

# Efeito de antioxidantes endovenosos sobre a peroxidação lipídica em humanos

---

José de Felipe Jr.  
Sandro Percário

Nas últimas décadas e, em especial nos últimos cinco anos, estamos assistindo a um vertiginoso aumento no interesse pelo estudo de radicais livres. Este fato não ocorre por mera casualidade, sendo decorrência do rápido crescimento do conhecimento médico-científico e de crescentes evidências da participação destas moléculas na gênese e fisiopatologia de inúmeras doenças de impacto mundial, tais como o câncer e a aterosclerose, dentre outras (01-18).

Quimicamente, definimos radicais livres como moléculas que apresentam vida livre e número ímpar de elétrons na camada de valência, ou seja, são espécies químicas reativas que possuem elétrons não pareados nos orbitais mais externos (17,18).

Embora inúmeras moléculas se encaixem na definição química de radical livre, consideramos que as espécies reativas tóxicas do oxigênio (ERTO) são as principais espécies químicas relacionadas com mecanismos patogênicos. As principais ERTOs são cinco: radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ); radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ); peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ); radicais alquila ( $R^{\cdot}$ ) e radicais peróxi-

do (ROO<sup>•</sup>), sendo os dois primeiros responsáveis pelo desencadeamento da produção dos outros três (03,10,17,18).

As ERTOs fazem parte do mecanismo intermediário das moléstias que envolvem isquemia, inflamação, trauma, moléstias degenerativas e hiperoxia. Mesmo nas moléstias onde as ERTOs não são a causa primária de lesão, elas são importantes porque toda destruição celular libera ferro, o qual catalisa a geração de radicais hidroxila, que é o mais lesivo para as membranas e o sistema enzimático (03,17-20).

A formação de radicais hidroxila nos sistemas biológicos ocorre de maneira não enzimática, através da reação de Haber-Weiss (Fig. 1) e necessita da presença de ferro (Fe<sup>3+</sup>) ou metais de transição.

Os radicais livres O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) apesar de pequena ação direta sobre constituintes celulares, causando-lhes dano, são considerados agressivos principalmente pelo fato de na reação de Haber-Weiss, reagirem para produzir os radicais hidroxila (OH<sup>•</sup>), verdadeiros responsáveis pela injúria celular. Estes radicais hidroxila atuando sobre lipídios, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos, em um fenômeno chamado de "estresse oxidativo", levarão a modificações da função e estrutura celular que poderão levar esta célula à morte. Da ação dos OH<sup>•</sup> sobre ácidos nucleicos decorrem modificações estruturais da molécula do DNA, implicando em alterações tais como mutações gênicas; sobre carboidratos (principalmente em glicosaminoglicanos) são capazes de provocar quebras nas cadeias glicídicas incorrendo em perda do reconhecimento do contato celular, podendo levar a divisões celulares não limitadas pelo contato de células vizinhas; em proteínas os radicais livres causam o fenômeno conhecido como peroxidação proteica, que causa quebra de cadeias polipeptídicas e/ou perda ou alteração de atividade enzimática, incorrendo em alterações funcionais e estruturais na célula; sobre lipídios resultam no bem conhecido fenômeno chamado peroxidação lipídica, que é principalmente responsável por alterações da permeabilidade da membrana celular. Desta forma evidenciamos que o resultado do estresse oxidativo é, com frequência, a morte da célula.

**Figura 1 - Reação de Haber-Weiss**



A manifestação do estresse oxidativo sobre os lipídios celulares é um dos fenômenos mais importantes mediado por radicais livres nos processos patológicos e recebe o nome particular de peroxidação lipídica.

Em nível fisiológico, podemos nos defender da injúria mediada pelos radicais livres utilizando as reservas antioxidantes celulares. Estas reservas são constituídas

por três sistemas de defesa antioxidante: enzimático; moléculas pequenas e o sistema de quelação de metais.

O sistema antioxidante enzimático é composto por três tipos de enzimas. O primeiro tipo são as enzimas superóxido dismutases (SOD), que atuam sobre o radical superóxido transformando-o em peróxido de hidrogênio. As SOD são representadas pela SOD-mitocondrial (mangânese dependente), a SOD-citoplasmática (dependente de cobre e zinco) e a SOD-extracelular (ferro dependente). Fazem parte do sistema antioxidante enzimático ainda, as enzimas Glutathione peroxidase (dependente de selênio) e a Catalase (20). Tanto a glutathione peroxidase como a catalase atuam sobre o peróxido de hidrogênio transformando-o em água. No entanto, não dispomos de enzimas que atuem sobre o radical hidroxila, verdadeiro causador de estresse oxidativo. Para tanto, nosso organismo dispõe de moléculas pequenas que diminuem a reatividade do radical hidroxila, tais como as vitaminas A, E e C, o beta caroteno, o ácido úrico e a molécula de glutathione (21-24).

Como sistema auxiliar de defesa antioxidante, o organismo utiliza-se de moléculas (principalmente proteínas) que se ligam à metais de transição impedindo-os de catalizar a reação de Haber-Weiss. Este sistema quelador de íons metálicos é composto por moléculas como a ferritina, a transferrina e a lactoferrina (queladoras de ferro), a ceruloplasmina e a albumina (queladoras de cobre) e um grupo de proteínas chamadas de metalotioneínas, proteínas que apresentam grupamentos tiólicos (enxofre-hidrogênio), capazes de se ligar à vários metais, tais como o chumbo e o cádmio (25).

Quando a produção de radicais livres sobrepuja a capacidade fisiológica de defesa antioxidante, instala-se o fenômeno de "estresse oxidativo", resultando em distúrbios morfológico-funcionais das células agredidas. A partir de então o dano celular passa a se acumular resultando no aparecimento de sinais e sintomas clínicos de moléstias (principalmente degenerativas) e é necessário que se intervenha com medidas terapêuticas antioxidantes.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de verificar o efeito do uso de estratégias antioxidantes diferentes sobre a peroxidação lipídica em humanos.

## Material e métodos

Foram estudados 107 indivíduos de ambos os sexos, provenientes de consultório de clínica médica. Estes indivíduos foram divididos em cinco grupos, cada qual sendo submetido a uma estratégia antioxidante endovenosa diferente, como segue:

- **EDTA-Magnésio:**

Preparado pela dissolução de 1,5 g EDTA em 200 ml de soro glicosado a 5% e misturado a uma solução 610 ml de sulfato de magnésio a 10%.

• **Magnésio:**

O sulfato de magnésio a 10%. 10 ml foi administrado em 200 ml de soro glicosado a 5%.

• **Vitamina C:**

Administrou-se 3 gramas de ácido ascórbico para cada indivíduo.

• **Manitol:**

O manitol foi administrado na quantidade de 10 g para cada indivíduo.

• **Completa:**

A estratégia completa consistiu na soma de todas as estratégias individuais relacionadas anteriormente, assim cada indivíduo recebeu EDTA, sulfato de magnésio, Vitamina C e Manitol nas proporções e quantidades já citadas.

Cada tipo de antioxidante foi misturado a um frasco de 250 ml de soro glicosado estéril, para formar o chamado soro antioxidante. Todos os indivíduos receberam o soro antioxidante pela via endovenosa por um período de duas horas ininterruptas, sendo coletadas amostras de sangue periférico para avaliação laboratorial da peroxidação lipídica imediatamente antes e imediatamente após a aplicação do soro antioxidante correspondente.

Dosagem do Malondialdeído (MDA):

A peroxidação lipídica foi avaliada pela dosagem do Malondialdeído (MDA), cujo procedimento técnico consiste em juntar 500ml de amostra a 1,0 ml do reagente do ácido tiobarbitúrico (TBA 10 mM em  $KH_2PO_4$  75 mM). Em seguida leva-se ao banho-maria (95°C x 60 min), após a incubação deixar esfriar à temperatura ambiente ou em água corrente; adicionar 4,0 ml de álcool n-butílico, homogeneizar bem e centrifugar a 3.000 rpm por 15 min; colher 3,0 ml do sobrenadante para leitura espectrofotométrica a 535nm (26-29).

## Resultados

Os valores de MDA obtidos para cada um dos grupos encontram-se representados na **tabela 1**.

## Discussão

Para os pacientes submetidos ao tratamento com EDTA-magnésio houve uma redução média de 36 %, indicando que a quelação de íons metálicos possa realmente influir de forma considerável na peroxidação lipídica e que a quelação destes íons possa se refletir em menores índices de MDA. Porém, dos 25 pacientes submetidos ao EDTA-magnésio, um não sofreu qualquer alteração dos níveis de MDA após a terapia, sugerindo que neste paciente os íons metálicos não estejam envolvidos em catálise da reação de Haber-Weiss, quer por existirem em pequena quantidade, quer por não estarem na forma iônica. Paralelamente, outros três pacientes apresentaram aumentos consideráveis do MDA após a utilização do EDTA-magnésio, indicando que a terapia de quelação não tenha produzido efeitos desejáveis, possivelmente devido ao fato de que o EDTA seja uma molécula queladora inespecífica de metais, levando à perda de quantidades razoáveis de minerais essenciais, moléculas importantes na defesa antioxidante, ou que o uso do EDTA tenha desmobilizado os estoques citoplasmáticos de metais, principalmente do ferro, liberando-os na forma iônica, permitindo que estes possam produzir aumentos nos níveis de MDA.

Os pacientes que receberam o magnésio exclusivamente não apresentaram diferenças significantes quando comparados os valores de MDA dos momentos antes e após o soro antioxidante, indicando que o sulfato de magnésio não apresenta propriedades antioxidantes intrínsecas e, que o efeito observado nos pacientes do grupo EDTA-magnésio não se deveu ao magnésio exclusivamente.

Para os pacientes que se submeteram ao tratamento

**Tabela 1** - Variação média da peroxidação lipídica de indivíduos submetidos à diferentes estratégias terapêuticas antioxidantes.

Estratégia Antioxidante	N	MDA		%	p
		antes	depois		
Completa	39	620 ± 45	290 ± 32	-53	< 0,001
EDTA - MgSO <sub>4</sub>	23	625 ± 50	400 ± 38	-36	< 0,001
Vitamina C	12	740 ± 54	461 ± 42	-38	< 0,01
MgSO <sub>4</sub>	12	784 ± 100	696 ± 80	-11	ns
Manitol	21	815 ± 65	880 ± 65	+8	ns

ns = não significante

com o manitol, observamos que não houve diferenças significativas nos valores de MDA, fato contrário aos dados da literatura, os quais sugerem o manitol como sendo um antioxidante potente. Esta ausência aparente de atividade antioxidante pode ser relacionada à qualidade do manitol empregado, sendo necessária melhor avaliação do produto.

Com o uso da estratégia antioxidante completa diminuiu-se em 53 % o valor médio da peroxidação lipídica, indicando grande eficácia desta estratégia, no entanto alguns pacientes submetidos à esta terapia apresentaram aumento nos valores de MDA, sugerindo-se o mesmo que notado para os pacientes do grupo tratado com o EDTA-magnésio.

Por outro lado, os pacientes tratados exclusivamente com a vitamina C apresentaram 38 % em média de diminuição dos níveis de MDA, tendo sido relatado apenas um paciente com aumento de 4,7 % do MDA. Estes dados sugerem que a utilização exclusiva da vitamina C possa ser considerada como terapia antioxidante efetiva e que, dada à sua baixa toxicidade e grande tolerância mesmo a altas doses, seja utilizada sempre que se desejar diminuir os níveis de peroxidação lipídica.

Desta forma verificamos que a utilização individualizada de estratégias antioxidantes não produzem os efeitos da combinação destas, no entanto a utilização da vitamina C deve ser empregada de rotina na terapia antioxidante.

## Referências bibliográficas

- 1-Fantone, J.C. & Ward, P.A. - Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J. Pathol.*, 107:397-418, 1982.
- 2-Southorn, P.A. - Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin. Proc.*, 63:381-9, 1988.
- 3-Felippe Jr., J. & Percário, S. - Radicais livres em medicina intensiva. *Rev. Bras. Terap. Intens.*, 3(3):66-72, 1991.
- 4-Harman, D. - Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.*, 11:298-300, 1956.
- 5-Alvira, D.R.; Villacampa, M.M.; Martin, M.P.V.; Navarro, L.G.; Velazquez, M.F.; Lamban, F.C.; Gil, E.S. - Prooxidación y antioxidación en gastroenterología: importancia de los radicales libres. *Rev. Esp. Enf. Digest.*, 77(1):64-72, 1990.
- 6-Bell, D.; Jackson, M.; Nicoll, J.J.; Millar, A.; Dawes, J.; Muir, A.L. - Inflammatory response, neutrophil activation, and free radical production after acute myocardial infarction: effect of thrombolytic treatment. *Br. Heart J.*, 63:82-7, 1990.
- 7-McCall, J.M.; Braugher, J.M.; Hall, E.D. - Lipid peroxidation and the role of oxygen free radicals in CNS injury. *Acta Anaesth. Bel.*, 38(4):373-9, 1987.
- 8-Sedgwick, J.B.; Geiger, K.M.; Busse, W.W. - Superoxide generation by hipodense eosinophils from patients with asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 142:120-5, 1990.

9-Stringer, M.D.; Gorog, P.G.; Freeman, A.; Kakkar, V.V. - Lipid peroxides and atherosclerosis. *Br. Med. J.*, 298:281-4, 1989.

10-Felippe Jr., J. & Percário, S. - Radicais livres em medicina. *Rev. Bras. Inflamação & Dor*, 1(3):06-10, 1993.

11-Bricaud, H. - Free radicals and myocardial ischemia. *Ann Cardiol. et D'Angiol.*, 35(7):423, 1986.

12-Bulkley, G.B. - The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery*, 94(3):407-11, 1983.

13-Cross, C.E.; Halliwekk, B.; Borish, E.T.; Pryor, W.A.; Ames, B.N.; Saul, R.L.; McCord, J.M.; Harman, D. - Oxygen radicals and human disease. In: Davis Conference. *Ann. Int. Med.*, 107:526-45, 1987.

14-Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C.; Blake, D. - Metal ions and oxygen radical reactions in human inflammatory joint disease. *Phil. Trans. Soc. Lond.*, 311:659-71, 1985.

15-Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. - The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Molec. Aspects Med.*, 8:89-193, 1985.

16-Percário, S. - Dosagem das LDLs modificadas através da peroxidação lipídica: correlação com risco aterogênico. *AMHFCMSCSP*, 13(49-52):07-09, 1993.

17-Lefler, J.E. - An introduction to free radicals. John Wiley & Sons, New York, 1993. p.p.287

18-Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. - Free radicals in biology and medicine. 2ed., Clarendon Press, Oxford, 1989.

19-Felippe Jr., J. & Percário, S. - Uso do EDTA na prevenção da doença aterosclerótica em coelhos alimentados com ração rica em colesterol. *Rev. Soc. Bras. Med. Biomolec. Rad. Livres*, 1(2): 22-5, 1995.

20-Summerville, L.F.J. & Massaro, D. - Protection from oxygen toxicity and endotoxin: role of endogenous antioxidant enzymes of the lung. *J. Clin. Invest.*, 65:1104-10, 1980.

21-Percário, S.; Vital, A.C.C.; Felippe Jr., J. - Efeito de duas formas farmacêuticas da vitamina E sobre a peroxidação lipídica. *Rev. Soc. Bras. Med. Biomolec. Rad. Livres*, 1(1): 17-8, 1994.

22-Percário, S.; Zuliani, C.R.; Felippe Jr., J. - Efeito da N-acetilcistina em um modelo animal de asma brônquica aguda. *Rev. Soc. Bras. Med. Biomolec. Rad. Livres*, 1(2): 20-1, 1995.

23-Felippe Jr., J. & Percário, S. - Prevenção de aterosclerose experimental com o uso de antioxidantes: papel das vitaminas e do beta caroteno. *Rev. Soc. Bras. Med. Biomolec. Rad. Livres*, 1(3): 21-5, 1995.

24-Warner, B.W.; Hasselgren, P.; Fischer, J. - Effect of allopurinol and superoxide dismutase on survival rate in rats with sepsis. *Curr. Surg.*, 191:93, 1986.

25-Metal chelation therapy, oxygen radicals and human disease. *Lancet*, 19:143-5, 1985. (Editorial)

26-Kohn, H.I. & Liversedge, M. - On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine and menadione. *J. Pharmacol. Experimen. Ther.*, 82:292-300, 1944.

**27-**Percário, S.; Vital, A.C.C.; Jablonka, F. - Dosagem do Malondialdeído (MDA). *NewsLab*, 2(6):46-50, 1994.

**28-**Conti, M.; Morand, P.C.; Levillain, P.; Lemonnier, A. - Improved fluorometric determination of malonaldehyde. *Clin. Chem.*, 37(7):1273-5, 1991

**29-**Percário, S.; Camargo, C.X.; Felipe Jr., J. - Avaliação dos radicais livres pela dosagem da peroxidação lipídica: padronização da técnica. Congresso Brasileiro de

Clínica Médica, II, 25 a 29 de setembro de 1993, São Paulo - SP. livro de resumos p.116.

---

*O Dr. José de Felipe Jr. é médico biomolecular e presidente de honra da MBRL.*

*O Dr. Sandro Percário é biomédico e presidente de consultoria em métodos aplicados à medicina biomolecular da MBRL.*