

Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura

Methods of the Antioxidant Defense: A Literature Review

George Gomes Cotinguiba^a; Jeime Rocksane do Nascimento Silva^a; Rhuanna Rackel de Sá Azevedo^a; Thiago José Matos Rocha^b; Aldenir Feitosa dos Santos^{cd*}

^aCentro Universitário Cesmac, Curso de Farmácia, AL, Brasil

^bUniversidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, PE, Brasil

^cUniversidade Estadual de Alagoas, Departamento de Química, AL, Brasil

^dCentro Universitário Cesmac, Mestrado Profissional de Pesquisa em Saúde Maceió, AL, Brasil

*E-mail: aldenirfeitosa@gmail.com

Recebido: 24 de janeiro de 2013; Aceito: 07 de março de 2013

Resumo

O termo radical livre refere-se a um átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. É este não emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas. O presente trabalho teve como objetivo apresentar uma abordagem sobre as principais contribuições descritas na literatura a respeito dos radicais livres, sua ação nas biomoléculas e suas consequências. Para tanto, foi realizada uma revisão de literatura utilizando artigos publicados nos periódicos indexados com base em banco de dados Lilacs, Medline e Scielo. Alguns radicais livres ocorrem naturalmente em nosso corpo através do nosso metabolismo, contudo, fatores exógenos tais como poluição, radiação, cigarro, herbicidas entre outros podem provocar a formação desses radicais. Nos últimos anos, os radicais livres vêm sendo discutidos devido a sua capacidade de desestabilizar biomoléculas como carboidratos, lipídios, proteínas, DNA entre outras, causando doenças degenerativas, artrite, inflamação, envelhecimento precoce, câncer e problemas cardiovasculares. Para inibir e reduzir a formação desses radicais, existem substâncias antioxidantes. Portanto, pode-se concluir, através de uma abordagem clara, a desmistificação dos possíveis questionamentos sobre a ação dos radicais livres no organismo humano.

Palavras-chave: Radicais Livres. Antioxidantes. Testes Laboratoriais.

Abstract

The term free radical refers to a highly reactive atom or molecule, which contains an odd number of electrons in its outer electronic shell, which confers high reactivity for these atoms or molecules. This paper aims to present an approach to the main contributions described in the literature about free radicals, their action on biomolecules and the consequences of these actions through a literature review using articles published in indexed journals based on Lilacs, Medline and Scielo databases. Some free radicals occur naturally in our body, however, exogenous factors such as pollution, radiation, cigarette, herbicides, among others, may lead to the formation of free radicals. In recent years, free radicals have been discussed because of its ability to destabilize biomolecules such as carbohydrates, lipids, proteins, DNA and others, causing degenerative diseases, arthritis, inflammation, aging, cancer and cardiovascular diseases. There are substances to inhibit and to reduce the formation of these radicals called antioxidants. Therefore, it can be concluded through a clear approach the demystifying of the possible questions about the action of free radicals in the human body.

Keywords: Free Radicals. Antioxidants. Laboratory Test.

1 Introdução

Nos anais da história da medicina, poucos eventos tiveram impacto tão profundo e matizado com respostas polifacéticas como o ocorrido em consequência à descoberta dos radicais livres, causando uma verdadeira eclosão nas áreas de investigação clínica relativas aos radicais livres - RL e antioxidantes¹.

Os RL são espécies químicas constituídas de um átomo ou associação de átomos, possuindo um elétron desemparelhado na sua órbita mais externa. Essa situação implica em alta instabilidade energética e cinética, uma vez que para se manterem estáveis precisam doar ou retirar um elétron de outra molécula. A principal fonte de radicais livres produzidos no organismo vem do metabolismo normal do oxigênio^{2,3}.

A importância dos radicais livres no metabolismo celular vem se tornando clara, em função de intensa investigação em vários campos, incluindo estudos da peroxidação lipídica, sistemas de oxi redutase e no papel da superóxido dismutase. O interesse por radicais livres e antioxidantes tem se intensificado ultimamente, pelo possível papel dessas substâncias na patogênese de diversas doenças⁴.

O termo radical livre refere-se às moléculas orgânicas e inorgânicas de existência independente, que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres. Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas. A presença dos radicais é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais^{5,6}.

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídios, carboidratos e DNA) está relacionado com seu sítio de formação. Entre as principais formas reativas do oxigênio, o O_2 apresenta baixa capacidade de oxidação, o radical hidroxila - OH mostra uma pequena capacidade de difusão e é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares. O peróxido de hidrogênio, H_2O_2 , não é considerado um radical livre verdadeiro, mais é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas⁵.

Os antioxidantes são qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz, podendo ser encontrados naturalmente em nosso organismo e em alimentos. Estes são responsáveis pela proteção do organismo contra a ação oxidativa dos radicais livres⁶⁻⁸.

Pequenas moléculas podem exercer efeito antioxidante, agindo diretamente na neutralização dos radicais livres e/ou participando indiretamente de sistemas enzimáticos com esta função. São elas: vitamina C, glutatona, ácido úrico, vitamina E, selênio e carotenoides⁴.

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos. Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução de radicais livres nas células⁵.

Dentro deste contexto, torna-se evidente a importância de entender como os radicais agem sobre as biomoléculas e suas consequências. O presente trabalho teve como objetivo apresentar uma abordagem sobre as principais contribuições descritas na literatura sobre os radicais, sua ação nas biomoléculas e suas consequências. Foram consultados artigos provenientes de revistas indexadas, relacionados ao tema proposto, na língua portuguesa, contemplando os anos de 2005 a 2013. Foram utilizados os seguintes descritores e suas combinações: Radicais Livres/ Free Radicals, Antioxidante/ antioxidant.

2 Desenvolvimento

2.1 Radicais livres e estresse oxidativo

Os radicais livres e os antioxidantes são temas de pesquisa nos últimos anos, quanto aos seus aspectos básicos e suas aplicações. Devido à sua importância, abrangência e pela possibilidade de promoção da saúde e cura de diversas doenças¹⁻⁴.

Os radicais livres são moléculas altamente reativas que podem interferir em reações normais do organismo, causando alterações. Sua reatividade deve-se à instabilidade da molécula, por possuir elétrons desemparelhados. A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas,

durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular (fatores endógenos) e pela exposição a fatores exógenos (ozônio, radiações gama e ultravioleta, medicamentos, dieta, cigarro, etc.)⁵⁻⁸.

Antioxidantes são substâncias que podem atrasar ou inibir as lesões causadas pelos radicais livres. A concentração dessas substâncias pode aumentar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes. O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares tem sido chamado de estresse oxidativo⁵⁻⁸. São indispensáveis na defesa contra infecções, sendo que os primeiros a chegar ao local são os neutrófilos que agirão contra o invasor e, em seguida os macrófagos que engolem e trituram o agente estranho. Essa estratégia de defesa só é possível porque o organismo utiliza o potencial destruidor dos radicais livres^{9,10}.

A maioria dos radicais livres tem como característica uma meia-vida muito curta, variando de minutos a nano segundos, sendo capazes de reagir rapidamente com vários compostos ou atingir alvos celulares, como as membranas, transformando a molécula atacada em outro radical livre e gerando reações em cadeia bastante danosas^{10,11}.

A formação de radicais livres pelo organismo em condições normais é inevitável, pois são necessários no processo de respiração celular nas mitocôndrias, que são as “usinas energéticas” das células, que geram a energia na forma de ATP (adenosina trifosfato). Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação^{10,11}.

Os radicais livres tem papel no sistema imunológico pois apresentam ação bactericida, fungicida, virótica, agindo como uma espetacular barreira de defesa do organismo frente à presença de microrganismos¹². Além disso, são encontrados envolvidos na fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso acarreta efeitos prejudiciais, tais como a lipoperoxidação de membranas e oxidação de proteínas¹³.

Alguns exemplos de radicais livres são: radical hidroxila - OH, ânion superóxido (O_2^-), radical peroxil - ROO., radical alcóxil - RO. e óxido nítrico - NO. Entre esses radicais livres, o OH e O_2^- são os que têm maior importância biológica, pois são formados durante o processo normal ou exacerbados da redução de oxigênio molecular (O_2) no interior das mitocôndrias. Embora o O_2 não seja um radical livre, pode favorecer a formação de espécies radicalares¹⁴⁻¹⁶.

2.2 Reações de produção de radicais livres

Devido a sua configuração eletrônica, o oxigênio, principal oxidante em virtude do metabolismo aeróbico, tende a receber um elétron de cada vez, o que acarreta na formação de compostos intermediários altamente reativos

– EROs (Figura 1). O primeiro composto obtido é o radical superóxido, formado quando o O_2 sofre a redução univalente isoladamente. Esse radical é pouco reativo e, portanto, não é altamente citotóxico^{10,17}.

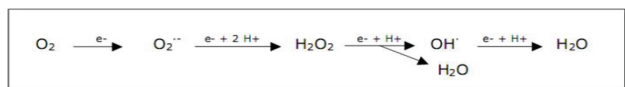


Figura 1: Reações químicas de formação de radicais livres

Fonte: Rossetto¹⁴

Uma vez que o O_2 é parcialmente reduzido pela recepção de dois elétrons, o produto obtido é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Apesar de não ser um radical livre, pois não tem elétrons desemparelhados na última camada, é importante porque participa das reações que produzem o radical OH^{\cdot} , seja via reação de Fenton ou de Haber-Weiss. Tem vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas e pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao ferro^{10,17}.

A toxicidade do peróxido de hidrogênio H_2O_2 se deve, em grande parte, à conversão da molécula em radical hidroxila (OH^{\cdot}) por hidrólise. Uma vez formado, o radical hidroxila OH^{\cdot} pode promover quebra e modificações nas bases de DNA das células, o que acarreta em alterações na expressão genética, mutação e apoptose celular, modificações em proteínas e peroxidação lipídica^{10,17}.

2.3 Mecanismos de formação das espécies reativas de oxigênio

A oxidação é um processo metabólico que permite ao sistema celular converter potencial energético de partículas assimiláveis em energia utilizável e necessária para atividades essenciais das células¹⁸⁻²¹.

A espécies reativas de oxigênio - EROs são moléculas capazes de reagir no organismo e conseqüentemente interferir nos processos biológicos e fisiológicos. Podem se formar de diferentes formas, entre elas, durante a redução do oxigênio a água na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria. A capacidade destas espécies em ocasionar danos depende da caracterização do tipo de radical e das moléculas que estão sendo atingidas²²⁻²⁴.

Outra forma de formação dos EROs ocorre durante os processos metabólicos normais ou patogênicos ou são provenientes de fontes exógenas físicas e químicas. Além de atuar como mediadores da transferência de elétrons, essas espécies atuam em vários processos bioquímicos, como a fagocitose, fenômeno em que EROs, H_2O_2 , ClO^- e O_2 , são produzidas para eliminar o agente agressor por oxidação²¹.

No metabolismo celular normal existe a produção constante de EROs (Quadro 1) e condições com alta produção de EROs acarreta ações deletérias em todos os componentes celulares¹⁴.

Quadro 1: Espécies reativas de oxigênio (EROs)

$O_2^{\cdot-}$	Ânion superóxido ou radical superóxido
HO_2^{\cdot}	Radical perhidroxil
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
OH^{\cdot}	Radical Hidroxila
RO^{\cdot}	Radical alquila
ROO^{\cdot}	Radical peróxido
$ROOH$	Hidroperóxido orgânico
O_2	Oxigenio singlet
RO_2	Carbonila excitada

Os radicais livres e demais moléculas que surgem em função das ações oxidativas nos sistemas biológicos são denominados de EROs. Para se protegerem contra oxidações os organismos dispõem de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos¹⁴.

O sistema enzimático é o primeiro a agir, evitando o acúmulo de ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. É formado por diversas enzimas, destacando-se a superóxido dismutase - SOD, a catalase - CAT e a glutatona peroxidase - GPx²³.

Quanto antioxidantes não enzimáticos, devem-se incluir algumas vitaminas (C, E e A), outros produtos naturais (ex.: carotenoides, flavonoides, outros polifenóis, furanoides e tióis) e produtos sintéticos (ex.: Ebselen, *N*-acetilcisteína e Trolox). É interessante notar que espécies carbonílicas no estado triplete, produzidas na termólise de dioxetanos e dismutação de radicais alcóxilas e peróxilas, formadas com altos rendimentos durante a peroxidação lipídica e outras oxidações biológicas, têm sido negligenciadas na literatura apesar de, *in vitro*, terem exibido reatividade similar à de radicais alcóxila²¹.

O processo de peroxidação lipídica é iniciado pela reação de um radical livre com um ácido graxo insaturado e propagado por radicais peróxila, podendo ser definido como uma cascata de eventos bioquímicos. Resulta na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como o malondialdeído, 4-hidroxinonenal e isoprostanos, que podem ser detectados em amostras biológicas e utilizados para avaliar o estresse oxidativo.

O excesso de EROs e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs) no organismo é combatido de forma eficaz por antioxidantes, que podem ser produzidos pelo corpo ou absorvidos por meio da alimentação. Promovem a neutralização das camadas com elétrons desemparelhados por meio da remoção ou adição de elétrons de acordo com a necessidade para a estabilização do átomo ou molécula¹⁹.

O consumo exagerado de gorduras, tabaco e álcool, assim como a exposição constante à poluição ou à condições de estresse, aumentam a formação de espécies reativas. Conseqüentemente, o balanço existente entre antioxidantes, EROs e ERNs é quebrado, surgindo o estresse oxidativo, que está associado a fisiopatologia de várias doenças²⁰.

2.4 Antioxidante e defesa antioxidante

O termo antioxidante tem natureza multiconceitual e pode ser definido como uma família heterogênea de moléculas naturais, presentes em baixas concentrações, comparativamente às biomoléculas que supostamente protegeriam o organismo, podendo prevenir ou reduzir a extensão do dano oxidativo^{23,24}.

São muito importantes para o ser humano, pois atacam os radicais livres que geram danos a saúde²⁵.

Os antioxidantes podem ser divididos quanto a suas classes e quanto o seu modo de ação. Quanto às classes, eles podem apresentar atividade enzimática e não enzimática (Figura 2), já no modo de ação podem ser primários e secundários.

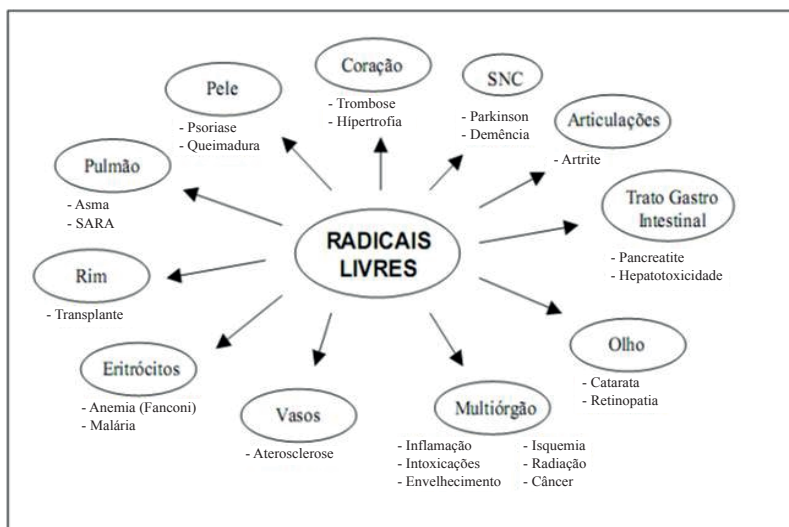


Figura 2: Doenças associadas às espécies reativas ao oxigênio EROs

A atividade enzimática são os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio. Já a atividade não enzimática são moléculas que interagem com as espécies radicalares e são consumidas durante a reação. Nesta classificação, incluem-se os antioxidantes naturais e sintéticos como os compostos fenólicos²⁶.

De acordo com seu modo de ação, os antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários. Os primários atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagindo com os radicais livres, formando o complexo lipídico-antioxidante que pode reagir com outro radical livre²⁶.

Os antioxidantes secundários atuam retardando as etapas de iniciação da autooxidação, por diferentes mecanismos que incluem complexação de metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singletes²⁶.

As defesas antioxidantes podem ser produzidas endogenamente ou adquiridas pela dieta. Estas estratégias de defesa incluem diferentes níveis de proteção, que podem ser resumidos em três formas principais de atuação: evitar a formação de ERO, neutralização destas espécies reativas e reparação de danos ocasionados por elas. Assim, o termo antioxidante pode ser considerado como qualquer substância que atrase, previna ou remova o dano oxidativo de uma molécula-alvo²⁷.

As células possuem sistemas de defesa enzimáticos e não-enzimáticos para proteger seus constituintes celulares e manter o estado redox celular. O sistema de defesa enzimático consiste tipicamente de pequenas moléculas que são solúveis em qualquer meio aquoso, agindo em geral como varredores de radicais, substância oxidada pelas ERO e assim removem os oxidantes da solução²⁸.

As defesas antioxidantes enzimáticas incluem a atividade da superóxido dismutase (Sod), catalase (Cat), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR) e glutathione S-transferase (GST)^{29,30}.

Dentre as principais defesas antioxidantes não-enzimáticas da célula estão as vitaminas C e E, carotenóides, flavonóides, pigmentos biliares, urato e o tripeptídeo glutathione (GSH), todos sendo captadores de radicais^{29,30}.

A Glutathione (GSH) é um tripeptídeo (glutamil-cisteinil-glicina) que desempenha função fundamental na proteção das células contra danos oxidativos causados por radicais oxidantes, atuando como sequestradora de radicais na homeostase tiólica, na manutenção do balanço redox da célula e para defesa contra agentes eletrofílicos, como os xenobióticos²⁷⁻³⁰.

O mecanismo de ação da glutathione ocorre por meio da redução do peróxido de hidrogênio e de hidropeptídeos orgânicos com utilização da glutathione (GSH), que atua como co-substrato da glutathione peroxidase, tendo propriedade de doador de elétrons, a qual poderá ser regenerada por meio da glutathione redutase - GR com a transferência de hidrogênio do NADPH²⁷⁻³⁰.

2.5 Patogenia das lesões provocadas por radicais livres

Nos últimos anos, uma quantidade substancial de evidências tem indicado o papel chave dos radicais livres e outros antioxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais²⁷⁻³⁰ (Figura 2).

As moléculas instáveis também podem ser formadas pelos efeitos do sol, contaminação por tabaco e bebida alcoólica, podendo danificar as membranas das células, provocando efeitos negativos sobre a pele e acelerando o processo de envelhecimento, devido à morte ou ao mau funcionamento das células. Os radicais livres atacam as células na parte superficial da epiderme, degradando os fibroblastos da derme e podendo, inclusive, lesar a cadeia de DNA, proteínas, carboidratos, lipídios e as membranas celulares na parte mais profunda da epiderme, causando câncer nos casos mais graves²⁷⁻³⁰.

A forma como estas doenças ocorrem permite uma classificação em dois grupos. O primeiro grupo engloba o estresse oxidativo mitocondrial, decorrente do desequilíbrio do estado redox sistêmico e da depuração prejudicada de glicose, o que sugere que a mitocôndria do músculo esquelético seja o principal sítio de geração de EROs. O segundo grupo ocorreria em consequência de uma condição oxidativa inflamatória, em que há estimulação excessiva da atividade da NADPH oxidase por citocinas e outros agentes²⁷⁻³⁰.

2.6 Testes laboratoriais (avaliação da atividade antioxidante)

Devido aos diferentes tipos de radicais livres e suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente. A busca por testes mais rápidos e eficientes tem gerado um grande número de métodos para avaliar a atividade de antioxidantes naturais pelo uso de uma grande variedade de sistemas geradores de radicais livres²⁷⁻³⁰.

Várias pesquisas de métodos reveladores e confiáveis para detecção precoce e prevenção de alterações no equilíbrio redox celular e de tecidos específicos, por meio da análise de “biomarcadores”, revestem-se, atualmente, de forte interesse científico e clínico²¹. Entre eles estão: métodos físicos, físico-químicos e biológicos, sendo discutido no presente trabalho alguns dos métodos físico-químicos e biológicos²⁷⁻³⁰.

Os biomarcadores têm características passíveis de avaliação e mensuração, como indicadores de processos biológicos normais, processos patogênicos ou de resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica. Assim, refletiriam mudanças em sistemas biológicos relacionadas à exposição ou aos efeitos de xenobióticos, ou outros tipos de fatores, incluindo aqueles relacionados a doenças³¹.

Os testes antioxidantes nos sistemas biológicos podem ser classificados em dois grupos: os ensaios usados para

avaliar peroxidação lipídica, no qual um lipídio ou substrato lipoproteico sob condições padrão é usado, e o grau de inibição da oxidação é medido, e os ensaios usados para medir a habilidade de sequestro de radicais livres³¹.

2.6.1 Métodos físico-químicos

a) Capacidade antioxidante total

Os testes propostos na literatura variam quanto ao tipo de radicais gerados, indicador de oxidação escolhido e método usado para sua detecção e quantificação. São chamados ensaios de captação (“trap assays”). Em todos esses ensaios, um radical é gerado e reage com moléculas-alvo, para produzir cor, fluorescência, quimiluminescência, perda ou ganho de sinais de ESR (“Electron Spin Resonance” ou Ressonância do Spin Eletrônico) ou outra mudança mensurável. A presença de antioxidantes altera esses sinais, o que permite sua análise quantitativa³².

Dentre os testes utilizados, aqueles conhecidos pelas siglas TRAP - Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter, ORAC - Oxygen-Radical Absorbancy Capacity, FRAP - Ferric-Reducing Ability of Plasma e TEAC - Trolox Equivalent Antioxidant Capacity. Sendo discutindo no presente artigo o teste ORAC que é um método cuja determinação analítica envolve reações de transferência de átomos de hidrogênio e o TEAC, transferência de elétrons³².

O decréscimo da CAOT não significa necessariamente que o dano oxidativo ocorreu, pode significar simplesmente que o mecanismo de defesa cumpriu sua função habitual³².

b) ORAC

O ORAC é um método que usa a proteína ficoeritrina, fotossintética, marcadora de fluorescência, como alvo dos radicais. O ORAC mede a diminuição da emissão de fluorescência de PE adicionada ao plasma em presença de um composto azo, gerador de radicais³².

O ORAC combina o tempo de inibição e a percentagem (%) de inibição da ação do radical pelo antioxidante e usa a área sob a curva para a quantificação. O teste expressa os resultados como unidades de ORAC ou equivalentes do trolox, que corresponde à quantidade de trolox em μmol que tem a mesma atividade antioxidante para o radical peroxila em 1 L de plasma. Porém, se o gerador de radicais for o Cu^{2+} , o trolox não pode ser usado como padrão, pois pode atuar como pró-oxidante na presença de este metal. Neste caso, a ação antioxidante será expressa em unidade antioxidante: uma unidade equivale à atividade antioxidante que causa o aumento da área sob a curva de decaimento de fluorescência de PE em 100%³².

c) TEAC

O TEAC baseia-se na inibição por antioxidantes do cátion radical 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfonato, sal de diamônio) ($\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_4$, M. M. 548,7 g/mol, ABTS^{•+}), que apresenta absorvância característica primária em 415 nm e

absorções secundárias em 660, 734 e 820 nm³².

O método original baseia-se na ativação de metamioglobina como peroxidase, em presença de ABTS. O complexo preferiu da heme proteína produziria o cátion radical ABTS^{•+} de cor azul esverdeada. A adição desse radical a um meio contendo antioxidantes permite avaliar, através do grau de descoloração, sua capacidade antioxidante. Alguns autores sugerem o uso de oxidação química de ABTS, com utilização de reagentes como dióxido de manganês ou persulfato de potássio, uma vez que outros antioxidantes podem contribuir para reduzir o radical ferrimioglobina formado durante a reação³².

O percentual de inibição de ABTS^{•+} é determinado em função da concentração e do tempo. Quando a medida é relativa à reatividade do trolox, como padrão, sob as mesmas condições, o teste é denominado TEAC, expresso como unidades equivalentes de trolox que correspondem a 1,0 mmol/L. Trata-se de um método aplicável para o estudo de antioxidantes lipossolúveis e hidrossolúveis³².

d) 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•+)

A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula, que confere a esta molécula uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 520 nm. O ensaio se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina. Quando uma determinada substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH, a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido^{30,31}.

O método é considerado um dos mais fáceis, precisos e reprodutivos na avaliação da atividade antioxidante de sucos de frutas, extratos vegetais e substâncias puras, tais como flavonóides e terpenóides³¹.

2.6.2 Métodos biológicos

a) Superóxido dismutase (SOD)

As principais formas de superóxido dismutases encontradas em humanos são a Cu/ZnSOD, localizada no citosol (dimérica), além de lisossomas, núcleo e espaço entre as membranas interna e externa da mitocôndria (tetramérica) e a MnSOD localizada na mitocôndria³².

A maioria das análises de SOD é realizada verificando-se a atividade de SOD indiretamente, geralmente por adição ao eritrócito do sistema xantina - xantina oxidase como fonte de O₂^{•-} e um composto que seja reduzido pelo O₂^{•-}^{18,26} como, por exemplo, o 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-cloreto de feniltetrazol (INT, C₁₉H₁₃ClIN₅O₂ .x H₂O, M.M. 505,7 g/mol). O O₂^{•-} transfere um elétron ao INT e produz formazana, detectada em espectrofotômetro a 505 nm. A atividade da enzima é medida a partir do grau de inibição da reação a que o eritrócito foi submetido e os valores são expressos em unidades por grama de hemoglobina (Hb) (U/g Hb). A inibição

da formação do cromógeno é proporcional à atividade de SOD presente na amostra. Nessa técnica, uma inibição de 50% é definida como uma unidade de SOD³².

b) Catalase (CAT)

A catalase, cujo sítio ativo contém o grupo heme, está enclausurada no peroxissoma, a principal organela responsável pela desintoxicação celular e oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, fonte inesgotável de peróxidos orgânicos, produtos carbonílicos e oxigênio singlete. A catalase é também encontrada nas mitocôndrias das células do tecido cardíaco³².

Há dois caminhos mais utilizados para estudo de sua atividade, que referem-se à medida do decaimento na concentração de H₂O₂ e geração do oxigênio. A leitura do decaimento de H₂O₂ é feita por espectrofotometria no ultravioleta a 240 nm. Os valores de CAT também são expressos em unidades por g de hemoglobina (U/g Hb). Uma unidade de CAT corresponde à atividade da enzima necessária para o consumo de 1 µmol de H₂O₂ em 1 min³².

3 Conclusão

Nas últimas décadas foram realizadas inúmeras pesquisas a fim de esclarecer o papel dos radicais livres em processos fisiopatológicos, como câncer, aterosclerose, inflamação, entre outros. Devido ao aumento das patologias causadas por radicais livres, torna-se cada vez mais importante o entendimento destes mecanismos tanto para os profissionais de saúde quanto para os pacientes. Portanto o presente trabalho de revisão de literatura pode concluir, através de uma abordagem clara, a desmistificação dos possíveis questionamentos sobre a ação dos radicais livres no organismo humano.

Referências

1. 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.
2. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160(1):1-40
3. Chorilli M, Leonard GR, Salgado HRN. Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. *Rev Bras Farm* 2007;3(88):113-8.
4. Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Biol Chem* 2008;4:278-86.
5. Liochev SI. Reactive oxygen species and the free radicals theory of aging. *Free Radic Biol Med* 2013;60:1-4.
6. Dias CAR, Moura PMSS, D'Angeliz CEM. A complexa interação entre radicais livres, suplementação e doenças. *Rev Multidiscip* 2010;10:34-43.
7. Chorilli M, Leonardi GR, Salgado HRN. Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. *Rev Bras Farm* 2007;88(3):113-8.
8. Machado H, Nagem TJ, Peters VM, Fonseca CS, Oliveira TT. Flavonóides e seu potencial terapêutico. *Bol Centro Biol Reprod* 2008;27(1/2):33-9.

9. Chorilli M, Leonard GR, Salgado HRN. Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. *Rev Bras Farm* 2007;3(88):113-8.
10. Silva RD. Radicais livres: conceito, fisiopatogênica, sistema de defesa e estresse oxidativo. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2010.
11. Castrogiovanni P, Imbesi R. Oxidative stress and skeletal muscle in exercise. *Ital J Anat Embryol* 2012;117(2):107-17.
12. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv in Aging*, 2007;2(2):219-36
13. Silva DC, Cerchiaro G, Honório KM. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. *Quim Nova* (2011);34(2):300-5.
14. Issa AY, Volate SR, Wargovich MJ. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: New directions and perspectives. *J Food Comp Analysis*, 2006;19:405-19.
15. Fusco D, Colloca G, Lo Monaco MR, Cesari M. Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clin Interv Aging*, 2007;2(3):377-87.
16. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease, 2011;283(2-3):65-87.
17. Misra MK, Sarwat M, Bhakuni P, Tuteja R, Tuteja N. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Med Sci Monit* 2009;15(10):209-19.
18. Neve JM, Matos CM, Moutinho CG, Gomes RL, Teixeira T. Atividade antioxidante e *in vitro* da citotoxicidade dos extractos aquosos de folha de *Mentha x piperita*. *Rev Fac Ciênc Saúde* 2009:344-54.
19. Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer.
20. Miorelli ST. Efeitos biológicos do composto organoselenado ebselen em células eucarióticas. Canoas, 2006.
21. Valentim IB, Goulart MOF, Silva CA, Bechara EJH, Trevisan MTS. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova* 2009;32(3):689-702.
22. Yagihara, FT. Efeito do CPAP no estresse oxidativo e na qualidade de vida em adultos e idosos com síndrome de apneia obstrutiva do sono. Dissertação. [Mestrado em Psicobiologia] – Universidade Federal de São Paulo; 2010.
23. Halliwell, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev* 2012;70:257-65.
24. Tieppo M. Croton Cajucara Benth (SACACA) uma planta da Amazônia. Avaliação do seu potencial antioxidante. Dissertação [Mestrado em Medicina] – Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007.
25. Ferreira RMA, Fernandes PLO, Fontes LO, Rodrigues APMS, Silva LT. Antioxidantes e sua importância na alimentação. *Rev Verde* 2010;5(5):26-30.
26. Sousa CMM, Silva HR, Vieira-Junior. GM, Ayres MCC, Costa CLC, Araújo DS. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim Nova* 2007;30(2):351-5.
27. Angelo PM, Jorge N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2007;66(1):232-40.
28. Dalvi SM, Patil VW, Ramraje NN, Phadtare JM, Gujarathi SU. Nitric oxide, carbonyl protein, lipid peroxidation and correlation between antioxidant vitamins in different categories of pulmonary and extra pulmonary tuberculosis. *Malays J Med Sci* 2013;20(1):21-30.
29. Kaliora AC, Dedoussis GVZ, Schmidt H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis* 2006;187:1.
30. Gasparri S. Estudo das atividades antioxidante e mutagênica/ antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal da *Costus spicatus*. Dissertação [Mestrado em Diagnóstico Genético e Molecular] - Universidade Luterana do Brasil; 2005.
31. Alves CQ, David JM, David JP, Bahia MV. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Quim Nova* 2010;33(10):2202-10.
32. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova* 2007;30(5):1323-38.

