

Hermes-Lima et al.

Consulting in Science and Education

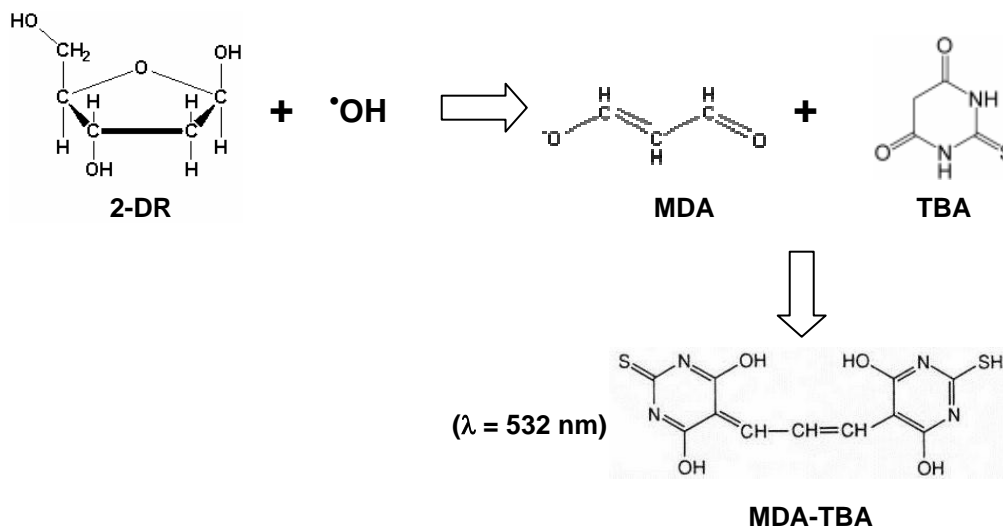
Apoio: Grupo de Pesquisa em Radicais de Oxigênio (GPRO)
Universidade de Brasília, Brasília, DF, 70910-900
E-mail: hermes@unb.br



Técnicas utilizadas corriqueiramente (1.1 a 1.10) e em implantação (2.1 a 2.4) pela equipe do Prof. Marcelo Hermes-Lima, PhD.

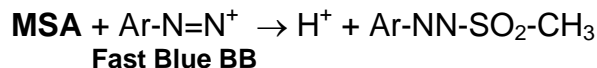
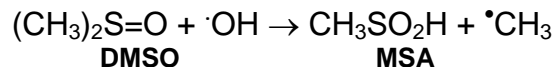
1.1. Degradação oxidativa da 2-desoxirribose

Técnica espectrofotométrica que determina a degradação oxidativa da 2-DR mediada por radicais hidroxil ($\cdot\text{OH}$) ou outras espécies químicas de alta reatividade. O princípio do ensaio é a quantificação de um produto da degradação da 2-desoxirribose (2-DR), o malonaldeído (MDA), através de sua condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Esta metodologia, de ampla utilização pela equipe de M. Hermes-Lima (vide por exemplo: Lopes et al., 1999; Hermes-Lima et al., 2000, 2001), foi recentemente adaptada para uso em extratos vegetais aquosos.



1.2. Oxidação do dimetil sulfóxido (DMSO)

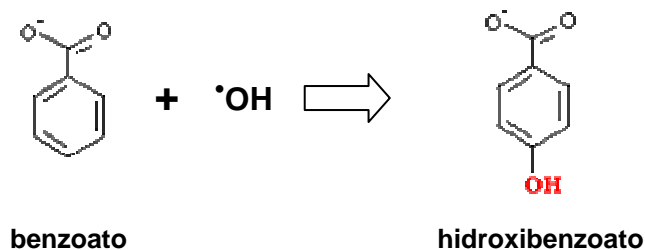
Metodologia de detecção de radicais $\cdot\text{OH}$ ideal em sistemas biológicos (e extratos vegetais) devido à baixa toxicidade/interferência do DMSO. O método é baseado na reação do DMSO com o radical $\cdot\text{OH}$ originando um produto não radicalar estável, o ácido metanosulfínico (MSA).



O MSA possui um átomo de oxigênio idêntico ao original encontrado no radical $\cdot\text{OH}$ sequestrado, desse modo, a quantificação de MSA torna-se uma forma indireta de determinação do radical $\cdot\text{OH}$ presente no meio. A Segunda etapa do procedimento inicia-se com a reação entre o MSA e um sal diazônico (Fast Blue BB) resultando em um produto que quando extraído em solvente orgânico apresenta coloração amarelada ($\lambda_{\text{MAX}} = 425 \text{ nm}$) precipitando-se em solução aquosa, a qual é extraída com a utilização de uma solução de tolueno-butanol.

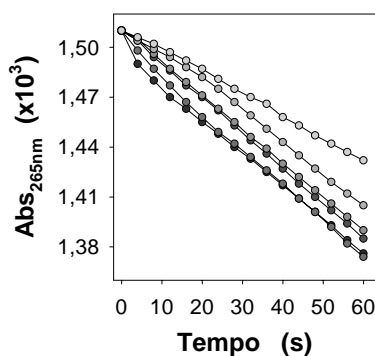
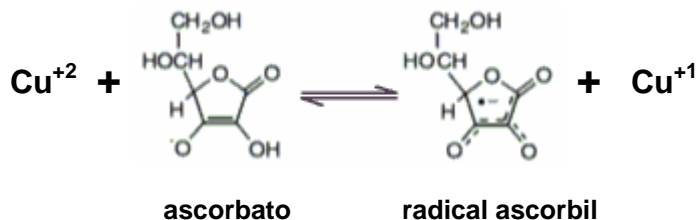
1.3. Hidroxilação do benzoato

Radicais hidroxil gerados *in situ* promovem a hidroxilação do benzoato a hidroxibenzoato, por meio de uma reação de adição. Os produtos assim formados são fluorescentes, podendo ser medidos os picos de emissão ($\lambda = 407 \text{ nm}$) e excitação ($\lambda = 305 \text{ nm}$).



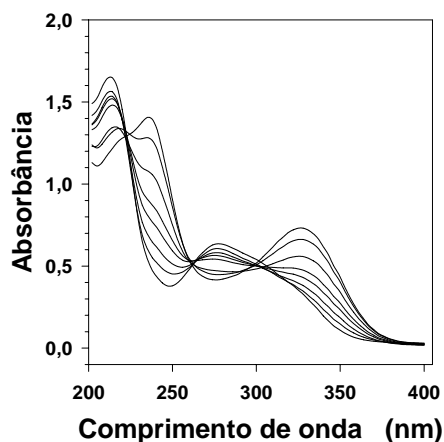
1.4. Oxidação de ácido ascórbico

Metodologia espectrofotométrica baseada na oxidação do ácido ascórbico (medido diretamente no comprimento de onda de 265 nm) mediada por metais de transição em estado oxidado, incluindo Cu(II) e Fe(III). A figura abaixo mostra o efeito do ácido tânico e sobre a oxidação de ascorbato induzida por íons cobre.



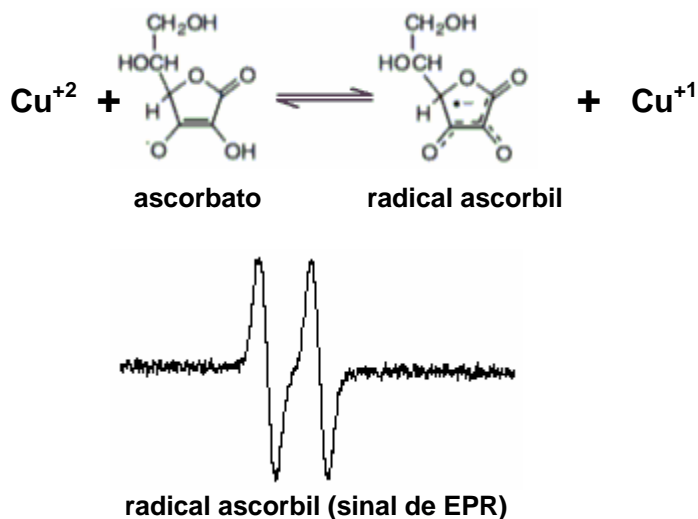
1.5. Formação de complexos metal-quelante

Cinética e caracterização de complexos metal-quelante através de técnicas espectrofotométricas (VIS + UV). A figura abaixo apresenta a formação de um complexo entre o polifenol ácido tânico e íons cobre.



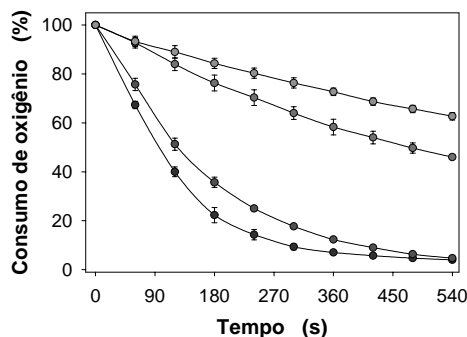
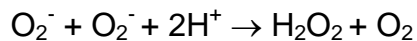
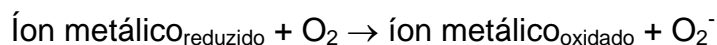
1.6. Estudos da formação de radical ascorbil através de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

Técnica que se baseia na detecção do sinal eletrônico emitido por qualquer molécula contendo elétrons desemparelhados nas camadas mais externas, quando posta sob a influência de um campo magnético. Este método torna possível a detecção direta do radical ascorbil em um equipamento de EPR. Compostos antioxidantes inibem a oxidação de ascorbato e portanto a formação do radical ascorbil (vide Mauricio et al., 2003).



1.7. Consumo de oxigênio intermediado por radicais livres

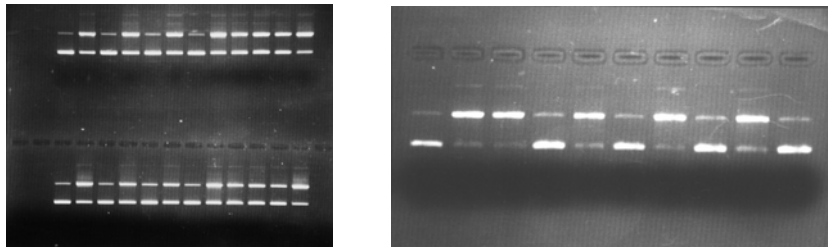
Metodologia baseada na quantificação do dióxigênio dissolvido no meio reacional. Seu desaparecimento é resultado da reação de oxidação de metais de transição em sua forma reduzida com formação de O_2^- e/ou H_2O_2 . A figura abaixo mostra o efeito do ácido tânico no consumo de O_2 cobre-dependente.



1.8. Degradação oxidativa de DNA de plasmídio

Metodologia baseada na degradação de moléculas de DNA de plasmídio através da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) no meio reacional. Nessa metodologia, os radicais formados produzem danos oxidativos em DNA de plasmídio na forma super-enovelada, provocando alterações estruturais na molécula. Os produtos formados a partir destes ataques radiculares são as formas circular-aberto (*open-circular*) e linear. Antioxidantes podem proteger o DNA do dano oxidativo (vide Hermes-Lima et al., 1998).

A figuras abaixo mostram (em 3 géis de agarose) o efeito do ácido tânico + cobre/ascorbato sobre o DNA plasmidial pUC18. As formas super-enoveladas são as bandas superiores.

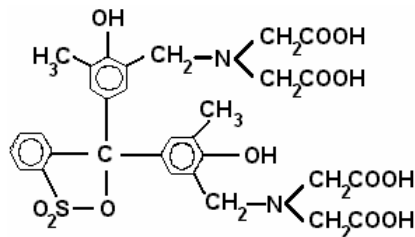


1.9. Método TBARS (peroxidação lipídica)

Método clássico para a determinação de produtos aldeídicos formados a partir da peroxidação lipídica em mitocôndrias isoladas, tecidos animais e extratos vegetais. Os produtos aldeídicos são então reagidos com TBA ($\lambda = 532 \text{ nm}$).

1.10. Método do alaranjado de xilenol (peroxidação lipídica)

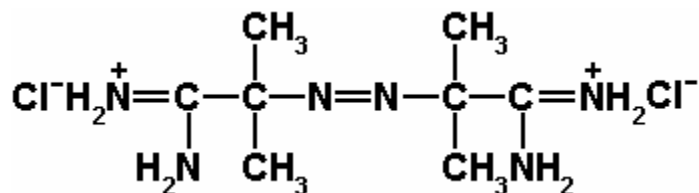
Método baseado na reação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) com o complexo Fe(II) xilenol em meio ácido. O produto desta reação não-estequiométrica, que envolve uma propagação do tipo radicalar, é o complexo Fe(III)-xilenol ($\lambda = 580 \text{ nm}$). Esta metodologia de determinação de conteúdos de LOOH em extratos/homogenatos foi desenvolvida por Hermes-Lima e colaboradores em 1995 (vide referência abaixo). A publicação resultante deste trabalho conta até o presente momento com 55 citações.



Alaranjado de xilenol

2.1. TRAP (Total Radical-trapping Antioxidant Parameter)

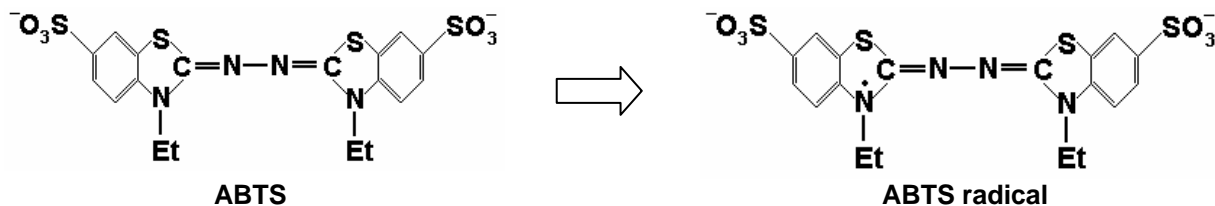
Seu princípio está baseado na peroxidação de lipídeos endógenos e exógenos em fluidos biológicos quando expostos a azo-iniciadores, como o AAPH. Pode ser aplicado a todos os fluidos biológicos e é determinado através do consumo de O₂ e/ou através da detecção direta de radicais peroxil por quimioluminescência.



2,2'- azobis (2-amidinopropano) hidroclorídrico (AAPH)

2.2. Formação do radical ABTS

Metodologia baseada na oxidação do ABTS (2,2'-Azinobis (3-etilbenzotiazolína 6-sulfonada) e formação do ABTS radical, o qual possui absorvância em 3 comprimentos de onda distintos ($\lambda = 660, 734$ e 820 nm). Antioxidantes presentes em extratos/homogenatos podem inibir a formação de ABTS radical.



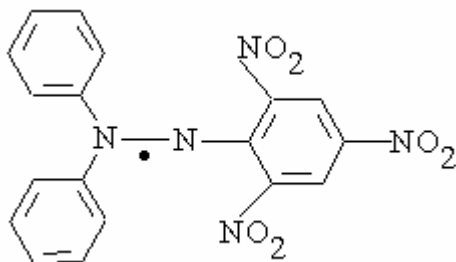
2.3. FRAP (Ferric Reducing Ability)

Metodologia baseada na determinação da capacidade (e cinética) de antioxidantes encontrados no plasma ou em extratos vegetais (extratos aquosos) de reduzir o complexo de TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe(III) a Fe(II)-TPT. O complexo com Fe(II) é medido a 539 nm. Este método avalia então a capacidade redutora do meio reacional.

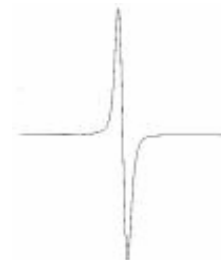
Nosso laboratório tem utilizado ferrozina para determinar (em 562 nm) a formação de Fe(II), a partir de Fe(III) e um redutor (como o ácido tânico; vide Lopes et al., 1999). Porém, este método tem limitações para estudos cinéticos.

2.4. Decomposição do radical DPPH (2,2'-difenil-1-picrilidrazil)

Metodologia baseada na ação de compostos antioxidantes sobre o DPPH[•], uma espécie radicalar estável. A avaliação antioxidante é obtida através de estudos espectrofotométricos ($\lambda = 517 \text{ nm}$) ou através da detecção do sinal de EPR do radical DPPH.



radical DPPH



sinal de EPR do radical DPPH

Referências:

- Avellar I, Magalhães MMM, Silva AB, Souza LL, Leitão AC & **Hermes-Lima M**. Re-evaluating the role of 1,10-phenanthroline in oxidative reactions involving ferrous ions and DNA damage. *Biochim. Biophys. Acta (General Subjects)*, submetido.
- Hermes-Lima M**. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: *Functional Metabolism: Regulation, and Adaptation* (pp 319-368, Chapter 12). K.B. Storey (Ed.), John Wiley & Sons, Inc., New York, **no prelo** (o livro será lançado em New York em agosto de 2004).
- Mauricio AQ, Lopes GKB, Gomes CS, Oliveira RG, Alonso A & **Hermes-Lima M**. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) inhibits iron-mediated ascorbate oxidation and ascorbyl radical formation. *Biochim. Biophys. Acta* 1620: 15-24, 2003.
- Hermes-Lima M**, Gonçalves MS & Andrade Jr RG. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) prevents copper-mediated free radical formation. *Mol. Cell. Biochem* 228: 73-82, 2001.
- Santos NCF, Castilho RF, Meinicke AR & **Hermes-Lima M**. The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) inhibits mitochondrial lipid peroxidation induced by Fe(II)-citrate. *Eur. J. Pharmacol.* 428: 37-44, 2001.
- Hermes-Lima M**, Ponka P & Schulman HM. The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) and its analogues prevent damage to 2-deoxyribose mediated by ferric iron plus ascorbate. *Biochim. Biophys. Acta (General Subjects)* 1523: 154-160, 2000.
- Ramos-Vasconcelos GR, Alves ALH & **Hermes-Lima M**. Radicais livres, antioxidantes e a adaptabilidade animal. In: *O Que é Vida: Para Entender a Biologia do Século XXI*, (pp. 209-231, Capítulo 9) C.N. El-Hani e A.A.P. Videira (Eds.), Editora Relume-Dumará, Rio de Janeiro, 2000.
- Lopes GKB, Schulman HM & **Hermes-Lima M**. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochim. Biophys. Acta* 1472: 142-152, 1999.
- Hermes-Lima M**, Willmore W, & Storey KB. Quantification of lipid peroxidation in tissues based on the Fe(III)xylene orange complex formation. *Free Radic. Biol. Med.* 19: 271-280, 1995.
- Hermes-Lima M**, Nagy E, Ponka P & Schulman HM. The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) protects plasmid pUC-18 DNA against $\cdot\text{OH}$ -mediated strand breaks. *Free Radic. Biol. Med.* 25: 875-880, 1998.

Produção: Roberto G. Andrade Jr. (Biólogo e Mestre, UnB; sócio da empresa Hermes-Lima et al.)