

## 1. Introdução

As plantas medicinais, seu uso e o conhecimento sobre suas propriedades terapêuticas, têm acompanhado o homem desde o alvorecer da sua jornada. Descobertas arqueológicas têm trazido à tona vestígios de uso de plantas com finalidades terapêuticas ou rituais em sociedades pré-históricas africanas, européias e de sociedades pré-colombianas nas Américas central e do sul por volta do século III a.C. Já os primeiros relatos escritos de propriedades de plantas medicinais podem ser encontrados no Pen Ts'ao (2800 a.C.) na China antiga, atribuído a Shen Numg, e no *Papyrus Ebers* (1500 a.C.) do antigo Egito, que foi descoberto pelo egiptólogo alemão Yorg Ebers (GOLDFARB, 1988).

O Brasil é o país com maior biodiversidade vegetal no mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas (GUERRA, 1999). Estas espécies estão dispersas em ecossistemas variados, tais como a floresta tropical amazônica, a mata atlântica, o pantanal, o mangue, o cerrado, e a caatinga. Apesar desta grande biodiversidade, ainda são poucos os estudos da flora brasileira sob o ponto de vista químico (RIBEIRO, 1987) e, ainda menores os estudos sobre atividades biológicas das plantas e de seus constituintes (CORDELL, 1995). Com o surgimento de novas doenças como a AIDS e o ressurgimento de doenças antes consideradas facilmente curáveis a exemplo da tuberculose e, a incidência cada vez maior de doenças como o câncer, é crescente a demanda e o interesse mundial na busca de novos fármacos. Uma das fontes para essa busca é a natureza. Esta é uma busca multidisciplinar que envolve profissionais das áreas de botânica, farmacologia, farmacognosia e química, e diversos profissionais da área de medicina. A Bahia, na riqueza de sua flora, possui regiões de cerrado no oeste, caatinga no centro e norte, mangue em algumas poucas áreas do litoral, campos rupestres na região da Chapada Diamantina e resquícios de mata atlântica concentrados principalmente ao sul na região da Reserva de Monte Pascoal.

Por tudo isto, faz-se necessários estudos botânicos, Químicos e farmacológicos detalhados da flora brasileira de um modo geral e da Bahia em particular com o intuito de conhecer e aproveitar melhor os nossos recursos naturais. Do ponto de vista químico, estes estudos não devem se resumir à caracterização química, mas devem também avaliar o potencial biológico, levando à um acúmulo de informações que possa despertar o interesse da indústria farmacêutica e levar à descoberta de novos fármacos para benefício da população.

### 1.1. Levantamento Botânico

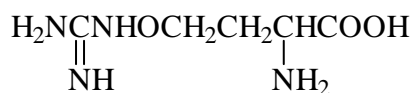
*Dioclea violacea* Mart. (ex. Benth.) pertence à divisão Angiospermae (Anthophyta), maior divisão do reino vegetal, que compreende as plantas superiores que contêm sementes encerradas no ovário e, portanto podem formar frutos. As estruturas férteis são protegidas por folhas estéreis especiais, constituindo a flor. Esse grupo domina a flora terrestre, sendo reconhecidas 344 famílias agrupadas em duas classes, as monocotiledôneas e as dicotiledôneas, compreendendo mais de 200000 espécies (JOLY, 2002).

As dicotiledôneas compreendem 48 ordens, representadas por 291 famílias. O gênero *Dioclea* pertence à ordem Rosales, que é composta pelas famílias Plantanaceae, Hamamelidaceae, Myrothamnaceae, Crassulaceae, Cephalotaceae, Bruneliaceae, Saxifragaceae, Cunoniaceae, Davidsoniaceae, Pittosporaceae, Byblidaceae, Roridulaceae, Bruniaceae, Rosaceae, Neuradaceae, Chrysobalanaceae, Connaraceae, Leguminosae e Krameriaceae (JOLY, 2002). A família Leguminosae (Fabaceae) é a terceira maior pertencente às dicotiledôneas, sendo superada apenas por Asteraceae e Orchidaceae, e é a maior família dentro da ordem Rosales. Possui três subfamílias, Mimosoideae, Caesalpinioideae e Faboideae (Papilionoideae), compreendendo cerca de 650 gêneros e mais de 18000 espécies (VARELA, 2004).

A subfamília Faboideae (Papilionoideae) abrange cerca de 400 gêneros, sendo, portanto a maior dentre as três subfamílias. Pertencem a esta subfamília todos os nossos legumes, a maioria constituída por plantas cultivadas tais como *Phaseolus vulgaris* L. (feijão), *Pisum sativum* L. (ervilha), *Lens culinaris* Medik. (lentilha), *Vicia faba* L. (fava), *Cicer arietinum* L. (grão-de-bico), *Glycine max* L. (soja) e *Arachis hypogaea* L. (amendoim), que possuem como característica a presença de grande quantidade de proteínas, óleos e carboidratos. Como plantas forrageiras destacam-se *Melilotus* e *Medicago sativa* L. (alfafa). Na indústria são muito utilizados *Indigofera anil* L. e *Indigofera hirsuta* L. (anil) e *Astragalus* (goma-arábica). Como madeiras importantes temos *Myroxylon balsamum* L. (cabriúva ou bálsamo), *Dalbergia brasiliensis* Vog. e *Dalbergia nigra* All. (caviúna), *Machaerium acutifolium* Vog. e *Machaerium scleroxylon* Tul. (jacarandá), *Centrolobium microchaete* Mart., *Centrolobium robustum* Mart. e *Centrolobium tomentosum* Guill. (araribá), *Bowdichia nitida* Spruce., *Bowdichia virgilioides* H.B.K. e *Bowdichia martiusii* Benth. (sucupira), *Andira bahiensis* N. (angelim) e *Dipteryx odorata* Aubl. (cumarú da Amazônia). Muitas espécies são também cultivadas apenas para uso ornamental, devido principalmente a suas belas flores como, por exemplo, *Lathyrus odoratus* L. (ervilha de cheiro), *Spartium junceum* L. (giesta), *Lupinus polyphyllus* Lindl. (lupino), *Clitoria*, certas espécies de *Phaseolus*, *Erythrina crista-galli* L.,

*Erythrina falcata* Benth., *Erythrina glauca* Willd., *Erythrina mulungu* Mart., *Erythrina velutina* Willd. e *Erythrina verna* Vell. (saranduba, maçaranduba, suína, corticeira-do-litoral e molungu) e *Wisteria floribunda* D.C. e *Wisteria sinensis* Sweet. (glicínia) que são trepadeiras de flores roxas (JOLY, 2002; da SILVA, 2004). A subfamília Faboideae é subdividida em tribos, onde as maiores são Swartzieae, Sophoreae, Dalbergieae, Amarpheae, Thephrosieae, Robinieae, Indigofereae, Phaseoleae, Desmodieae, Psoraleae, Loteae, Galegeae, Trifolieae, Podalyrieae, Liparieae, Bossiaeeae, Crotalarieae, Thermopsidae e Ginisteeae (KASS, 1997).

A tribo Phaseoleae a qual pertence *D. violacea* é atualmente dividida em oito subtribos: Cajaninae, Phaseolinae, Clitoriinae, Ophrestiinae, Kennediinae, Erythrinae, Diocleinae e Glicininae (VARELA, 2004). A subtribo Diocleinae ocorre principalmente no continente americano e possui algumas características primitivas como o hábito lenhoso ou grosso, as flores grandes possuindo discos proeminentes em volta do ovário, a hila normalmente longa e a presença do aminoácido não protéico canavanina (**1**) (ácido L-2-amino-4-guanidinooxi-butanóico).



**1**

Lackey (1981) reconheceu a presença de 13 gêneros em Diocleinae: *Dioclea*, *Cymbosema*, *Cleobulia*, *Canavalia*, *Macropsyчанthus*, *Luzonia*, *Camptosema*, *Cratyliа*, *Collaea*, *Galactia*, *Calopogonium*, *Herpyza* e *Pachyrhizus*, porém, ele próprio sugeriu que os três últimos gêneros talvez estivessem inapropriadamente localizados nesta subtribo (VARELA, 2004). Estudos anteriores da morfologia do pólen da subtribo Diocleinae (KAVANAGH, 1981) já confirmavam esta observação e sugeriam a exclusão destes três gêneros, além da reclassificação do gênero *Cymbosema* como *Dioclea*. Estudos filogenéticos da tribo Phaseoleae baseados no DNA dos cloroplastos concluíram que os gêneros *Calopogonium* e *Pachyrhizus* pertencem na verdade à subtribo Glycininae (DOYLE, 1993), o que levou à transferência destes gêneros para esta tribo. Estudos filogenéticos da subtribo *Diocleinae* baseados no DNA ribossômico confirmaram esta exclusão e a reclassificação do gênero *Cymbosema*, cujo único representante era *Cymbosema roseum*, como uma nova espécie de *Dioclea* (VARELA, 2004). Desta maneira, a subtribo Diocleinae possui atualmente 9 gêneros: *Dioclea*, *Cleobulia*, *Canavalia*, *Macropsyчанthus*, *Luzonia*, *Camptosema*, *Cratyliа*, *Collaea* e *Galactia*.

O gênero *Dioclea* possui cerca de 50 espécies distribuídas em zonas tropicais, sendo a maioria encontrada na América Central e do Sul, especialmente na Amazônia (PEREZ, 1990). No Brasil ocorrem 29 espécies de *Dioclea*. No Quadro 1 encontram-se descritas as ocorrências das espécies de *Dioclea* no Brasil (CORREA, 1984; da SILVA, 2004).

Quadro 1 –Espécies de *Dioclea* de ocorrência no Brasil

<b>Espécie</b>	<b>Localização</b>	<b>Nome popular</b>
<i>D. argentea</i> Desv.	PA até BA	Cavany, cava
<i>D. bicolor</i> Benth. var. <i>bicolor</i>  var. <i>rostrata</i> Max.	AM e MT	Feijão bravo Mucitaíba verdadeira, mucuna, mucunã Mucuaran
<i>D. coriacea</i> Benth.		Olho de boi
<i>D. densiflora</i> Hub.	PA	Feijão bravo
<i>D. edulis</i> Kuhlman		Corvanha, curaunhas
<i>D. erecta</i> Hoehne.	MT	Coroanha
<i>D. ferruginea</i> Ducke.	Amazônia	Mucuna, mucunã
<i>D. fimbriata</i> Hub.	PA	Feijão bravo
<i>D. flexuosa</i> Hook.	Amazônia	Mucuna, mucunã
<i>D. glabra</i> Benth.	Guiana até PE, GO e MT	Feijão bravo, cipó mucunarana, mucuna, mucunã, mucunã de flor branca, orelha de veado, pucumã
<i>D. glycinoides</i> DC.	SP até RS, e MT	Cutello
<i>D. grandiflora</i> Mart.	PE, PB e BA	Feijão bravo, mucuna, mucunã, mucunã de caroço, mucunã verdadeira
<i>D. guianensis</i> Benth.		Pé de pato
<i>D. jacquiniana</i> Bello.	AM, SP, BA e MG	Cumandatiá
<i>D. lasiocarpa</i> Mart.	Guiana até SP, MG e MT	Mucuna, mucunã, catinga de macaco
<i>D. lasiophylla</i> Mart.	Guiana até SP, GO, MG e MT	Feijão bravo
<i>D. latifolia</i> Benth.	SP, GO e MT	Feijão bravo

<i>D. leiophylla</i> Ducke.	Amazônia	Mucuna, mucunã
<i>D. macrantha</i> Hub.	PA	Feijão bravo, mucuna, mucunã
<i>D. macrocarpa</i> Hub.	Guiana e Amazônia	Feijão bravo, mucuna, mucunã, mucitaíba verdadeira
<i>D. malacocarpa</i> Ducke.	Amazônia	Mucuna, mucunã
<i>D. megacarpa</i> Rolfe.	Amazônia, PI e RJ	Mucitaíba verdadeira, mucuna, mucunã, mucunã mansa
<i>D. reflexa</i> Hook. var. <i>glabrescens</i> var. <i>grandifolia</i>	Amazônia até PI e RJ	Feijão bravo, mucuna, mucunã
<i>D. rostrata</i> Benth.	PA, CE, MG e MT	Feijão de boi, mandioca silvestre
<i>D. rufescens</i> Benth.	Brasil Central, RJ, SP e MG	Feijão bravo
<i>D. sclerocarpa</i> Ducke.	AM	Mandiocaçu, cipó olho de boi, mucuna, mucunã, mucunã de batata, mucunã mandioca, mucunã mansa, olho de boi
<i>D. sericea</i> HKB.	Colômbia, introduzida no Brasil	Mucuna, mucunã
<i>D. violacea</i> Mart.	Guiana até SP e MT	Cipó de imbirí, mucunã açu, coroanha
<i>D. virgata</i> Amsh.	Guiana até SP, MG e MT	Mucuna, mucunã, cipó de anauerá, cipó pixuna, feijão bravo, feijãorana

*Dioclea violacea* Mart. (ex Benth) é uma trepadeira lenhosa e extraordinariamente pilosa, com pelos castanho-escuros, folhas pecioladas compostas de três folíolos grandes, ovado-oblongos, agudos no ápice e arredondados na base, revestidos de pubescência ferrugínea de consistência aveludada. Suas belas flores violáceo-púrpuras (Figura 1, p. 6) florescem em janeiro e logo frutificam. Seus frutos são constituídos por uma vagem sésil de até 13 cm de comprimento, 6 cm de largura e 2cm de espessura, revestidos de pelos ferrugíneos e de um pó urticante (pó-de-mico). Cada fruto contém em geral três sementes, raramente quatro, que são

castanho-avermelhadas, duras, achatadas e venenosas quando ingeridas cruas. Quando reduzidas a pó são utilizadas como formicida, parasiticida e são aplicadas na pele contra picadas de insetos e animais venenosos. Já cozidas são aproveitadas como alimento depois de reduzidas a farinha (CORREA, 1984; LEPREVOST, 1952; MELLO, 1971).

O nome científico *Dioclea* é uma homenagem a Diocles Carystius, companheiro de Hipócrates, pai da medicina moderna. Já *violacea* é uma homenagem a suas belas flores. É conhecida popularmente no Rio de Janeiro como Coroanha, que significa “aquela que nasce quando se fazem as roças” (coro = fazer, onha = nascer). No norte e nordeste é conhecida como Mucunã-Assú ou como Cipó de Imbirí (CORREA, 1984; LEPREVOST, 1952). Já foi estudada anteriormente sob o ponto de vista químico através da dosagem de proteínas, açúcares, umidade, fibra e cinzas, e determinação dos componentes minerais das cinzas (LEPREVOST, 1952).



Figura 1 – Foto de um espécime de *Dioclea violacea*, detalhe da flor, autoria do Prof. Jorge M. David.

## 1.2. Levantamento Fitoquímico

Diversas espécies de *Dioclea* têm sido estudadas através da análise de proteínas e lecitinas, a exemplo de *D. grandiflora* (AINOUZ, 1987; ROUGÉ, 1990), *D. lehmanni* (PÉREZ, 1990, 1998), *D. altissima* (MOREIRA, 1997) *D. guianensis* e *D. virgata* (CALVET, 1999). No entanto, até o presente momento apenas *D. grandiflora* e *D. lasiophylla* foram estudadas sob o ponto de vista fitoquímico.

*D. grandiflora* (Figura 3, p. 9) tem ocorrência restrita nas regiões de tabuleiro e semi-árido nordestino, sendo conhecida popularmente como olho-de-boi. Possui emprego na medicina popular no tratamento de cálculos renais e doenças da próstata. Estudos fitoquímicos anteriores realizados com suas raízes levaram ao isolamento de cinco novos flavonóides prenilados, três flavonóides metoxilados, e um triterpeno de ocorrência comum (Figura 2, p. 8). A primeira flavanona a ser isolada, denominada diocleína (**2**) (2',5,5'-triidroxi-6,7-dimetoxiflavanona) (BHATTACHARYYA, 1995), apresentou atividade analgésica intensa (BATISTA, 1995), aumento do fluxo coronário (ALMEIDA, 2002), atividade vasodilatadora (LE MOS, 1999) e vasorelaxante (TRIGUEIRO, 2000). Esta inclusive já foi sintetizada (SPEARING, 1997). Na seqüência foram isolados o dioclenol (**3**) (3,5,7-triidroxi-8-metoxi-6-prenilflavanona) (BHATTACHARYYA, 1997) e a dioflorina (**4**) (2',5,7-triidroxi-8-metoxi-6-prenilflavanona) (BHATTACHARYYA, 1998), que apresentaram atividade analgésica (ALMEIDA, 2000). Além destas foram isolados o agrandol (**5**) (5,7-diidroxi-6-metoxi-8-prenilflavanona), o diosalol (**6**) (2',3,5,5',7-pentaidroxi-6-metoxiflavanona), o paraibanol (**7**) (2',3,5,5',7-pentaidroxi-6-metoxi-8-prenilflavanona), a 5,7,2',5'-tetraidroxi-6-metoxi-8-prenilflavanona (**8**) e a  $\beta$ -amirina (**9**) (JENKINS, 1999). Por fim foi isolado o floranol (**10**) (2',3,5,7-tetraidroxi-6-metoxi-8-prenilflavanona) (LE MOS, 2002), o qual apresentou atividade vasodilatadora (REZENDE, 2004).

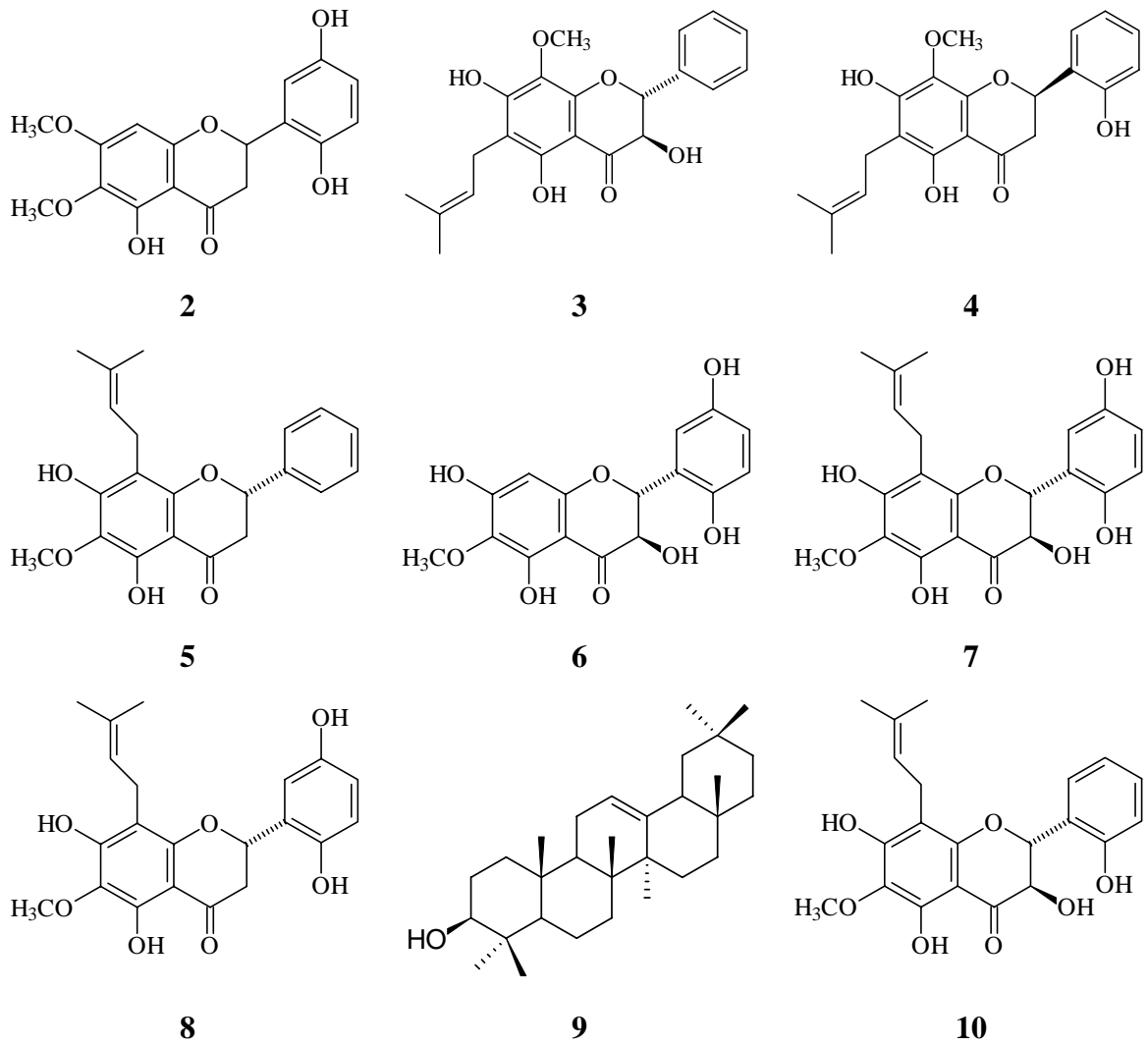


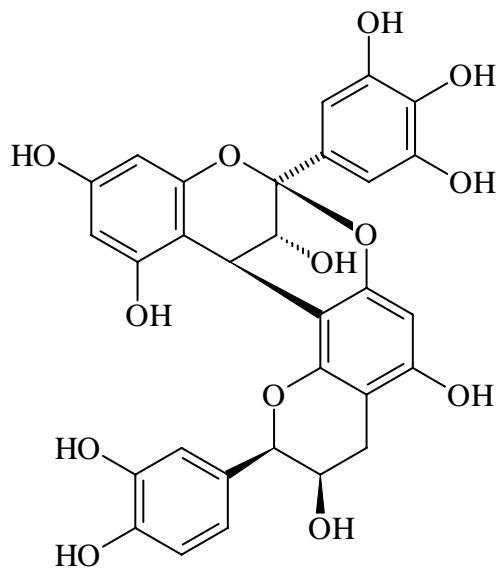
Figura 2 – Substâncias isoladas de *Dioclea grandiflora*



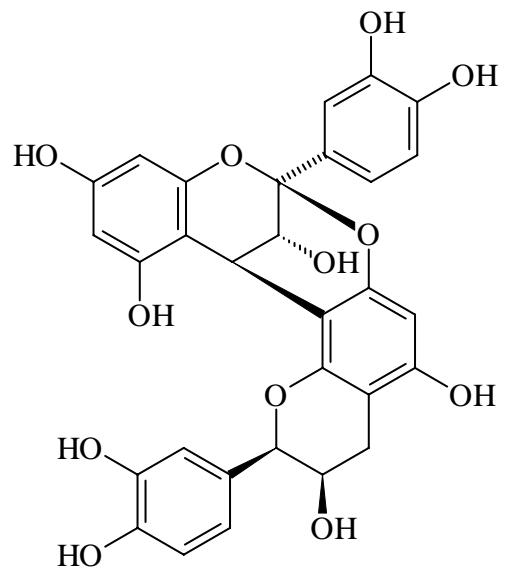


Figura 3 – Exsicata de *Dioclea grandiflora*

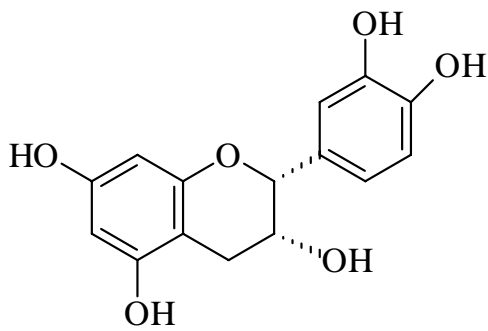
*Dioclea lasiophylla* (Figura 7, p. 14) é uma trepadeira de ocorrência na costa atlântica da América do Sul, desde a Guiana até o estado de São Paulo, sendo conhecida popularmente como feijão-bravo. Tem emprego na medicina popular como analgésico e, no tratamento de pedras nos rins e reumatismo. Estudos fitoquímicos anteriores realizados no LPPN (Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais) do grupo de pesquisa na Universidade Federal da Bahia levaram ao isolamento de proantocianidinas do tipo A2, flavonóides, lignanas, um álcool, um triterpeno esterificado com ácido ferúlico, em conjunto com outros triterpenos e esteróides (Figuras 4, 5 e 6, p. 11, 12 e 13). Primeiramente foi isolada do extrato em acetato de etila a nova substância *epigallocatequina-(2 $\beta$ →7,4 $\beta$ →8)-epicatequina* (**11**), a *epicatequina* (**12**) (3,3',4',5,7-pentahidroxi-*flavona*), a 3'- $\beta$ -D-glicopiranosídeo *luteolina* (**13**) (4',5, 7-triidroxi-3'-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo-*flavona*), o 7- $\beta$ -D-glicopiranosídeo *crisoeriol* (**14**) (4',5-diidroxi-3'-metoxi-7-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo-*flavona*) e o 2-metil-2,4-pentanodiol (**15**). Deve-se destacar que as substâncias **11** e **12** apresentaram alta atividade antioxidante (BARREIROS, 2000). Em seguida foi isolada a *epicatequina-(2 $\beta$ →7,4 $\beta$ →8)-epicatequina* (**16**) que também apresentou alta atividade antioxidante (DAVID, J. P., 2002). Por fim foi isolado do extrato clorofórmico o novo triterpeno ácido 3- $\beta$ -*E*-feruloil oleanólico (**17**), o ácido 3- $\beta$ -*E*-cafeoil oleanólico (**18**), o ácido oleanólico (**19**), o ácido betulínico (**20**), a vanilina (**21**), o vanilato de metila (**22**), o pinosinol (**23**) e o siringaresinol (**24**). Além desses, do extrato hexânico foram isolados o  $\beta$ -sitosterol (**25**), o estigmasterol (**26**), o ácido 3- $\beta$ -acetil oleanólico (**27**), o lupeol (**28**) e a lupenona (**29**), sendo que as substâncias **17**, **18** e **24** apresentaram atividade antioxidante (DAVID, J. M., 2004).



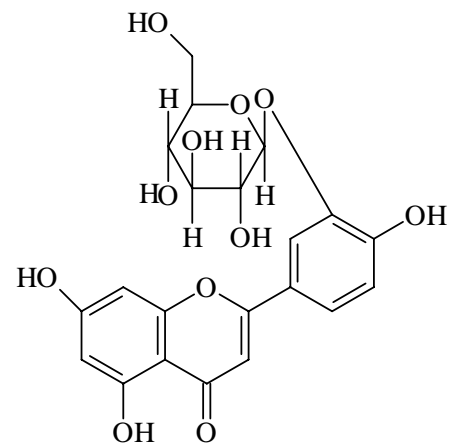
11



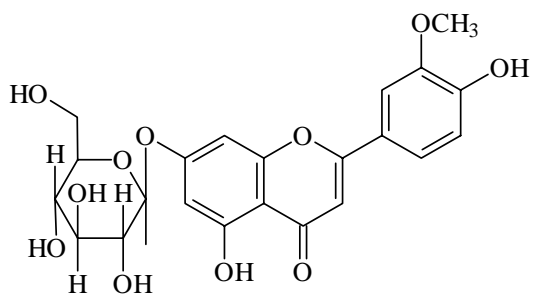
16



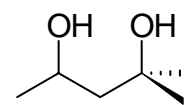
12



13

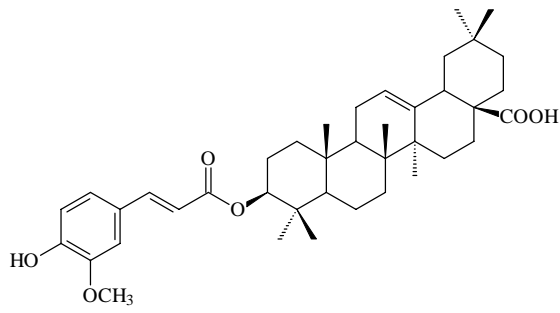


14

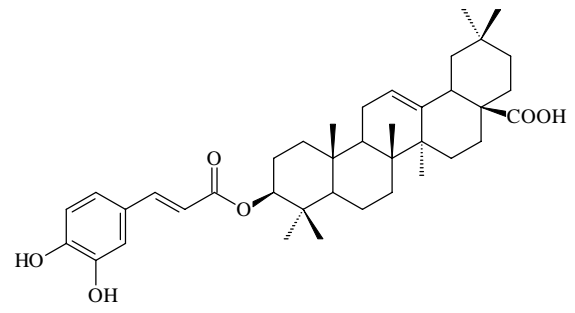


15

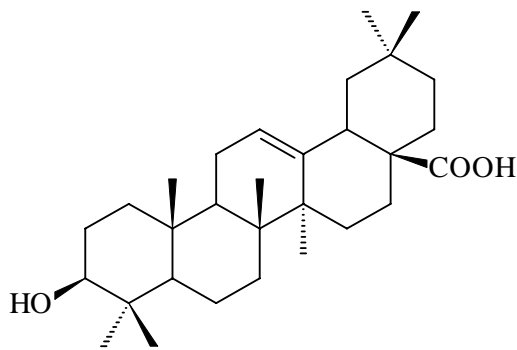
Figura 4 – Substâncias isoladas do extrato acetato de etila de *Dioclea lasiophylla*



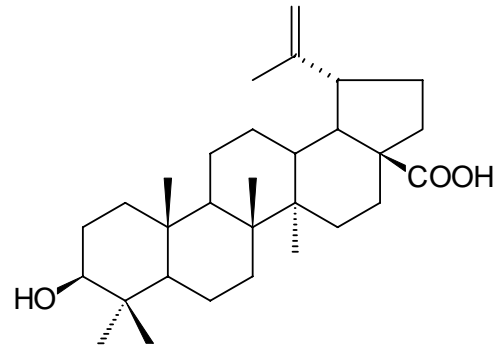
17



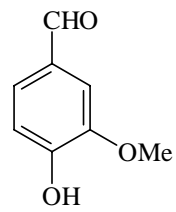
18



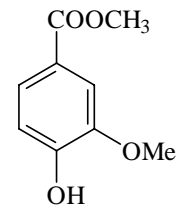
19



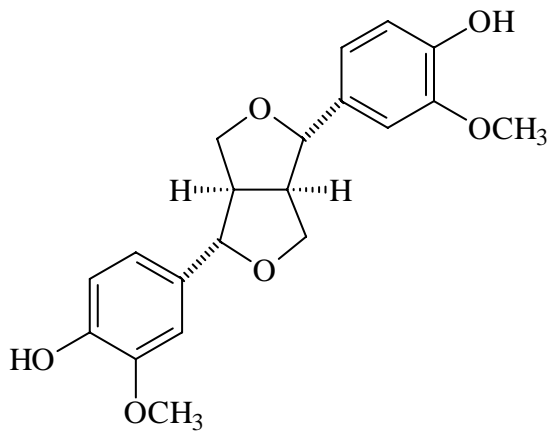
20



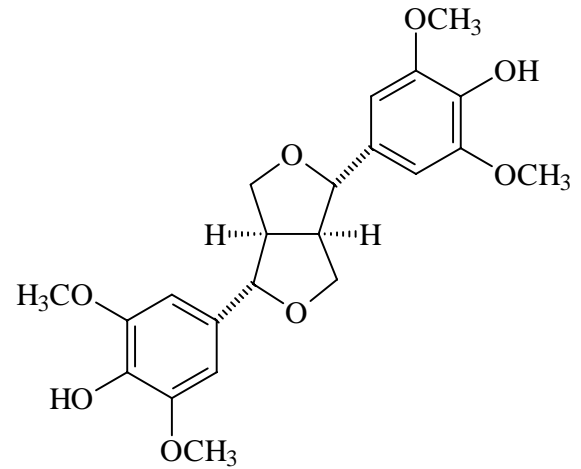
21



22

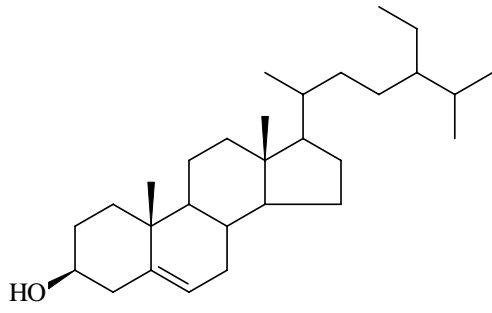


23

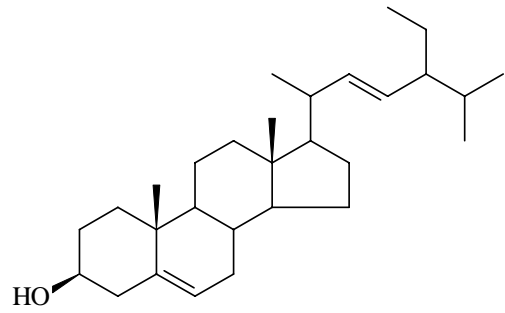


24

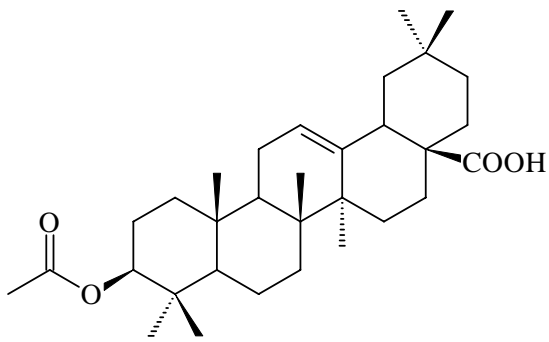
Figura 5 – Substâncias isoladas do extrato clorofórmico de *Dioclea lasiophylla*



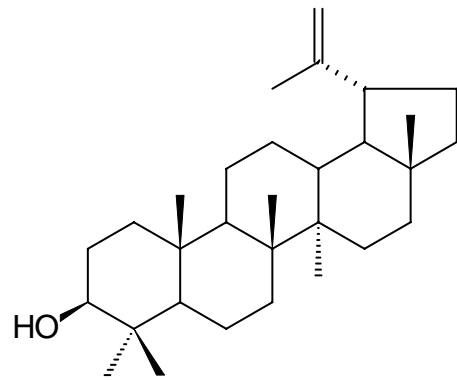
25



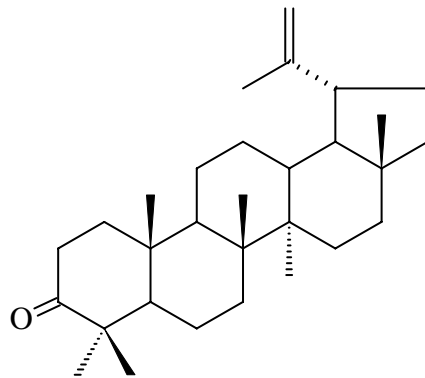
26



27



28



29

Figura 6 – Substâncias isoladas do extrato hexânico de *Dioclea lasiophylla*



Figura 7 – Exsicata de *Dioclea lasiophylla*

### 1.3. Atividade antioxidante

Como visto anteriormente, algumas das substâncias isoladas de *Dioclea lasiophylla* apresentaram atividade antioxidante. Há forte interesse no estudo dos antioxidantes devido principalmente às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo. Os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados espécies reativas de oxigênio (ERO) ou de nitrogênio (ERN) (VISIOLI, 2000; FINKEL, 2000; HALLIWELL, 2000a; PIETTA, 2000) e possuem diferentes papéis no organismo. Encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto o seu excesso apresenta efeitos prejudiciais tais como: a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, aos carboidratos e até ao DNA (SARMA, 1999). Dessa forma, encontram-se relacionados com mais de uma centena de patologias manifestadas como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (HALLIWELL, 1992).

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. De acordo com Halliwell (1992) “*Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada a do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo*”. Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem enzimaticamente, a exemplo da Se-glutationa peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) (FINKEL, 2000) ou, não-enzimaticamente a exemplo da glutathione (GSH), peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), ácido dihidrolipóico e CoQH<sub>2</sub>. Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina-E),  $\beta$ -caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides (PIETTA, 2000; HALLIWELL, 1995). Dentre os aspectos preventivos, é interessante ressaltar a correlação existente entre atividade antioxidante de substâncias polares e a capacidade de inibir ou retardar o aparecimento de células cancerígenas, além de retardar o envelhecimento das células em geral (HO, 1994). Outro interesse ligado aos antioxidantes é a sua aplicação na indústria, onde são utilizados para a proteção de cosméticos, fármacos e alimentos, prevenindo a decomposição oxidativa desses pela ação da luz, temperatura e umidade (FAURÉ, 1984).

### 1.3.1. O Estresse Oxidativo

O organismo humano sofre ação constante de ERO e ERN geradas em processos inflamatórios, por alguma disfunção biológica ou proveniente dos alimentos. As principais ERO distribuem-se em dois grupos, que são aqueles formados pelos radicais livres hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ), superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ) e alcoxila ( $\text{RO}^\bullet$ ), e pelas espécies não radicalares oxigênio ( $\text{O}_2$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ). Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ) (HALLIWELL, 1999a; CHATGILIALOGLU, 2001; WISEMAN, 1995; CADET, 1999). Enquanto alguns deles podem ser altamente reativos no organismo atacando lipídios, proteínas e o DNA, outros são reativos apenas com os lipídios. Existem ainda alguns que são pouco reativos, mas apesar disso podem gerar espécies danosas.

#### 1.3.1.1. O papel do radical hidroxila no estresse oxidativo

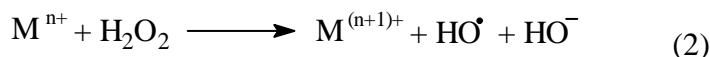
O radical  $\text{HO}^\bullet$  é o mais deletério ao organismo, pois devido a sua meia-vida muito curta dificilmente pode ser seqüestrado *in vivo*. Os radicais altamente reativos como  $\text{HO}^\bullet$  freqüentemente atacam as moléculas por abstração de hidrogênio. Porém não menos importante é o ataque por adição a insaturações. Nos experimentos de laboratório o radical hidroxila facilmente pode ser seqüestrado *in vitro* por inúmeras moléculas devido a sua alta reatividade. No entanto, para que os resultados *in vitro* se reproduzam *in vivo*, é necessário ministrar alta concentração do antioxidante para que este alcance o local onde o radical  $\text{HO}^\bullet$  está presente em concentração suficiente para suprimi-lo. Existem duas maneiras de controlar a presença do radical  $\text{HO}^\bullet$ , reparar os danos causados por ele ou inibir a sua formação, vez que ele origina-se e ataca no mesmo sítio.

O radical  $\text{HO}^\bullet$  é formado no organismo principalmente por dois mecanismos; a) reação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  com metais de transição; b) homólise da água por exposição à radiação ionizante (HALLIWELL, 1992) (Equação 1). A radiação ultravioleta produz o radical  $\text{HO}^\bullet$  nas células da pele e, a radiação  $\gamma$  e raios X produzem este radical onde incidem. O acúmulo de mutações no DNA produzido pelo ataque intenso do radical hidroxila pode levar ao desenvolvimento de câncer em seres humanos no período de 15 a 20 anos.

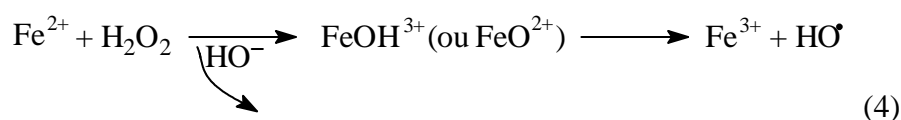




O peróxido de hidrogênio isoladamente é praticamente inócuo, porém ele pode difundir-se facilmente através das membranas celulares como, por exemplo, a membrana do núcleo. Devido ao fato da célula possuir metais de transição em seu interior o  $\text{H}_2\text{O}_2$  gera o radical  $\text{HO}^\bullet$  no interior da mesma (SARMA, 1999) (Equação 2).



Em nosso organismo, os metais de transição mais importantes para a ocorrência dessa reação são o  $\text{Cu}^{1+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$ . Nesse sistema a importância do ferro é mais pronunciada devido a sua maior biodisponibilidade. O ferro no organismo na maior parte do tempo encontra-se complexado com proteínas de transporte (ex. transferrina), e armazenamento (ex. ferritina e hemosiderina). A reação do  $\text{Fe}^{2+}$  com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é denominada reação de *Fenton* e pode ser representada de maneira simplificada (Equação 3) ou de forma mais complexa (Equação 4).



O radical hidroxila causa danos ao DNA, RNA, proteínas, lipídios e membranas celulares, do núcleo e mitocondrial, podendo atacar o DNA tanto nas bases nitrogenadas quanto na desoxirribose. O ataque ao açúcar pelo  $\text{HO}^\bullet$  pode ser realizado por abstração de um dos átomos de hidrogênio (**30**, **31**, **32**) (Figura 8, p. 18). Esse ataque quase sempre leva a ruptura da cadeia de DNA (HALLIWELL, 1999a; CHATGILIALOGLU, 2001; WISEMAN, 1995; CADET, 1999). O mecanismo dessa ruptura tem como principais produtos 5'-8-ciclo-2'-desoxiadenosina 8OHdA (**33**) e 5'-8-ciclo-2'-desoxiguanosina 8OHdG (**34**). O radical  $\text{HO}^\bullet$  é eletrofílico por natureza, fato que possibilita a sua interação com as bases nitrogenadas por adição às insaturações nos sítios de alta densidade eletrônica. Assim reage com as bases púricas por adição a C-4 e C-8, além de C-5 em menor proporção, gerando 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapyG) (**35**), 4,6-diamino-5-formamido-pirimidina (FapyA) (**36**), 8-oxo-7,8-diidro-2'-desoxiguanosídeo (8-oxoG) (**37**), 8-oxoA (**38**) (BERGER, 1999). O ataque às bases pirimidínicas dá-se por adição à ligação dupla  $\Delta^{5,6}$ , e produz os radicais livres em C-6 e C-5 nas proporções aproximadamente de 70% e 30% respectivamente, gerando 5-hidroxi-6-hidrocitosina, 6-hidroxi-5-hidrocitosina, 5-hidroxi-6-peroxicitosina, 6-hidroxi-5-peroxicitosina, 5-hidroxi-6-oxocitosina e 6-hidroxi-5-oxocitosina. Os radicais peroxila podem decompor-se gerando a citosinaglicol que é o produto majoritário. A timina sofre a adição do radical hidroxila à ligação dupla  $\Delta^{5,6}$ , formando os radicais livres em C-5 e C-6, e em menor

teor o radical decorrente da abstração de um próton da metila em C-5, que gera 5-hidroxi-6-hidrotimina, 6-hidroxi-5-hidrotimina, 5-hidroxi-6-oxotimina e timinaglicol como principal produto (HALLIWELL, 1999a; CHATGILIALOGLU, 2001; WISEMAN, 1995; CADET, 1999).

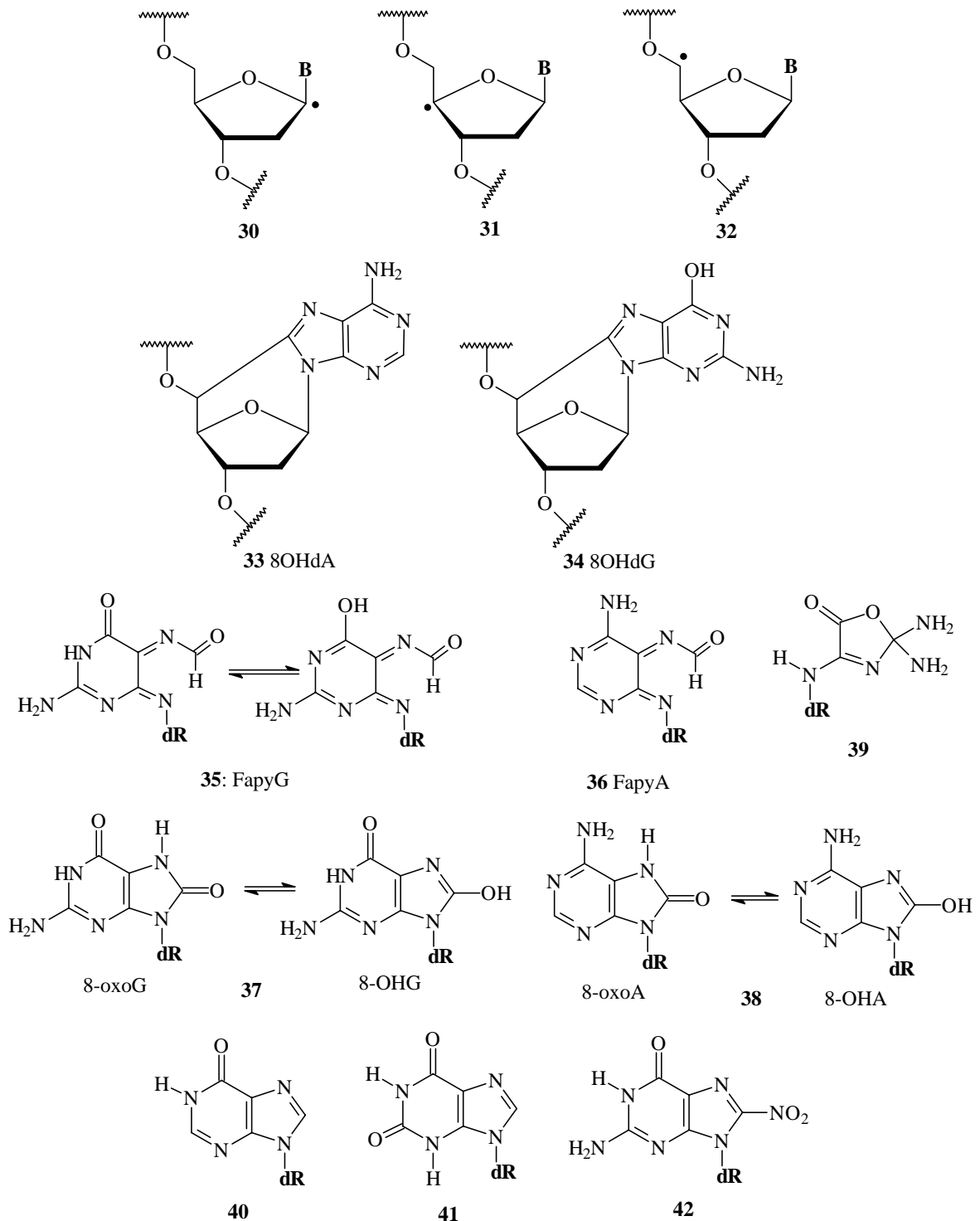


Figura 8 – Principais produtos da oxidação do DNA por ERO e ERN

Nos aminoácidos e proteínas o radical hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ) pode reagir na cadeia lateral. Ataca preferencialmente cisteína, histidina, triptofano, metionina e fenilalanina, e em menores proporções arginina e asparagina (BERGER, 1999).

Os ataques aos aminoácidos que compõem as proteínas podem gerar danos como fragmentações, clivagens e ligações cruzadas, o que pode ter como conseqüência perda de atividade enzimática, dificuldades no transporte ativo através das membranas celulares, citólise e morte celular. Esse ataque pode dar-se por adição do radical hidroxila ou por abstração de hidrogênio. Todos os aminoácidos podem sofrer abstração do hidrogênio do carbono  $\text{C}\alpha$  -COOH ligado à carboxila e ao grupo amino. Essa abstração, com exceção da glicina, leva a perda de  $\text{CO}_2$  e formação de carbono radicalar (BERGER, 1999). Na Figura 9 (p. 20) são mostrados os principais produtos dessas reações, destacando-se o tiohidroperóxido (**43**), cistina (**44**) (SCHÖNEICH, 1999), 2-hidroxi-histidina (**45**) em equilíbrio com a 2-oxo-histidina (**46**) (ZHAO, 1997), metionina sulfóxido (**47**), metionina sulfona (**48**) (VOGT, 1995), derivados da arginina, lisina e prolina (**49**, **50** e **51**), nitroacetato (**52**), oxima (**53**), hidroxilamina (**54**) (VOGT, 1995) e oxalato (**55**) (BERGER, 1999).

Como exemplo do ataque de radicais hidroxila a lipídios temos a ação deste radical nos lipídios de membrana. Os radicais livres centrados no oxigênio como os radicais  $\text{HO}^\bullet$  atacam a cadeia lipídica em sítios susceptíveis como o grupo metilênico alílico, convertendo este em novo centro de radical livre. Esse carbono radicalar facilmente adiciona oxigênio gerando o radical lipídio-peroxila, que pode facilmente atacar as proteínas de membrana, produzindo danos nas células.

Os ácidos graxos poliinsaturados são mais susceptíveis ao ataque por radicais livres, pois possuem o carbono metilênico *bis*-alílico. O radical formado pela abstração do hidrogênio desse grupo metilênico gera os ácidos hidroperoxioctadecadienóicos (HPODE), 13-*Z,E*-HPODE, 9-*E,Z*-HPODE, 9-*E,E*-HPODE e 13-*E,E*-HPODE e, a decomposição destes gera os aldeídos  $\alpha,\beta$ -insaturados 4-hidroperoxi-2-nonenal, 4-hidroxi-2-nonenal (**62**), 4-oxo-2-nonenal (**63**) e 4,5-epóxi-2(*E*)-decenal (**64**). Esses aldeídos  $\alpha,\beta$ -insaturados são conhecidos por sua ação genotóxica, pois em presença do 2'-desoxiguanosídeo e do 2'-desoxiadenosídeo sofrem adição gerando heptanona-eteno-desoxiguanosídeo (**65**), heptanona-eteno-desoxiadenosídeo (**66**), eteno-desoxiadenosídeo (**67**), eteno-adenosídeo, hexanol-1,N2-propano-desoxiguanosídeo (**68**). A decomposição dos ácidos graxos com três ou mais insaturações gera como produto adicional o aldeído malônico (**69**), que também pode se adicionar ao 2'-

desoxiguanosídeo gerando pirimidol-[1,2-a]-purin-10-ona deoxiguanosídeo (**70**) (Figura 10, p. 21) (BLAIR, 2001).

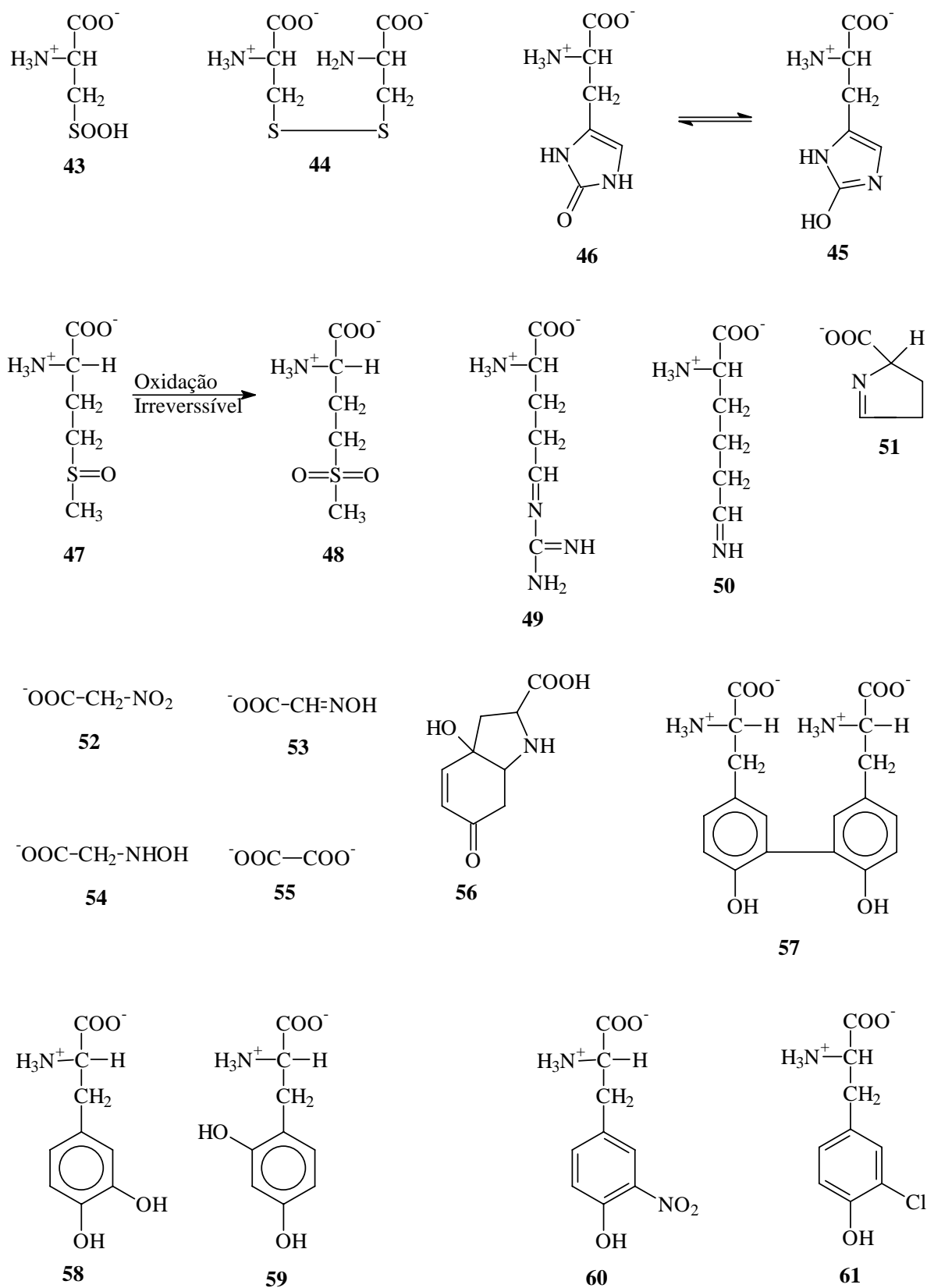


Figura 9 – Principais produtos da oxidação dos aminoácidos e proteínas por ERO e ERN

### 1.3.1.2. O papel do oxigênio no estresse oxidativo

A forma mais deletéria do oxigênio ao organismo é o oxigênio simples ( $^1\text{O}_2$ ). Esse é a causa ou o intermediário da toxicidade fotoinduzida do  $\text{O}_2$  em organismos vivos. O seu tempo de meia-vida depende muito do meio onde se encontra. Na estratosfera é da ordem de minutos, em meio aquoso sua meia-vida é muito pequena, pois ele choca-se com as moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  transferindo sua energia, desativando-se retornando a forma de oxigênio tripleto. Em meio orgânico é mais comum a ocorrência de choque com transferência de energia, sem reação química, seguida da dissipação dessa energia na forma de calor. Esse tipo de choque é denominado “Quenching” colisional e representa a forma como a água desativa o  $^1\text{O}_2$ . Porém, em meio orgânico a meia-vida do oxigênio simples é maior e, portanto ele pode causar algumas reações químicas com determinados aceptores por incorporação do  $\text{O}_2$ .

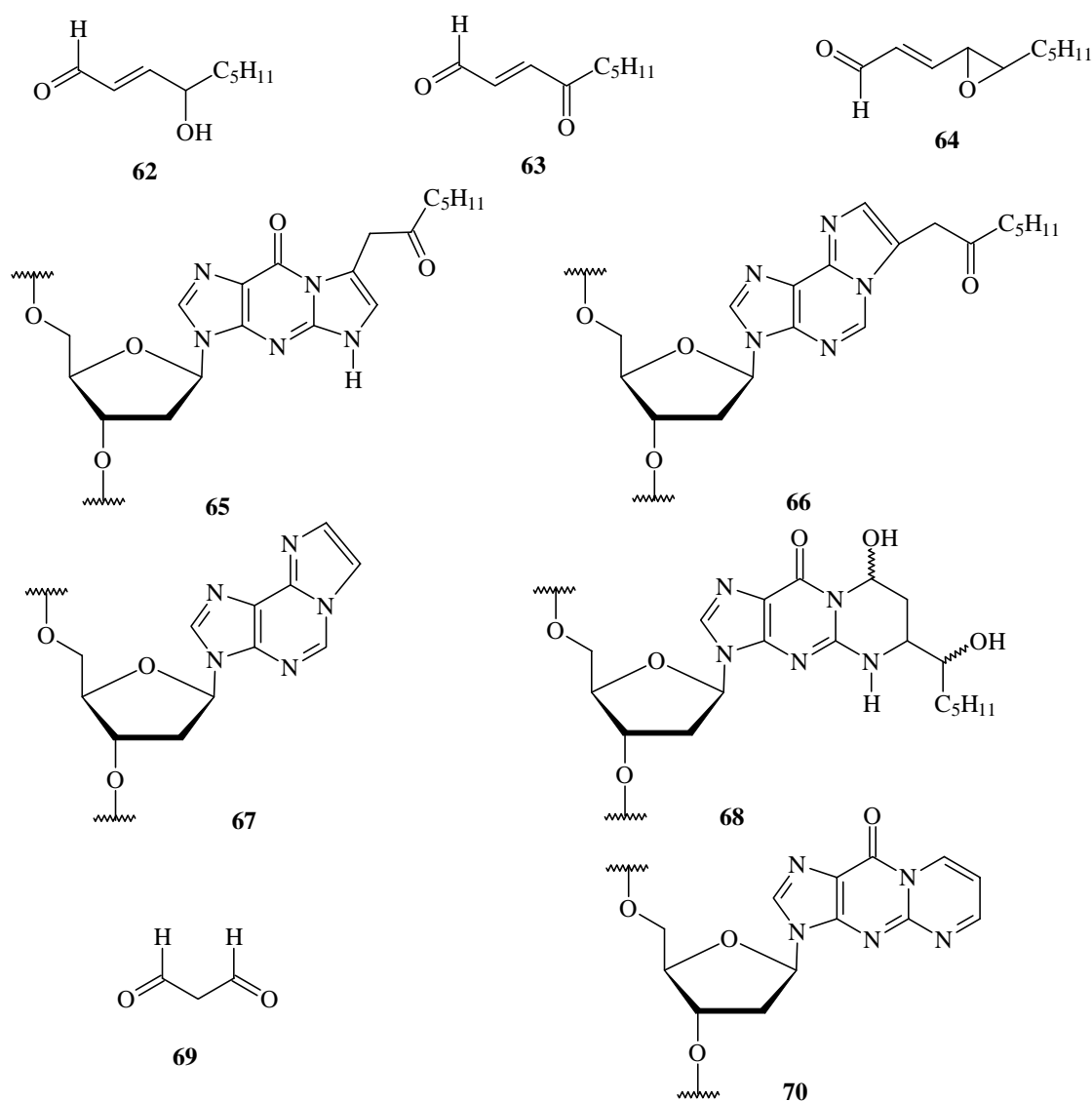
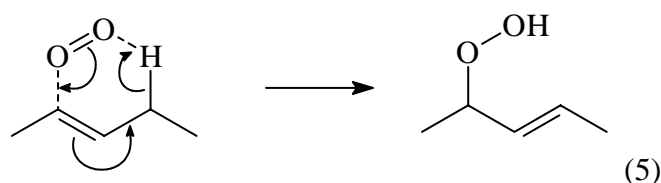


Figura 10- Aldeídos genotóxicos produzidos pela da oxidação dos lipídios por ERO e ERN, e produtos resultantes de seu ataque ao DNA

O oxigênio simpleto reage com algumas classes de biomoléculas, e em geral essas reações são do tipo eno (Equação 5) e dieno (Reações de Diels-Alder). Os compostos naturais mais reativos frente ao  $^1\text{O}_2$  são os carotenóides, devido ao fato da velocidade da reação aumentar quando o substrato apresenta múltiplas insaturações ou insaturações conjugadas. Assim, o  $^1\text{O}_2$  reage mais lentamente com os ácidos graxos do que com o  $\beta$ -caroteno, e quanto maior o número de insaturações presentes nos ácidos graxos, mais rapidamente eles irão reagir. Essa reação se dá por incorporação do oxigênio à cadeia com conseqüente migração da ligação dupla formando ácidos hidroperóxidos como os HPODE (LARSON, 1997).



Na Figura 9 são vistos os produtos da reação do  $^1\text{O}_2$  com os aminoácidos cisteína, metionina, triptofano, tirosina e histidina (JIN, 1995). A reação do oxigênio simpleto com os ácidos nucleicos é significativa apenas para a base guanina, que origina 8OHG (37) (Figura 8, p. 18).

#### 1.3.1.3. O papel do peróxido de hidrogênio no estresse oxidativo

O peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) é pouco reativo frente às moléculas orgânicas na ausência de metais de transição. No entanto, ele exerce papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de transpor as membranas celulares facilmente e gerar o radical hidroxila. Sozinho ele não oxida a maioria das moléculas orgânicas, com exceção de proteínas que apresentem resíduos de metionina ou grupos tiol muito reativos a exemplo da GSH.

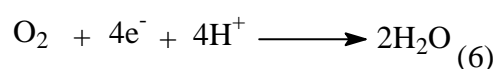
O peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) é gerado *in vivo* pela dismutação do radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), ou é produzido por enzimas oxidases e pela  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos. As mitocôndrias são importante fonte de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e, como a presença deste radical pode causar sérios danos, elas são ricas em SOD que o converte em  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O peróxido de hidrogênio gerado é então parcialmente eliminado por catalases, glutatona peroxidase e peroxidases ligadas a tioredoxina, mas como essa eliminação tem baixa eficiência, grande parte do  $\text{H}_2\text{O}_2$  é liberado para o resto da célula (HALLIWELL, 2000b; BABIOR, 2000).

O  $\text{H}_2\text{O}_2$  está presente em bebidas como chás verde e preto e principalmente café instantâneo e, rapidamente se difunde pelas células da cavidade oral e do trato gastrointestinal. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  também é produzido por bactérias presentes na boca, sendo utilizado pela peroxidase salivar para oxidar o tiocianeto ( $\text{SCN}^-$ ) em tiocianato ( $\text{OSCN}^-$ ), um produto tóxico para certas

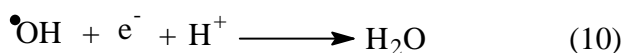
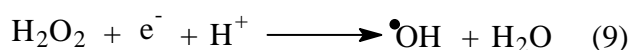
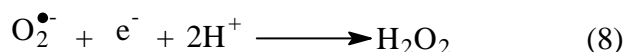
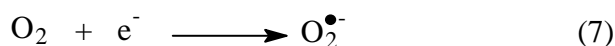
bactérias. Ele é também utilizado pelos fagócitos na produção de ácidos hipohalogenosos, que são oxidantes muito efetivos no combate a vírus, bactérias e outros corpos estranhos, mas que por outro lado apresentam efeitos deletérios quando expostos às moléculas biológicas (VOGT, 1995; HALLIWELL, 2000b).

#### 1.3.1.4. O papel do radical ânion superóxido no estresse oxidativo

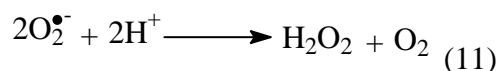
A maior fonte de energia para os organismos aeróbicos está na terceira etapa da respiração, que ocorre no interior da mitocôndria, onde uma molécula de  $O_2$  é reduzida a duas moléculas de  $H_2O$ , com o consumo de 4 elétrons (Equação 6).



Como esses elétrons são transferidos em etapas monoelétrônicas são gerados produtos de redução parcial. A redução do  $O_2$  por um elétron produz o radical ânion superóxido (Equação 7). Esse radical ânion superóxido por sua vez é reduzido por um elétron produzindo o peróxido de hidrogênio (Equação 8). A transferência de mais um elétron para o  $H_2O_2$  gera o radical hidroxila (Equação 9) e a primeira molécula de  $H_2O$ . Finalmente a redução do radical hidroxila produz a segunda molécula de água (Equação 10) (BABIOR, 1997).

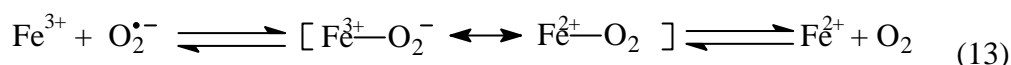


O radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) ao contrário da maioria dos radicais livres é inativo. Em meio aquoso sua reação principal é a dismutação, na qual se produz uma molécula de peróxido de hidrogênio e uma molécula de oxigênio (Equação 11). Ele também é uma base fraca, cujo ácido conjugado, o radical hidroperóxido ( $HOO^{\bullet}$ ) (Equação 12), é muito mais reativo que ele.



O radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) participa de certos processos químicos importantes no contexto biológico. O principal deles, e também um de seus efeitos mais deletérios ao

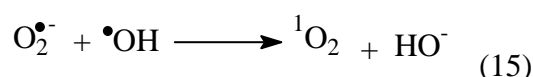
organismo é auxiliar na produção de radical HO<sup>•</sup>. O superóxido pode reduzir certos quelatos de Fe (III) (Equação 13).



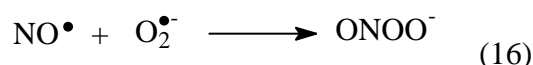
Uma vez que o Fe<sup>+2</sup> reage com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela reação de Fenton (Equação 3) produzindo o radical hidroxila, o papel do radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> na produção de radical HO<sup>•</sup> pode ser resumido pela equação de Haber-Weiss (Equação 14) (HALLIWELL, 1992; KEHRER, 2000).



Além de sua participação direta na geração de radical HO<sup>•</sup> através da reação de Haber-Weiss, o radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> possui a habilidade de liberar Fe<sup>2+</sup> das proteínas de armazenamento e de ferro-sulfo proteínas, tais como ferritina e aconitase, respectivamente. O radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> também reage com o radical HO<sup>•</sup> produzindo oxigênio simpleto <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (Equação 15).



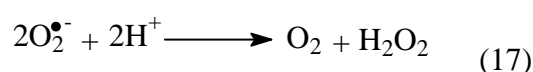
Este radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> reage também com o óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) produzindo peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) (Equação 16), que pode gerar produtos tão danosos quanto o radical hidroxila ou, liberar novamente óxido nítrico que em baixas concentrações tem efeito relaxante muscular.



O radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> também age como vasoconstritor, elevando a pressão arterial, fato que pode ser prejudicial em determinadas situações. A interação dos radicais O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e NO<sup>•</sup> tanto pode ser danosa à célula, quanto pode ser reguladora do tônus vascular (BABIOR, 1997).

A atuação do radical ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) como oxidante direto é irrelevante. Este é incapaz de oxidar os ácidos nucleicos, e entre os aminoácidos, o único que sofre oxidação com o radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> é a cisteína. A partir dessa reação forma-se um superóxido (43) e o tio-radical (44) vistos anteriormente (Figura 8) (HALLIWELL, 2000b; BABIOR, 2000).

O radical ânion superóxido O<sub>2</sub><sup>•-</sup> presente no organismo é eliminado pela enzima superóxido dismutase que catalisa a dismutação de duas moléculas de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> em oxigênio e peróxido de hidrogênio (Equação 17).



A dismutação do O<sub>2</sub><sup>•-</sup> está longe de reduzir os efeitos deletérios do radical ânion superóxido no organismo. Ao contrário, essa causa aumento do seu potencial deletério, visto



que o peróxido de hidrogênio gerado não eliminado do organismo pelas enzimas peroxidases e catalase pode gerar radicais hidroxila (HALLIWELL, 2000b; BABIOR, 2000).

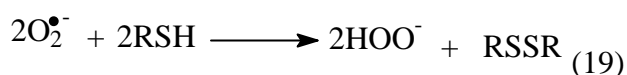
Apesar destes efeitos danosos, o radical  $O_2^{\bullet-}$  tem vital importância para as células de defesa e sem ele o organismo está desprotegido contra infecções causadas por vírus, bactérias e fungos. O radical  $O_2^{\bullet-}$  é propositalmente gerado *in vivo* por fagócitos ou outras células de defesa como linfócitos e fibroblastos durante o processo inflamatório para combater corpos estranhos. Os fagócitos o produzem com o auxílio da enzima leucócito NADPH oxidase, que catalisa a redução por um elétron do  $O_2$  com gasto de uma molécula de NADPH (Equação 18) (HALLIWELL, 2000b; BABIOR, 2000; BABIOR, 1997).



O radical ânion superóxido formado é bactericida fraco, capaz de inativar proteínas ferro-sulfurosas das bactérias, porém ele gera alguns produtos que possuem forte atividade antimicrobiana tais como ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) que são os principais responsáveis pelo combate a corpos estranhos.

Em alguns casos o radical  $O_2^{\bullet-}$  age como antioxidante, reduzindo semiquinonas para que elas possam retomar as suas atividades metabólicas na célula. Um exemplo é a redução da ubiquinona para ubiquinol no interior da mitocôndria (HALLIWELL, 2000b; BABIOR, 2000; BABIOR, 1997).

Por fim, o radical ânion superóxido funciona como sinalizador molecular através da sua capacidade de oxidar grupos  $-SH$  em ligações dissulfeto (Equação 19), podendo ativar e desativar enzimas que contenham metionina.



#### 1.3.1.5. O papel das ERN no estresse oxidativo

O radical óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) pode ser produzido no organismo pela ação da enzima óxido nítrico sintase a partir da arginina, oxigênio e NADPH, gerando também  $NADP^+$  e a citrulina (TAMIR, 1996). Esse radical também pode ser produzido em maiores quantidades através dos fagócitos humanos quando estimulados (HALLIWELL, 1999a; CHATGILIALOGLU, 2001; WISEMAN, 1995; CADET, 1999; HALLIWELL, 2000b; BABIOR, 2000). O nitrato pode transformar-se em nitrito e, este reage com os ácidos gástricos gerando o ácido nitroso ( $HNO_2$ ). O óxido nitroso ( $N_2O_3$ ) também é precursor do  $HNO_2$  através da sua reação com a água. O ácido nitroso e o óxido nítrico são importantes bactericidas. Entretanto a ingestão de

alimentos ricos nestas substâncias devido a sua alta mutagenicidade, pode levar ao câncer de estômago. O  $\text{HNO}_2$  promove a desaminação das bases do DNA que contém grupo  $-\text{NH}_2$  livre que são a citosina, adenina e guanina formando-se a uracila, hipoxantina (**40**) e xantina (**41**) respectivamente (HALLIWELL, 1999a; CHATGILIALOGLU, 2001; WISEMAN, 1995; CADET, 1999). O óxido nítrico  $\text{NO}^\bullet$  não é suficientemente reativo para atacar o DNA diretamente, mas ele pode reagir com o radical ânion superóxido  $\text{O}_2^{\bullet-}$  produzido pelos fagócitos gerando o peroxinitrito. Esse último, por sua vez, pode sofrer reações secundárias formando agentes capazes de nitrar aminoácidos aromáticos, a exemplo da tirosina gerando nitrotirosina (**60**) e as bases do DNA, em particular a guanina, na qual o produto principal é a 8-nitroguanina (**42**) (HALLIWELL, 1999a; CHATGILIALOGLU, 2001; WISEMAN, 1995; CADET, 1999; HALLIWELL, 2000b; BABIOR, 2000; EISERICH, 1996). A presença do tampão  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  contribui para a nitração de biomoléculas pois o carbonato ao ser protonado forma o radical bicarbonato ( $\text{HCO}_3^\bullet$ ), e este oxida anéis aromáticos, produzindo bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) e o radical aromático correspondente. A formação do radical aromático facilita a entrada do radical  $\text{NO}_2^\bullet$  (DENICOLA, 1996).

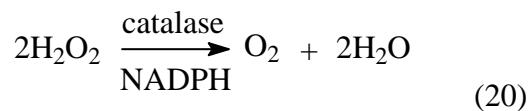
### 1.3.2. A Proteção ao Organismo Contra o Estresse Oxidativo

Os radicais livres promovem reações com substratos biológicos podendo ocasionar danos às biomoléculas, e conseqüentemente afetar a saúde humana. Os danos mais graves são aqueles causados ao DNA e RNA. Se a cadeia do DNA é quebrada, ela pode ser reconectada em outra posição, alterando assim a ordem de suas bases. Este é um dos processos básicos da mutação e pode desencadear a oncogênese. Uma enzima que tenha seus aminoácidos alterados pode perder a sua atividade ou ainda assumir atividade diferente. Enquanto que, ocorrendo na membrana celular, a oxidação de lipídios interfere no transporte ativo e passivo normal através da membrana ou, ocasiona a ruptura dessa, levando a morte celular. A oxidação de lipídios no sangue agride as paredes das artérias e veias, facilitando o acúmulo desses lipídios, com conseqüente aterosclerose, podendo causar trombose, infarto ou acidente vascular cerebral (AVC). As proteções conhecidas do organismo contra as ERO e ERN abrangem a proteção enzimática também denominada proteção por macromoléculas, e a proteção por micromoléculas, que têm origem no próprio organismo ou são adquiridas na dieta.

As macromoléculas são representadas pelas enzimas e podem atuar diretamente contra as ERO e ERN ou ainda reparar os danos causados por essas espécies ao organismo. Um

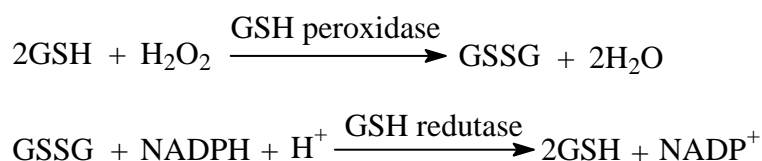
exemplo é a catalase (CAT) que converte o peróxido de hidrogênio em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>. Outras são capazes de eliminar a molécula ou a unidade dessa que se encontra danificada, como por exemplo, as enzimas responsáveis pela excisão das bases nitrogenadas danificadas e substituição destas por outras intactas. Observa-se que o acúmulo ao longo dos anos dessas bases danificadas pode ocasionar um câncer (HALLIWELL, 1999a; CHATGILIALOGLU, 2001; WISEMAN, 1995; CADET, 1999; BABIOR, 1997).

O sistema de prevenção ou atuação direta contra as espécies nocivas ERO e ERN é formado por três sistemas enzimáticos antioxidantes. O primeiro desses sistemas é composto por dois tipos de enzimas superóxido dismutase (SOD), que catalisam a destruição do radical ânion superóxido O<sub>2</sub><sup>•-</sup> convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio. A decomposição do radical ânion superóxido O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ocorre naturalmente, porém por ser uma reação de segunda ordem, necessita que ocorra colisão entre duas moléculas de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, de forma que há necessidade de maior concentração do radical ânion superóxido. A presença da enzima SOD favorece essa dismutação tornando a reação de primeira ordem, eliminando a necessidade de choque entre as moléculas. Desse modo a velocidade da reação torna-se independente da concentração de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> no meio. A ação desta enzima permite a eliminação do O<sub>2</sub><sup>•-</sup> mesmo em baixas concentrações. Existem duas formas de SOD no organismo, a primeira contém Cu<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup> como centros redox. Esta ocorre no citosol e a sua atividade não é afetada pelo estresse oxidativo. A segunda contém Mn<sup>2+</sup> como centro redox, ocorre na mitocôndria e a sua atividade aumenta com o estresse oxidativo (BABIOR, 1997). O segundo sistema de prevenção é muito mais simples, sendo formado pela enzima catalase que atua na dismutação do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em oxigênio e água (Equação 20), de acordo com a equação apresentada a seguir (BABIOR, 1997).

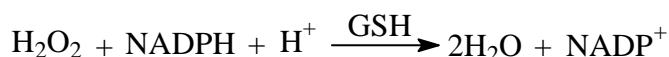


O terceiro sistema é composto pela micromolécula glutathiona (GSH) em conjunto com duas enzimas que são a glutathiona peroxidase (GPx) e a glutathiona redutase (GR). A glutathiona peroxidase (GPx) possui como elemento ativo em seu centro redox o selênio (Se) ligado a uma unidade de cisteína (selenocisteína). A presença do selênio na enzima explica a importância desse metal e sua atuação como antioxidante nos organismos vivos. Esse sistema também catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, sendo que a glutathiona opera em ciclos entre sua forma oxidada e sua forma reduzida, também com o

consumo de uma molécula de NADPH (BABIOR, 1997). O esquema da reação apresenta-se a seguir.



Reação geral:



Muitas substâncias de baixo peso molecular presentes em nosso organismo podem atuar como antioxidantes biológicos. Dentre elas podem ser destacados os carotenóides, a bilirrubina, a ubiquinona e o ácido úrico. Porém, as mais importantes micromoléculas no combate ao estresse oxidativo são os tocoferóis e o ácido ascórbico (vitamina C) (BABIOR, 1997).

#### 1.3.2.1. O papel da vitamina C no ciclo oxidativo

O ácido ascórbico ou vitamina C é comumente encontrado em nosso organismo na forma de ascorbato (**71**). Por ser muito solúvel em água, ele está localizado nos compartimentos aquosos dos tecidos orgânicos. O ascorbato desempenha papéis metabólicos fundamentais no organismo humano, atuando como agente redutor, reduzindo metais de transição (em particular  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ ) presentes nos sítios ativos das enzimas ou nas formas livres no organismo (HALLIWELL, 1999b; LEVINE, 1998; PODMORE, 1998).

Por ser um bom agente redutor o ascorbato (**71**) pode ser oxidado pela maioria das ERO e ERN que chegam ou são formadas nos compartimentos aquosos dos tecidos orgânicos. Sua oxidação produz inicialmente o radical semidesidroascorbato (**72**) que é pouco reativo. Esse radical pode ser reconvertido em ascorbato, ou duas moléculas dele podem sofrer desproporcionamento originando uma molécula de desidroascorbato (**73**) e regenerando uma molécula de ascorbato. O desidroascorbato pode ser então regenerado para ascorbato através de um sistema enzimático, ou ser oxidado irreversivelmente gerando oxalato (**74**) e treonato (**75**) (Figura 11, p. 29) (BABIOR, 1997; HALLIWELL, 1999b; LEVINE, 1998; PODMORE, 1998).

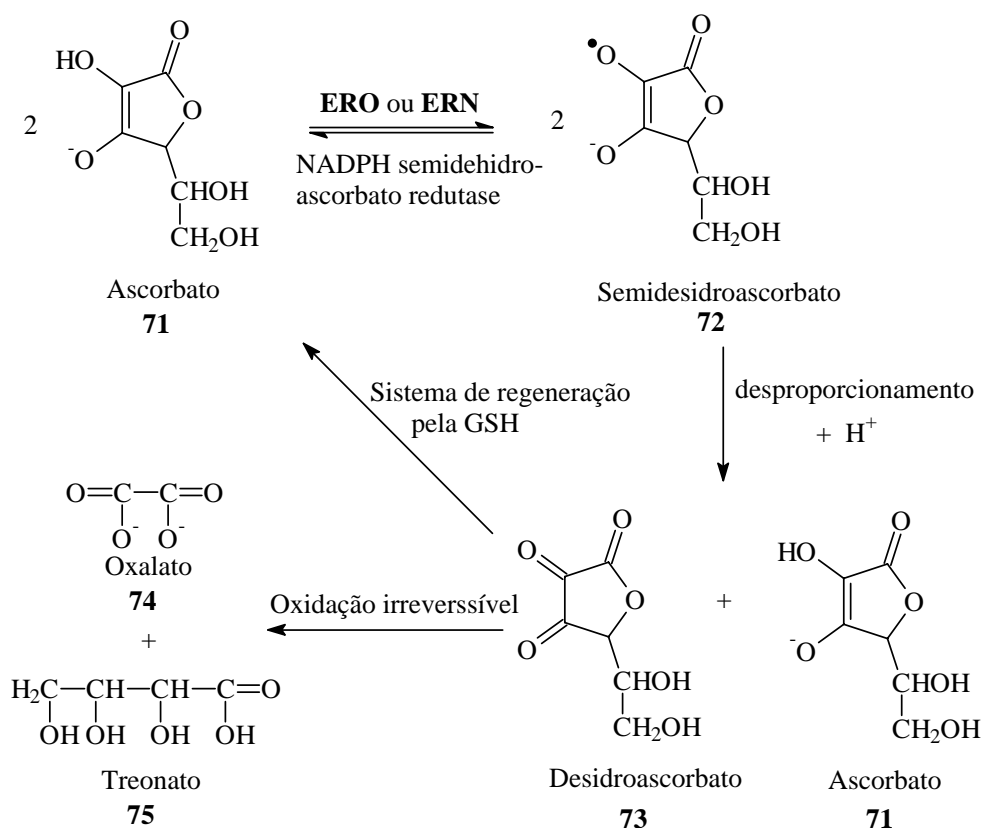


Figura 11 – Ciclo oxidativo do ascorbato

Tendo em vista que, o ascorbato converte as ERO e ERN em espécies inofensivas e que os derivados do ascorbato são pouco reativos, este age como antioxidante *in vivo* protegendo as biomoléculas contra danos causados por essas espécies reativas. Devido às propriedades antioxidantes do ascorbato, muitos autores sugerem ingestão diária de doses maiores dele, para a proteção contra o desenvolvimento de doenças crônicas. Porém o seu uso em altas doses é controverso e ainda está sendo debatido. Sabe-se que ele protege o organismo contra o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e de alguns tipos de câncer, em particular o de estômago (HALLIWELL, 1999b; LEVINE, 1998; PODMORE, 1998).

O ascorbato possui também propriedades pró-oxidantes. Por ser um bom agente redutor, ele reduz o  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  e o  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$  e, conforme referido anteriormente, esses íons de metais de transição reagem com o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) através da reação de *Fenton*, gerando o radical hidroxila. Indiretamente então o ascorbato pode induzir a reações de radicais livres. Porém, em função do Fe encontrar-se na maior parte do tempo ligado a proteínas de transporte ou armazenamento, em situação normal as propriedades antioxidantes do ascorbato suplantam suas propriedades pró-oxidantes (HALLIWELL, 1999b; LEVINE, 1998; PODMORE, 1998).

O ascorbato pode atuar contra a peroxidação de lipídios de duas maneiras. No plasma sanguíneo ele atua na prevenção através da reação com as ERO e ERN presentes, ou na restauração doando hidrogênio ao radical lipídio (76). Isso explica seu papel na prevenção de doenças cardiovasculares, devido ao fato que sem a formação dos radicais lipídio-peroxila (77) não ocorre o ataque as proteínas das paredes dos vasos e artérias sanguíneos, causando o acúmulo de lipídios nessas paredes e conseqüentemente o seu entupimento. Por outro lado nas membranas celulares ele atua em parceria com o  $\alpha$ -tocoferol (78). O radical livre normalmente abstrai um próton do carbono metilênico alílico, e o radical lipídio formado (76) rapidamente adiciona oxigênio tripleto gerando o radical lipídio-peroxila (77). Nesta etapa o tocoferol (78) age doando um hidrogênio para esse radical formando o lipídio-hidroperóxido (79) e o radical tocoferoxila (80). O ascorbato (71) na interface da membrana celular regenera o tocoferol doando um hidrogênio, se transformando em semidesidroascorbato (72). As enzimas fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), fosfolipídio hidroperóxido glutaciona peroxidase (PH-GSH-peroxidase), glutaciona peroxidase (GSH-peroxidase) e ácido graxo coenzima A (AG-CoA) restauram o lipídio (Figura 12, p. 31) (BUETTNER, 1993).

O papel do ascorbato na proteção à oxidação do DNA e conseqüentemente sua ação preventiva no câncer é um pouco controversa. Sabe-se que o consumo de ascorbato inferior ao recomendado (40-60mg/dia) aumenta a oxidação do DNA. Por exemplo, o consumo de 5mg/dia aumenta os níveis de 8OHdG em 91%. O consumo de 60mg/dia reduz os níveis de 8OHdG e 8OHG no organismo, reduzindo-se assim o risco de câncer, vez que essas espécies são altamente mutagênicas. Uma suplementação superior a 500mg/dia de ascorbato decresce ainda mais os níveis de 8OHdG e 8OHG. Porém ocorre o aumento nos níveis de 8OHA, Fapy-A e Fapy-G. Mesmo com o aumento dessas espécies, o processo é benéfico, pois o 8OHdG e o 8OHG têm maior poder mutagênico que 8OHA, Fapy-A e Fapy-G. Não está estabelecido se a queda nos níveis de 8OHdG e 8OHG é conseqüência direta da ação do ascorbato como antioxidante ou da sua atuação como cofator das enzimas de reparo. Além disso, os níveis de 8OHA, Fapy-A e Fapy-G só aumentam expressivamente quando a concentração de ascorbato no plasma sanguíneo está acima de 70 $\mu$ M. Como a ingestão de 100mg/dia promove uma concentração de 60 $\mu$ M no plasma, recomenda-se uma ingestão entre 100-200mg/dia para otimizar suas propriedades antioxidantes sem causar danos ao DNA (HALLIWELL, 1999b; LEVINE, 1998; PODMORE, 1998).

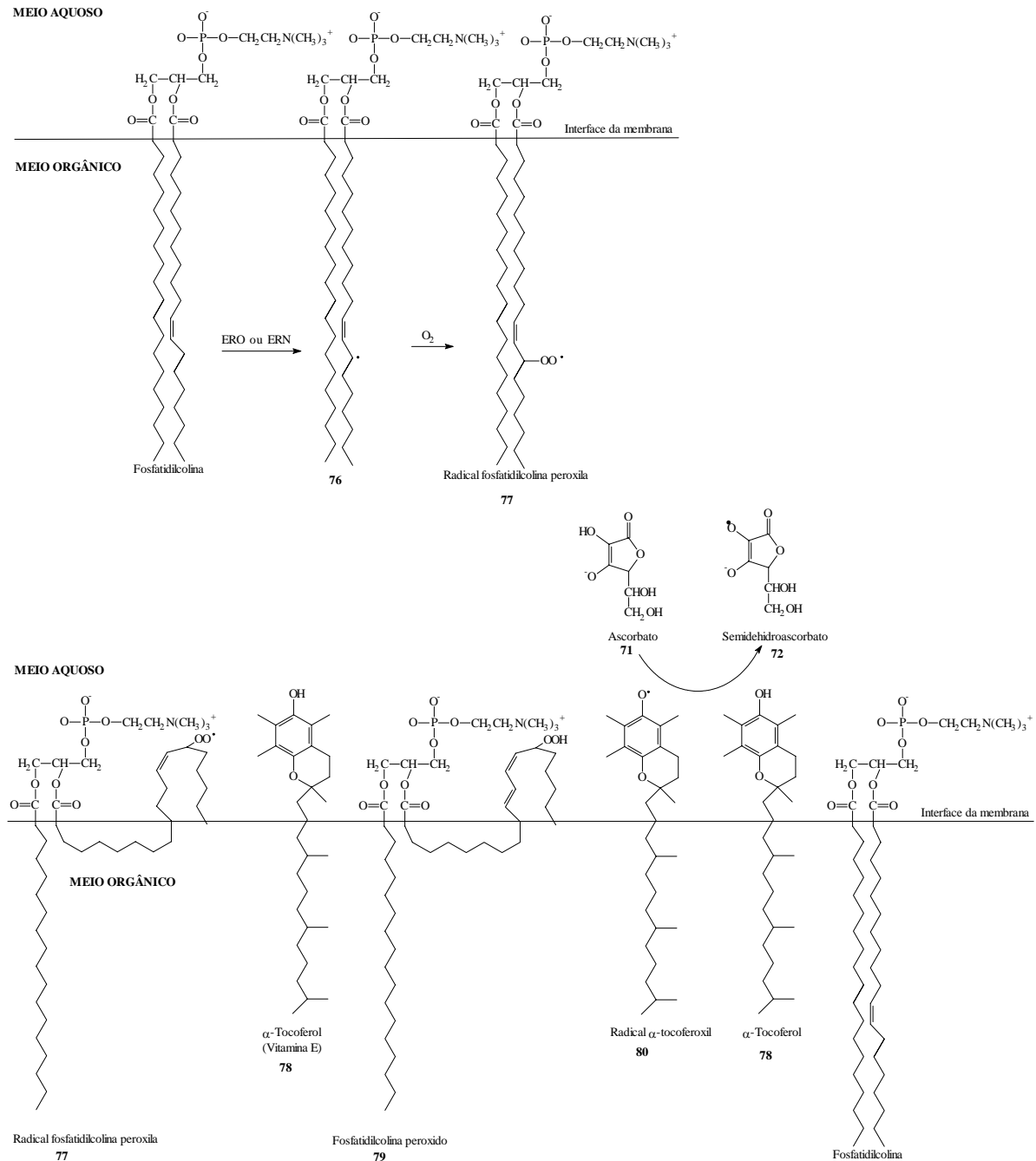


Figura 12 – Ataque à membrana celular e proteção pelo tocoferol e ascorbato

### 1.3.2.2. O papel da vitamina E no ciclo oxidativo

A vitamina E é constituída principalmente por quatro tocoferóis, e secundariamente por quatro tocotrienóis. Dentre os tocoferóis o  $\alpha$ -tocopherol (**78**) é o mais ativo e, o mais importante. As fontes mais comuns de tocoferóis são nozes, amêndoas, óleos vegetais comuns e gérmen de trigo. Enquanto que os tocotrienóis se concentram em cereais e certos óleos vegetais como óleo de palma (dendê) e de casca de arroz (THERIAUL, 1999).

Estudos comprovam que a vitamina E é um eficiente inibidor da peroxidação de lipídios *in vivo*. Os tocoferóis  $\alpha$  e, em menor proporção, os tocotrienóis, agem como doadores de H para o radical peroxila, interrompendo a reação radicalar em cadeia. Cada tocoferol pode reagir com até dois radicais peroxila, e nesse caso o tocoferol é irreversivelmente desativado. Para que os tocoferóis não se desativem eles necessitam do mecanismo de regeneração sinérgico com o ascorbato nas membranas celulares e com a ubiquinona na membrana mitocondrial (BUETTNER, 1993; JACOB, 1995) (Figura 9, p. 20).

A reação de doação do H radicalar fenólico para os radicais peroxila é acelerada pela presença de um grupo metoxi em *para*, pois este estabiliza o radical formado por ressonância e, grupos metila em *orto* ou em *orto* e *meta*. Ao mesmo tempo, essa reação é retardada quando a hidroxila fenólica encontra-se estericamente impedida por grupos alquil maiores em *orto*, ou quando ocorre a presença de um grupo retirador de elétrons em *para*. Deste modo, não é possível prever qual dos tocoferóis tem maior atividade. No entanto, estudos cinéticos realizados *in vitro* demonstram que o  $\alpha$ -tocoferol possui uma constante de velocidade grande ( $k = 235 \pm 50 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) para a transferência do H para um radical peroxila. Essa constante é maior do que para maioria dos antioxidantes sintéticos e ligeiramente superior aos outros tocoferóis:  $\beta$ -tocoferol ( $k = 166 \pm 33 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $\gamma$ -tocoferol ( $k = 159 \pm 42 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) e  $\delta$ -tocoferol ( $k = 65 \pm 13 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Esses resultados estão em acordo com o observado em testes *in vivo* (BURTON, 1981).

Observações do efeito cinético em  $\alpha$ -tocoferol com a hidroxila fenólica marcada com deutério confirmam que a reatividade reside na porção fenólica da molécula. Com base nessa observação foram avaliadas as constantes de velocidade de doação do H para o 2,3,5,6-tetrametil-4-metoxifenol (TMMP) (**81**) e do 2,2,5,7,8-pentametil-6-hidroxicromano (PMHC) (**82**). Observa-se que a constante de velocidade para o TMMP ( $k = 21 \pm 2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) representava apenas 9% da atividade do  $\alpha$ -tocoferol. Enquanto que para o PMHC ( $k = 214 \pm 81 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) é aproximadamente idêntica à atividade do  $\alpha$ -tocoferol. Esta aparente incoerência pode ser explicada por efeitos estéricos. A presença do grupo metoxi em *para* nos fenóis (**83**) aumenta a velocidade de doação do H radicalar. Isso é devido ao fato que o elétron não ligante do oxigênio metoxílico pode se deslocalizar migrando para o oxigênio do radical fenóxido (**84**) formando o íon fenolato, que é estabilizado por sua deslocalização com o anel aromático. O radical TMMP não apresenta esse aumento de velocidade na doação do H devido ao impedimento estérico dos grupos metila. Esses grupos promovem o deslocamento da metoxila por efeito estérico para fora do plano do anel aromático, de modo que o orbital *p* com o seu



par de elétrons fique no plano do anel aromático, inviabilizando assim a migração do elétron. Com o PMHC e os tocoferóis ocorre o aumento da velocidade de doação do H. Esse fato é explicado pela presença de um segundo anel com o oxigênio, que impede o giro do grupo e mantém o orbital  $p$  perpendicular ao anel aromático. Assim, torna-se possível a migração do elétron não ligante do oxigênio do anel para o orbital semipreenchido do oxigênio radicalar (85). Embora o  $\alpha$ -tocoferol e o PMHC apresentem atividades semelhantes *in vitro*, o PMHC apresenta pouca ou nenhuma atividade *in vivo*. Esse fato é explicado pela cadeia carbônica lateral dos tocoferóis que aumentam sua solubilidade nas biomembranas, sitio onde eles atuam (Figura 13, p. 33) (BURTON, 1981).

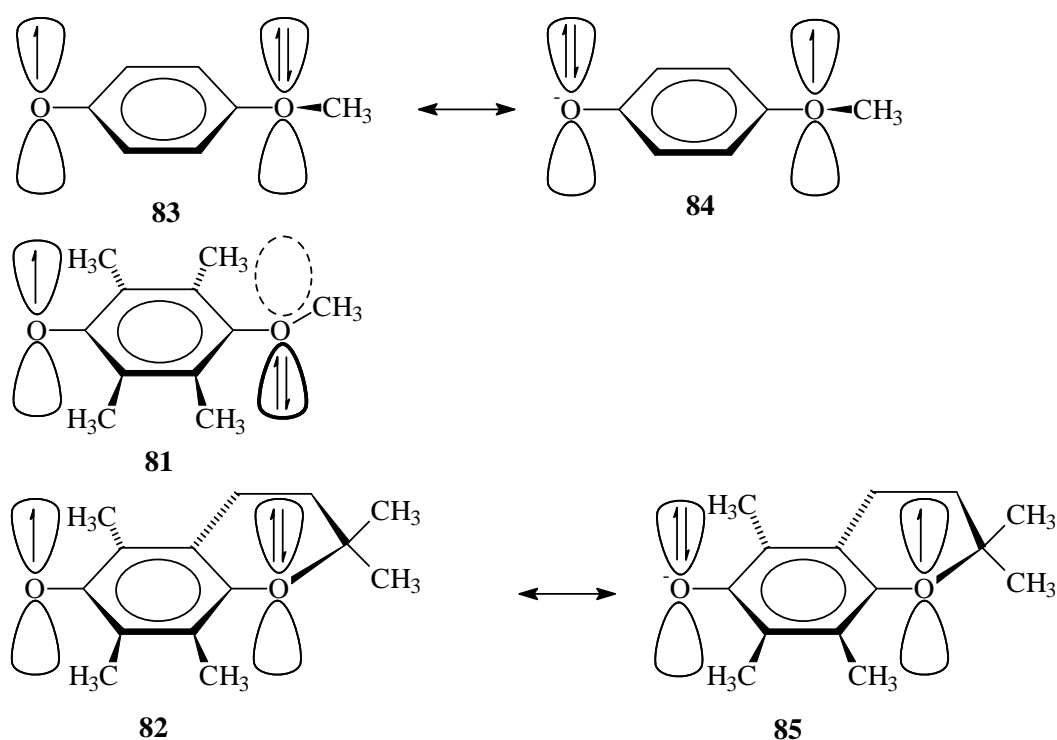


Figura 13 – Representação das estruturas dos radicais 4-metoxifenoxil, TMMP e PMHC com os orbitais dos átomos de oxigênio

Com base em observações estruturais é de se esperar que os tocotrienóis apresentem atividade semelhante à dos tocoferóis perante as ERO e ERN. Porém a atividade do  $\alpha$ -tocotrienol contra a peroxidação de lipídios é maior que a do  $\alpha$ -tocoferol, assim como a atividade dos tocotrienóis é maior que a dos respectivos tocoferóis. Essa diferença de atividade é justificada por uma distribuição mais uniforme na bicamada lipídica das membranas, que leva à interação mais eficiente do anel cromano com os radicais lipídicos e a maior eficiência na reciclagem do radical cromanoxil (THERIAUL, 1999).

### 1.3.2.3. O papel dos carotenóides e da vitamina A no ciclo oxidativo

Depois dos tocoferóis, os carotenóides são a segunda classe em importância de antioxidantes lipofílicos conhecida. Dentre os carotenóides, o  $\beta$ -caroteno é a mais importante fonte de vitamina A (BURRI, 1997; PALACE, 1999). Eles formam um tipo incomum de agentes redutores biológicos, pois reduzem melhor os produtos de oxidação a baixos níveis de oxigênio. Altos níveis de oxigênio levam a destruição dos carotenóides. Na maioria dos tecidos biológicos o nível de oxigênio é baixo, de modo que os carotenóides adquirem importância como antioxidantes. Os carotenóides agem *in vivo* como desativadores do oxigênio simpleto ou como seqüestradores dos radicais peroxila, reduzindo a oxidação do DNA e lipídios, que está associada a doenças degenerativas como o câncer e doenças cardíacas (BURRI, 1997; PALACE, 1999).

Estudos realizados com seres humanos revelaram que a diminuição no nível de carotenóides aumenta os danos causados pelo estresse oxidativo. Enquanto que uma suplementação retorna o estresse oxidativo aos níveis basais. O nível de ingestão mínimo é de 600 $\mu$ g/dia, representando  $\frac{1}{4}$  da ingestão média numa dieta normal. Estudos realizados com suplementação de 6 a 10 mg/dia de  $\beta$ -caroteno mostraram o aumento de sua presença no soro sanguíneo, associado à redução do risco de câncer e doenças cardíacas. Suplementações maiores entre 30-90 mg/dia (valor impossível de ser obtido na dieta) não apresentam sintomas de toxicidade. Porém 15% dos indivíduos apresentam amarelamento da pele, o que sugere que o  $\beta$ -caroteno não é metabolizado pelas rotas normais (BURRI, 1997; PALACE, 1999).

A principal atividade antioxidante dos carotenóides é a desativação do oxigênio simpleto, sendo que a velocidade para essa reação é superior a dos tocoferóis. A desativação do  $^1\text{O}_2$  pode se dar de duas formas, pela transferência física da energia de excitação do  $^1\text{O}_2$  para o carotenóide e pela reação química do carotenóide com o  $^1\text{O}_2$ . Em condições normais no organismo, 95% da desativação do  $^1\text{O}_2$  é física, restando somente 5% para reagir quimicamente, o que torna os carotenóides antioxidantes mais efetivos (BURRI, 1997; PALACE, 1999; MORDI, 1993).

Uma outra atividade recentemente estudada é aquela do seqüestro de radicais peroxila. Os radicais peroxila adicionam-se a dupla ligação 5-6, 5'-6' ou 15-15' da cadeia do caroteno. Estudos de mecanismo revelaram a preferência pela adição em 5,6 ou 5',6', gerando o radical altamente estabilizado por ressonância (**89**). Esse radical sofre então uma substituição homolítica intramolecular ( $\text{S}_{\text{H}1}$ ), originando os éteres cíclicos (**87** e **88**), interconversíveis em meio ácido, além do radical alcóxila (MORDI, 1993).

O processo completo de oxidação dos carotenóides pode ser dividido em duas etapas. Na primeira ocorre a formação de éteres cíclicos e compostos carbonílicos. Na segunda etapa os produtos primários são convertidos em compostos carbonílicos de cadeias menores, com liberação de CO<sub>2</sub> e ácidos carboxílicos (MORDI, 1993; WOODALL, 1997a; WOODALL, 1997b).

Os mecanismos propostos anteriormente esclarecem a atividade dos carotenóides frente ao oxigênio simpleto e os radicais peroxila. Porém não esclarecem a atividade contra outros radicais e se esses são capazes de interromper a reação radicalar em cadeia. Observa-se também a menor atividade antioxidante para os carotenóides que possuem substituição em 4 e/ou 4', em relação aos outros. Essas observações podem ser explicadas pela presença de carbonos metilênico em 4 e 4' vizinhos as insaturações conjugadas, que doam um hidrogênio para os radicais livres, devido ao fato do radical gerado ser extremamente estabilizado por ressonância (90) (WOODALL, 1997a; WOODALL, 1997b). A oxidação posterior é demonstrada na Figura 14 (p. 36).

Outro aspecto da atividade dos carotenóides diz respeito à polaridade. Aqueles que possuem grupos polares nos anéis A e B são efetivos na prevenção da oxidação das membranas. Essa polaridade os localiza de maneira tal que estão em contato mais próximo com a fase aquosa, reagindo com os radicais que penetram a membrana. Os apolares, tais como o licopeno e o  $\beta$ -caroteno são mais regeneradores que preventivos, combatendo os radicais formados com mais eficiência no interior da membrana (WOODALL, 1997a; WOODALL, 1997b). Os retinóides (vitamina A) possuem grupos polares que os localizam na membrana celular na região próxima a fase aquosa. No entanto, eles apresentam atividade antioxidante cerca de cinco vezes menor que a do  $\beta$ -caroteno. Essa queda na atividade deve-se provavelmente à menor conjugação destas estruturas, fato que torna o radical formado menos estabilizado por ressonância (BURRI, 1997; PALACE, 1999; WOODALL, 1997a; WOODALL, 1997b).

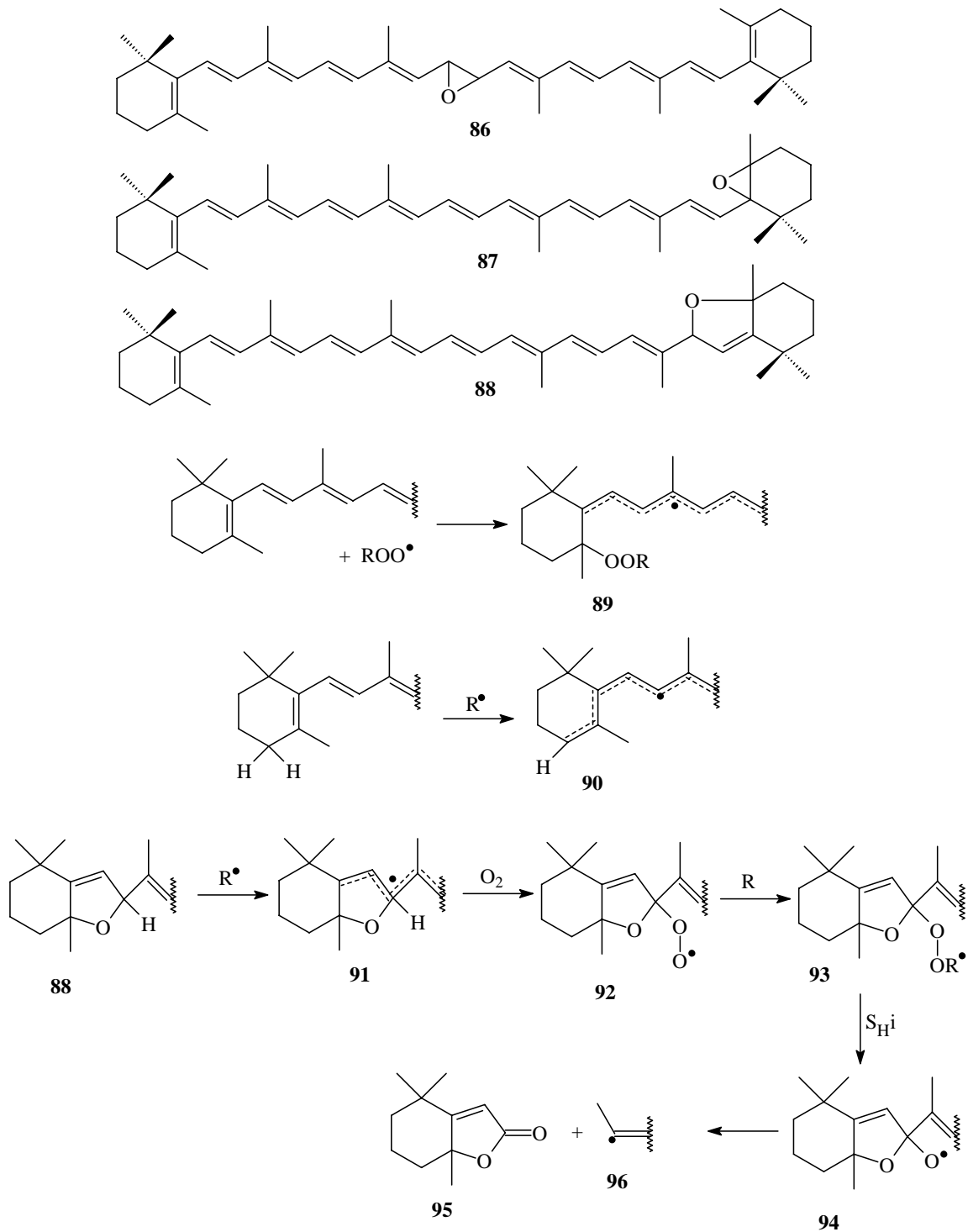


Figura 14 – Principais produtos do ciclo oxidativo do  $\beta$ -caroteno

#### 1.3.2.4. O papel da coenzima Q<sub>10</sub> no ciclo oxidativo

A coenzima Q<sub>10</sub> é uma quinona lipossolúvel que possui uma longa cadeia isoprenóide lateral. A ubiquinona é o único lipídio endogenamente sintetizado que apresenta função redox (NELSON, 2002). Embora de forma diferenciada e bem específica é biossintetizada por todas as células, o que a torna o maior constituinte da membrana mitocondrial interna, membrana

do complexo de Golgi e membrana dos lisossomos. Por outro lado, apenas poucas moléculas dela são encontradas na membrana do LDL. Essa variação na distribuição sugere funções diferentes para diferentes membranas biológicas. A ubiquinona ingerida como suplemento alimentar se distribui principalmente entre o fígado e o plasma sanguíneo, não sendo absorvida pelas membranas com concentração elevada desta substância. Nos humanos, a sua biossíntese é muito ativa até os 30 anos de idade, época que ocorre a estagnação de sua produção e, a partir desta idade os níveis de ubiquinona começam a decrescer. Estudos indicam que a administração de suplementos de ubiquinona possui efeito benéfico no tratamento de doenças do coração, degeneração muscular e outras doenças degenerativas (DALLNER, 2000; NOHL, 2001). Sua forma reduzida ubiquinol-10 (CoQH<sub>2</sub>) é uma hidroquinona que ocorre predominantemente no coração, rins e fígado e, a forma oxidada ubiquinona (CoQ<sub>10</sub>) é abundante no cérebro e no intestino (NOHL, 1998; BLIZNAKOV, 1999). A principal função da ubiquinona acontece na membrana mitocondrial interna, onde participa da cadeia de transporte de elétrons e translocação de prótons H<sup>+</sup> na mitocôndria, juntamente com os citocromos e as desidrogenases mitocondriais. As desidrogenases oxidam os NADH, NADPH e FADH<sub>2</sub> e transferem os prótons e os elétrons para a ubiquinona, convertendo-a em ubiquinol. Este por sua vez transfere os prótons para a matriz mitocondrial e os elétrons para os citocromos. Dessa forma, citocromos reduzem o O<sub>2</sub> para H<sub>2</sub>O com esses elétrons e os prótons da matriz. Todo esse processo é indispensável para a produção de ATP (DALLNER, 2000; NOHL, 2001).

Porém, o ciclo redox da ubiquinona também é capaz de transferir elétrons desemparelhados para aceptores que não participam da cadeia respiratória. A oxidação do ubiquinol dá-se pela doação de hidrogênio para um radical livre, gerando a ubiquinona semiquinona. O prosseguimento da oxidação leva a formação da ubiquinona com a desativação final de dois radicais livres. Dessa maneira essa substância possui grande poder antioxidante através do seqüestro de radicais livres, bem como se mostra eficiente na interrupção de reações radicalares em cadeia. Tal atividade está limitada ao meio lipossolúvel devido a sua longa cadeia lateral (LARSON, 1997; DALLNER, 2000; NOHL, 2001).

Outra importante função da ubiquinona é a regeneração do tocoferol na membrana mitocondrial, onde ela exerce a mesma função regenerativa que o ascorbato exerce na membrana celular. O ubiquinol (**97**) doa um hidrogênio radicalar para o radical tocoferil (**80**) gerando ubiquinona semiquinona (**98**) e  $\alpha$ -tocoferol (**78**). O prosseguimento dessa reação gera ubiquinona e regenera mais uma molécula de  $\alpha$ -tocoferol (Figura 15, p. 38) (BUETTNER, 1993; JACOB, 1995; KAGAN, 1998).

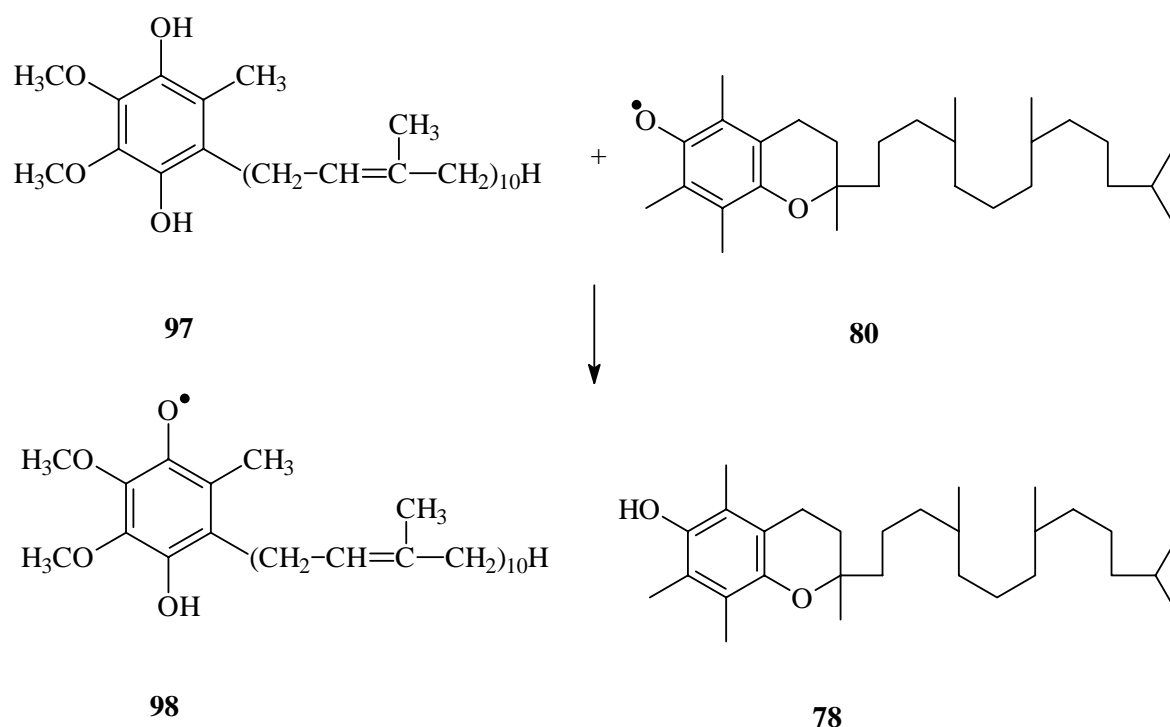


Figura 15 – Regeneração do tocoferol pelo ubiquinol

A ubiquinona também exerce papel considerável na desativação do radical ânion superóxido, pois este após ser gerado na mitocôndria é prontamente oxidado pela ubiquinona formando oxigênio e a forma reduzida ubiquinol (HALLIWELL, 2000b; BABIOR, 2000; BABIOR, 1997). A cadeia lateral da ubiquinona e ubiquinol também exerce função importante na atividade destes, uma vez que suas insaturações participam na desativação do oxigênio simpleto  $^1\text{O}_2$ , tanto por desativação física colisional quanto por adição as insaturações (LARSON, 1997). Uma última atividade relevante da ubiquinona na mitocôndria é a redução do nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) a óxido nítrico (NO), que é um agente bioregulador (DALLNER, 2000; NOHL, 2001).

Toda essa atividade antioxidante está favorecida na mitocôndria devido à estabilização do radical livre intermediário (98) pelos seus pares redox, através do fluxo de elétrons da cadeia respiratória. No pH= 6,0 da mitocôndria esse radical encontra-se predominantemente na sua forma desprotonada. Nesse estado, sem a presença de seus pares redox ele se desestabiliza em presença de oxigênio gerando ubiquinona e radical ânion superóxido  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Porém, em situações de acúmulo de NADH, tal como na isquemia, ou em outras membranas que não possuem tal estabilização, o acúmulo da forma desprotonada aumenta a reação de formação do radical ânion superóxido. Como o ubiquinol possui atividade análoga a SOD, o superóxido é dismutado gerando  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O contato da ubiquinona semiquinona desprotonada com o

peróxido de hidrogênio ou o radical peroxila é desastroso, gerando radicais hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ) e alcoxila ( $\text{RO}^\bullet$ ) respectivamente.

Na membrana dos lisossomos a atividade apresentada pela ubiquinona é diferente. Esta membrana é muito rica em ubiquinona, com a peculiaridade de que a espécie dominante é a  $\text{CoQ}_9$ , que se encontra 70% na forma reduzida desprotonada. Sua função é o transporte de  $\text{H}^+$  para o interior do lisossomo, além de ter uma função prooxidante. Nesse caso a geração de radicais livres auxilia na função do lisossomo (DALLNER, 2000; NOHL, 2001; NOHL, 1998; BLIZNAKOV, 1999). Nas outras membranas e no plasma o papel da ubiquinona é fundamentalmente de antioxidante. Como não há a presença dos pares redox da mitocôndria para estabilizar as ubiquinonas semiquinonas, elas são controladas por desproporcionamento onde duas moléculas de semiquinonas geram uma molécula de ubiquinol e uma de ubiquinona. Outra forma de eliminação do excesso de semiquinonas é a sua regeneração pelo ascorbato, gerando ubiquinol e semidesidroascorbato. Os efeitos deletérios das semiquinonas são eliminados em condições normais. Isso favorece os efeitos benéficos da ubiquinona, tornando-a útil como antioxidante para o organismo (DALLNER, 2000; NOHL, 2001; NOHL, 1998; BLIZNAKOV, 1999).

#### 1.3.2.5. O papel do ácido úrico no ciclo oxidativo

O ácido úrico é a principal forma de excreção de nitrogênio das aves e dos répteis. Nos mamíferos ele é o produto secundário de excreção, derivado das bases purínicas. Na maioria dos tecidos orgânicos encontra-se na forma de ânion urato ( $\text{pK}_{a1}=5,4$ ). Somente a partir dos anos 80 foi demonstrado que ele é um antioxidante efetivo nos sistemas biológicos, capaz de proteger o DNA e lipídios de ERO e ERN. A alta polaridade do ácido úrico restringe a sua atividade ao meio aquoso. A sua concentração nos compartimentos aquosos do organismo encontra-se muito próxima de seu limite de solubilidade ( $300\mu\text{M}$ ). Indivíduos com aterosclerose podem apresentar nível elevado de ácido úrico no sangue, que é indicativo da existência de um mecanismo compensatório encontrado pelo organismo para controlar o estresse oxidativo (LARSON, 1997; NIETO, 2000; SIMIC, 1989).

O mecanismo antioxidante do urato (**99**) pode ser resumido pela reação com a maioria dos agentes oxidantes a uma velocidade superior as outras purinas (Figura 16, p. 40). Nessa reação há formação do radical urato (**100**) estabilizado. Devido ao baixo  $\text{pK}_a=3,1$  do radical urato, este se encontra na forma de seu ânion radical, o que facilita a doação de um próton em

conjunto com o elétron. O pKa de segunda ionização de 9,5 não permite que o radical urato se encontre na forma de um diânion no organismo (NIETO, 2000; SIMIC, 1989).

O urato reage rapidamente com o radical hidroxila  $\text{HO}^\bullet$ , no entanto, o urato é inerte às espécies superóxido ( $\text{HOO}^-$ ), radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), peróxidos ( $\text{ROOH}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Sozinho não é capaz de desativar o oxigênio simpleto  $^1\text{O}_2$ , porém no meio biológico ele causa indiretamente a sua desativação através da desativação de outras espécies excitadas. Sua reação mais importante é com os radicais peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ) e  $\text{NO}_2^\bullet$  (gerando  $\text{NO}_2^-$ ). Essa grande atividade contra os radicais peroxila é à base do seu efeito antioxidante protetor do DNA e lipídios. Como ocorre em meio aquoso, o urato reage com os radicais peroxila antes desses penetrarem a membrana e iniciarem seus danos.

O urato é capaz de recuperar estruturas já atacadas que se tornaram radicais livres através da doação de um elétron e um próton. Ele também é responsável pela estabilização do ascorbato no plasma sanguíneo, inibindo a reação de Fenton (LARSON, 1997; NIETO, 2000; SIMIC, 1989) através de sua capacidade de quelar íons metálicos como  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{Cu}^+$ .

O ânion radical urato pode ser regenerado a urato pelo ascorbato, gerando semidesidroascorbato. Porém o urato não é capaz de regenerar a vitamina E. A decomposição oxidativa irreversível do urato leva a formação inicialmente da alantoína, e prossegue gerando o ácido alantóinico, ácido cianúrico, ácido parabânico, ácido oxálico e ácido glioxílico (NIETO, 2000; SIMIC, 1989).

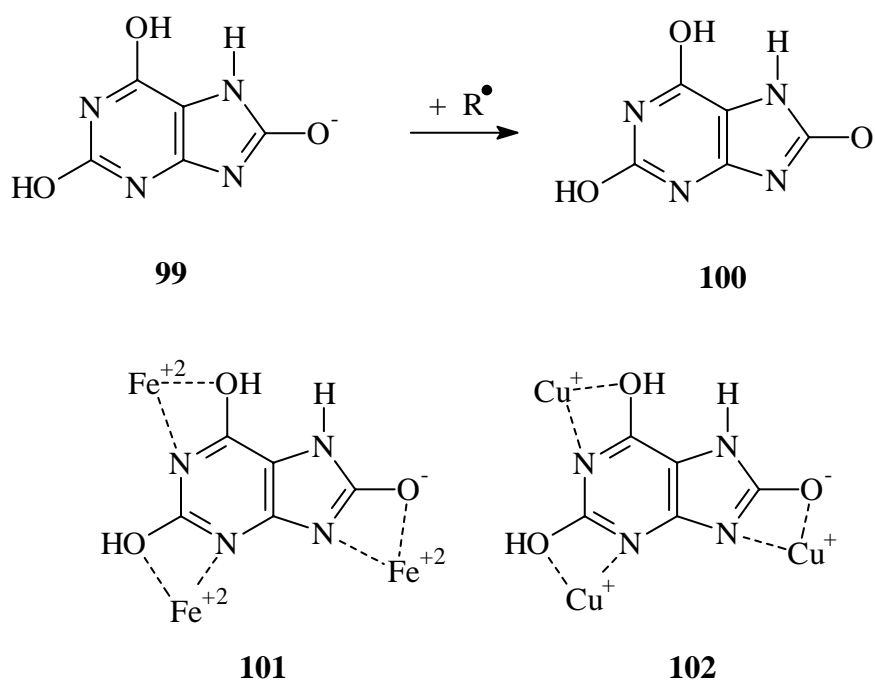
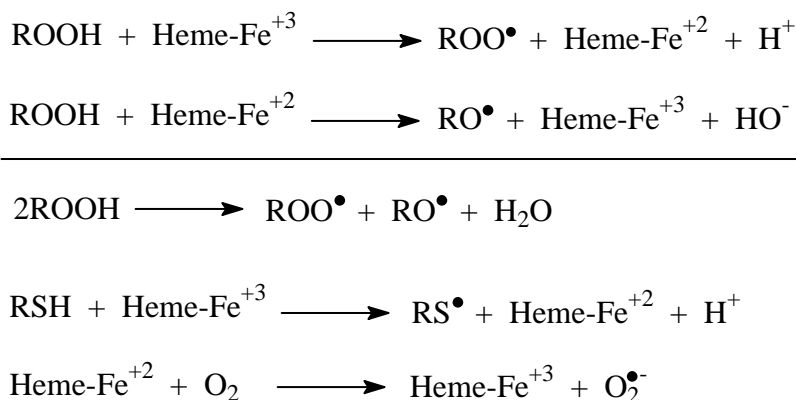


Figura 16 – Sumário das reações envolvendo a atividade antioxidante do ácido úrico



### 1.3.2.6. O papel da hemoglobina no ciclo oxidativo

A degradação da hemoglobina libera o grupo heme no organismo. A ferroporfirina ou grupo heme da hemoglobina é liberado no baço, originário das células vermelhas mortas. A sua degradação libera o  $\text{Fe}^{+3}$  e produz a biliverdina, um intermediário tetrapirrólico linear, que é reduzido pelo NADPH sob a ação da enzima biliverdina reductase a bilirrubina, que pode se apresentar na forma lactâmina ou lactímica. O heme não é diretamente transportado pelo sangue devido a sua atividade prooxidante. Devido ao Fe central, esse é capaz de reagir com peróxidos ROOH ou  $\text{H}_2\text{O}_2$  originando radicais livres peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ), alcoxila ( $\text{RO}^\bullet$ ) e hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ). Também é capaz de reagir com resíduos de cisteína (RSH) gerando tio-radicais ( $\text{RS}^\bullet$ ), ou com oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) produzindo radicais superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) (DAILLY, 1998).



Tanto a biliverdina quanto à bilirrubina possuem propriedades pró e antioxidantes, além de propriedades tóxicas *in vitro* e *in vivo*. O aumento da biliverdina é detectado em indivíduos com necrose hepática e pode ampliar a atividade de certos oncogenes do fígado, ocasionando câncer. No entanto, em condições normais a atividade antioxidante da bilirrubina suplanta a sua atividade prooxidante (ASAD, 2001).

A atividade antioxidante da bilirrubina ocorre principalmente quando se encontra ligada à albumina sérica, sendo esse complexo considerado um dos antioxidantes naturais dos fluidos extracelulares. Essa atividade acontece principalmente devido à sua grande reatividade com radicais peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ). No entanto ela também reage com radicais superóxido a 1/10 da velocidade do ascorbato. A reação da bilirrubina com o oxigênio simpleto é variável, podendo ser tanto um gerador a partir do oxigênio tripleto, quanto um desativador físico efetivo. Por ultimo, essa exerce o papel de regeneradora do  $\alpha$ -tocoferol, embora com menor importância que outros regeneradores tais como o ascorbato e a  $\text{CoQ}_{10}$  (LARSON, 1997; ASAD, 2001).

### 1.3.3. Flavonóides Como Antioxidantes

De modo geral, os polifenóis e em particular os flavonóides possuem uma estrutura química ideal para a atividade de seqüestro de radicais livres, sendo esses antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E. A glicosilação dos flavonóides reduz a atividade desses, mas aumenta a solubilidade em água, o que permite o seu armazenamento nos vacúolos das células. A atividade antioxidante dos flavonóides depende da sua estrutura, e pode ser determinada por cinco fatores; reatividade como agente doador de  $H^\bullet$  e elétrons, estabilidade do radical flavanoil formado, reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interação com as membranas.

A atividade de seqüestro de radicais livres está relacionada às propriedades redutoras dos flavonóides como doadores de  $H^\bullet$  e elétrons. Essa propriedade está diretamente ligada ao potencial de oxidação dos flavonóides e das espécies a serem seqüestradas. Quanto maior o potencial de oxidação do flavonóide, maior é a sua atividade como seqüestrador de radicais livres. Flavonóides com potencial de oxidação maior que o do  $Fe^{+3}$  e  $Cu^{+2}$  e, seus complexos podem reduzir esses metais, sendo potencialmente prooxidante, tendo em vista que o  $Fe^{+2}$  e o  $Cu^+$  participam da reação de Fenton geradora de radicais livres (RICE-EVANS, 1997; van ACKER, 1996).

A atividade dos flavonóides como agentes doadores de  $H^\bullet$  e elétrons também está relacionada ao número de hidroxilas presentes. Em geral quanto maior o número de hidroxilas, maior a atividade (CAO, 1997). Flavonóides sem nenhuma hidroxila ou que tenham todas as suas hidroxilas substituídas não apresentam atividade antioxidante ou prooxidante. Flavonóides monoidroxilados apresentam atividade muito baixa, por exemplo a 5-hidroxi-flavona tem atividade abaixo dos limites de detecção. Flavonas possuindo apenas uma hidroxila em 3, 6, 3' ou 4', assim como flavanonas apresentando apenas uma hidroxila em 2'-OH, 3'-OH, 4'-OH, 6-OH mostram fraca atividade. A 7-hidroxi-flavanona representa uma exceção, que pode ser justificada pela tendência maior da 7-OH em doar  $H^\bullet$  devido à estabilização do radical formado por deslocalização com a carbonila em C-4 (**103** e **104**) (Figura 17, p. 43).

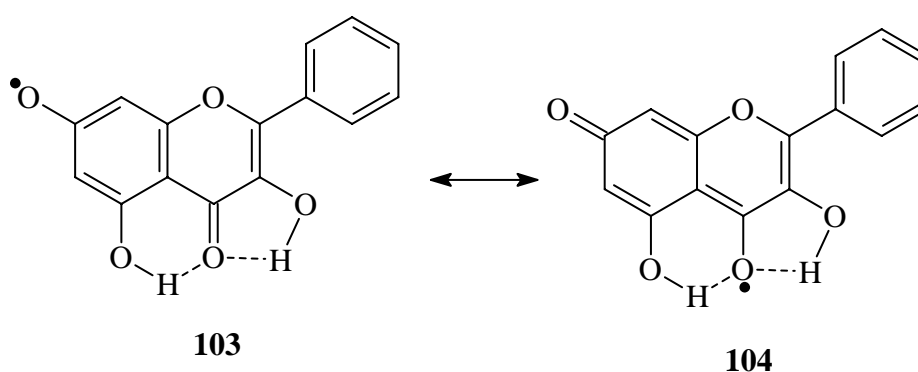


Figura 17 – Deslocalização do elétron desemparelhado na 7-hidroxi flavanona

Entretanto, apesar dessa exceção, para proteger os lisossomos e outras membranas contra o estresse oxidativo foi constatada a necessidade de no mínimo duas hidroxilas fenólicas no flavonóide, demonstrando que os monoidroxi flavonóides não são efetivos. Entre os flavonóides dihidroxilados, destacam-se aqueles que possuem o sistema catecol (3',4'-diidrox) no anel B. Os flavonóides com múltiplas hidroxilas como a miricetina (**105**), quecertina (**106**), luteolina (**107**), fustina (**108**), eriodictiol (**109**) e taxifolina (**110**) possuem forte atividade antioxidante quando comparados ao  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno, glutatona, ácido úrico e bilirrubina (Figura 18, p. 43) (CAO, 1997; YANG, 2001).

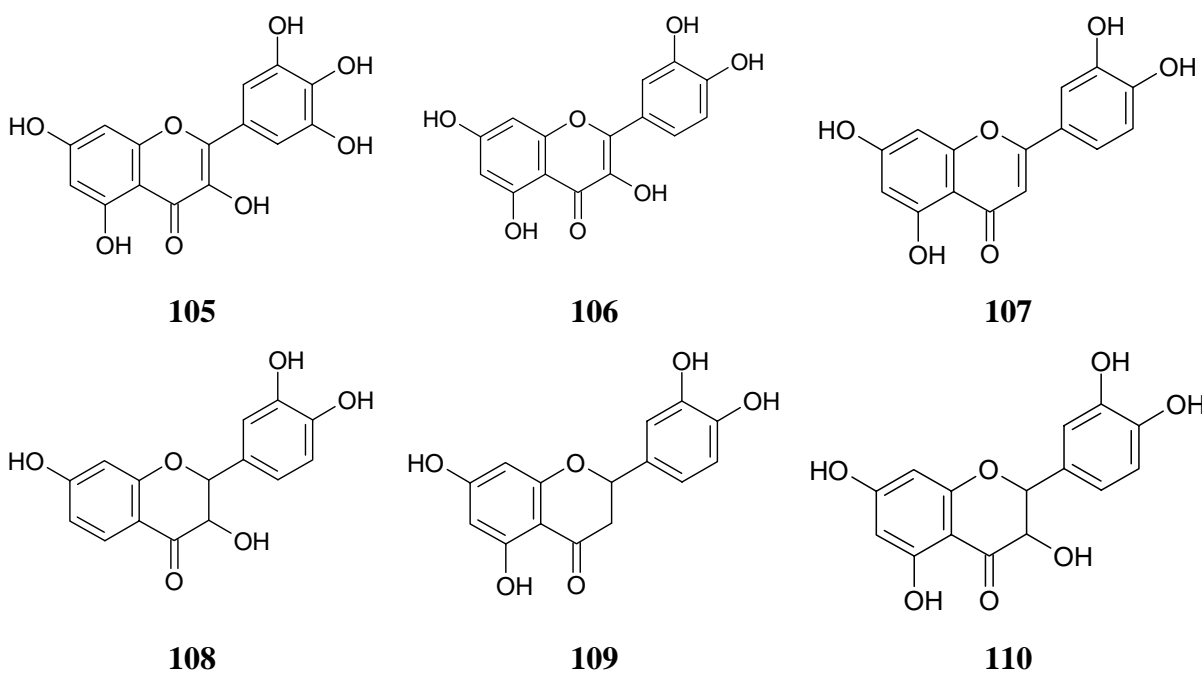


Figura 18 – Flavonóides antioxidantes

A estabilidade do radical livre flavanoil formado depende da habilidade do flavonóide em deslocalizar o elétron desemparelhado. A presença de hidroxilas em *orto* é o principal fator que auxilia nessa deslocalização. Os outros fatores são, a presença de insaturação no anel C e hidroxila em C-4' no anel B conjugada com a carbonila; ângulo do anel B do flavonóide e do radical formado em relação ao restante da estrutura sendo que esse ângulo é regulado pela presença ou ausência de hidroxila em C-3; presença de duas insaturações no anel C; conjugação da carbonila em C-4 com hidroxila em C-5; e presença de hidroxila em C-7 (RICE-EVANS, 1996). A doação do H<sup>•</sup> ocorre principalmente nas posições 7-OH > 4'-OH > 5-OH, seguindo a seqüência das constantes de dissociação. Os flavonóides, devido ao seu caráter fracamente ácido encontram-se em geral parcialmente ionizados, o que aumenta a estabilidade na posição C-4' e favorece a deslocalização do elétron desemparelhado do radical formado entre os anéis A, B e C. Como exemplo temos a quecertina parcialmente ionizada em C-4' (**111**). A doação do H<sup>•</sup> radicalar para o radical livre ocorre principalmente nas posições C-4' (**112**) e C-7 (**113**). Ambos os radicais livres formados podem ter seu elétron deslocalizado pela estrutura, com maior estabilidade para os radicais **112**, **114** e **115**, devido à estabilização resultante das ligações de hidrogênio (Figura 19, p. 44) (PIETTA, 2000; RICE-EVANS, 1996; BORS, 1990).

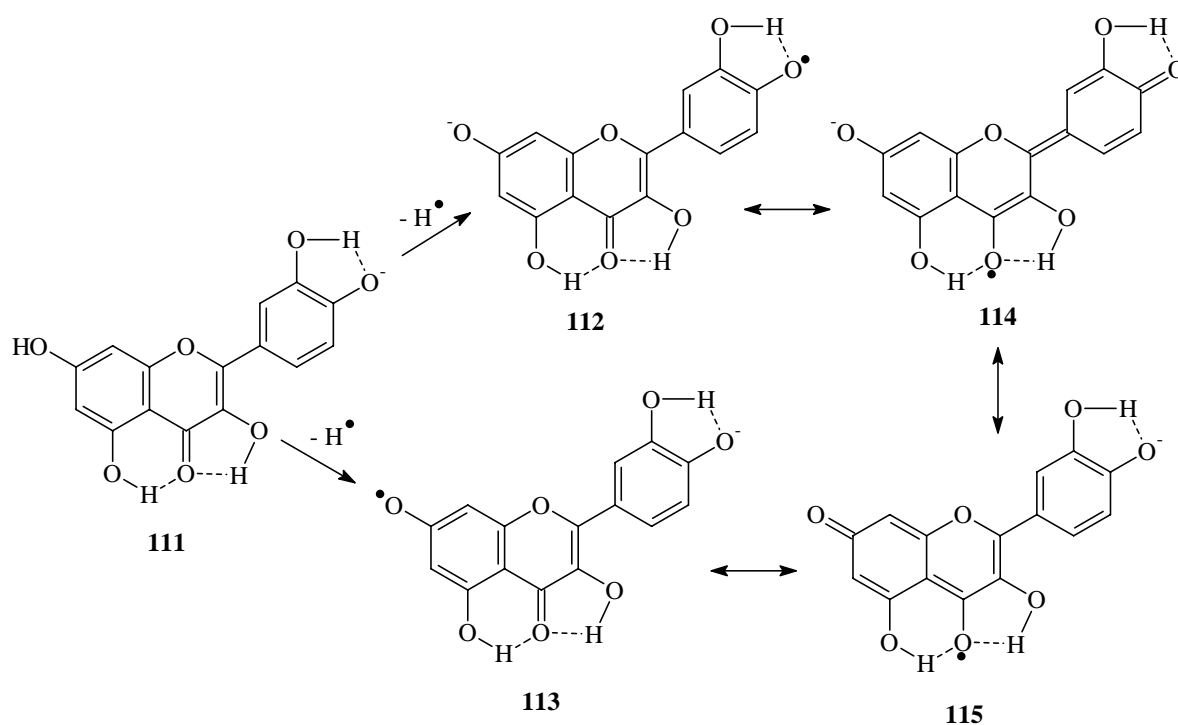


Figura 19 - Mecanismo da estabilização elétron desemparelhado nos flavonóides

A remoção de metais de transição livres do meio biológico é fundamental para a proteção antioxidante do organismo, visto que estes catalisam as reações de Fenton e de Haber-Weiss. Para a atividade de quelação de metais de transição é fundamental a presença de grupos *orto*-difenólicos, onde o mais comum é o sistema 3',4'-diidroxil, unidade catecol em B, e/ou estruturas cetol como 4-ceto-3-hidroxi e 4-ceto-5-hidroxi. A substituição de qualquer uma das hidroxilas envolvidas na quelação de metais reduz essa atividade devido principalmente ao impedimento estérico provocado. Outros sistemas *orto*-difenólicos em flavonóides menos comuns também podem quelar os metais de transição como, por exemplo o 6,7-diidroxil ou 7,8-diidroxil (PIETTA, 2000; RICE-EVANS, 1997; van ACKER, 1996a; BORS, 1990).

O último fator importante que influencia a atividade antioxidante dos flavonóides é a sua interação com as biomembranas. Quanto maior a lipofilicidade do flavonóide maior será a incorporação deste pela membrana, que é alvo da maioria das ERO e ERN. Assim, deve haver uma concentração mínima do flavonóide por ácido graxo de modo a assegurar a presença de uma de suas moléculas próxima ao sítio de ataque do radical (van ACKER, 1996b; van ACKER, 1998; BLAZOVICS, 2000). Flavonóides que possuem uma cadeia de açúcares ligada em sua estrutura são muito polares, não sendo assimilados pela membrana. Porém nesta forma eles podem ser armazenados em vesículas, possuindo assim um tempo maior de permanência no organismo. Os flavonóides que são assimilados pelas membranas exercem a função de moduladores de fluidez. Restringindo essa fluidez os flavonóides geram um impedimento físico para a difusão das ERO e ERN, de modo que decresce a cinética das reações responsáveis pelo estresse oxidativo. Esse tipo de atividade antioxidante é também relatado para o  $\alpha$ -tocoferol e o colesterol (ARORA, 2000; ARORA, 1998; BLAZOVICS, 2000).

#### **1.4. Atividade Imunomoduladora**

O sistema imunológico humano é constituído por células de defesa como granulócitos, macrófagos, células de Kupffer, monócitos, linfócitos T e B, células assassinas e seus mediadores químicos, que desempenham funções diversificadas como síntese de antígenos, remoção de microorganismos por fagocitose, destruição de bactérias, vírus ou células tumorais. A atividade imunomoduladora pode ser subdividida em imunoestimuladora e imunossupressora. A atividade imunoestimuladora é importante para aumentar a resposta do sistema imunológico em doenças imunodepressoras como a AIDS, o câncer em geral e a Leucemia especificamente. Enquanto que, a atividade imunossupressora é útil nos casos em que se deseja diminuir ou suprimir a resposta do sistema imunológico, como é o caso dos transplantes de órgãos para evitar a rejeição, e em diversas alergias onde a respostas do sistema imunológico é desproporcional ao agente causador, podendo vir a ser letal.

A atividade imunoestimuladora primária consiste na estimulação não específica do sistema imunológico como um todo. No entanto, como muitas doenças infecciosas recorrentes e doenças malignas são causadas por um decréscimo no número ou na função de células específicas do sistema imune, os ensaios para atividade imunoestimuladora elegem um tipo de célula alvo a serem estudadas, em geral granulócitos, monócitos, macrófagos ou linfócitos-T.

Os linfócitos compreendem uma população de células com diferentes propriedades imunológicas, tais como mediar uma resposta primária, serem precursores pré-funcionais, células de memória, e células imunologicamente ativas. Eles podem ser subdivididos em linfócitos-T e linfócitos-B. Os linfócitos-T agem como células auxiliares, supressoras, citotóxicas e de memória. Avaliar a atividade dos linfócitos-T é, portanto, avaliar sua habilidade de proliferação, de produzir mediadores, de induzir respostas citotóxicas e regular a resposta do sistema imune (WAGNER, 1991).

## 2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho são:

- 2.1. Isolar as substâncias provenientes do metabolismo secundário presentes nos diferentes extratos do caule de *Dioclea violacea*.
- 2.2. Elucidar as estruturas das substâncias isoladas através de métodos espectrométricos como RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e outros experimentos (DEPT, NOESY, HMBC, HMQC, COSY, HETCOR), EM, IV, UV-VIS,  $[\alpha]_D$ , DC, além de comparação com dados da literatura.
- 2.3. Submeter as substâncias isoladas a testes de atividade antioxidante *in vitro* pelos métodos de inibição da autooxidação do  $\beta$ -caroteno, e de seqüestro do radical livre estável DPPH.
- 2.4. Submeter as substâncias isoladas a bioensaios de atividade imunomoduladora.
- 2.5. Obter através de síntese as substâncias que apresentarem maior atividade.