

FLAVONOIDES E RADICAIS LIVRES¹

FLAVONOIDS AND FREE RADICALS

Fernanda Oliveira Lima², Aline Sobreira Bezerra³

RESUMO

O interesse por substâncias antioxidantes aumentou consideravelmente nos últimos anos, pois moléculas que diminuem a peroxidação de lipídeos podem minimizar ou inibir os danos oxidativos causados ao DNA, proteínas e carboidratos. Os flavonóides, um grupo de metabólitos secundários, amplamente distribuídos no reino vegetal, apresentam propriedades antiinflamatórias, antibacterianas, antivirais, antialérgicas e antitumorais, além de possuírem propriedades antioxidantes sobre radicais livres de forma a inativá-los e a prevenir os danos oxidativos em nível celular. Acredita-se que a atividade biológica dos flavonóides seja devido às suas propriedades antioxidantes. Devido à grande importância dada atualmente aos radicais livres e antioxidantes, existe uma forte demanda por técnicas analíticas capazes de identificar e quantificar esses dois grupos de compostos.

Palavras-chave: compostos polifenólicos, defesas antioxidantes, atividade antioxidante.

ABSTRACT

The interest for antioxidants has increased considerably in recent years, for molecules that decrease lipid peroxidation may minimize or inhibit oxidative damage caused to DNA, proteins and carbohydrates. Flavonoids, a group of secondary metabolites widely distributed in the plant kingdom, have anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, anti-allergic and antitumor properties, besides possessing anti-oxidant properties on free radicals in order to inactivate them and help to prevent oxidative damage at the cellular level. It is believed that the biological activity of flavonoids is due to their antioxidant properties. Due to the great importance currently given to free radicals and antioxidants, there is a strong demand for analytical techniques able to identify and quantify these two groups of compounds.

Keywords: polyphenolic compounds, antioxidant defenses, antioxidant activity.

INTRODUÇÃO

O interesse pela ação de compostos antioxidantes tem aumentado nos últimos anos, principalmente pela preocupação na prevenção ao envelhecimento e às doenças degenerativas relacionadas aos danos causados ao organismo pelos radicais livres, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, doenças degenerativas e disfunções cerebrais, como Alzheimer e Parkinson (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BIANCHI; ANTUNES, 1999; HAVSTEEN, 2002; VALKO et al., 2007, VELLOSA et al., 2007).

¹ Relacionada à Dissertação de Mestrado em Química Analítica.

² Professora do Curso de Zootecnia e Ciências Biológicas - UFSM/Palmeira das Missões. E-mail: fernandalima@gmail.com

³ Professora do Curso de Nutrição - UFSM/Palmeira das Missões. E-mail: alinecelo@hotmail.com

Os compostos polifenólicos, um grupo de metabólitos secundários, amplamente distribuídos no reino vegetal, apresentam propriedades antiinflamatórias, antibacterianas, antivirais, antialérgicas e antitumorais, além de possuírem propriedades antioxidantes e inibirem a atividade de muitas enzimas como as xantinas-oxidases. Acredita-se que a atividade biológica dos compostos polifenólicos seja devido às suas propriedades antioxidantes (PIETTA, 2000; HAVSTEEN, 2002; SIMÕES et al., 2004; VALKO et al., 2007).

Considerando a grande variedade de compostos com propriedades antioxidantes, alguns métodos *in vitro* foram desenvolvidos para a avaliação da atividade anti-radicalar destas espécies. Estes métodos empregam espécies radicalares estáveis em que a detecção do ponto final da reação se realiza, geralmente, por medida da absorvância no UV. Entre as metodologias mais conhecidas para determinação da atividade antioxidante de alimentos, bebidas e de plasma sanguíneo, estão os ensaios de captura de radicais livres DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina) e o ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico] (MOLYNEUX, 2004; PERES-JIMENEZ; SAURA-CALIXTO, 2008).

RADICAIS LIVRES E DEFESAS ANTIOXIDANTES

Nas últimas décadas, pesquisas apontam os radicais livres como principais responsáveis pelo envelhecimento e por doenças degenerativas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BIANCHI; ANTUNES, 1999; HAVSTEEN, 2002; RE et al., 1999; VALKO et al., 2007; VELLOSA, BARBOSA; OLIVEIRA, 2007).

Os radicais livres podem ser definidos como espécies que contêm um ou mais elétrons não pareados em orbitais atômicos ou moleculares, ou seja, que apresentam um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Este elétron não pareado, geralmente, confere um considerável grau de reatividade aos radicais livres (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; RIBEIRO et al., 2005; VALKO et al., 2007).

As reações de oxi-redução são o meio de formação de radicais livres, uma vez que eles provocam ou resultam deste tipo de reação. O radical livre pode ceder o elétron desemparelhado, oxidando-se, ou receber um elétron, reduzindo-se. Nesta tentativa de se estabilizar quimicamente, os radicais livres propiciam reações em cadeia que terminam alterando a conformação, a estrutura ou as funções de diversos componentes celulares (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; VALKO et al., 2007).

Para limitar os níveis de radicais livres e impedir a indução de danos, defesas antioxidantes agem frente à produção contínua deles durante os processos metabólicos com o objetivo de equilibrar a formação e a remoção de espécies radicalares no organismo. O efeito prejudicial dos radicais livres ocorre quando eles estão em quantidade excessiva no organismo, ultrapassando a capacidade do sistema de defesa antioxidante de neutralizá-los (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BIANCHI; ANTUNES, 1999; VALKO et al., 2007).

Inúmeros fenômenos fisiopatológicos são dependentes da geração local de radicais livres, como

por exemplo: produção de sais biliares ou de urato, detoxificação de anabolizantes esteróides ou de álcool etílico, agressão dos fagócitos sobre agentes infecciosos ou da reoxigenação sobre um tecido infartado, exaustão de um atleta treinado ou de outro sedentário, melhora da qualidade de vida ou diminuição da longevidade, malefícios da exagerada irradiação solar sobre o corpo ou benefício do tratamento por cobaltoterapia. Além disso, os radicais livres são parte essencial do organismo, devido ao trânsito de elétrons individualmente sobre os citocromos da cadeia respiratória mitocondrial. Portanto, os radicais livres são escolhidos pela natureza, de certa maneira, para ocasionar o envelhecimento e limitar o tempo de permanência de qualquer ser vivo sobre o nosso planeta (HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, 1999).

Nos seres vivos, as espécies mais conhecidas e que são geradoras de radicais são derivadas de espécies ativas de oxigênio. Quando o oxigênio recebe elétrons externos, pode passar a ser um ânion ou radical superóxido e reagir, tanto como um redutor, entregando um elétron excedente, ou como oxidante, transformando-se em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ou ainda mais comumente, o superóxido pode ser transformado enzimaticamente a peróxido.

ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)

Radicais livres derivados do oxigênio, chamados de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (em inglês, reactive oxygen species (ROS)) representam a classe mais importante de espécies de radicais gerados em sistemas vivos (VALKO et al., 2007). O oxigênio é o último aceptor de elétrons no sistema de produção de energia aeróbico, por isso representa uma parte essencial do metabolismo aeróbico (PIETTA, 2000).

A terminologia, EROs, inclui as espécies de radicais livres de oxigênio e outras que, apesar de não possuírem elétrons desemparelhados, são muito reativas em decorrência de sua instabilidade (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; RIBEIRO et al., 2005).

As EROs são onipresentes e derivadas do metabolismo do oxigênio. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O . Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila (HO_2^{\cdot}) e hidroxila (HO^{\cdot}), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Essas espécies desempenham papéis importantes na biologia celular, já que em baixos níveis as EROs são indispensáveis em muitos processos bioquímicos, incluindo mensagens intracelulares, diferenciação celular, apoptose, imunidade e defesa contra microorganismos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; VALKO et al., 2007; ROBERTS; SINDHU, 2009).

O estresse oxidativo, também referido na literatura como um desequilíbrio antioxidante dos radicais livres, ocorre quando o valor líquido destas moléculas excede a capacidade antioxidante, que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres. Assim, o estresse oxidativo pode ocorrer como consequência de um aumento geral na geração de EROs, uma diminuição do sistema antioxidante, ou ambos (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

RADICAL SUPERÓXIDO ($O_2^{\cdot-}$)

Considerado como pouco reativo em soluções aquosas, o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é formado após a primeira redução do O_2 pela adição de um elétron, pode reagir como oxidante ou como redutor dando origem a outras espécies reativas. Em meio aquoso, sua reação principal é a dismutação, na qual se produz uma molécula de peróxido de hidrogênio e uma molécula de oxigênio. Ele também é uma base fraca cujo ácido conjugado, o radical hidroperóxido (HOO^{\cdot}) é mais reativo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; RIBEIRO et al., 2005; VALKO et al., 2007).

O radical $O_2^{\cdot-}$, apesar dos efeitos danosos, tem importância vital para as células de defesa e sem ele o organismo está desprotegido contra infecções causadas por vírus, bactérias e fungos. A formação do radical $O_2^{\cdot-}$ ocorre de forma espontânea, por exemplo, na membrana mitocondrial, através da cadeia respiratória e por fagócitos ou linfócitos e fibroblastos durante o processo inflamatório, para combater corpos estranhos. Além disso, também pode ser produzido por flavoenzimas, lipoxigenases e cicloxigenases (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; RIBEIRO et al., 2005; VALKO et al., 2007).

RADICAL HIDROXIL (HO^{\cdot})

O radical hidroxil, teoricamente, é o mais reativo das EROs, com um curto tempo de meia-vida, de aproximadamente 10^{-9} s. Ele pode oxidar qualquer molécula biológica. Assim, quando produzidos, *in vivo*, os HO^{\cdot} reagem no próprio sítio onde foram gerados (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; RIBEIRO et al., 2005; VALKO et al., 2007).

As principais vias de formação do HO^{\cdot} são pela reação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com metais de transição e pela homólise da água por exposição à radiação ionizante (RIBEIRO et al., 2005; VALKO et al., 2007).

Para se estabilizar, o HO^{\cdot} promove, principalmente, a abstração de hidrogênio e/ou a adição a insaturações de moléculas próximas. Assim, este radical pode modificar bases purínicas e pirimidínicas, inativar várias proteínas e iniciar a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; VALKO et al., 2007).

RADICAL HIDROPEROXIL ($HO_2^{\cdot-}$)

O $HO_2^{\cdot-}$ representa a forma protonada do radical $O_2^{\cdot-}$. Evidências indicam que o radical hidroperoxil ($HO_2^{\cdot-}$) é mais reativo que o radical $O_2^{\cdot-}$ por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; VALKO et al., 2007).

PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂)

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂), apesar de não ser considerado um radical livre verdadeiro, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o HO•. Formado pela conversão espontânea e enzimática de dois radicais superóxido, o H₂O₂ é mais estável do que o radical HO• e tem a capacidade de atravessar camadas lipídicas. Estas propriedades possibilitam que o H₂O₂ reaja com alvos biológicos distantes do seu local de formação e provoque danos, por exemplo, na molécula do DNA por meio de reações enzimáticas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BIANCHI & ANTUNES, 1999; RIBEIRO et al., 2005).

DEFESAS ANTIOXIDANTES

A exposição aos radicais livres tem levado os organismos a desenvolverem uma série de mecanismos de defesa. Os mecanismos de defesa contra os radicais livres, induzidos pelo estresse oxidativo envolvem: mecanismos preventivos, mecanismos de reparo, defesas física, e as defesas antioxidantes (RIBEIRO et al., 2005; VALKO et al., 2007).

Antioxidante é um antigo termo, que no início era aplicado para a descrição de inibidores de processos oxidativos, os quais são capazes de reagir com radicais peroxil. Atualmente, este termo é frequentemente aplicado a todos os inibidores de radicais livres (DENISOV; AFANAS'EV, 2005). Os antioxidantes são substâncias que, mesmo presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidante, podem atrasar ou inibir as taxas de oxidação (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Existem três grandes tipos de defesas antioxidantes. Os antioxidantes diretos, “varredores” de radicais livres e quelantes, podem suprimir diretamente a formação de radicais livres. Além dos antioxidantes diretos, existem outros dois grupos importantes de inibidores de radicais livres: as enzimas antioxidantes e os compostos que possuem propriedades antioxidantes, que são considerados antioxidantes indiretos. Compostos com propriedades de antioxidação indireta podem afetar a formação de radicais livres, por exemplo, inibindo a atividade de enzimas pró-oxidantes (DENISOV; AFANAS'EV, 2005).

Inibidores diretos promovem a supressão da formação de radicais livres, através da reação direta com os radicais livres, como mostrado na figura 1, para formar novos radicais inativos ou quelar metais de transição cataliticamente ativos para formar complexos inativos (DENISOV & AFANAS'EV, 2005).

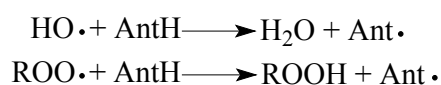


Figura 1 - Reação direta dos antioxidantes com os radicais livres hidroxil (HO•) e peroxil (ROO•) (DENISOV; AFANAS'EV, 2005).

Antioxidantes enzimáticos incluem, principalmente, as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx), catalase (CAT). A SOD catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , na presença de próton H^+ . A GPx catalisa a redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos a seus correspondentes alcoóis pela conversão da glutationa reduzida (GSH) para glutationa oxidada (GSSG). E a CAT é uma heme proteína citoplasmática que catalisa a redução do H_2O_2 à H_2O e O_2 (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; VALKO et al., 2007).

Antioxidantes não enzimáticos são representados, principalmente, pelo ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutationa (GSH), flavonóides e outros antioxidantes.

O ácido ascórbico, estrutura apresentada na figura 2, é uma molécula usada na hidroxilação de várias reações bioquímicas nas células. A sua principal função é a hidroxilação do colágeno, a proteína fibrilar que dá resistência aos ossos, dentes, tendões e paredes dos vasos sanguíneos. Além disso, é um poderoso antioxidante. Em valores de pH normalmente encontrados no meio intracelular, o ácido ascórbico encontra-se predominantemente na sua forma ionizada, o ascorbato (LEHNINGER, 2005).

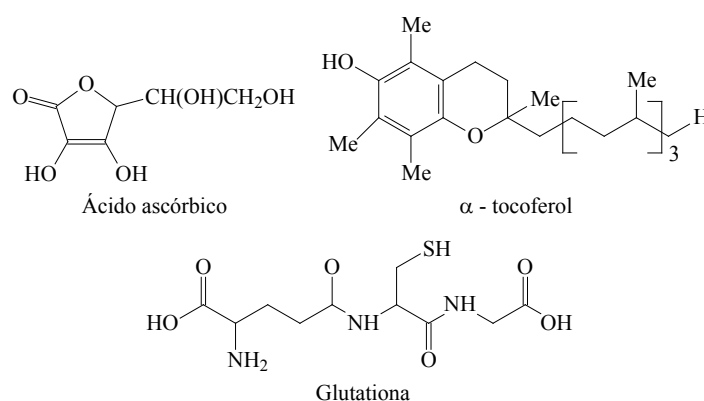


Figura 2 - Estrutura química dos principais antioxidantes não enzimáticos (LEHNINGER, 2005).

Uma das atividades mais importantes do ascorbato no organismo humano é na desidratação de resíduos de prolina no colágeno. O colágeno, uma proteína estrutural fundamental, necessita ter determinados resíduos de prolina na forma hidroxiprolina para manter uma estrutura tridimensional correta. A hidroxilação é feita pela enzima prolil-4-hidroxilase; o ascorbato não intervém diretamente nesta hidroxilação (LEHNINGER, 2005).

Por outro lado, o ácido ascórbico pode atuar como catalisador na reação de Fenton, promovendo a redução de íons férricos em íons ferrosos, conforme mostrado na figura 3. Assim, o ácido ascórbico pode ser tanto um antioxidante, quanto um pró-oxidante dependendo das condições (DENISOV; AFANAS'EV, 2005).

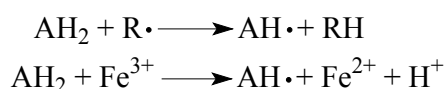


Figura 3 - Reação entre um antioxidante e com radicais livres e com íon férrico (DENISOV; AFANAS'EV, 2005).

Em plantas, o ascorbato encontra-se em concentrações relativamente elevadas (2 a 25 mM) e atua na desintoxicação do peróxido de hidrogênio. A enzima ascorbato peroxidase catalisa a redução do peróxido de hidrogênio a água, usando o ascorbato como agente redutor. Também é precursor dos íons tartarato e oxalato (LEHNINGER, 2005).

Este antioxidante reage, muito lentamente e somente por desprotonação, com o radical superóxido ($k = 0,32 \pm 0,08 \text{ l mol}^{-1}\text{s}^{-1}$), porém reage de forma relativamente rápida com o radical hidroperóxil ($K = 1,6 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1}\text{s}^{-1}$) (DENISOV; AFANAS'EV, 2005).

O α -tocoferol, também conhecido como vitamina E, estrutura apresentada na figura 2 é um derivado fenólico lipossolúvel, que apresenta um grupo hidroxila muito ativo que é responsável pela grande capacidade antioxidante desta vitamina (PIETTA, 2000; DENISOV; AFANAS'EV, 2005).

Segundo DENISOV; AFANAS'EV (2005), as constantes de velocidade para as reações de α -tocoferol com os radicais $\text{HOO}\cdot$ e $\text{ROO}\cdot$ são suficientemente elevadas, sendo estimadas em $2 \times 10^5 \text{ l mol}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Outro importante antioxidante é a glutatona, estrutura apresentada na figura 2. A glutatona é um tripeptídeo (g-L-glutamil-L-cisteinil-glicina (GSH), que desempenha várias funções no organismo, por exemplo, no metabolismo, transporte, catálise, manutenção de proteínas, etc. Como composto redox, a glutatona atua como um “varredor” de radicais livres e como um doador de elétrons no ciclo redox da glutatona peroxidase e da glutatona redutase que catalisa a redução de peróxidos. (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; RIBEIRO et al., 2005; VALKO et al., 2007; DENISOV; AFANAS'EV, 2005).

O ácido ascórbico e GSH são os mais importantes antioxidantes solúveis em meio aquoso encontrados nos organismos vivos. A atividade antioxidante da glutatona é especialmente importante no cérebro, que contém níveis relativamente baixos de SOD, catalase e glutatona peroxidase. Neste caso, a alteração do metabolismo de GSH pode contribuir para patogênese de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson (DENISOV; AFANAS'EV, 2005).

Em condições normais, existe um equilíbrio entre os níveis de radicais livres e os de espécies antioxidantes. Este equilíbrio é essencial para a sobrevivência e saúde dos organismos (VALKO et al., 2007).

Na tabela 1, estão relacionadas as EROs com os respectivos antioxidantes.

Tabela 1 – EROs e os antioxidantes.

ERO	Antioxidantes	
	Endógenos	Exógenos
Superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)	Superóxido dismutase (SOD): a) citoplasmática: Zinco-Cobre b) mitocondrial: Manganês	Vitaminas, zinco, cobre, manganês, picnogenol, EDTA
Radical peróxil ($\text{ROO}\cdot$)	Glutatona peroxidase, selênio, cisteína	Vitamina E, selênio
Radical hidroxila ($\text{HO}\cdot$)	Não relatado na literatura	Vitamina C, picnogenol, dimetil sulfóxido, EDTA, ácido dimercapto succínico e manitol
Peróxido de hidrogênio	Catalase Fe_2^+	Não relatado na literatura

Fonte: VALKO et al., (2007).

FLAVONÓIDES COMO CAPTADORES RADICALARES

Atualmente, são conhecidos mais de 4200 flavonóides diferentes (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002; RE et al., 1999; SIMÕES et al., 2004), os quais são substâncias fenólicas e/ou polifenólicas, derivadas de benzo-pirona e isoladas de uma vasta gama de plantas vasculares. Eles atuam em plantas como antioxidantes, antimicrobianos, fotorreceptores, atratores visuais, repelentes herbívoros, e para a seleção de luz. (PIETTA, 2000; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002; HAVSTEEN, 2002; RE et al., 1999; YAO et al., 2004; DENISOV; AFANAS'EV, 2005).

Além de vários vegetais, os flavonóides são encontrados em sementes, frutos secos, grãos e especiarias, bem como nas bebidas, como vinho (sobretudo vinho tinto), chá, e cevada (em níveis mais baixos) (PIETTA, 2000; HAVSTEEN, 2002; SIMÕES et al., 2004; DENISOV; AFANAS'EV, 2005).

Os flavonóides são membros de uma classe de compostos naturais que recentemente tem sido objeto de considerável interesse científico e terapêutico, uma vez que têm sido relatadas importantes atividades biológicas, tais como, ações antialérgicas, antivirais, antiinflamatórias e vasodilatadoras. Entretanto, o maior interesse, realmente, tem sido na atividade antioxidante dos flavonóides, que é devido a sua capacidade de inibir e/ou reduzir a formação de radicais livres e na capacidade de quelar metais (HARBORNE; WILLIAS, 1992; PIETTA, 2000; HAVSTEEN, 2002; RE et al., 1999; DENISOV; AFANAS'EV, 2005).

O termo “fenólico” ou “polifenólico” pode ser definido como sendo uma substância que tem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais (ésteres, éteres metílicos, glicosídeos e outros) (SIMÕES et al., 2004).

A estrutura básica dos flavonóides é o núcleo que consiste de 15 átomos de carbono, composto do tipo C6-C3-C6, dispostos em dois anéis aromáticos, que são denominados A e B, conectados por uma ponte de três carbonos, que contém um átomo de oxigênio (anel C), como mostrado na figura 4 (PIETTA, 2000; HAVSTEEN, 2002; RE et al., 1999; SIMÕES et al., 2004).

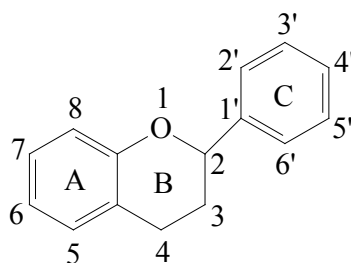


Figura 4 - Estrutura básica dos flavonóides (ACKER et al., 1996; PIETTA, 2000; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002; HAVSTEEN, 2002; DENISOV; AFANAS'EV, 2005).

Do ponto de vista biossintético, os flavonóides são derivados do ácido cinâmico (*trans*-4-cumarato), o qual deriva do metabolismo dos aminoácidos fenilalanina e tirosina. O ácido cinâmico age como precursor na síntese de um intermediário, ao qual são adicionados três resíduos de malonato

e, posteriormente, a estrutura é ciclizada. Subseqüentes hidroxilações e reduções formam diferentes flavonóides (ACKER et al., 1996; PIETTA, 2000; FORKMANN; MARTENS, 2001; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002; HAVSTEEN, 2002; DENISOV; AFANAS'EV, 2005).

A grande diversidade de flavonóides é decorrente das variações estruturais, tais como: flavonas, flavanóis, flavonóis, diidroflavonóis, antocianidinas e isoflavonóides.

De modo geral, a grande variabilidade dos flavonóides apresenta: 1) diferenças na estrutura do anel C e no seu estado de oxi-redução; 2) diferenças no grau de hidroxilação e nas posições dos grupos hidroxila; 3) diferenças na derivatização dos grupos hidroxila, por exemplo, com grupos metila, hidratos de carbono, ou isoprenóides (PIETTA, 2000; HAVSTEEN, 2002; SIMÕES et al., 2004; DENISOV; AFANAS'EV, 2005). Os flavonóides são classificados em grupos pelo nível de oxidação e no padrão de substituição do anel C. Enquanto os compostos individuais, dentro de um mesmo grupo, são diferenciados pelo padrão de substituição dos anéis A e B. (PIETTA, 2000; HAVSTEEN, 2002; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002; YAO et al., 2004; SIMÕES et al., 2004).

Os flavonóides são, geralmente, hidroxilados nas posições 3, 5, 7, 3', 4' e 5'. Alguns desses grupos hidroxila podem ser metilados, acetilados ou sulfatados. Quando glicosídeos são formados, a ligação glicosídica é normalmente localizada na posição 3. Os glicosídeos mais comuns são L-ramnose, D-glicose, glucorhamnose, galactose, ou arabinose (HAVSTEEN, 2002).

Os efeitos antioxidantes dos flavonóides podem ser explicados por sua prevenção a peroxidação lipídica através do aprisionamento de radicais de iniciação lipídica, tais como, superóxido, hidroxil e hidroperoxil, conforme mostrado na figura 5 (HAVSTEEN, 2002; DENISOV; AFANAS'EV, 2005).

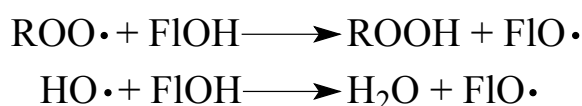


Figura 5 - Reação dos flavonóides com os radicais livres peroxil (ROO[•]) e hidroxil (HO[•]) (DENISOV; AFANAS'EV, 2005).

Outro efeito, muito importante, é a quelação de íons metálicos, por exemplo, a complexação com íons ferro, suprimindo a reação de Fenton, mostrada na figura 6 (ACKER et al., 1996; DENISOV; AFANAS'EV, 2005).

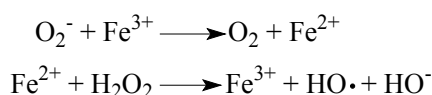


Figura 6 - Reação de Fenton (ACKER et al., 1996; DENISOV; AFANAS'EV, 2005).

Muitos autores têm tentado elucidar a relação estrutura-atividade dos flavonóides quanto ao poder antioxidante. No entanto, isso é uma tarefa difícil, já que o potencial antioxidante pode ser determinado por vários fatores, dos quais a lipoflicidade, a quelação de ferro, e a limpeza de radicais livres são os mais importantes.

As principais aplicações dos flavonóides são na indústria como corantes, aromatizantes e flavorizantes. Além disso, o interesse pela indústria farmacêutica é crescente, e justifica-se pelo fato dos flavonóides apresentarem uma série de vantagens em relação a outros fármacos, principalmente em termos de não apresentar efeitos colaterais, como ulcerogenicidade. Assim, parece claro que os antioxidantes naturais são bem indicados para atenuar os efeitos deletérios do estresse oxidativo celular. Entretanto, estudos mais aprofundados e rigorosos devem ser conduzidos para determinar a concentração destas espécies em diferentes tipos de plantas medicinais e o seu real poder antioxidante frente a sistemas radicalares.

MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Diversas metodologias para medição da atividade antioxidante total são descritas na literatura, principalmente, para amostras de fluidos biológicos, extratos de alimentos e plantas, e compostos puros. Cada método varia quanto ao tipo de radical gerado, ao indicador de oxidação empregado e ao método de detecção e quantificação usado. (RE et al., 1999; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999; HUANG et al., 2005).

Os ensaios antioxidantes podem ser classificados em duas categorias: ensaios baseados em estudos de cinética química, também denominados de métodos diretos e ensaios mediados pela transferência de elétrons, também denominados de métodos indiretos (RE et al., 1999; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999; HUANG et al., 2005).

Os radicais livres podem ser gerados por processos físico-químicos, químicos ou enzimáticos. Os métodos físico-químicos envolvem técnicas como fotólise ou oxidação fotodinâmica. Já os métodos químicos utilizam sistemas, por exemplo, de Fenton, que contêm um agente redutor e um íon metálico. E, por fim, os métodos enzimáticos empregam as reações principalmente as reações da xantina oxidase e da NAD(P) oxidase na geração de radicais livres (RE et al., 1999; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999; HUANG et al., 2005).

Segue abaixo a descrição dos métodos mais empregados na avaliação da atividade antioxidante dos flavonóides.

CINÉTICA QUÍMICA

Redução do β -caroteno

Este ensaio está baseado na capacidade de substâncias antioxidantes em retardar a oxidação do β -caroteno na presença de luz. A solução de β -caroteno em CH_2Cl_2 , de coloração amarelada, atua como um revelador em cromatografia em camada delgada sendo que quando aplicada em uma

corrida cromatográfica e exposta à luz inicia-se o processo de oxidação do β -caroteno ocasionando a descoloração da placa. Substâncias antioxidantes serão evidenciadas através de manchas amareladas demonstrando o efeito antioxidante da amostra (DENISOV; AFANAS'EV, 2005).

Quimioluminescência do luminol

De forma geral, este método está baseado na habilidade do luminol e de compostos relacionados em gerar luminescência sob um fluxo de radicais livres. A produção de espécies reativas de oxigênio gera certa luminescência, a qual pode ser aumentada através da inserção do luminol no sistema (FERREIRA; ROSSI, 2002).

A adição de um antioxidante no sistema, como um “sequestrador” de radicais, resulta numa extinção da quimioluminescência num pronunciado período de indução, conforme mostrado na figura 7. Outras versões do método diferem no tipo de radical livre ativo produzido e no modo como este é produzido (FERREIRA; ROSSI, 2002).

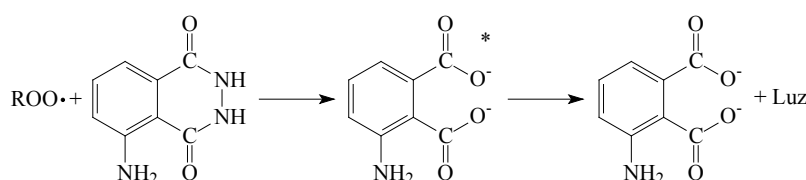


Figura 7 - Reação do luminol com radicais alquil-peroxilas em meio alcalino para geração de luz.

TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRONS

Redução do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)

O radical DPPH é estável, de coloração púrpura, porém quando reduzido passa a ter coloração amarela. Com isso, pode ser facilmente detectado por espectroscopia devido a sua intensa absorção na região visível (SÁNCHEZ-MORENO, 2002; MOLYNEUX, 2004).

O método está baseado na capacidade do DPPH em reagir com doadores de hidrogênio, conforme apresentado na figura 8. Na presença de substâncias antioxidantes o mesmo recebe H⁺ sendo então reduzido. O ensaio é iniciado pela adição do DPPH à amostra, então a capacidade da amostra de reduzir o DPPH, ou seja, evitar sua oxidação, é evidenciada pela porcentagem de DPPH restante no sistema. Com isso, a porcentagem de DPPH restante é proporcional à concentração de antioxidante (AH) (SÁNCHEZ-MORENO, 2002; MOLYNEUX, 2004).

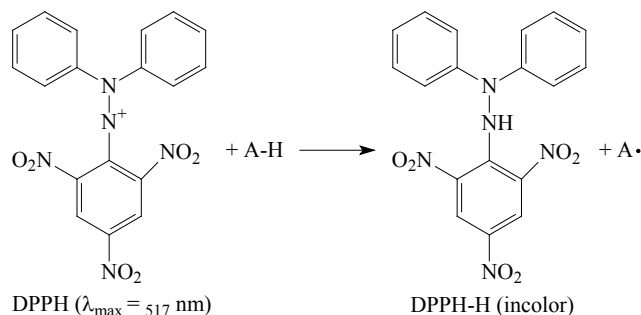


Figura 8 - Reação do DPPH com espécies antioxidantes (MOLYNEUX, 2004).

Oxidação do ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico))

O ensaio TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) tem como objetivo monitorar o decaimento do cátion-radical $ABTS^{*+}$, produzido pela oxidação do ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)), gerado pela adição de uma amostra contendo antioxidantes. Na ausência de fenóis, $ABTS^{*+}$ é estável, mas reage energeticamente com um doador de átomo de hidrogênio, como fenóis, sendo convertido em uma forma não colorimétrica do ABTS, conforme reação apresentada na figura 9. A quantificação é determinada pela quantidade de $ABTS^{*+}$ consumida, devido à reação deste com a amostra contendo fenóis, sendo expressa em Trolox equivalente (HUANG et al., 2005).

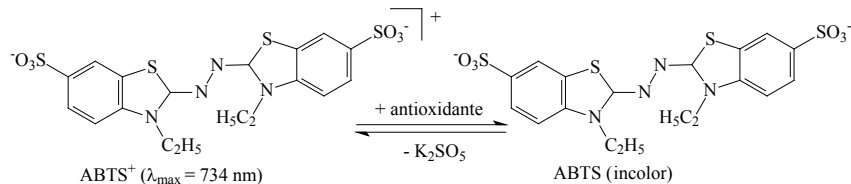


Figura 9 - Reação do trolox com espécies antioxidantes (PANNALA et al., 2001; HUANG et al., 2005).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O interesse pela descoberta de novos antioxidantes de fontes naturais tem aumentado, principalmente para prevenir a deterioração fisiológica de organelas e, conseqüentemente, minimizar o efeito oxidativo provocado pelos radicais livres nas células vivas. Várias substâncias de origem vegetal têm sido apontadas como compostos antioxidantes. Recentemente, o interesse por essas substâncias antioxidantes aumentou muito, pois moléculas que diminuem a peroxidação de lipídeos, podem minimizar os danos oxidativos causados ao DNA, proteínas e carboidratos.

Os flavonóides apresentam uma série de vantagens em relação a outras drogas, principalmente em termos de não apresentar efeitos colaterais, como ulcerogenicidade. Assim, parece claro que os antioxidantes naturais são bem indicados para atenuar os efeitos deletérios do estresse oxidativo celular. Contudo, estudos mais aprofundados e rigorosos devem ser conduzidos para determinar a concentração destas espécies em diferentes tipos de plantas medicinais e o seu real poder antioxidante frente a sistemas radicalares.

REFERÊNCIAS

- ACKER, S. B. E. V. et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 20, p.331-342, 1996.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**. v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- DENISOV, E. T. **Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology**. Boca Raton: CRC Taylor & Francis Group, 2005. 981p.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 43, p. 61-68, 1997.
- FERREIRA, E. C.; ROSSI, A. V. A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise. **Química Nova**. v. 25, n. 6, p.1003-1011, 2002.
- FORKMANN, G.; MARTENS, S. Metabolic engineering and applications of flavonoids. **Current Opinion in Biotechnology**., n. 12, p. 155-160, 2001.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*, 3. Aufl., **Oxford University Press**, Oxford, 1999
- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. n. 55, p. 481-504, 2000.
- HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 96, p. 67–202, 2002.
- HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 13, p.572-584, 2002.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 1841, n. 53, p. 1841-1856, 2005.
- LEHNINGER, L. A. **Lehninger principles of biochemistry**. 4th ed. New York: W. H. Freeman, 2005.
- MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**. v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.
- PANNALA, A. S. et al. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 282, p.1161-1168, 2001.

PERES-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Anti-oxidant capacity of dietary polyphenols determined by ABTS assay: a kinetic expression of the results. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 43, p. 185–191, 2008.

PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**. v. 63, p. 1035–1042, 2000.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 26, n. 9/10, p. 1231–1237, 1999.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**. v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

ROBERTS, C. K.; SINDHU, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sciences**. n. 84, p. 705–712, 2009

SANCHEZ-MORENO, C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Science and Technology International**. v. 8, n.3, p. 121–137, 2002.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação e da capacidade antioxidante. **Química Nova**. v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5^o edição, ver. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 39, p. 44–84, 2007.

VELLOSA J. C. R.; BARBOSA, V. F.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 5, n. 2, p. 119-130, 2007.

YAO, L. H. et al. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**. v. 59, p.113-122, 2004.