agric Food Chem.* **2006** Apr 19;54(8):2932-7.
87. Gulcin I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology.* **2006** Jan 16;217(2-3):213-20.
88. Kono Y, Kobayashi K, Tagawa S, Adachi K, Ueda A, Sawa Y, et al. Antioxidant activity of polyphenolics in diets. Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochim Biophys Acta.* 1997 Jun 6;1335(3):335-42.
89. Nardini M, D'Aquino M, Tomassi G, Gentili V, Di Felice M, Scaccini C. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Free Radic Biol Med.* **1995** Nov;19(5):541-52.
90. Chen YF, Tsai HY, Wu TS. Anti-inflammatory and analgesic activities from roots of *Angelica pubescens*. *Planta Med.* **1995** Feb;61(1):2-8.
91. Yamada J, Tomita Y. Antimutagenic activity of caffeic acid and related compounds. *Biosci Biotechnol Biochem.* **1996** Feb;60(2):328-9.
92. Ani V, Varadaraj MC, Akhilender-Naidu K. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenolic compounds from bitter cummin (*Cuminum nigrum L.*). *Eur Food Res Technol.* **2006**;224:109-15.
93. Kang NJ, Lee KW, Shin BJ, Jung SK, Hwang MK, Bode AM, et al. Caffeic acid, a phenolic phytochemical in coffee, directly inhibits Fyn kinase activity and UVB-induced COX-2 expression. *Carcinogenesis.* **2009** Feb;30(2):321-30.
94. Hynes MJ, O'Coinceanainn M. The kinetics and mechanisms of reactions of iron(III) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin. *J Inorg Biochem.* **2004** Aug;98(8):1457-64.
95. Yamanaka N, Oda O, Nagao S. Prooxidant activity of caffeic acid, dietary non-flavonoid phenolic acid, on Cu²⁺-induced low density lipoprotein oxidation. *FEBS Lett.* **1997** Mar 24;405(2):186-90.
96. Sørensen A-DM, Haahr A-M, Becker EM, Skibsted LH, Bergenståhl B, Nilsson L, et al. Interactions between Iron, Phenolic Compounds, Emulsifiers, and pH in Omega-3-Enriched Oil-in-Water Emulsions. *J Agric Food Chem.* **2008**;56:1740-50.
97. Mauricio AQ. Estudo da atividade antioxidante do ácido caféico e da PIH: um polifenol natural e um quelante sintético. *Dissertação de Mestrado.* Brasília. Universidade de Brasília; **2006**.

98. Gutteridge JM. Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free-radical damage to amino acids and carbohydrates. *FEBS Lett.* **1981** Jun 15;128(2):343-6.
99. Cheeseman KH, Beavis A, Esterbauer H. Hydroxyl-radical-induced iron-catalysed degradation of 2-deoxyribose. Quantitative determination of malondialdehyde. *Biochem J.* **1988** Jun 15;252(3):649-53.
100. Gomes CS. Estudos da Ooxidação de Íons Ferro e Estanho na Produção de Radicais Livres: Efeitos de Antioxidantes. *Dissertação de Mestrado*. Brasília. Universidade de Brasília; **2005**.
101. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. In: *Analytical Chemistry - an Introduction*. 7th ed. USA; **2000**.
102. Azevedo MO, Felipe MSS, Brígido MM, Maranhão AQ, De-Souza MT. In: *Técnicas Básicas em Biologia Molecular*. 1^a ed. Brasília - Brasil: UnB; **2003**.
103. Hermes-Lima M, Nagy E, Ponka P, Schulman HM. The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) protects plasmid pUC-18 DNA against *OH-mediated strand breaks. *Free Radic Biol Med.* **1998** Nov 15;25(8):875-80.
104. Vugman NV, Herbst MH. In: *Fundamentos e Aplicações da Ressonância Magnética Nuclear. Introdução à Ressonância Paramagnética Eletrônica de Onda Contínua. Aplicações ao estudo de complexos de metais de transição*. 1^a ed. Rio de Janeiro: AUREMN; **2007**.
105. Weil JA, Bolton JR, Wertz JE. In: *Electron Paramagnetic Resonance, Elementary Theory and Practical Applications*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons; **2007**.
106. Davies MJ. In: *Biomedical Applications of Spectroscopy*. New York: John Wiley & Sons; 1996.
107. Barr D. A Step-by-step procedure for Spin-trapping the Hidroxyl Radical. *EPR Division of Bruker BioSpin Corp.* **1998**.
108. Clement JL, Ferre N, Siri D, Karoui H, Rockenbauer A, Tordo P. Assignment of the EPR spectrum of 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO) superoxide spin adduct. *J Org Chem.* **2005** Feb 18;70(4):1198-203.
109. Romette JL. Electrochemical Biosensors in Clinical Analysis. In: *Electrochemical Detection Techniques in the Applied Biosciences*. New York: John Wiley & Sons; **1988**. p. 110-1.
110. Hermes-Lima M, Goncalves MS, Andrade RG, Jr. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) prevents copper-mediated in vitro free radical formation. *Mol Cell Biochem.* **2001** Dec;228(1-2):73-82.
111. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* **1999** May;26(9-10):1231-7.
112. Schlesier K, Harwat M, Bohm V, Bitsch R. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radic Res.* **2002** Feb;36(2):177-87.
113. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem.* **2005** Mar 23;53(6):1841-56.

114. Stookey LL. Ferrozine - A New Spectrophotometric Reagent for Iron. *Anal Chem.* **1970**;42(7):779-81.
115. Harris DC. In: *Quantitative Chemical Analysis*. 2nd ed. Company WHFa, editor. New York: W. H. Freeman and Company; **1987**.
116. Ginani J. Estudo da ação antioxidante *in vitro* do polifenol ácido elágico. *Dissertação de Mestrado*. Brasília. Universidade de Brasília; **2005**.
117. Halliwell B, Gutteridge JM, Aruoma OI. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem.* **1987** Aug 15;165(1):215-9.
118. Aruoma OI, Grootveld M, Halliwell B. The role of iron in ascorbate-dependent deoxyribose degradation. Evidence consistent with site-specific hydroxyl radical generation caused by iron ions bound to the deoxyribose molecule. *Jour Inorg Biochem.* **1987**;29:289-99.
119. Welch KD, Davis TZ, Aust SD. Iron autoxidation and free radical generation: effects of buffers, ligands, and chelators. *Arch Biochem Biophys.* **2002** Jan 15;397(2):360-9.
120. Searle AJF, Tomasi A. Hydroxyl free radical production in iron-cysteine solutions and protection by zinc. *J Inorg Biochem.* **1982**;17(2):161-6.
121. Morgan B, Lahav O. The effect of pH on the kinetics of spontaneous Fe(II) oxidation by O₂ in aqueous solution--basic principles and a simple heuristic description. *Chemosphere.* **2007** Aug;68(11):2080-4.
122. Duesterberg CK, Mylon SE, Waite TD. pH effects on iron-catalyzed oxidation using Fenton's reagent. *Environ Sci Technol.* **2008** Nov 15;42(22):8522-7.
123. Chen F, Ma W, He J, Zhao J. Fenton degradation of malachite green catalyzed by aromatic additives. *J Phys Chem A.* **2002**;106:9485-90.
124. Hermes-Lima M, Wang EM, Schulman HM, Storey KB, Ponka P. Deoxyribose degradation catalyzed by Fe(III)-EDTA: kinetic aspects and potential usefulness for submicromolar iron measurements. *Mol Cell Biochem.* **1994** Aug 17;137(1):65-73.
125. Pardo-Andreu GL, Delgado R, Nunez-Selles AJ, Vercesi AE. Dual mechanism of mangiferin protection against iron-induced damage to 2-deoxyribose and ascorbate oxidation. *Pharmacol Res.* **2006** Mar;53(3):253-60.
126. Pardo-Andreu GL, Sanchez-Baldoquin C, Avila-Gonzalez R, Delgado R, Naal Z, Curti C. Fe(III) improves antioxidant and cytoprotecting activities of mangiferin. *Eur J Pharmacol.* **2006** Oct 10;547(1-3):31-6.
127. Garcia P, Romero C, Brenes M, Garrido A. Effect of metal cations on the chemical oxidation of olive o-diphenols in model systems. *Jour Agric Food Chem.* **1996**;44:2101-5.
128. Shindo H, Huang PM. Catalytic effects of Mn(IV), iron(III), aluminium, and silicon oxides on the formation of phenolic polymers. *Soil Sci Soc Am J.* **1984**;48:927-34.
129. Silva FA, Borges F, Guimaraes C, Lima JL, Matos C, Reis S. Phenolic acids and derivatives: studies on the relationship among structure, radical

scavenging activity, and physicochemical parameters. *J Agric Food Chem.* **2000** Jun;48(6):2122-6.

130. Hermes-Lima M, Ponka P, Schulman HM. The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) and its analogues prevent damage to 2-deoxyribose mediated by ferric iron plus ascorbate. *Biochim Biophys Acta.* **2000** Oct 18;1523(2-3):154-60.

131. Kunsági-Máté S, Stampel E, Kollár L, Pour-Nikfardjam MS. The effect of the oxidation state of iron ions on the competitive complexation of malvidin by caffeic or ellagic acid. *Food Research International.* **2008**;41:693-6.

132. Gu C, Karthikeyan KG, Sibley SD, Pedersen JA. Complexation of the antibiotic tetracycline with humic acid. *Chemosphere.* 2007 Jan;66(8):1494-501.

133. Khvan AM, Kristallovich EL, Abduazimov KA. Complexation of Caffeic and Ferulic Acids by transition-metal ions *Chemistry of Natural Compounds.* **2001**;37:72-5.

134. Russel JB. In: *Química Geral.* 2ª ed. São Paulo: Makron Books; **1994.**

135. Sungur S, Uzar A. Investigation of complexes tannic acid and myricetin with Fe(III). *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* **2008** Jan;69(1):225-9.

136. Cheng ZJ, Kuo SC, Chan SC, Ko FN, Teng CM. Antioxidant properties of butein isolated from *Dalbergia odorifera*. *Biochim Biophys Acta.* **1998** Jun 15;1392(2-3):291-9.

137. Bicalho JM. Estudo da Ação Antioxidante *in Vitro* dos Extratos Alcoólicos das Folhas e das Flores da Capuchinha (*Tropaeolum majus L.*). *Dissertação de Mestrado.* Brasília. Universidade de Brasília; **2008.**

138. Sangali A, Vieira MC, Zarate NAH. Resíduo Orgânico e Nitrogênio na Produção de Biomassa da Capuchinha (*Tropaeolum majus L.*). *Revista Ciência Agrotec.* **2004**;28:831-9.

139. Santo APE, Martins ISS, Tomy SC, Ferro VO. Efeito anticoagulante *in vitro* do extrato hidroetanólico da folhas e flores édulas de *Tropaeolum majus L.* (Tropaeolaceae) sobre o plasma humano. *Latin American Journal of Pharmacy.* **2007**;26(732-736).

140. Andrade-Jr RG. Mecanismos de Ação Antioxidante e Pró-oxidante do Polifenol Ácido Tânico na Presença de Íons Cobre. *Dissertação de Mestrado.* Brasília. Universidade de Brasília; **2004.**

141. Perez CA, Wei Y, Guo M. Iron-binding and anti-Fenton properties of baicalein and baicalin. *J Inorg Biochem.* **2009** Mar;103(3):326-32.

142. Below-Jr JF, Connick RE, Coppel CP. Kinetics of the Formation of the Ferric Thiocyanate Complex. *J Am Chem Soc.* **1958**;80:2961-7.

143. Afanas'eva IB, Ostrakhovitch EA, Mikhal'chik EV, Ibragimova GA, Korkina LG. Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. *Biochem Pharmacol.* **2001** Mar 15;61(6):677-84.

144. Mahal HS, Kapoor S, Satpati AK, Mukherjee T. Radical scavenging and catalytic activity of metal-phenolic complexes. *J Phys Chem B.* **2005** Dec 22;109(50):24197-202.

145. Lapenna D, Ciofani G, Festi D, Neri M, Pierdomenico SD, Giamberardino MA, et al. Antioxidant properties of ursodeoxycholic acid. *Biochem Pharmacol.* **2002** Dec 1;64(11):1661-7.
146. Moon J-H, Terao J. Antioxidant Activity of Caffeic Acid and Dihydrocaffeic Acid in Lard and Human Low-Density Lipoprotein. *J Agric Food Chem.* **1998**;46:5062-5.
147. Ignatowicz E, Balana B, Vulimiri SV, Szaefer H, Baer-Dubowska W. The effect of plant phenolics on the formation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-DNA adducts and TPA-stimulated polymorphonuclear neutrophils chemiluminescence in vitro. *Toxicology.* **2003** Aug 1;189(3):199-209.
148. Baer-Dubowska W, Szaefer H, Krajka-Kuzniak V. Inhibition of murine hepatic cytochrome P450 activities by natural and synthetic phenolic compounds. *Xenobiotica.* **1998** Aug;28(8):735-43.
149. Inoue S, Ito K, Yamamoto K, Kawanishi S. Caffeic acid causes metal-dependent damage to cellular and isolated DNA through H₂O₂ formation. *Carcinogenesis.* **1992** Sep;13(9):1497-502.
150. de Avellar IG, Magalhaes MM, Silva AB, Souza LL, Leitao AC, Hermes-Lima M. Reevaluating the role of 1,10-phenanthroline in oxidative reactions involving ferrous ions and DNA damage. *Biochim Biophys Acta.* **2004** Nov 18;1675(1-3):46-53.
151. Perron NR, Hodges JN, Jenkins M, Brumaghim JL. Predicting how polyphenol antioxidants prevent DNA damage by binding to iron. *Inorg Chem.* **2008** Jul 21;47(14):6153-61.
152. Reinke LA, Rau JM, McCay PB. Characteristics of an oxidant formed during iron (II) autoxidation. *Free Radic Biol Med.* **1994** Apr;16(4):485-92.
153. Kipton H, Powell J, Taylor MC. Interactions of iron(II) and iron(III) with gallic acid and its homologues: A potentiometric and spectrophotometric study. *Australian Journal of Chemistry.* **1982**;35:739-56.
154. Kawabata T, Schepkin V, Haramaki N, Phadke RS, Packer L. Iron coordination by catechol derivative antioxidants. *Biochem Pharmacol.* **1996** Jun 14;51(11):1569-77.
155. Hider RC, Liu ZD, Khodr HH. Metal chelation of polyphenols. *Methods Enzymol.* **2001**;335:190-203.
156. Ryan P, Hynes MJ. The kinetics and mechanisms of the complex formation and antioxidant behaviour of the polyphenols EGCg and ECG with iron(III). *J Inorg Biochem.* **2007** Apr;101(4):585-93.
157. Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem.* **2000** Aug;48(8):3396-402.
158. Santos NC, Castilho RF, Meinicke AR, Hermes-Lima M. The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone inhibits mitochondrial lipid peroxidation induced by Fe(II)-citrate. *Eur J Pharmacol.* **2001** Sep 28;428(1):37-44.

159. Andjelkovic M, Camp JV, Meulenaer BD, Depaemelaere G, Socaciu C, Verloo M, et al. Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chemistry*. **2006**;98:23-31.
160. Posner AM. The Kinetics of Autoxidation of Ferrous Ions in Concentrated HCl Solutions. *Transactions of Faraday Society*. **1953**;49:382-8.
161. Huffman RE, Davidson N. Kinetics of the ferrous iron-oxygen reaction in sulfuric acid solution. *Journal of the American Chemical Society*. **1956**;78:4836-42.
162. George P. The Oxidation of Ferrous Perchlorate by Molecular Oxygen. *Journal of the Chemical Society*. **1954**:4349-59.
163. Brissot P. Hemochromatosis at the intersection of classical medicine and molecular biology. *C R Acad Sci III*. **2001** Sep;324(9):795-804.
164. Brar S, Henderson D, Schenck J, Zimmerman EA. Iron accumulation in the substantia nigra of patients with Alzheimer disease and parkinsonism. *Arch Neurol*. **2009** Mar;66(3):371-4.
165. Smith MA, Harris PL, Sayre LM, Perry G. Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1997** Sep 2;94(18):9866-8.
166. Hagerman AE. *Tannin Handbook*. Disponível em <http://www.users.muohio.edu/hagermae/tanninpdf>.

ANEXO I

Reevaluation of the 2-Deoxyribose Assay for Determination of Metal-Mediated Free Radical Formation

Thiago C. Genaro-Mattos^{(1,2)*}, **Luana T. Dalvi**^{(1,3)*}, **Ricardo G. Oliveira**⁽¹⁾, **Janini S. Ginani**⁽¹⁾ and **Marcelo Hermes-Lima**⁽¹⁾.

1) Oxyradical Research Group, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 70910-900, Brazil;

2) Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 70910-900, Brazil;

3) Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 70910-900, Brazil;

***: Joint first authors.**

Corresponding author: Marcelo Hermes-Lima, PhD. **Address:** Departamento de Biologia Celular. Universidade de Brasília, Brasília, 70910-900, Brazil. **Tel:** +55 61 3307 2043; **E-mail:** m_hermes_lima@yahoo.com.br

Abstract

Background: The 2-deoxyribose (2-DR) degradation assay is a widely used test for determining anti/pro-oxidant properties of molecules and plant extracts. Most reports use reaction blanks omitting 2-DR or thiobarbituric acid (TBA). However, when studying Fe(II)-mediated reactions, we verified that these blanks are not appropriated. Fe(III) – a product of these reactions – causes a relevant artifact in the assay, where 2-DR is oxidized by Fe(III). **Method:** 2-DR degradation was determined at 532 nm as TBA-reactive substances. **Results and Conclusion:** HPLC determinations indicated that Fe(III) added after or before TBA generates considerable amounts of malonaldehyde (2-DR degradation product) in comparison with assays employing Fenton reagents or Fe(II) autoxidation. Addition of catalase and thiourea has no effect on Fe(III)-induced 2-DR degradation indicating lack of ROS involvement. This Fe(III)-mediated 2-DR damage is dependent on iron and 2-DR concentrations, but not on buffer composition or iron-chelators. Depending on the assay conditions Fe(III)-interference accounts for 20 to 90% of 2-DR degradation mediated by Fe(II). **Significance:** A new reaction blank is proposed herein – based on the use of Fe(III) - for the 2-DR assay. The lack of such correction has caused the underestimation of antioxidant capacity of various compounds in many previous studies in the last 2 decades.

Key-words: Fenton, Iron autoxidation, Hydroxyl radical, TBARs, 2-Deoxyribose

Introduction

The 2-deoxyribose (2-DR) degradation assay for determination of hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) or hydroxyl-like species (both called herein “OH-like species”) was developed in the 1980’s [1-8] and has become a very popular assay to analyze the pro- or antioxidant activities of pure compounds or plant extracts. One of the reasons for the popularity is because it is an inexpensive and simple assay, which leads to similar results as those using EPR methods. Several hundred studies have been published in the past two decades employing the 2-DR degradation assay for *in vitro* oxidative stress studies (see **Figure 1**), and some examples are given below.

The reaction of OH-like species with 2-DR leads to the formation of malonaldehyde, which is measured after its reaction with thiobarbituric acid (TBA) [4]. Malonaldehyde is also quantified, along other aldehydes, as TBA-reactive substances (TBARs) for lipid peroxidation studies – despite over 10 year of controversy whether the assay is valid or not [9]. The majority of 2-DR degradation assays use the metal-containing systems for the generation of OH-like species that are described in **Table 1** and shown in references [10] to [36].

A problem with these studies is how to make a blank reaction, to discount 2-DR degradation during the analytical part of the assay. After addition of TBA and an acid (usually HCl, phosphoric acid and trichloroacetic acid) the incubating medium is boiled (from 5 to 60 min) to allow the reaction between TBA and malonaldehyde, followed by determination at 532 nm. What is often reported in the literature is the use of blanks without 2-DR or without TBA, so the absorbance of the studied compounds is discounted. However this procedure does not solve the problem of 2-DR degradation during the boiling phase of the assay.

We have made an adaptation several years ago of the 2-DR assay in order to discount 2-DR degradation during the boiling phase of the method. We used a blank called “zero time incubation”, where ascorbate (used to start free radical formation from oxygen plus Fe(III) or Cu(II)) is included in the reacting media after the addition of TBA [18]. Relevant differences in 2-DR degradation were noticed when discounting 2-DR degradation from “time zero incubation” to the “true reaction” (suppose 10-30 min incubation). The use of this reaction blank – explained in detail by Hermes-Lima et al. (2000) [19] - was employed in all other publications from our laboratory [19, 25, 28, 33] and from others [20, 21, 26].

On the other hand, no attempts have been made to adjust the 2-DR degradation assay for the caveats mentioned above when employing Fe(II) autoxidation or Fenton reagents to generate OH-like species. Preliminary observations from our group suggested that Fe(III), a product of these reactions, is able to induce 2-DR degradation [37]. Therefore, how much of 2-DR degradation is promoted by OH-like species (during either the “true” incubation period or the boiling phase of assay) or by the metal itself? In this study we observed that metal-interference is of major significance.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents and solutions

Ascorbic acid, catalase (bovine liver), caffeic acid, 2-deoxyribose (2-DR), desferrioxamine, ellagic acid, EDTA, ferrozine, potassium phosphate, tannic acid (penta-m-digalloyl-glucose), and thiobarbituric acid (TBA) were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Ferric chloride and ferrous ammonium sulfate were from Merck. Other reagents were of analytical grade. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) was donated

from Dr. Prem Ponka, Lady Davies Institute for Medical Research, Montreal.

Stock solutions of ascorbate, ferrozine, 2-DR, and phosphate buffer (pH 7.2) were prepared weekly in Milli-Q water. Stock solutions of EDTA were prepared in Milli-Q water with the addition of KOH to help solubilization. Stock solutions of metal chelators (as 0.5 mM) and Fe(II) (as 0.5 mM) were freshly prepared in Milli-Q water. Fe(III) 0.5 mM was freshly prepared in 10 mM HCl. Details for the preparation of stock solutions of ellagic acid is described by Andrade Jr. et al. [33]. Details for the preparation of stock solutions of PIH are described by Hermes-Lima et al. [32]. TBA stock solutions (1% w/v) were prepared daily in 50 mM NaOH. Aqueous persimmon extracts were prepared as described by Dalvi [38].

2.2. The 2-deoxyribose degradation assay

The method is based on the determination of MDA [8], a degradation product of 2-DR, by measurement of the condensation product with TBA. Typical reactions were started by the addition of either Fe(II) or Fe(III) to solutions (0.5 mL final volume) containing 5 mM 2-DR, 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) and H₂O₂ (peroxide was omitted in the Fe(II) autoxidation assays). Reactions were carried out for 10 min at room temperature (24-25°C) and stopped by the addition of 0.5 mL 4% phosphoric acid followed by the addition of 0.5 mL TBA solution. After boiling for 15 min, solutions were allowed to cool to room temperature, and the absorbance was measured at 532 nm [10,16]. In experiments using catalase, the enzyme was added to reaction media before the inclusion of iron.

In certain reactions, Fe(II) or Fe(III) ions were included (as a 0.05 mL addition) right after the inclusion of TBA. These reactions were called “iron added after TBA”, and were used to determine the effect of the metal itself on the 2-DR degradation.

TBA-reactive substances (TBARS) were expressed in either as A_{532} or as nmol/mL using the extinction coefficient of $153 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.3 HPLC analysis

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) experiments to detect MDA-TBA₂ were performed in the same conditions as the 2-DR degradation assay (**section 2.2**). This HPLC method was adapted from Candan and Tuzmen [39]. The mobile phase contained methanol:phosphate (60/40% v/v); final phosphate concentration was 50 mM, pH 6.8.

Determinations were made in a Class-VP HPLC system (Shimadzu Co.) equipped with auto injector (SIL-10AD VP, Shimadzu Co.), pump (LC-10AD VP, Shimadzu Co.), column oven (CTO-10AS VP, Shimadzu Co.) and fluorescence detector (RF-551, Shimadzu Co.). A Shim-pack CLC-ODS (M) column (Shimadzu C18 4.6 mm x 25 cm) was used for the separations. The flow was adjusted to 0.6 mL/min and 20 μL was selected as the injection volume. Maximum pressure was 250 Kg/cm^2 . The fluorescence detector wavelengths were set to 532 nm (excitation) and 553 nm (emission).

3. Results and Discussion

3.1. Fe(II) autoxidation and 2-DR degradation

Degradation of 2-DR (5 mM) after 10 min incubation with either Fe(II) or Fe(III) (at 50 μM) in phosphate-buffered media (pH 7.2) yielded average A_{532} values of 0.31 (*assay A1*; **Table 2**) and 0.08 (*assay A2*; values ranged from 0.07 to 0.12 A_{532}), respectively. It is well known that Fe(II) in aerated solutions undergo autoxidation and

formation of OH-like species and ferric ions, causing hydroxylation of spin traps in EPR studies [40-41], salicylate hydroxylation [42], plasmid DNA damage [43], lipid peroxidation [44] and 2-DR degradation [3, 28]. Within 1-2 min of incubation almost all Fe(II) is converted into Fe(III) when phosphate concentration is 10 mM [43, 45]. Thus, it became stimulating to investigate whether Fe(III) causes 2-DR degradation and malonaldehyde formation.

Addition of Fe(II) after the inclusion of TBA (see *assay A3*) yielded an average A_{532} value that is ~90% smaller than the observed in the regular Fe(II) autoxidation reaction in phosphate-buffered media (**Table 2**, see *assay A1*). On the other hand, addition of Fe(III) after TBA (*assay A4*) yielded an A_{532} essentially the same as in *assay A2* (Fe(III) added at the onset of the assay). This observation strongly suggests that Fe(III) is oxidizing 2-DR without the participation of reactive oxygen species (ROS). In the condition of *assay A2* (in the absence of any reducing agent) ferric ions should not be converted to Fe(II) - which could undergo autoxidation and ROS formation before reacting with 2-DR. Such oxidation of 2-DR by Fe(III) – called herein “Fe(III)-interference” – is a significant portion of the yield of 2-DR degradation in the Fe(II) autoxidation assay (ranging 30-40%).

The degradation of 2-DR during incubation of 50 μ M Fe(II), in the presence of Fe(III) (50 μ M), was also investigated (*assay A5*). This was examined because the rate of Fe(II) aerobic oxidation increases significantly when Fe(III) is added to the media [42, 46-47]. The yield of 2-DR degradation in *assay A5* was the same as the sum of “Fe(II) alone” plus “Fe(III) alone” (**Table 2**). Therefore, Fe(III) had no catalytic effect on 2-DR damage induced by Fe(II) autoxidation. On the other hand, the autoxidation of 100 μ M Fe(II), with no addition of Fe(III), produced a yield of 2-DR degradation (*assay*

A6) significantly higher than in *assay A5*. These results further corroborate the proposal of a “Fe(III)-interference” in the 2-DR assay.

It is also observed that catalase addition to the incubation media promoted a 60% decrease in 2-DR damage caused by Fe(II) autoxidation (*assay A8*) and had no effect on Fe(III)-induced 2-DR degradation (*assay A9*; **Table 2**). Interestingly, the yield of 2-DR degradation in *assay A8* was quite similar to *assay A2*, indicating once more that a relevant portion of 2-DR degradation during Fe(II) autoxidation is caused by Fe(III)-interference. In addition, the free radical scavenger thiourea (100 mM) was also able to inhibit 2-DR degradation in the conditions of *assay A1* (75% inhibition), but not in *assay A2* (**Table 2**).

These experiments, overall, indicate that H₂O₂ and other ROS formed during ferrous ions autoxidation, are not involved in the mechanism of Fe(III)-mediated 2-DR damage. Moreover, the reaction of Fe(III) with 2-DR seems to take place in the analytical part of the method - after addition of TBA. This conclusion is based on the fact that A₅₃₂ are the same for *assays A2* and *A4* (**Table 2**), employing 50 μM iron, and also at other iron concentrations (see Section 3.2).

In agreement with our proposal that “Fe(III) alone” does not induce 2-DR damage by means of ROS formation, Urbański and Beręsewicz [42] found no salicylate hydroxylation by Fe(III) (10 or 20 μM) in phosphate-containing media. On the other hand, salicylate hydroxylation is dependent on Fe(II) concentration and inhibited by catalase and by the absence of oxygen in the assay media [42].

3.2. Fe(II) autoxidation: the effect of iron concentration (*assays AF*)

In order to further analyze the Fe(III)-interference on the 2-DR degradation induced by Fe(II) autoxidation (in phosphate-buffered media), the effect of Fe(II)

concentration was studied. For each concentration of Fe(II) tested, we compared the effect of “Fe(III) alone”. **Figure 2A** shows that increasing Fe(II) concentration from 10 to 400 μM causes a significant augment in 2-DR degradation (*assays AF1*). The same was noticed when increasing Fe(III) concentration (iron added after TBA: *assays AF4*). There was no significant difference in A_{532} when comparing results of *assays AF4* with those using Fe(III) added at the onset of incubation (*assays AF2*).

It is noted that when increasing Fe(II) concentration there is a decrease in the percentage of Fe(III)-interference in the yield of 2-DR degradation. In the presence of 10 μM iron the Fe(III)-interference was ~50% of the recorded A_{532} (**Figure 2B**). The interference decreased to 30-35% when iron ions are at 200-400 μM . Thus, the higher the iron concentration in the reaction media, the smaller the Fe(III)-interference in the assay. In consequence, as Fe(II) levels are increased in the media higher yields of ROS-mediated 2-DR damage are observed. This is of particular interest for many studies, since iron concentrations in most *in vitro* experiments range 5 to 50 μM – levels where Fe(III)-interference is of major significance.

Another relevant observation is that low levels of 2-DR damage are observed when Fe(II) is added after TBA (*assays AF3*). Average A_{532} values increased from 0.025 to 0.040, from 10 to 400 μM iron, respectively (**Figure 2A**; see also *assay A3* on **Table 2**). This can be explained because (i) possibly only a fraction of Fe(II) is converted into ferric ions before reaction with 2-DR (and thus the resulting Fe(III) would react with 2-DR at the boiling phase of the assay) and/or (ii) only a minor amount of OH-like species may be formed (from Fe(II) autoxidation) during the boiling phase of the assay. It is relevant to mention that at boiling-water temperatures nearly all dissolved oxygen is lost to the atmosphere, thus limiting the aerobic oxidation of Fe(II) to Fe(III). Moreover, in the boiling phase of the assay, the very acidic conditions (pH

1.3) will avoid Fe(II) binding to phosphate buffer (since all phosphate will be in the form of phosphoric acid), which is a very important step for Fe(II) autoxidation [40,45].

3.3. Fenton and 2-DR degradation: effect of iron concentration (*assays FF*)

As in the case of the Fe(II) autoxidation reaction, the formation of Fe(III) as a product of the Fenton reaction could be affecting the actual yield of 2-DR damage caused by OH-like species. **Figure 3A** shows that when increasing Fe(II) concentration, from 10 to 400 μM , in the presence of 500 μM H_2O_2 , there is a progressive rise in 2-DR degradation (*assays FF1*).

2-DR damage induced by Fe(III) plus H_2O_2 (*assays FF2* – iron starting the reaction) produced values that are considerably smaller than *FF1 assays* in any iron concentration. When iron (either Fe(II) or Fe(III)) is added after TBA (*assays FF3* and *FF4*), A_{532} values in all iron concentrations were essentially the same as those in *assays FF2 (Figure 3A)*.

As in the case of *AF assays (Figure 2)*, the increase in iron concentration in the reaction media – containing Fenton reagents (H_2O_2 at 0.5 mM) - causes a progressive decrease in the percent of Fe(III)-interference in 2-DR degradation (**Figure 3B**). It is noteworthy that iron-interferences higher than 90% are recorded at 10 to 20 μM Fe(II). This is also observed when employing 0.1 mM H_2O_2 (data not shown). These results are quite relevant for *in vitro* experiments employing Fenton reactions, where iron levels are usually below 20-30 μM .

The comparison of 2-DR damage obtained in *assays FF4* (Fe(III) after TBA; in the presence of 0.5 mM H_2O_2) and *assays AF4* (Fe(III) after TBA; without H_2O_2) shows quite relevant differences in A_{532} values at low iron concentrations (10 to 75 μM). 2-DR degradation was 1.8-fold higher in media containing 50 μM Fe(III) plus H_2O_2 when

compared with Fe(III) alone (**Figure 4**). These results suggest that H₂O₂ have an important effect on the Fe(III)-interference. Therefore it is important to study the effect of varying the concentration of H₂O₂ on iron-interference reactions.

3.4. Fenton: The effect of different H₂O₂ concentrations (*assays FH*)

The increase in H₂O₂ concentration in the media caused an augment in 2-DR degradation through Fenton reagents (Fe(II) at 50 μM): from ~0.20 A₅₃₂ in the absence of H₂O₂ to ~0.35 A₅₃₂ at 1 mM H₂O₂ (*assays FH1*). Observe that at 0.1 mM H₂O₂ the yield of 2-DR damage reached near-saturation (**Figure 5**). When employing Fe(III) (added at the onset of the assay - *assays FH2*), the rise in A₅₃₂ values, in the same range of H₂O₂ concentrations (zero to 1 mM), was from 0.10 to 0.18.

The results from *assays FH2* were essentially the same as those using Fe(III) added after TBA (*assays FH4*). As in the case of the dependence of Fe(III) concentration (see Fig. 3A), the 2-DR degradation caused by “Fenton-Fe(III)” in all H₂O₂ concentrations (*assays FH2*) was mostly due to the reaction of Fe(III) with 2-DR.

When determining 2-DR damage in the absence of iron (media containing only contaminating iron; see [18]), the increase in H₂O₂ levels from zero to 0.5 mM produced an increase in A₅₃₂ (coined herein “delta-A₅₃₂”) of approximately 0.03. Delta-A₅₃₂ was also 0.03 when 2-DR damage was caused by increasing H₂O₂ levels (from zero to 0.5 mM) in the presence of 50 μM Fe(III) (**Table 3**). These results indicate that H₂O₂ itself has almost no effect on 2-DR degradation.

Therefore, at this point, the experiments of *Fe(III)-interference* were carried out without H₂O₂ addition, either for Fe(II) autoxidation or Fenton reactions.

3.5. The effect of 2-DR concentration

The effect of 2-DR concentration was also studied on the Fenton-induced 2-DR degradation reaction (**Figure 6A**). It is observed that augmenting 2-DR concentration – from 5 to 30 mM - there is an increase in A_{532} when employing Fenton reagents. However, when using Fe(III) (reactions without H_2O_2), there is a growing *Fe(III)-interference*: from 39% at 5 mM 2-DR to 57% at 30 mM 2-DR (**Figure 6B**). Special attention must be given to this experiment because the assay of varying 2-DR concentration is used to analyze the mechanism of antioxidant action of several molecules (see [10], [19] and [28]).

The effect of 2-DR concentration on the 2-DR degradation reaction induced by Fe(II) autoxidation was also analyzed. The Fe(III)-interference increased from 49 to 72%, from 5 to 30 mM 2-DR, respectively (**Figure 6B**).

It is not surprising that when augmenting 2-DR concentration in the media (with a fixed Fe(III) concentration) there is an increase in the yield of the reaction between Fe(III) and 2-DR. This argues for a bimolecular nature of the interaction between Fe(III) and 2-DR.

3.6. Fe(III)-interference versus the effect of iron chelators or a fruit extract

We also analyzed whether or not the presence of antioxidants in the reaction media would alter Fe(III)-interference on the Fenton-mediated 2-DR damage. **Figure 7** shows the antioxidant effect of tannic acid on 2-DR degradation induced by Fenton reagents or by Fe(II) autoxidation. When Fe(III) is used in the assay, it does not change the A_{532} values in assays containing several concentrations of tannic acid (3 to 50 μ M), as well as in the absence of tannic acid.

Similar results were observed when testing, PIH, DFO, caffeic acid, ellagic acid and persimmon aqueous extracts (see **Table 4**). These results (and those using catalase and thiourea – Table 2) indicate that the presence of antioxidants (radical scavengers or metal chelators) or a fruit extract (with antioxidant activity [48]) do not alter the action of Fe(III) in promoting oxidation and degradation of 2-DR.

3.7. Fe(III)-interference *versus* the effect of buffers

The effect of buffer (phosphate, Mops, Tris and HEPES) concentration on the Fe(III)-interference is observed in **Table 5**. Only in the presence of phosphate buffer the Fe(II) autoxidation reaction promoted relevant yields of 2-DR degradation – i.e., higher than the Fe(III)-interference. In the case of other buffers (Hepes, TRIS and MOPS), 2-DR damage induced by Fe(III) produced higher A_{532} values than Fe(II) autoxidation assays. This is explained by the low rates of Fe(II) oxidation to Fe(III) in Hepes, Tris or MOPS (either in the 10 min incubation period or in the boiling phase of the assay). In consequence, under these conditions, little Fe(III) is formed in media containing Fe(II), 2-DR and any of these buffers (Hepes, Tris or MOPS). Thus, *Fe(III)-interference* is not an issue in these cases.

In the case of the Fenton reaction, 2-DR damage was more pronounced in the presence of Hepes and MOPS buffer (both at 10 mM) than in phosphate buffer. Moreover, 2-DR damage was inhibited in 40 mM Hepes (in comparison with 10 mM Hepes), possibly by an antioxidant effect of the buffer itself.

Aust et al. [47] demonstrated that iron has low affinity for Hepes or MOPS buffer and high affinity for phosphate buffer. Thus, Fe(II) autoxidation in media containing Hepes and MOPS is quite slow. In phosphate-buffered media Fe(II) oxidation by oxygen ($k = 5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) is faster than by H_2O_2 ($k = 55 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), which

leads to lower yields of $\cdot\text{OH}$ production and, consequently, to less 2-DR damage. These facts explain the smaller levels of 2-DR damage induced by Fe(II)-autoxidation (in Hepes and MOPS) than by Fenton reagents in media containing these buffers. The low yield of 2-DR damage in the Fenton reaction carried out in Tris buffer (when compared to phosphate buffer) is yet to be understood.

It can also be verified in **Table 5** that Fe(III) reaction with 2-DR was unaffected by buffer type or concentration. However Fe(III)-interference should be an issue to be considered when Fenton reaction is carried out in solutions containing any of these buffers because Fe(III) is a reaction product in all cases. Moreover, the percent of 2-DR damage due to Fe(III)-interference ranged from low values in MOPS buffer (10-11%) to very significant ones in Tris buffer (48-67%) (**Table 5**). This should become a relevant caveat – if not properly discounted - when analyzing the effect of antioxidant substances in the 2-DR degradation induced by Fe(II) plus H_2O_2 .

3.8. HPLC experiments

HPLC experiments were performed in order to confirm that Fe(III) reacts with 2-DR to form MDA. **Figure 8a** shows the chromatogram of the standard, which is the adduct MDA-TBA₂ performed by the direct reaction of TBA with MDA. The retention time for the standard was the same as the observed for the reaction product between 2-DR and Fenton reagents (**Fig 8b**) and between Fe(III) and 2-DR (**Fig 8c**). Interestingly, HPLC determinations showed that Fe(III)-interference (with 50 μM iron) accounts for 26% of the total Fenton-induced 2-DR damage, which is nearly the same to spectrophotometric observations, where Fe(III)-interference accounts for 28%. These data further indicate that Fe(III) generates considerable amounts of MDA when reacting with 2-DR.

4. Conclusions

The *Fe(III)-interference* is a serious caveat in the 2-DR assay when analyzing the formation of OH-like species via Fe(II) autoxidation (reactions 1 to 3 on **Scheme 1**) or Fenton reagents (reactions 2 and 3). Many 2-DR degradation studies in the literature employ Fe(II) levels between 5 and 200 μM . Therefore a relevant portion of the 2-DR degradation yield in these studies (20 to 90%) is not related to hydroxyl radicals or OH-like species, but to the interaction of Fe(III) – a product of reactions – into 2-DR (reactions 4 and 5 on **Scheme 1**). Moreover, *Fe(III)-interference* is affected by 2-DR concentration and iron concentration, but not by the presence of antioxidants, iron chelators, or buffer composition.

We propose that new studies employing the 2-DR assay (with Fenton or Fe(II) autoxidation reactions) should use “Fe(III) alone” as a blank to discount for Fe(III)-interference, which is in fact a relevant experimental artifact. In the case of studies employing Fe(III) (or Cu(II)) and ascorbate (or other reducing agent), with or without H_2O_2 in the media, we propose the use of “time zero reaction” (ascorbate added after TBA as a blank), as previously described by Hermes-Lima et al. [19]. In the case of experiments employing ascorbate (0.5 mM) and Fe(III) (50 μM , in the presence of a chelator, such as EDTA or citrate), 2-DR damage – after 30 min incubation - reaches an average A_{532} value of 0.070. The “time zero reaction” in these experiments accounts for 10-30% of the sugar degradation (data not shown).

Many studies analyzing the antioxidant action of pure compounds or plant extracts have probably underestimated the I_{50} values for these compounds or extracts. For example, in the study of the antioxidant action tannic acid on 2-DR degradation via Fenton reactants, Lopes et al. [10] reported that the polyphenol (at 10 μM) inhibited 2-

DR damage by 38% when Fenton reagents were both 100 μM . However, when making a correction for the Fe(III)-interference, the actual blockage of 2-DR damage through antioxidant action would have been approximately 50% (see Section 3.6 for more details on antioxidants). The inhibitory effect of tannic acid (10 μM) on 2-DR degradation through 50 μM Fe(II) autoxidation was also underestimated in a recent report [28]: from 17% protection of 2-DR damage to an actual 26-27% protection after correction for Fe(III)-interference. Other studies employing PIH as an antioxidant against 2-DR damage (for example, induced by 100 μM Fe(II) plus 100 μM H_2O_2), also reported underestimated inhibitory values: from 43% inhibition of 2-DR damage at 100 μM PIH [11] to an actual 60% inhibition after proper correction. The 65% protection of 2-DR degradation (caused by 30 μM Fe(II) plus 100 μM H_2O_2) by 250-700 μM *ortho*-phenanthroline reported by De Avellar et al. [16], after correction for Fe(III)-interference, would have been about 80%.

In addition, when testing the antioxidant effect of nasturtium leaf extracts (*Tropaeolum majus* L.) against Fenton-induced 2-DR damage the uncorrected I_{50} value was 80 ng/mL. When the Fe(III)-interference was discounted, in a new series of determination, the I_{50} value for nasturtium leaf extracts dropped by exactly 50% (J. M. Bicalho and M. Hermes-Lima, unpublished data).

On the other hand, Morelli and coworkers [15] reported overestimated A_{532} values for varying 2-DR concentrations (from 0.05 to 0.8 mM) versus 2-DR damage via Fenton reagents. The increase in 2-DR levels in the assay only makes the Fe(III)-interference more pronounced (see Fig. 6). In the case of Fe(II) autoxidation (29 μM iron), the classical 1980s study of Gutteridge [3] has also overestimated A_{532} values when studying the effect of 2-DR concentration (from 3 to 30 mM): values of 2-DR damage (at 30 mM 2-DR) caused by ROS should have been 45-55% smaller. In

conclusion, studies employing Fenton reagents or Fe(II) autoxidation reaction for 2-DR damage should be corrected for the artifact of Fe(III)-interference (it is out of the scope of this paper go list all these studies). Furthermore, the classical calculations of rate constants for the reaction of $\cdot\text{OH}$ with antioxidants (employing the 2-DR assay and Fenton reagents; see page 366 on Ref. [5]) should be reexamined.

Formation of ROS in aerated media containing Fe(III) can only take place in the presence of reducing agents (such as ascorbate; see: refs. 18 and 19), which is not the case of phosphate buffer or 2-DR. Ferric ions are more likely to form Fe(III)-(OH)₃ in phosphate-buffered solutions in near-neutral pHs [49,50], as well as ferric complexes with phosphate and 2-DR [4, 37, 47, 49, 51]. During the boiling phase of the method (at pH 1.3), Fe(III) reacts with 2-DR producing malonaldehyde (reactions 4 and 5). Of course, after Fe(III) reaction with 2-DR, a significant yield of Fe(II) should be formed (reaction 4). Indeed, addition of 1 mM of ferrozine (a Fe(II) indicator [10]) after inclusion of 2-DR, Fe(III) and TBA (followed by 15 min boiling), produced significant yields of the purple Fe(II)-ferrozine complex (R. Oliveira and M. Hermes-Lima, unpublished).

An important evidence that the Fe(III)-interference takes place at the boiling phase of the assay is the fact that MDA formation from 2-DR and Fe(III) (50 μM) is increased as the boiling period (following 10 min of incubation at 25°C) is augmented. Recorded A_{532} values at 5, 10, 15, 30 and 60 min of boiling were 0.083 ± 0.011 , 0.095 ± 0.003 , 0.107 ± 0.003 , 0.126 ± 0.010 and 0.170 ± 0.016 , respectively (n=6; data not shown). On the other hand, when incubation time at room temperature is increased from 10 to 60 min, there is no difference in the yield of MDA production from 2-DR and Fe(III) (data not shown).

The results also indicated that 2-DR damage induced by the so-called “Fenton-Fe(III)” was nearly 100% caused by the reaction of Fe(III) with 2-DR (see **Table 2**) and not due to OH-like formation. Oxyradical formation from Fenton-Fe(III) is supposed to happen via Fe(III) reduction by H₂O₂, which may produce Fe(II) for a second round of reaction with remaining H₂O₂ [52,53]. Plasmid DNA damage has been shown to occur by Fenton-Fe(III) reactions; no plasmid damage was observed with Fe(III) or H₂O₂ alone [54]. However, our study showed that the 2-DR assay has severe limitations for the study of Fenton-Fe(III) reactions.

The mechanism of 2-DR degradation (reactions 4 and 5) via the “Fe(III)-interference pathway” is yet to be studied and is out of the scope of this work. However, it could be similar to the reaction of hydroxyl radicals with 2-DR, which supposedly involves H[•] abstraction from carbon C4 of the carbohydrate [8]. Cheeseman et al. [8] also proposed that iron ions could catalyze the breakdown of a malonaldehyde precursor, possibly a 2-DR-hydroperoxide. However, the possible direct action of Fe(III) for the initiation of 2-DR breakdown was not envisaged by these authors.

Finally, we conclude that the 2-DR assay is still a valid, simple and non-expensive *in vitro* tool for the determination of OH-like species and the effect of antioxidants and/or pro-oxidants. However, extra care should be taken when designing experimental blanks to account for the Fe(III)-interference artifact.

4.1 Using the Fe(III)-interference as an assay’s blank

In order to circumvent the serious caveat that Fe(III)-interference causes to the 2-DR method, we propose herein a new assay’s blank. When studying 2-DR oxidation by Fe(II) autoxidation, just make a parallel experiment in the same experimental conditions, except that Fe(II) is replaced by Fe(III). The A₅₃₂ values obtained in the

Fe(II)-containing assays should be subtracted by the ones obtained with Fe(III). When studying the effect of Fe(II) plus an oxidant (such as H₂O₂), just replace Fe(II) for the same amount of Fe(III).

5. Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Sandra Arruda (Universidade de Brasília (UnB)), Fernanda Ribeiro Rosa (UnB) for the help with the HPLC experiments and Rafaella Franco (UnB) for the technical support. Thiago C. Genaro-Mattos and Janini S. Ginani were recipients of studentships from CNPq (Brazil). Luana T. Dalvi was recipient of a studentship from CAPES (Brazil). This research was supported by grants from CNPq and Milênio-CNPq (Brazil).

6. References

- [1] J.M. Gutteridge, Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free-radical damage to amino acids and carbohydrates. *FEBS Lett.* 128 (1981) 343-346.
- [2] J.M. Gutteridge, Superoxide dismutase inhibits the superoxide-driven Fenton reaction at two different levels. Implications for a wider protective role. *FEBS Lett.* 185 (1985) 19-23.
- [3] J.M. Gutteridge, Ferrous-salt-promoted damage to deoxyribose and benzoate. The increased effectiveness of hydroxyl-radical scavengers in the presence of EDTA. *Biochem J.* 243 (1987) 709-714.
- [4] J.M. Gutteridge, B. Halliwell, The deoxyribose assay: an assay both for 'free' hydroxyl radical and for site-specific hydroxyl radical production. *Biochem J.* 253 (1988) 932-933.

- [5] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, In: Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd edition, Oxford University Press, Oxford, 1999.
- [6] J.M. Gutteridge, D. Toeg, Iron-dependent free radical damage to DNA and deoxyribose. Separation of TBA-reactive intermediates. *Int J Biochem.* 14 (1982) 891-893.
- [7] B. Halliwell, J.M. Gutteridge, O.I. Aruoma, The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem.* 165 (1987) 215-219.
- [8] K.H. Cheeseman, A. Beavis, H. Esterbauer, Hydroxyl-radical-induced iron-catalysed degradation of 2-deoxyribose, *Biochem. J.* 252 (1988) 649-653.
- [9] M. Hermes-Lima, Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. In: Functional Metabolism: Regulation and Adaptation. Edited by K.B. Storey. Wiley-Liss, Hoboken, New Jersey, 2004.
- [10] G.K Lopes, H.M Schulman, M. Hermes-Lima, Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochim Biophys Acta.* 1472 (1999) 142-152.
- [11] M. Hermes-Lima, N.C. Santos, J. Yan, M. Andrews, H.M. Schulman, P. Ponka, EPR spin trapping and 2-deoxyribose degradation studies of the effect of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) on $\cdot\text{OH}$ formation by the Fenton reaction. *Biochim Biophys Acta.* 1426 (1999) 475-482.
- [12] J. Glebska, L. Pulaski, K. Gwozdziński, J. Skolimowski, Structure-activity relationship studies of protective function of nitroxides in Fenton system. *Biometals.* 14 (2001) 159-170.

- [13] H.C. Goel, I. Prem Kumar, S.V. Rana, Free radical scavenging and metal chelation by *Tinospora cordifolia*, a possible role in radioprotection. *Indian J Exp Biol.* 40 (2002) 727-734.
- [14] Z. Cheng, Y. Li, W. Chang, Kinetic deoxyribose degradation assay and its application in assessing the antioxidant activities of phenolic compounds in a Fenton-type reaction system. *Anal Chim Acta.* 478 (2003) 129-137.
- [15] R. Morelli, S. Russo-Volpe, N. Bruno, R. Lo Scalzo, Fenton-dependent damage to carbohydrates: free radical scavenging activity of some simple sugars. *J Agric Food Chem.* 51 (2003) 7418-7425.
- [16] I.G. De Avellar, M.M. Magalhaes, A.B. Silva, L.L. Souza, A.C. Leitao, M. Hermes-Lima, Reevaluating the role of 1,10-phenanthroline in oxidative reactions involving ferrous ions and DNA damage. *Biochim Biophys Acta.* 1675 (2004) 46-53.
- [17] M. Mozdzan, J. Szemraj, J. Rysz, D. Nowak, Antioxidant properties of carnosine re-evaluated with oxidizing systems involving iron and copper ions. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 96 (2005) 352-360.
- [18] M. Hermes-Lima, E.M. Wang, H.M. Schulman, K.B. Storey, P. Ponka, Deoxyribose degradation catalyzed by Fe(III)-EDTA: kinetic aspects and potential usefulness for submicromolar iron measurements. *Mol Cell Biochem.* 137 (1994) 65-73.
- [19] M. Hermes-Lima, P. Ponka, H.M. Schulman, 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.

- [20] H.M. Schulman, M. Hermes-Lima, E.M. Wang, P. Ponka, In vitro antioxidant properties of the iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and some of its analogs. *Redox Rep.* 1 (1995) 373–378.
- [21] E.G. Campos, M. Hermes-Lima, J.M. Smith, R.K. Prichard, Characterization of *Fasciola hepatica* cytochrome c peroxidase as an enzyme with potential antioxidant activity in vitro. *Int J Parasitol.* 29 (1999) 655-662.
- [22] C.L. Hsieh, G.C. Yen, Antioxidant actions of du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) toward oxidative damage in biomolecules. *Life Sci.* 66 (2000) 1387-1400.
- [23] D. Lapenna, G. Ciofani, D. Festi, M. Neri, S.D. Pierdomenico, M.A. Giamberardino, F. Cuccurullo, Antioxidant properties of ursodeoxycholic acid. *Biochem Pharmacol.* 64 (2002) 1661-1667.
- [24] H.J. Dorman, O. Bachmayer, M. Kosar, R. Hiltunen, Antioxidant properties of aqueous extracts from selected lamiaceae species grown in Turkey. *J Agric Food Chem.* 52 (2004) 762-770.
- [25] A.Q. Mauricio, G.K. Lopes, C.S. Gomes, R.G. Oliveira, A. Alonso, M. Hermes-Lima, Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone inhibits iron-induced ascorbate oxidation and ascorbyl radical formation. *Biochim Biophys Acta.* 1620 (2003) 15-24.
- [26] G.L. Pardo-Andreu, R. Delgado, A.J. Nunez-Selles, A.E. Vercesi, Dual mechanism of mangiferin protection against iron-induced damage to 2-deoxyribose and ascorbate oxidation. *Pharmacol Res.* 53 (2006a) 253-260
- [27] G.L. Pardo-Andreu, R. Delgado, A.J. Nunez-Selles, A.E. Vercesi, *Mangifera indica* L. extract (Vimang) inhibits 2-deoxyribose damage induced by Fe(III) plus ascorbate. *Phytother Res.* 20 (2006b) 120-124.

- [28] R.G. Andrade Jr, J.S. Ginani, G.K. Lopes, F. Dutra, A. Alonso, M. Hermes-Lima, Tannic acid inhibits in vitro iron-dependent free radical formation, *Biochimie*. 88 (2006) 1287-1296.
- [29] E. Joubert, P. Winterton, T.J. Britz, W.C Gelderblom, Antioxidant and pro-oxidant activities of aqueous extracts and crude polyphenolic fractions of rooibos (*Aspalathus linearis*). *J Agric Food Chem*. 53 (2005) 10260-10267.
- [30] A.Q. Maurício, 2006, Estudo da atividade antioxidante do ácido caféico e da PIH: um polifenol natural e um quelante sintético. MSc Thesis. University of Brasília, Brazil.
- [31] J.E. Biaglow, Y. Manevich, F. Uckun, K.D. Held, Quantitation of hydroxyl radicals produced by radiation and copper-linked oxidation of ascorbate by 2-deoxy-D-ribose method, *Free Radic Biol Med*. 22 (1997) 1129-1138.
- [32] M. Hermes-Lima, M.S. Gonçalves, R.G. Andrade Jr, Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) prevents copper-mediated in vitro free radical formation. *Mol Cell Biochem*. 228 (2001) 73-82.
- [33] R.G. Andrade Jr, L.T. Dalvi, J.M. Silva Jr, G.K. Lopes, A. Alonso, M. Hermes-Lima, The antioxidant effect of tannic acid on the in vitro copper-mediated formation of free radicals, *Arch Biochem Biophys*. 437 (2005) 1-9.
- [34] E. Pedreno, A.J. Lopez-Contreras, A. Cremades, R. Penafiel, Protecting or promoting effects of spermine on DNA strand breakage induced by iron or copper ions as a function of metal concentration. *J Inorg Biochem*. 99 (2005) 2074-2080.
- [35] J.C. Ball, A.M. Straccia, W.C. Young, A.E. Aust, The formation of reactive oxygen species catalyzed by neutral, aqueous extracts of NIST ambient

- particulate matter and diesel engine particles, *J Air Waste Manag Assoc.* 50 (2000) 1897-1903.
- [36] B. Tadolini, Oxygen toxicity. The influence of adenine-nucleotides and phosphate on Fe²⁺ autoxidation. *Free Radic Res Commun.* 5 (1989) 237-243.
- [37] J.S. Ginani, 2005. Estudo da ação antioxidante *in vitro* do polifenol ácido elágico. MSc Thesis. University of Brasília, Brazil.
- [38] L.T. Dalvi, 2008. Mecanismos de ação de antioxidantes de origem vegetal: estudo do polifenol ácido elágico e do extrato de caqui (*Diospyros kaki*). MSc Thesis. University of Brasília, Brazil.
- [39] N. Candan, N. Tuzmen, Very rapid quantification of malondialdehyde (MDA) in rat brain exposed to lead, aluminium, and phenolic antioxidants by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Neurotoxicology.* 29 (2008) 708-713.
- [40] L.A. Reinke, J.M. Rau, P.B. McCay, Characteristics of an oxidant formed during iron (II) autoxidation. *Free Radic Biol Med.* 16 (1994) 485-492.
- [41] S.Y. Qian, G.R. Buettner, Iron and dioxygen chemistry is an important route to initiation of biological free radical oxidations: an electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Free Radic Biol Med.* 26 (1999) 1447-1456.
- [42] N.K. Urbański, A. Beręsewicz, Generation of [•]OH initiated by interaction of Fe²⁺ and Cu⁺ with dioxygen; comparison with the Fenton chemistry. *Acta Biochim Pol.* 47 (2000) 951-962.
- [43] J. Flemmig, J. Arnhold, Ferrous ion-induced strand breaks in the DNA plasmid pBR322 are not mediated by hydrogen peroxide *Eur Biophys J.* 36 (2007) 377-384.

- [44] L. Tang, Y. Zhang, Z. Qian, X. Shen, The mechanism of Fe²⁺-initiated lipid peroxidation in liposomes: the dual function of ferrous ions, the roles of the pre-existing lipid peroxides and the lipid peroxy radical. *Biochem. J.* 352 (2000) 27-36.
- [45] C.S. Gomes. Estudos da oxidação de íons ferro e estanho na produção de radicais livres: efeitos de antioxidantes. MSc Thesis. University of Brasília, Brazil.
- [46] R.F. Castilho, A.R. Meinicke, A.E. Vercesi, M. Hermes-Lima, Role of Fe(III) in Fe(II)citrate-mediated peroxidation of mitochondrial membrane lipids. *Mol Cell Biochem.* 196 (1999) 163-168.
- [47] K.D. Welch, T.Z. Davis, S.D. Aust, Iron autoxidation and free radical generation: effects of buffers, ligands, and chelators. *Arch Biochem Biophys.* 397 (2002) 360-369.
- [48] L.T. Dalvi, I.G.J. De Avellar, A. Alonso, M. Hermes-Lima, Effect of Persimmon (*Diospyros kaki*) extracts in oxidative processes mediated by iron ions in vitro. 37th Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2008. Águas de Lindoia, Brazil, Abstract T-60.
- [49] N.C.F. Santos, Quantificação da ação antioxidante do Piridoxal Isonicotinoil Hidrazona (PIH) contra o estresse oxidativo induzido por íons ferro. 1998. MSc Thesis. University of Brasília, Brazil.
- [50] Y.C. Li, L.G. Bachas, D. Bhattacharyya, Kinetics studies of trichlorophenol destruction by chelate-based Fenton reaction. *Environ Engin Sci* 22 (2005) 756-771.
- [51] O.I. Aruoma, M. Grootveld, B. Halliwell, The role of iron in ascorbate-dependent deoxyribose degradation. Evidence consistent with site-specific hydroxyl

radical generation caused by iron ions bound to the deoxyribose molecule.

Jour Inorg Biochem. 29 (1987) 289-299.

[52] F. Chen, W. Ma, J. He, J. Zhao, Fenton degradation of malachite green catalyzed

by aromatic additives. J Phys Chem A. 106 (2002) 9485-9490.

[53] C.K. Duesterberg, S.E. Mylon, T.D. Waite, pH effects on iron-catalyzed oxidation

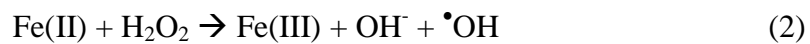
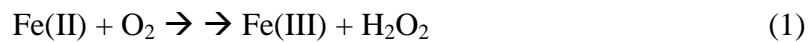
using Fenton's reagent. Environ Sci Technol. 42 (2008) 8522-8527.

[54] C. Zhao, G. Dodin, C. Yuan, H. Chen, R. Zheng, Z. Jia, B.T. Fan, "In vitro"

protection of DNA from Fenton reaction by plant polyphenol verbascoside.

Biochim Biophys Acta. 1723 (2005) 114-123.

Main classical reactions



Fe(III)-interference



Scheme 1: 2-DR degradation reactions induced by $\cdot\text{OH}$ (reactions 1-3) and Fe(III) (reactions 4-5).

Table 1 - Metal-mediated hydroxyl radical-generation systems¹

Conditions	References
Fenton reactants Fe(II) (with or without EDTA) plus H ₂ O ₂	[10-17],
Fe(III)-EDTA ² plus ascorbate (or other reducing agents) and dissolved oxygen in the reacting media	[18-28],
Fe(III) (with or without EDTA) plus H ₂ O ₂ and oxygen ³	[17, 29-30],
Fe(II) plus ascorbate and oxygen (with or without H ₂ O ₂)	[10],
Fe(III)-EDTA plus xanthine oxidase, hypoxanthine and oxygen	[19],
Cu(II) plus ascorbate (or other reducing agents) and oxygen	[31-33],
Cu(II) plus H ₂ O ₂ and oxygen	[17,34],
Ascorbate plus contaminating metals and oxygen	[35]
Fe(II) plus O ₂ (the so-called ferrous autoxidation reaction)	[3, 16, 28, 36].

¹: The buffers used to keep near-neutral pH in these systems are mostly phosphate, TRIS or Hepes (concentrations ranging from 5 to 50 mM). The concentration of 2-DR in the assays varies between 3 and 20 mM.

²: Citrate, ADP and NTA are often used to replace EDTA.

³: It is assumed that H₂O₂ may reduce ferric ions in this assay.

Table 2 - Effects of Fe(II) autoxidation on 2-DR degradation

Experimental Conditions	Mean \pm SD	Assay
<i>Effect of Fe(II) and Fe(III)</i>		
Fe(II)	0.307 \pm 0.011 (7)	A1
Fe(III)	0.077 \pm 0.010 (7)	A2
Fe(II) [#]	0.027 \pm 0.009 (7)	A3
Fe(III) [#]	0.074 \pm 0.012 (7)	A4
Fe(II) + Fe(III)	0.368 \pm 0.013 (7)	A5
Fe(II) 100 μ M	0.451 \pm 0.025 (7)	A6
Fe(III) 100 μ M	0.141 \pm 0.013 (7)	A7
<i>Effect of antioxidants</i>		
Fe(II) + catalase	0.122 \pm 0.023 (8) *	A8
Fe(III) + catalase	0.079 \pm 0.011 (8) *	A9
Fe(II) + thiourea	0.077 \pm 0.013 (7)	A10
Fe(III) + thiourea	0.073 \pm 0.014 (7)	A11

All samples were incubated for 10 min in media containing 10 mM phosphate (pH 7.2) and 5 mM 2-DR after the addition of Fe(II) and/or Fe(III) (at 50 μ M or 100 μ M). In samples A8, A9, A10 and A11, catalase (2,000 U/mL) or thiourea (100 mM) were added before iron ions (50 μ M). These samples were also incubated for 10 min after addition of metals. Results are represented as mean \pm SD (*n* values are in parenthesis).

[#] 50 μ M iron was added after H₃PO₄ and TBA.

* Values were subtracted from blanks containing catalase and 2-DR (without iron).

Incubation time was 10 minutes.

Table 3 - Effect of different H₂O₂ concentrations on 2-DR degradation

	Mean ± SD	□-A ₅₃₂ *
<i>Reactions without iron</i>		
H ₂ O ₂ zero	0.019 ± 0.003 (8)	-
H ₂ O ₂ 0.1 mM	0.031 ± 0.004 (8)	-
H ₂ O ₂ 0.2 mM	0.035 ± 0.005 (8)	-
H ₂ O ₂ 0.5 mM	0.045 ± 0.007 (8)	0.03
<i>With 50µM Fe(III) (after TBA)</i>		
H ₂ O ₂ zero	0.113 ± 0.009 (6)	-
H ₂ O ₂ 0.1 mM	0.139 ± 0.010 (6)	-
H ₂ O ₂ 0.2 mM	0.146 ± 0.005 (6)	-
H ₂ O ₂ 0.5 mM	0.145 ± 0.005 (6)	0.03

Reaction conditions were as described in Table 1, except that Fe(II) was not present.

Results are represented as mean ± SD (*n* values are in parenthesis).

* □ □ - A₅₃₂: This is A₅₃₂ 0.045 minus A₅₃₂ 0.019 (reaction without iron) and A₅₃₂ 0.145 minus A₅₃₂ 0.113 (reactions with ferric ions).

Table 4 - Effect of iron chelators and a fruit extract on Fe(III) interference

Antioxidants	Reaction media		
	Fenton	Autoxidation	Fe(III)
Control	0.321 ± 0.011	0.247 ± 0.009	0.112 ± 0.006
PIH	0.252 ± 0.002	0.168 ± 0.007	0.112 ± 0.008
DFO	0.323 ± 0.007	0.203 ± 0.016	0.126 ± 0.013
Tannic acid	0.217 ± 0.007	0.143 ± 0.004	0.107 ± 0.010
Caffeic acid	0.275 ± 0.005	0.180 ± 0.007	0.106 ± 0.006
Ellagic acid	0.278 ± 0.010	0.191 ± 0.018	0.105 ± 0.015
Persimmon extract	0.236 ± 0.012	0.163 ± 0.013	0.121 ± 0.011

Reaction media contained 10 mM phosphate (pH 7.2), 5 mM 2-DR, H₂O₂ (0 or 100 μ M), in the absence or presence of antioxidants (100 μ M PIH, 50 μ M DFO, 50 μ M tannic acid, 200 μ M caffeic acid, 30 μ M ellagic acid and 2.0 mg/mL persimmon fruit extract). Iron ions (50 μ M) were used to start reactions. Incubation time was 10 min. Values are mean \pm SD ($n=6$).

Table 5 - Effect of selected buffers on Fe(III)-interference

Buffers	Reaction media			
	Fe(II) autoxidation	Fenton reaction	Fe(III)	Fe(III) interference %
Phosphate				
5 mM	0.288 ± 0.008 (6)	0.349 ± 0.015 (6)	0.115 ± 0.017 (6)	33%
10 mM	0.270 ± 0.013 (6)	0.337 ± 0.006 (6)	0.108 ± 0.010 (6)	32%
20 mM	0.270 ± 0.022 (6)	0.319 ± 0.011 (6)	0.106 ± 0.012 (6)	33%
40 mM	0.253 ± 0.009 (6)	0.311 ± 0.011 (6)	0.103 ± 0.016 (6)	33%
50 mM	0.260 ± 0.006 (6)	0.302 ± 0.007 (6)	0.100 ± 0.015 (6)	33%
Hepes				
10 mM	0.053 ± 0.011 (6)	0.734 ± 0.032 (6)	0.109 ± 0.007 (5)	15%
40 mM	0.054 ± 0.011 (6)	0.382 ± 0.014 (6)	0.109 ± 0.006 (5)	29%
TRIS				
10 mM	0.043 ± 0.007 (6)	0.230 ± 0.015 (6)	0.111 ± 0.009 (7)	48%
40 mM	0.072 ± 0.005 (6)	0.175 ± 0.018 (6)	0.118 ± 0.006 (7)	67%
MOPS				
10 mM	0.067 ± 0.009 (6)	1.128 ± 0.078 (6)	0.108 ± 0.007 (7)	10%
40 mM	0.071 ± 0.017 (6)	1.047 ± 0.125 (5)	0.113 ± 0.006 (7)	11%

Reaction media contained buffers (pH 7.2), 5 mM 2-DR and H₂O₂ (0 or 100 μ M). Iron ions (50 μ M) were used to start reactions. Incubation time was 10 min. Results are represented as mean \pm SD (*n* values are in parenthesis). Percent values for Fe(III)-interference are relative to Fenton reactions.

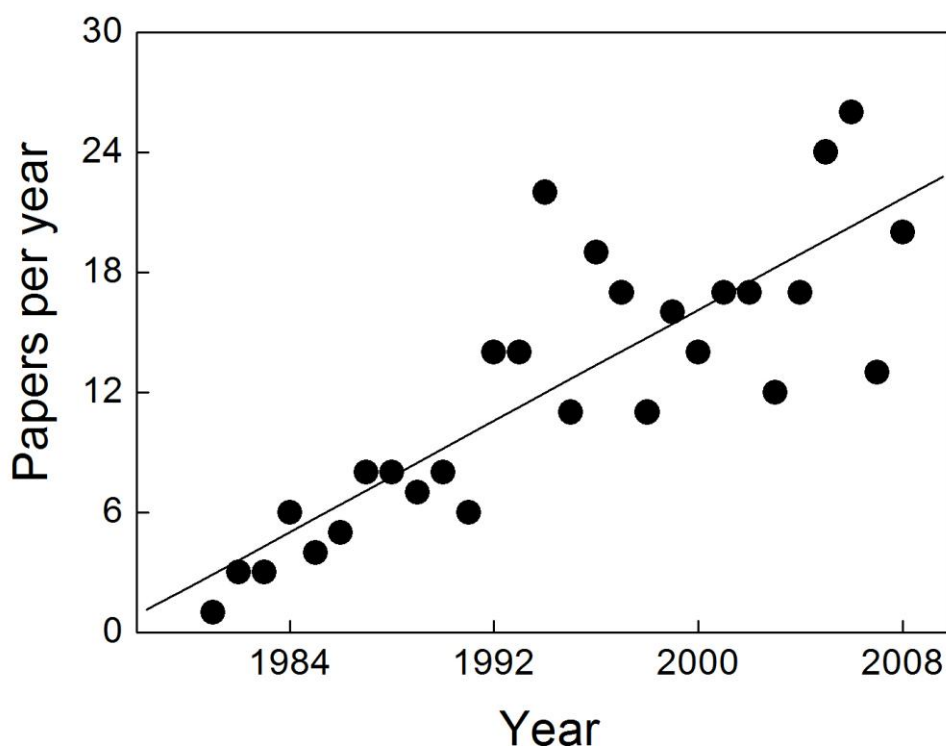


Fig. 1. Papers published using the 2-deoxyribose oxidative degradation assay from 1981 to 2008. The symbols represent the total number of articles using 2-DR oxidation assay per year from 1981 to 2008. Data was extracted from PubMed (www.pubmed.com) in January, 2009. The terms fields were “2-DR and degradation”, “2-deoxyribose and oxidation”, “2-deoxyribose and degradation” and “2-deoxyribose and assay” and “2-deoxyribose” (the word “deoxyribose” was also used to replace “2-deoxyribose” in all searches). Each one of the abstracts (and/or the full papers) was checked to make sure the study was actually using the 2-DR degradation assay to evaluate in vitro free radical formation. The total number of abstracts from 1981 to 2008 was 348.

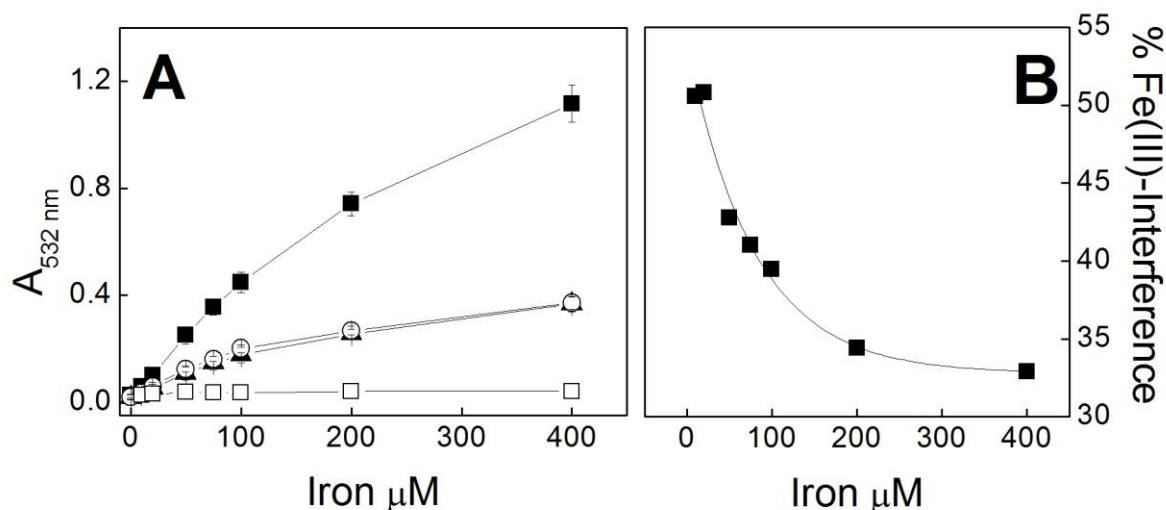


Fig. 2A. Effect of iron concentration on 2-deoxyribose (5 mM) oxidative degradation in phosphate-buffered media (10 mM at pH 7.2). Fe(II) autoxidation *Assays AF1* (\blacksquare); Fe(III) autoxidation *Assays AF2* (\circ) Fe(II) after TBA *Assays AF3* (\square) and Fe(III)-Interference (Fe(III) added after TBA) *Assays AF4* (\blacktriangle). The reactions were incubated for 10 min. Values are means \pm SD. ($n=6$). **Fig. 2B.** Percent of Fe(III)-interference on Fe(II) autoxidation. The line represents a first order exponential decay ($R^2=0.982$). The first data-point on Panel B represents 10 μM iron.

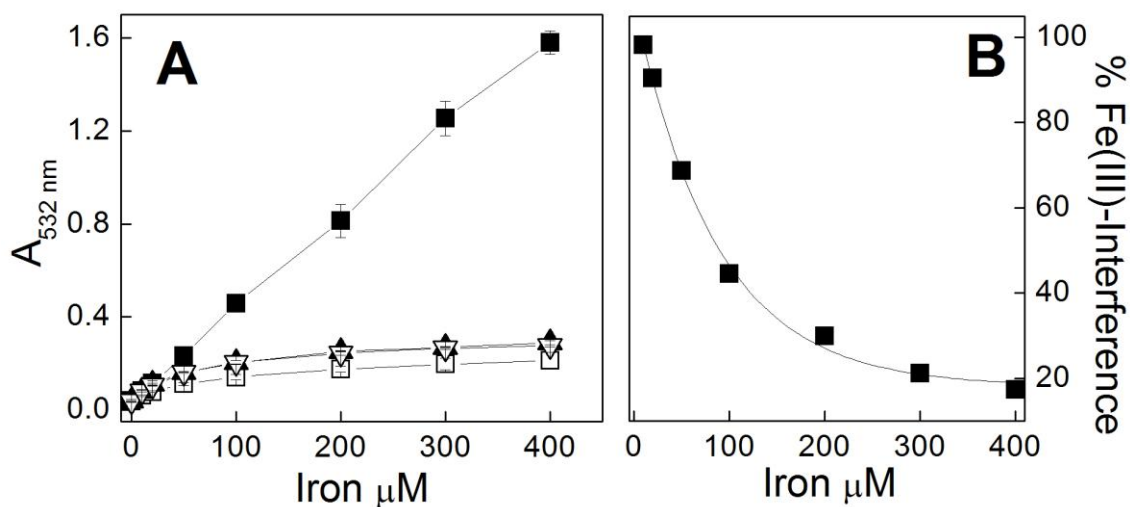


Fig. 3A – Effect of iron concentration on 2-deoxyribose (5 mM) oxidative degradation in phosphate-buffered media (10 mM at pH 7.2) containing H_2O_2 (0.5 mM). Fenton reaction Assays *FF1* (\blacksquare); Fe(II) blank (Fe(II) added after TBA) Assays *FF3* (\square); Fe(III)-Interference Assays *FF2* (\blacktriangle) and Fe(III) blank (Fe(III) added after TBA) Assays *FF4* (∇). The reactions were incubated for 10 min. Values are means \pm SD. ($n=6$). **Fig. 3B**. Percent of Fe(III)-interference on Fenton reaction. The line represents a first order exponential decay ($R^2=0.998$). The first data-point on Panel B represents 10 μM iron.

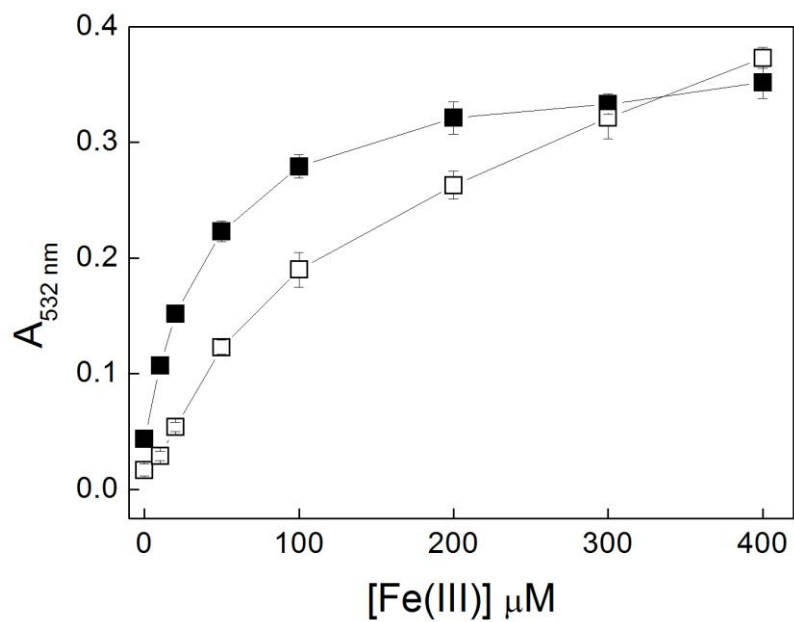


Fig. 4. Effect of H_2O_2 on Fe(III)-interference. (■) Oxidative damage to 2-deoxyribose (5 mM) induced by Fe(III) (0 to 0.4 mM) plus 0.5 mM H_2O_2 on phosphate-buffered media (10 mM at pH 7.2); (□) without H_2O_2 . Values are means \pm SD. ($n=6$)

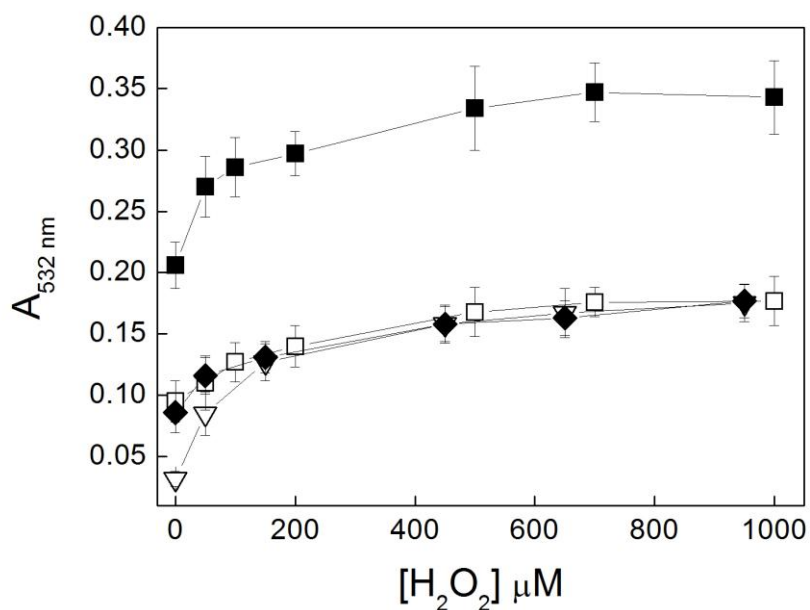


Fig. 5. Effect of H₂O₂ concentration on 2-deoxyribose (5 mM) oxidative degradation in phosphate-buffered media (10 mM, pH 7.2) induced by 50 μM Fe(II) (Assays *FH1* ■) or by 50 μM Fe(III) Assays *FH2* (□). Assays *FH3* (▽) and Assays *FH4* (◆) represents, respectively, the Fe(II) and Fe(III) blanks (iron added after TBA). The reactions were incubated for 10 min. Values are means ± SD. (*n*=10).

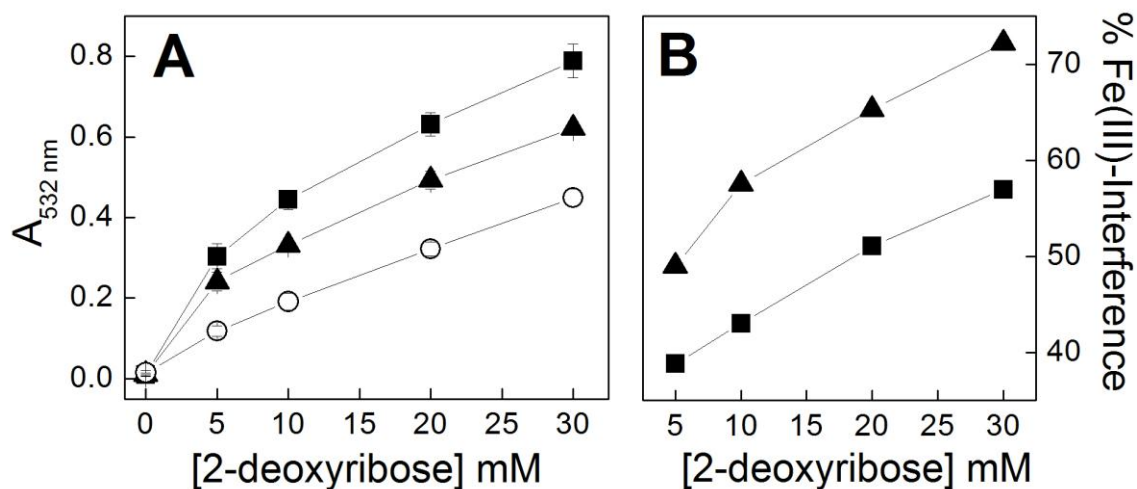


Fig. 6A – Evaluation of the 2-deoxyribose concentration in phosphate-buffered media (10 mM at pH 7.2). (■) Fenton reaction containing 50 μM Fe(II) plus 100 μM ; (▲) Fe(II) autoxidation at 50 μM Fe(II); and (○) Fe(III)-interference containing 50 μM Fe(III). (n=9). **Fig. 6B** shows the percent of Fe(III)-interference on Fenton reaction (■) or Fe(II) autoxidation (▲).

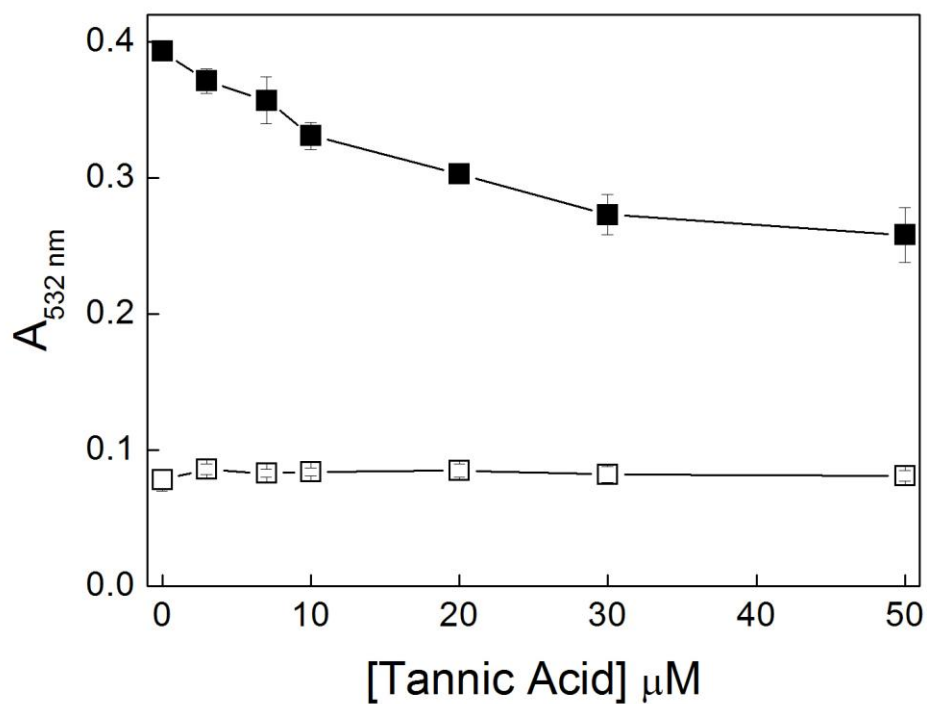


Fig. 7 – Effect of Tannic Acid on Fenton reaction or Fe(III)-interference. The reactions occurred in phosphate-buffered media (10 mM at pH 7.2) containing 2-DR (5 mM), H_2O_2 (100 μM) in the presence of 50 μM Fe(II) (\blacksquare) or 50 μM Fe(III) (\square). All samples were incubated for 10 minutes. ($n=3$).

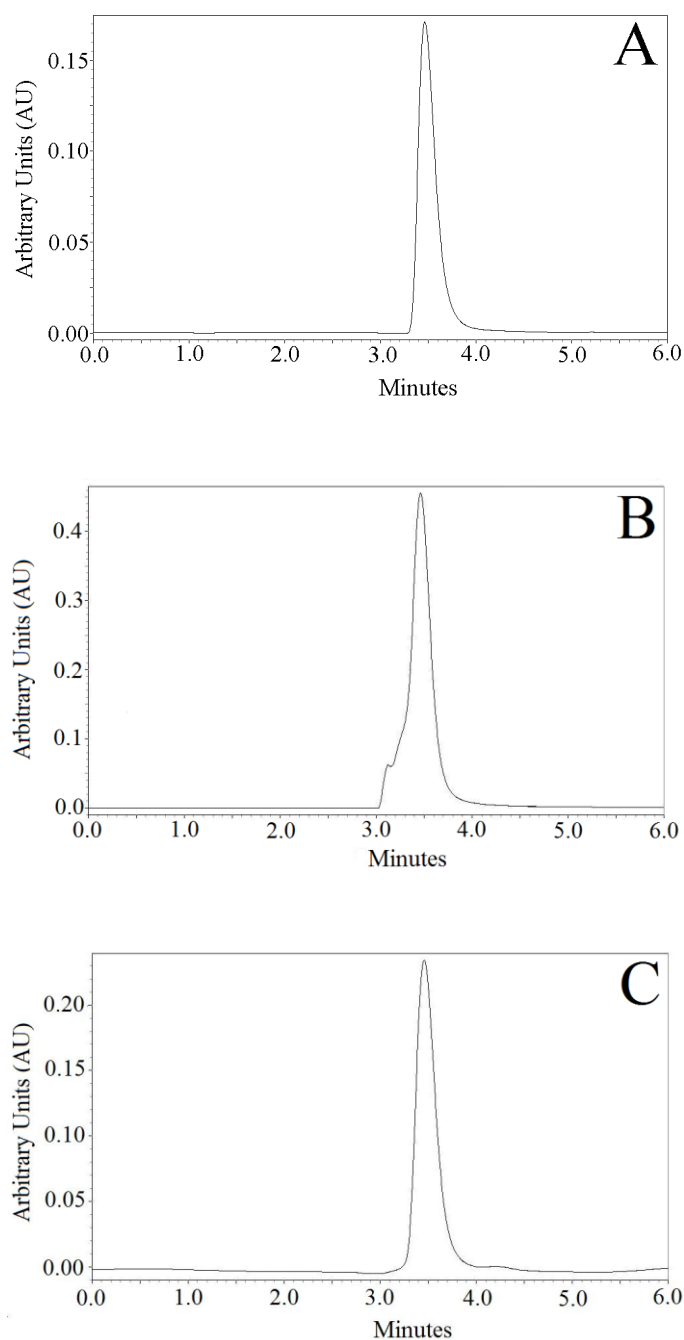


Fig. 8 – MDA-TBA₂ chromatograms. All chromatograms contain TBA 1% w/v in NaOH 50 mM. **(A)** Chromatogram of pure MDA (0.67 nmol/mL). The observed retention time is 3.5 minutes; **(B)** Chromatogram generated by Fe(II) 50 μM, H₂O₂ 100 μM and 2-DR 5 mM in phosphate buffer 10 mM (pH 7.2). The observed retention time is 3.5 minutes; **(C)** Chromatogram generated by Fe(III) 50 μM and 2-DR 5 mM in phosphate buffer 10 mM (pH 7.2); The observed retention time is 3.5 minutes.

RESPOSTA DOS REVISORES

Manuscript No.: BBAGEN-09-132

Title: Reevaluation of the 2-Deoxyribose Assay for Determination of Metal-Mediated Free Radical Formation

Article Type: Regular Paper

BBA Section: BBA - General Subjects

Corresponding Author: Dr Marcelo Hermes-Lima

All Authors: Thiago C Genaro-Mattos; Luana T Dalvi; Ricardo G Oliveira; Janini S Ginani; Marcelo Hermes-Lima, Ph.D

Submit Date: Mar 25, 2009

Dear Dr. Hermes-Lima:

On behalf of the Executive Editors of *Biochimica et Biophysica Acta*, I would like to thank you for submitting the above-mentioned article to BBA - General Subjects. I am pleased to inform you that your paper may become acceptable for publication.

Your study is mainly a methodological improvement of an assay that is used by many different research groups. For this reason, we consider the manuscript to be of general interest even though it does not provide the new insights into biological mechanisms that are generally required for publication in BBA - General Subjects.

Due to the technical nature of your work, we needed to make sure that it was of both high quality and high relevance to the field. To make certain that this was indeed the case, the paper was evaluated by five reviewers, all highly knowledgeable in the field. It is my pleasure to conclude that all of the reviewers found your manuscript to be of good quality, although two of them argued for publication in a more specialized journal. After weighing the reviewers' recommendations, I am willing to consider a revised version of this study for publication, provided that you shorten the manuscript and clarify the Methods section so that it is comprehensible to new researchers wishing to use the 2-

deoxyribose assay. In addition, you will need to answer the other specific points raised by the reviewers.

We look forward to receiving your prompt response.

Thank you, and we look forward to receiving your revised manuscript.

Yours sincerely,

Elias Arnér, M.D., Ph.D.

Executive Editor

BBA - General Subjects

Please see below Reviewer(s) comments:

Reviewer #1: The manuscript describes experiments aimed at reevaluating the accuracy of the 2-Deoxyribose (2-DR) assay for determination of metal-mediated free radical formation. Results obtained by HPLC determinations indicate that Fe (III) added after or before TBA reacts with 2-DR generating considerable amounts of malonaldehyde. Depending on the assay conditions Fe (III)-interference accounts for 20 to 90% of 2-DR degradation mediated by Fe(II). In my opinion, the conclusions are adequately supported by the results and by statistical analysis.

Reviewer #2: The authors present convincing data to support their conclusion that Fe(III) can interfere in the deoxyribose assay for OH-like species, by reacting during the step where the reaction mixture is boiled with TBA under acid conditions. This information is potentially useful to people using the assay and presentation as a technical note in an appropriate specialist journal could be justified. However, the message does not warrant such a long and detailed manuscript. It would be preferable to present key experiments demonstrating the source of interference rather than an exhaustive presentation of all the results of all the conditions presented, plus the recommendation that an additional control should be included. A manuscript of about a quarter the

length, with a similar reduction in Figures and Tables would be reasonable. Not all the background references, the detail in Table 1 and Fig 2, and the detailed interpretation of previous studies in the Conclusion, are needed.

Reviewer #3: Genaro-Mattos TC, Dalvi LT, Oliveira RG, Ginani JS, Hermes-Lima M. Reevaluation of the 2-deoxyribose assay for determination of metal-mediated free radical formation.

Major concerns:

1. The focus of the investigation is on limitations of a commonly employed *in vitro* assay of oxidative stress (or what might be referred to as an "artifact"). Measurement of TBA reactive products of deoxyribose has been previously reported to have several restrictions (at least one reference is cited by the authors).

The results are interesting but relevant only to those hoping to employ the assay; there is no pertinence to any tissue injury.

2. The investigation is poorly delineated despite attempts to clarify the conditions in Table 2. It requires an extraordinary effort simply to understand the actual experiments and what is being tested.

3. Most investigators are very aware of several limitations of this assay (although not the specific pathways of oxidation of 2-deoxyribose by Fe³⁺ as demonstrated in these studies). I would propose that investigators frequently control for any possible implications of these studies by a careful selection of controls. For example, I disagree that "most reports use reaction blanks omitting 2-DR or thiobarbituric acid". Most would simply employ addition of a saline or PBS control and differences are statistically evaluated.

Minor concerns:

1. The authors provide the title "Reevaluation of the 2-deoxyribose assay for determination of metal-mediated free radical formation". Why is "metal-mediated" included in this title?

2. Throughout the manuscript, should malonaldehyde be malondialdehyde?

3. Abstract, page 2, line 4: "appropriated" should be "appropriate".

4. Methods, page 5, line 6 from the bottom: "enzyme" should be "enzyme".

Reviewer #4: BBAGEN-09-132

The work examines some of the chemistry of 2-deoxyribose and its implications in its use in oxidative assays. The authors demonstrate that metals such as iron have a chemistry that may not be accounted for in typical assay protocols.

Comments are:

1. Methods: I have real concern over the preparation of ascorbate only on a weekly basis when the solution is in a pH 7.2 buffer. Were precautions used to ensure that it did not oxidize rapidly? Trace metals and oxygen will lead to its oxidation very rapidly, especially if 1 week is the time scale of reference. See

Buettner GR. (1988) In the absence of catalytic metals, ascorbate does not autoxidize at pH 7: Ascorbate as a test for catalytic metals. *J Biochem Biophys Meth* 16: 27-40. PMID: 3135299 [http://dx.doi.org/10.1016/0165-022X\(88\)90100-5](http://dx.doi.org/10.1016/0165-022X(88)90100-5) (Google Scholar will yield a pdf link.)

2. Page 7: "It is also observed that catalase addition to the incubation media promoted a 60% decrease in 2-DR damage caused by Fe(II) autoxidation" This is similar to the general results reported on the effects of catalase in reference 41. Qian also observed an effect with SOD.

3. Abstract: appropriated. Should be appropriate.

4. Figure 1 is really not needed.

5. Figure 2B is not really an exponential DECAY. I don't see a good explanation of the information in this figure. Does it relate to order of reaction? What is the bigger interpretation?

6. Although not mentioned as it is another issue, the oxidative effects of ferrous iron and dioxygen are very pH-dependent. See

Schafer FQ, Buettner GR. (2000) Acidic pH amplifies iron-mediated lipid peroxidation in cells. Free Radic Biol Med. 28:1175-1181. PMID: 10889446 [http://dx.doi.org/doi:10.1016/S0891-5849\(00\)00319-1](http://dx.doi.org/doi:10.1016/S0891-5849(00)00319-1)

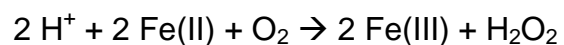
7. The authors should consult with an editor to fine tune their manuscript.

Reviewer #5: This is an important paper and should be published in its present form.

I would suggest one minor change:

Scheme 1

The first equation in this Scheme should be balanced ie



ANEXO II

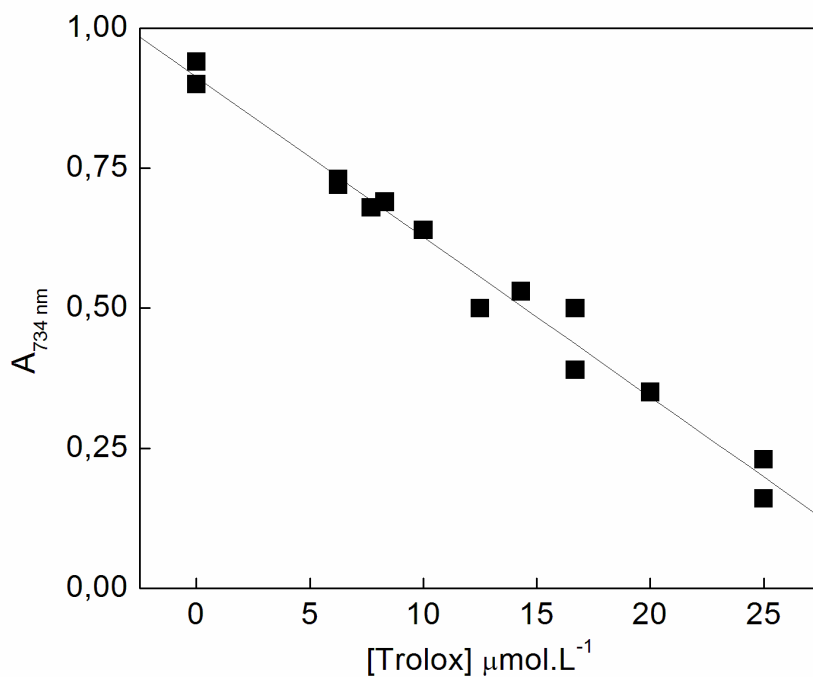


Figura 56. Curva de calibração do Trolox. O meio reacional continha KPi 20 mmol.L^{-1} , ABTS^{++} $60 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

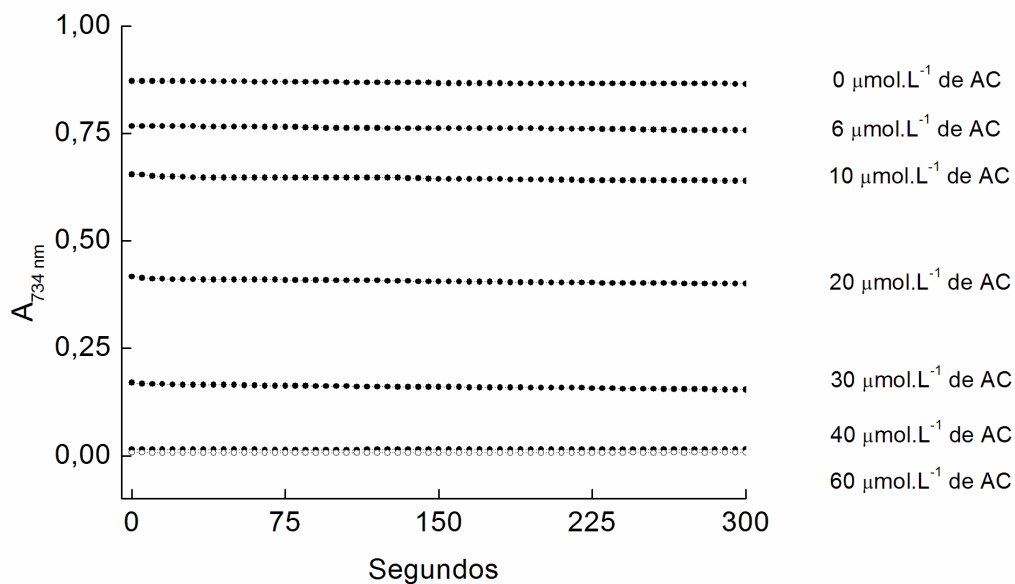


Figura 57. Cinética da redução do radical ABTS pelo AC. O meio reacional era composto por KPi 20 mmol.L^{-1} , ABTS^{++} $60 \mu\text{mol.L}^{-1}$, AC 0 a $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

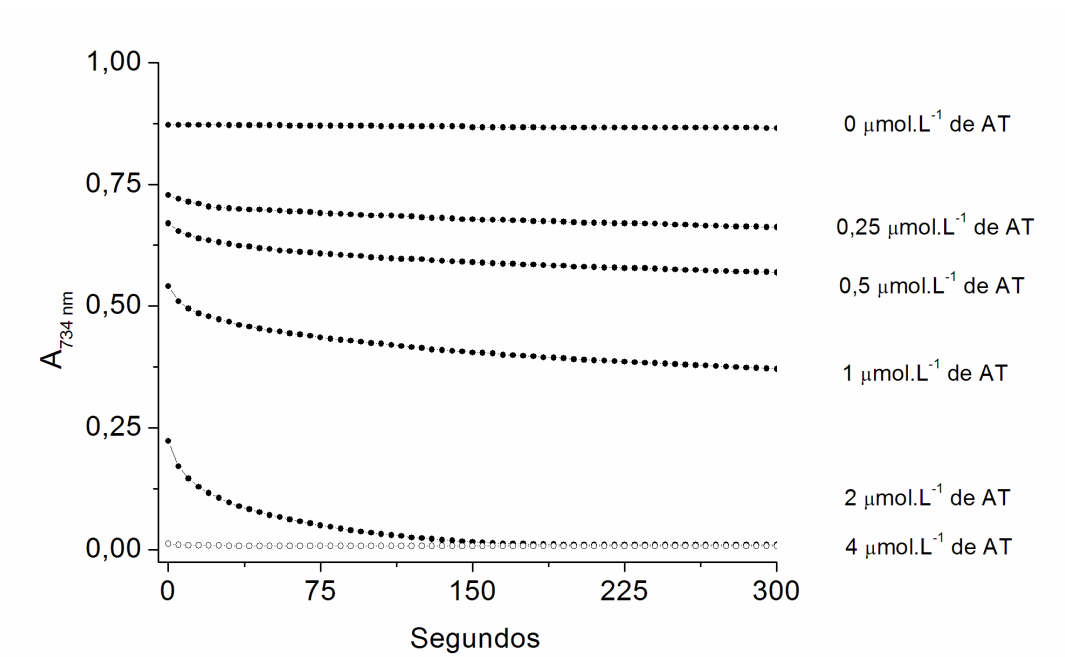


Figura 58. Cinética da redução do radical ABTS pelo AT. O meio reacional era composto por KPi 20 mmol.L^{-1} , ABTS^{++} $60 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$, AC 0 a $4 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$.