Universidade de São Paulo
Instituto de Química

DESENVOLVIMENTO DE UM ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DA
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE PRODUTOS NATURAIS
ATRAVÉS DA QUIMILUMINESCÊNCIA DO LUMINOL

Erick Leite Bastos

Prof. Dr. Josef Wilhelm Baader

Dissertação de Mestrado

São Paulo, junho de 2000

”Desenvolvimento de um Ensaio para Determinação da
Capacidade Antioxidante de Produtos Naturais Através da
Quimiluminescência do Luminol”

ERICK LEITE BASTOS

**Dissertação de Mestrado submetida ao
Instituto de Química da Universidade de São Paulo
como parte dos requisitos necessários à obtenção do
grau de Mestre em Ciências - Área: Química Orgânica.**

Aprovado por:

Prof. Dr. JOSEF WILHELM BAADER
IQ - USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. PAULO ROBERTO HRIHOROWITSCH MORENO
IQ - USP

Profa. Dra. ANA CAMPA
FCF - USP

SÃO PAULO
28 DE JUNHO DE 2000.

Desenvolvimento de um Ensaio para Determinação
da Capacidade Antioxidante de Produtos Naturais através da
Quimiluminescência do Luminol

Índice

AGRADECIMENTOS.....	IX
RESUMO	XI
ABSTRACT	XIII
INTRODUÇÃO.....	1
ESPÉCIES REATIVAS E ESTRESSE OXIDATIVO.....	1
PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	6
ANTIOXIDANTES	6
<i>Antioxidantes Sintéticos</i>	8
PRODUTOS NATURAIS	9
<i>Photomorphe umbellata</i>	9
DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE	10
<i>Ensaio TRAP</i>	11
<i>Ensaio TEAC</i>	14
<i>Ensaio TOSC</i>	15
OBJETIVOS	17
RESULTADOS	19
INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DOS REAGENTES SOBRE A CINÉTICA DE EMISSÃO	19
TENTATIVA DE ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES PADRÃO DO SISTEMA.....	25
<i>Estabilização da Hemina</i>	27
DEFINIÇÃO DO SISTEMA PADRÃO.....	29
ESTUDO CINÉTICO UTILIZANDO SISTEMA PADRÃO	29
EFEITO DA ADIÇÃO DE DIVERSOS ANTIOXIDANTES AO SISTEMA PADRÃO.....	32
PADRONIZAÇÃO DO SISTEMA ATRAVÉS DA ÁREA DE SUPRESSÃO	34
UTILIZAÇÃO DO MÉTODO PARA AVALIAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS	36
DISCUSSÃO	41
INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DOS REAGENTES SOBRE A CURVA DE EMISSÃO.....	41
<i>Efeito da Concentração de Luminol</i>	43
<i>Efeito da Concentração de Peróxido de Hidrogênio</i>	44
<i>Efeito da Concentração de Hemina</i>	46
<i>Padronização de Hemina</i>	46
ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES PADRÃO DO SISTEMA.....	47
EFEITO DA ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTES AO SISTEMA PADRÃO.....	48
PADRONIZAÇÃO DO SISTEMA ATRAVÉS DA ÁREA DE SUPRESSÃO.....	49
UTILIZAÇÃO DO MÉTODO PARA AVALIAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS	51
CONCLUSÃO.....	53
PARTE EXPERIMENTAL.....	55
MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
<i>Reagentes</i>	55
<i>Solventes</i>	55
<i>Produtos Naturais</i>	55
ENSAIOS CINÉTICOS	56
<i>Solução de Luminol</i>	56

<i>Solução de H_2O_2</i>	56
<i>Solução de Hemina</i>	56
PADRONIZAÇÃO DA PREPARAÇÃO DE HEMINA	57
<i>Método A</i>	57
<i>Método B</i>	57
<i>Preparação e Purificação de Dímero e Monômero</i>	57
<i>Aparelhagem</i>	57
PROCEDIMENTOS	57
OPERAÇÕES MATEMÁTICAS	58
<i>Medida de Intensidade Máxima (I_{MAX})</i>	58
<i>Cálculo de Constante de Velocidade (k_{obs})</i>	58
<i>Cálculo do Tempo de Supressão</i>	58
<i>Cálculo da Área de Supressão</i>	58
<i>Cálculo Estatísticos</i>	59
ANEXOS	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

Índice de Figuras

• FIGURA 1: SUMÁRIO DA FORMAÇÃO DE ALGUMAS ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO (EAO) VIA TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRON OU DE ENERGIA (E).	2
• FIGURA 2: CURVA CINÉTICA DA EMISSÃO DE QUIMILUMINESCÊNCIA OBTIDO UTILIZANDO-SE ABAP. [LUMINOL]: 0,10 mM E [ABAP]: 65 mM, EM TAMPÃO FOSFATO pH=11,6 (N = 1).	19
• FIGURA 3 : CINÉTICA DE DECAIMENTO DO SISTEMA LUMINOL/H ₂ O ₂ /HEMINA COM DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE LUMINOL. [H ₂ O ₂]: 0,1 mM, [HEMINA] 0,33 μM E [LUMINOL]: (-,A) 10 mM, (-,B) 5 mM, (-,C) 1 mM, (-,D) 0,5 mM, (-,E) 0,1 mM, (-,F) 0,05 mM, (-,G) 0,01 mM, (-,H) 0,005 mM, EM TAMPÃO FOSFATO pH=11,6 (N = 5).	20
• FIGURA 4: CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE MÁXIMA (I _{MAX}) E A CONCENTRAÇÃO DE LUMINOL. [H ₂ O ₂]: 0,1 mM E [HEMINA] 0,33 μM, EM TAMPÃO FOSFATO pH=11,6. AS BARRAS INDICAM O DESVIO PADRÃO OBTIDO DE 5 MEDIDAS.	20
• FIGURA 5: DEPENDÊNCIA DA CONSTANTE DE VELOCIDADE OBSERVADA (K _{obs}) COM A CONCENTRAÇÃO DE LUMINOL. [H ₂ O ₂]: 0,1 mM E [HEMINA] 0,33 μM, EM TAMPÃO FOSFATO pH=11,6. AS BARRAS INDICAM O DESVIO PADRÃO OBTIDO DE 5 MEDIDAS.	21
• FIGURA 6: (A) CINÉTICA DE DECAIMENTO DO SISTEMA LUMINOL/H ₂ O ₂ /HEMINA COM DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE HEMINA. [H ₂ O ₂]: 0,1 mM, [LUMINOL]: 0,1 mM EM TAMPÃO FOSFATO pH=11,6 (N=7). (B) CINÉTICA DE DECAIMENTO DO SISTEMA LUMINOL/H ₂ O ₂ /HEMINA COM CONCENTRAÇÕES DE HEMINA UMA ORDEM DE GRANDEZA INFERIOR. [H ₂ O ₂]: 0,1 mM, [LUMINOL]: 0,1 mM EM TAMPÃO FOSFATO pH=11,6 (N=7).	21
• FIGURA 7: CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE MÁXIMA (I _{MAX}) E A CONCENTRAÇÃO DE HEMINA. [H ₂ O ₂]: 0,1 mM E [LUMINOL] 0,10 mM, EM TAMPÃO FOSFATO pH=11,6. AS BARRAS INDICAM O DESVIO PADRÃO OBTIDO DE 5 MEDIDAS.	22
• FIGURA 8: DEPENDÊNCIA DA CONSTANTE DE VELOCIDADE OBSERVADA (K _{obs}) COM A CONCENTRAÇÃO DE HEMINA. [H ₂ O ₂]: 0,1 mM E [LUMINOL] 0,10 mM, EM TAMPÃO FOSFATO pH=11,6. OS GRÁFICOS MENORES APRESENTAM AS REGIÕES DE CONCENTRAÇÃO SEPARADAS POR UMA ORDEM DE GRANDEZA. AS BARRAS INDICAM O DESVIO PADRÃO OBTIDO DE 5 MEDIDAS.	22
• FIGURA 9: CINÉTICA DE DECAIMENTO DO SISTEMA LUMINOL/H ₂ O ₂ /HEMINA COM DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE H ₂ O ₂ . [HEMINA] 0,33 μM, [LUMINOL]: 0,10 mM E [H ₂ O ₂]: (-,A) 0,005 mM, (-,B) 0,01 mM, (-,C) 0,05 mM, (-,D) 0,1 mM, (-,E) 0,5 mM E (-,F) 1 mM, EM TAMPÃO FOSFATO pH=11,6 (N=3).	23
• FIGURA 10: CINÉTICA DE DECAIMENTO DO SISTEMA LUMINOL/H ₂ O ₂ /HEMINA COM DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE H ₂ O ₂ . [HEMINA]: 0,33 μM, [LUMINOL]: 0,10 mM E [H ₂ O ₂]: (-) 1 mM, (-) 0,9 mM, (-) 0,8 mM, (-) 0,7 mM, (-) 0,6 mM, (-) 0,5 mM, (-) 0,4 mM, (-) 0,3 mM, (-) 0,2 mM, (-) 0,1 mM, EM TAMPÃO FOSFATO pH=11,6. AS BARRAS DE DESVIO PADRÃO FORAM OMITIDAS, ENTRETANTO SÃO APRESENTADAS AS MÉDIAS DE 5 MEDIDAS.	23
• FIGURA 11: CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE MÁXIMA (I _{MAX}) E A CONCENTRAÇÃO DE H ₂ O ₂ . [HEMINA]: 0,33 μM E [LUMINOL] 0,10 mM, EM TAMPÃO FOSFATO pH=11,6. AS BARRAS INDICAM O DESVIO PADRÃO OBTIDO DE 3 MEDIDAS.	24
• FIGURA 12: DEPENDÊNCIA DA CONSTANTE DE VELOCIDADE OBSERVADA (K _{obs}) COM A CONCENTRAÇÃO DE H ₂ O ₂ . [HEMINA]: 0,33 μM E [LUMINOL] 0,10 mM, EM TAMPÃO FOSFATO pH=11,6. AS BARRAS INDICAM O DESVIO PADRÃO OBTIDO DE 3 MEDIDAS.	24
• FIGURA 13: CINÉTICA DE DECAIMENTO DO SISTEMA LUMINOL/H ₂ O ₂ /HEMINA COM CONCENTRAÇÕES DE HEMINA UMA ORDEM DE GRANDEZA INFERIOR. [H ₂ O ₂]: 10 μM, [LUMINOL]: 0,12 mM E [HEMINA]: (-) 0,28 μM, (-) 0,57 μM, (-) 0,81 μM, (-) 1,14 μM, (-) 1,38 μM, (-) 1,70 μM, (-) 2,44 μM, EM TAMPÃO FOSFATO pH=11,6.	25

- **FIGURA 14:** (A) CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE MÁXIMA (I_{MAX}) E A CONCENTRAÇÃO DE HEMINA. (B) DEPENDÊNCIA DA CONSTANTE DE VELOCIDADE OBSERVADA (K_{OBS}) COM A CONCENTRAÇÃO DE HEMINA. [LUMINOL] 0,10 mM; [H₂O₂]: 10 µM EM TAMPÃO FOSFATO pH 11,6 (N=2). PONTOS ENTRE PARÊNTESES NÃO FORAM CONSIDERADOS NO AJUSTE LINEAR. 26
- **FIGURA 15:** CINÉTICA DE DECAIMENTO DO SISTEMA ABAP ([ABAP]: 65 mM; [LUMINOL]: 0,1 mM EM TAMPÃO FOSFATO pH 11,6); DO SISTEMA PADRÃO INICIAL (I) ([H₂O₂]: 0,1 mM; [LUMINOL]: 0,1 mM; [HEMINA]: 0,33 µM, EM TAMPÃO FOSFATO pH 11,6) E DO SISTEMA PADRÃO POSTERIOR (II) ([H₂O₂]: 10 µM; [LUMINOL]: 0,1 mM; [HEMINA]: 50 nM, EM TAMPÃO FOSFATO pH 11,6). 26
- **FIGURA 16:** (A) EFEITO DA ADIÇÃO DE DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE TROLOX, 100 s APÓS O INÍCIO DA REAÇÃO, SOBRE A CINÉTICA DE EMISSÃO. [H₂O₂]: 10 µM; [LUMINOL]: 0,1 mM; [HEMINA]: 50 nM; (—,A) CURVA PADRÃO, (—,B) 0,1 µM, (—,C) 1 µM, (—,D) 2 µM, (—,E) 3 µM E (—,F) 4 µM, EM TAMPÃO FOSFATO pH 11,6 (N=1). (B) DEPENDÊNCIA ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE TROLOX E O TEMPO DE SUPRESSÃO MEDIDO ATRAVÉS DA DIFERENÇA ENTRE O INSTANTE DA ADIÇÃO DO ANTIOXIDANTE E O MOMENTO ONDE SUA INTENSIDADE ATINGIU 50% DO VALOR INICIAL. 27
- **FIGURA 17:** ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA HEMINA EM (—) NaOH 1 M E (—) TAMPÃO FOSFATO pH 11,6. O GRÁFICO INSERIDO APRESENTA O RESULTADO OBTIDO POR BROWN *ET AL.* UTILIZANDO HEMINA ENVELHECIDA (— —) E FRESCA (-----). EXTRAÍDO DE BROWN, S.B.; JONES, P.; SUGGETT, A.; *TRANS FARADAY SOC.*, 64; 986-993 (1968). 28
- **FIGURA 18:** ESPECTRO DE ABSORÇÃO OBTIDO COM VARIAS RELAÇÕES DMSO/NaOH 1M COMO SOLVENTE. FORAM DISSOLVIDOS 2,5 MG DE HEMINA EM 5 mL DO SOLVENTE. 28
- **FIGURA 19:** CINÉTICA DE DECAIMENTO DO SISTEMA PADRÃO FINAL. [H₂O₂]: 10 µM; [LUMINOL]: 0,1 mM; [HEMINA]: 0,9 µM, EM TAMPÃO FOSFATO (µ=0,1) pH 11,6. 29
- **FIGURA 20:** CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE MÁXIMA (I_{MAX}) E A CONCENTRAÇÃO DE HEMINA, EM DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO. [LUMINOL] 0,10 mM, EM TAMPÃO FOSFATO pH=11,6. AS BARRAS INDICAM O DESVIO PADRÃO OBTIDO DE 7 MEDIDAS. 30
- **FIGURA 21:** DEPENDÊNCIA DA CONSTANTE DE VELOCIDADE OBSERVADA (K_{OBS}) COM A CONCENTRAÇÃO DE HEMINA, PARA DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO. [LUMINOL] 0,10 mM, EM TAMPÃO FOSFATO pH=11,6. AS BARRAS INDICAM O DESVIO PADRÃO OBTIDO DE 7 MEDIDAS. 30
- **FIGURA 22:** CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE MÁXIMA (I_{MAX}) E A CONCENTRAÇÃO DE LUMINOL. [H₂O₂]: 10 µM E [HEMINA] 0,9 µM, EM TAMPÃO FOSFATO pH=11,6. AS BARRAS INDICAM O DESVIO PADRÃO OBTIDO DE 5 MEDIDAS. 31
- **FIGURA 23:** DEPENDÊNCIA DA CONSTANTE DE VELOCIDADE OBSERVADA (K_{OBS}) COM A CONCENTRAÇÃO DE LUMINOL. [H₂O₂]: 10 µM E [HEMINA] 0,9 µM, EM TAMPÃO FOSFATO pH=11,6. AS BARRAS INDICAM O DESVIO PADRÃO OBTIDO DE 5 MEDIDAS. 32
- **FIGURA 24:** EFEITO DA ADIÇÃO APÓS 100 s DO INÍCIO DO DECAIMENTO DE DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE TROLOX, SOBRE A CINÉTICA DE EMISSÃO DO SISTEMA PADRÃO. [H₂O₂]: 10 µM; [LUMINOL]: 0,1 mM; [HEMINA]: 0,9 µM, EM TAMPÃO FOSFATO pH 11,6. 32
- **FIGURA 25:** DEPENDÊNCIA ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE TROLOX E O TEMPO DE SUPRESSÃO MEDIDO ATRAVÉS DA DIFERENÇA ENTRE O INSTANTE DA ADIÇÃO DO ANTIOXIDANTE E O MOMENTO ONDE SUA INTENSIDADE ATINGIU 50% DO VALOR INICIAL (N=5). 33
- **FIGURA 26:** EFEITO DA ADIÇÃO DE DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO ÚRICO, 100 s APÓS O INÍCIO DO DECAIMENTO, SOBRE A CINÉTICA DE EMISSÃO DO SISTEMA PADRÃO; E DEPENDÊNCIA ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ÚRICO E O TEMPO DE SUPRESSÃO. 33
- **FIGURA 27:** EFEITO DA ADIÇÃO DE DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO ASCÓRBICO, 100 s APÓS O INÍCIO DO DECAIMENTO QUIMILUMINESCENTE, SOBRE A CINÉTICA DE EMISSÃO DO SISTEMA PADRÃO; E DEPENDÊNCIA ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO E O TEMPO DE SUPRESSÃO MEDIDO ATRAVÉS DA DIFERENÇA ENTRE O INSTANTE DA ADIÇÃO DO ANTIOXIDANTE E O MOMENTO ONDE SUA INTENSIDADE ATINGIU 50% DO VALOR INICIAL. [H₂O₂]: 10 µM; [LUMINOL]: 0,1 mM; [HEMINA]: 0,9 µM, EM TAMPÃO FOSFATO pH 11,6. 34
- **FIGURA 28:** DEPENDÊNCIA ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE TROLOX E A ÁREA DE SUPRESSÃO OBTIDA. [H₂O₂]: 10 µM; [LUMINOL]: 0,1 mM; [HEMINA]: 0,9 µM, EM TAMPÃO FOSFATO pH 11,6 (N=7). 35
- **FIGURA 29:** DEPENDÊNCIA ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ÚRICO E A ÁREA DE SUPRESSÃO OBTIDA. [H₂O₂]: 10 µM; [LUMINOL]: 0,1 mM; [HEMINA]: 0,9 µM, EM TAMPÃO FOSFATO pH 11,6 (N=7). 35
- **FIGURA 30:** DEPENDÊNCIA ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO E A ÁREA DE SUPRESSÃO OBTIDA. [H₂O₂]: 10 µM; [LUMINOL]: 0,1 mM; [HEMINA]: 0,9 µM, EM TAMPÃO FOSFATO pH 11,6 (N=7)... 35
- **FIGURA 31:** CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA (A) EXTRATO BRUTO DE *PHOTOMORPHE UMBELLATA* E (B) 4-NEROLIDILCATECOL PURO. SÃO APRESENTADAS AS

INTENSIDADES DOS PICOS, OBTIDOS POR DETECÇÃO ESPECTROSCÓPICA DE UV-VISÍVEL EM 254 NM (EM CIMA) E ÍNDICE DE REFRAÇÃO (EM BAIXO).	36
• FIGURA 32: CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA (A) FRAÇÃO CROMATOGRÁFICA A (FRAÇÕES DE 1 A 9), (B) FRAÇÃO CROMATOGRÁFICA B (FRAÇÕES DE 10 A 16), (C) FRAÇÃO CROMATOGRÁFICA C (FRAÇÕES DE 17 A 23 E (D)) FRAÇÃO CROMATOGRÁFICA D (FRAÇÕES DE 24 A 30). SÃO APRESENTADAS AS INTENSIDADES DOS PICOS, OBTIDOS POR DETECÇÃO ESPECTROSCÓPICA DE UV-VISÍVEL EM 254 NM (EM CIMA) E ÍNDICE DE REFRAÇÃO (EM BAIXO). OS TEMPOS DE RETENÇÃO PODEM MOSTRAR PEQUENAS VARIAÇÕES.	37
• FIGURA 33: EFEITO DA ADIÇÃO APÓS 50 S DO INÍCIO DO DECAIMENTO DE 4-NEROLIDILCATECOL, SOBRE A CINÉTICA DE EMISSÃO DO SISTEMA PADRÃO. [H ₂ O ₂]: 10 µM; [LUMINOL]: 0,1 mM; [HEMINA]: 0,9 µM; [4-NC]: 1,1 µM, EM TAMPÃO FOSFATO PH 11,6.	38
• FIGURA 34: DEPENDÊNCIA ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE 4-NEROLIDILCATECOL E A ÁREA DE SUPRESSÃO OBTIDA. [H ₂ O ₂]: 10 µM; [LUMINOL]: 0,1 mM; [HEMINA]: 0,9 µM, EM TAMPÃO FOSFATO PH 11,6 (N=5). ..	39
• FIGURA 35: EFEITO DA ADIÇÃO APÓS 50 S DO INÍCIO DO DECAIMENTO DE HESPERIDINA, SOBRE A CINÉTICA DE EMISSÃO DO SISTEMA PADRÃO. [H ₂ O ₂]: 10 µM; [LUMINOL]: 0,1 mM; [HEMINA]: 0,9 µM; [HESPERIDINA]: 1,18 µM, EM TAMPÃO FOSFATO PH 11,6.	39
• FIGURA 36: EXTRAPOLAÇÃO DAS CURVAS CINÉTICAS DO SISTEMA LUMINOL/H ₂ O ₂ /HEMINA COM DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE H ₂ O ₂ . [HEMINA]: 0,33 µM, [LUMINOL]: 0,10 mM E [H ₂ O ₂]: (-) 1 mM, (-) 0,9 mM, (-) 0,8 mM, (-) 0,7 mM, (-) 0,6 mM, (-) 0,5 mM, (-) 0,4 mM, (-) 0,3 mM, (-) 0,2 mM, (-) 0,1 mM, EM TAMPÃO FOSFATO PH=11,6.	45
• FIGURA 37: CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE MÁXIMA CALCULADA (I _{MAX}) E A CONCENTRAÇÃO DE H ₂ O ₂ . [HEMINA]: 0,33 µM E [LUMINOL] 0,10 mM, EM TAMPÃO FOSFATO PH=11,6.	46
• FIGURA 38: RELAÇÃO INTENSIDADE/K _{obs} PARA VÁRIAS CONCENTRAÇÕES DE LUMINOL E HEMINA. FORAM DEFINIDAS PARA O SISTEMA PADRÃO AS CONCENTRAÇÕES NAS REGIÕES DE MÁXIMO. [H ₂ O ₂]: 10 µM.	48
• FIGURA 39: RELAÇÃO INTENSIDADE/K _{obs} PARA VÁRIAS CONCENTRAÇÕES DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO. FOI DEFINIDA PARA O SISTEMA PADRÃO UMA CONCENTRAÇÃO DEZ VEZES MENOR DO QUE A REGIÃO DE MÁXIMO. [LUMINOL]: 0,1 mM; [HEMINA]: 0,9 µM.	48
• FIGURA 40: COMPILAÇÃO DA DEPENDÊNCIA ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE TROLOX (●), ÁCIDO ÚRICO (▲) E ÁCIDO ASCÓRBICO (■) E O TEMPO DE SUPRESSÃO. [H ₂ O ₂]: 10 µM; [LUMINOL]: 0,1 mM; [HEMINA]: 0,9 µM, EM TAMPÃO FOSFATO PH 11,6.	49
• FIGURA 41: COMPILAÇÃO DA DEPENDÊNCIA ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE TROLOX (●), ÁCIDO ÚRICO (▲) E ÁCIDO ASCÓRBICO (■) E A ÁREA CALCULADA PELA INTEGRAL DA SUPRESSÃO. [H ₂ O ₂]: 10 µM; [LUMINOL]: 0,1 mM; [HEMINA]: 0,9 µM, EM TAMPÃO FOSFATO PH 11,6.	50

Índice de Esquemas

•	ESQUEMA 1: SUMÁRIO DA PROPAGAÇÃO DE ESPÉCIES ATIVAS A PARTIR DO SUPERÓXIDO.	4
•	ESQUEMA 2: ESTRUTURA DO ÁCIDO ASCÓRBICO E SEUS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO, APRESENTANDO UM EXEMPLO DE ESTABILIZAÇÃO DO CARÁTER RADICALAR POR ANTIOXIDANTES. EM pH FISIOLÓGICO ESTÁ PRESENTE A FORMA DESPROTONADA (ASCORBATO) CONSIDERANDO QUE O pK_{a1} DO ÁCIDO ASCÓRBICO É 4,25.	7
•	ESQUEMA 3: SEQUÊNCIA DE REDUÇÕES DO OXIGÊNIO ATÉ A ÁGUA E ENZIMAS QUE ATUAM COMO REDUTORES.	7
•	ESQUEMA 4: MECANISMO DE INICIAÇÃO RADICALAR A PARTIR DA TERMÓLISE DE AZOCOMPOSTOS. A REAÇÃO DE UM RADICAL ALQUIL COM OXIGÊNIO POSSUI UMA CONSTANTE DE SEGUNDA ORDEM DA ORDEM DE $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ SENDO ASSIM, O RADICAL PEROXIL É NORMALMENTE CONSIDERADO A ESPÉCIE RESPONSÁVEL PELA ABSTRAÇÃO DE HIDROGÊNIO DE UM SUBSTRATO LH OXIDÁVEL.	11
•	ESQUEMA 5: A ESTRUTURA DO TROLOX APRESENTA OS REQUISITOS PARA UMA AÇÃO ANTIOXIDANTE EFETIVA: UM FENOL IMPEDIDO COM UM OXIGÊNIO DE ÉTER EM POSIÇÃO <i>para</i> EM UM SISTEMA DE ANEL CUJA ESTRUTURA PROPORCIONA ESTABILIZAÇÃO ESTEREOELETRÔNICA DO RADICAL FENOXIL RESULTANTE, NA TRANSFERÊNCIA DO ÁTOMO DE HIDROGÊNIO A UM RADICAL DE OXIGÊNIO, COMO O PEROXIL. DEVIDO A ESTA ESTRUTURA DE CROMANOL, QUE PROPORCIONA A CARACTERÍSTICA ANTIOXIDANTE E O GRUPO CARBOXÍLICO, QUE CONFERE MODERADA SOLUBILIDADE EM MEIO AQUOSO, O TROLOX APRESENTA VANTAGENS EM RELAÇÃO A OUTROS ANTIOXIDANTES.	12
•	ESQUEMA 6: MECANISMO SIMPLIFICADO DA QUIMILUMINESCÊNCIA DO LUMINOL EM MEIO AQUOSO, OXIDADO POR PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.	41
•	ESQUEMA 7: PROPOSTA MECANÍSTICA SIMPLIFICADA DO SISTEMA LUMINOL/ H_2O_2 /HEMINA, FRENTE A SUBSTÂNCIAS REDUTORAS.	42
•	ESQUEMA 8: MECANISMO SIMPLIFICADO DA QUIMILUMINESCÊNCIA DO SISTEMA LUMINOL/ H_2O_2 /HEMINA.	43
•	ESQUEMA 9: DIVERSOS EQUILÍBRIOS ENVOLVENDO HEMINA. (A) EQUAÇÕES E pK_a S PARA EQUILÍBRIO ENTRE HEMINA E HEMATINA E ENTRE HEMINA MONÔMERO E HEMINA DÍMERO; (B) PROVÁVEL ESTRUTURA DE PONTE OXO ENVOLVENDO O FERRO CENTRAL DA PORFIRINA NA FORMAÇÃO DO DÍMERO.	47
•	ESQUEMA 10: PROCEDIMENTO DE ISOLAMENTO DE PRINCÍPIOS ATIVOS DE PRODUTOS NATURAIS, AVALIANDO-SE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM DIVERSAS ETAPAS DO PROCESSO.	51

Índice de Tabelas

•	TABELA I: NÚMERO DE RADICAIS (N) SEQUESTRADOS POR MOLÉCULA DE ADITIVO. ¹³	13
•	TABELA II: CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE MÁXIMA (I_{MAX}) E A CONCENTRAÇÃO DE LUMINOL. $[H_2O_2]$: 10 μ M E [HEMINA] 0,9 μ M, EM TAMPÃO FOSFATO pH=11,6.....	31
•	TABELA III: ATIVIDADE RELATIVA A 1 μ M DE TROLOX ATRIBUÍDA AO EXTRATO BRUTO, ÀS FRAÇÕES CROMATOGRAFICAS E AO 4-NEROLIDILCATECOL	38
•	TABELA IV: NÚMERO DE RADICAIS SEQUESTRADOS (N) POR MOLÉCULA DE ANTIOXIDANTE EM DIVERSOS ENSAIOS UTILIZANDO MÉTODOS DE CONSUMO DE OXIGÊNIO, PICOERITINA E QUIMILUMINESCÊNCIA.	50

Agradecimentos

Ao acaso atribuo minha fortuna, pois nunca soube exatamente o que buscava. E o que encontrei? Amigos sinceros e um deslumbramento infantil pela descoberta.

Neste sentido, destaco algumas pessoas que contribuíram neste processo. **Josef Wilhelm Baader** que, com sua personalidade forte e orientação consistente e dedicada, modificou a forma como vejo o mundo. **Paulete Romoff**, que me ajudou a perceber como alguém pode ser admirado por sua pureza de caráter. **Cassius Vinicius Stevani**, o maior que conheci. Maravilhosamente sarcástico, ilumina por onde passa – sem se dar conta.

Meus **amigos do Instituto**: Sandra, Carlão, Valdecir, Patrícia, Lillian, Ana, Sascha, Fernando Dutra, Fernando “Beleza” e Fernanda Knudsen. Os **professores** que colaboram com a minha formação: Etelvino J. H. Bechara, Luiz H. Catalani, Ivan A. Campos, Daisy B. Resende, Ana Campa e Gianluca Azzellini.

À **FAPESP** pelo apoio financeiro.

Resumo

Na última década, o estudo de espécies ativas de oxigênio e nitrogênio e o seus papeis em um grande número de patologias revelou que substâncias antioxidantes são capazes de prevenir os efeitos do estresse oxidativo. A reação quimiluminescente de luminol e peróxido de hidrogênio, na presença de hemina como catalisador, tem sido utilizada como método de avaliação de atividade antioxidante, uma vez que a emissão pode ser suprimida por este tipo de substância.

Foi realizado um estudo cinético para estabelecer as condições experimentais do ensaio. As concentrações dos reagentes foram variadas em diferentes condições experimentais na ausência e na presença de antioxidantes, e os resultados obtidos levaram ao melhor entendimento acerca do sistema. Um novo método para o tratamento de dados foi também utilizado, permitindo a correlação entre o efeito antioxidante e o número de fótons suprimidos.

Vários antioxidantes conhecidos (trolox, ácido ascórbico e ácido úrico) foram utilizados para estabelecer a metodologia. A atividade antioxidante foi calculada a partir da correlação entre a área de supressão obtida e a concentração de antioxidante, usando trolox como composto de referência. Empregando esta metodologia foi possível determinar a atividade antioxidante dos extratos e do produto majoritário isolado de *Photomorphe umbellata*, o 4-nerolidicatecol.

Abstract

In the last decade the study of active oxygen and nitrogen species and their role in a large number of chronic diseases, including cancer, heart disease and even aging itself, revealed that natural and synthetic antioxidants are able to prevent the effects caused by oxidative stress. Several methods can be used to evaluate the total antioxidant activity in body fluids, complex mixtures and isolated substances. Simple trapping assays can quantify the total antioxidant content in a sample, which is expressed as TRAP (total radical-trapping potential) or TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and these indexes are well accepted due to its high sensitivity and operational facilities. The determination of the antioxidant potential of plant extracts and isolated natural products may constitute a simple tool to evaluate the potential biological activity of plant constituents.

The chemiluminescence reaction of luminol and hydrogen peroxide in the presence of hemin as catalyst has been used as the method to evaluate the antioxidant activity, since the chemiluminescence emission can be suppressed by antioxidants, and a linear relationship between antioxidant concentration and the observed induction time is obtained. A kinetic study was performed to establish the ideal experimental conditions for the assay. The reactant concentrations were varied in the absence and the presence of antioxidants, and the results lead to a better understanding of the system. A new method for data treatment is also used, which allows the correlation of the antioxidant effect to the number of photons suppressed.

Several well-known antioxidants (trolox, ascorbic and uric acid) were used to establish the methodology. TRAP values were calculated from the correlations between the number of photons suppressed and the antioxidant concentration, using trolox as reference compound. Using this methodology we were able to determine the antioxidant activity of *Photomorphe umbellata* extracts, and of its isolated major compound, 4-nerolidylcatechol.

Introdução

O estado fundamental do oxigênio molecular, O_2 , é essencial em muitas das vias metabólicas convencionais de todas as formas de vida aeróbica, desde procariontes, protistas, plantas e fungos até animais superiores. Entretanto, espécies de oxigênio parcialmente reduzidas são um dos co-produtos destes processos, e representam cerca de 1% do consumo total de oxigênio em condições fisiológicas. Apesar de sua utilidade em diversos mecanismos celulares, o dano causado ao organismo por estas espécies, incluindo aqueles associados a peroxidação lipídica, é normalmente atribuído como um fator fundamental em doenças cardiovasculares, artrite reumática, câncer, algumas desordens inflamatórias e AIDS.¹⁻³ Além disso, postula-se que o dano oxidativo continuado é responsável, em parte, pelo envelhecimento.⁴ Desta forma, o processo de evolução que inicialmente utilizou o oxigênio, visando um balanço energético mais favorável, como suporte fisiológico de organismos aeróbicos teve como consequência efeitos deletérios sobre as espécies derivadas.

Em geral, a atividade metabólica – através de enzimas e outras substâncias antioxidantes – em conjunção com a organização estrutural da célula, é capaz de controlar os efeitos nocivos de espécies ativas de oxigênio. Apesar disso, as defesas antioxidante do organismo são aparentemente incompletas, considerando-se o dano oxidativo ao DNA, proteínas, lipídeos e moléculas de baixa massa molecular observados em seres vivos em presença de oxigênio. Deste paradoxo, o equilíbrio fisiológico resulta do balanço entre espécies pró e antioxidativas, e é afetado por fatores externos que favorecem o dano oxidativo, o que torna a caracterização e o estudo de novas substâncias que atuem na prevenção ou reparo destes eventos importantes na manutenção da qualidade de vida.

Espécies Reativas e Estresse Oxidativo

A expressão **Espécies Reativas de Oxigênio** é um termo geral, que inclui não somente radicais livres, mas também alguns de seus derivados não radicalares, de alto potencial oxidante. A ativação do oxigênio ocorre por rotas que podem ser agrupadas em reações de transferência de energia, como na formação de oxigênio singlete (1O_2), ou transferência de elétron (Figura 1).

• **Figura 1:** Sumário da formação de algumas Espécies Ativas de Oxigênio (EAO) via transferência de elétron ou de energia (E).

Radicais livres de oxigênio ocorrem nas células como o resultado de uma sucessão de reduções do oxigênio molecular. Esta redução sucessiva de quatro elétrons do oxigênio até água é catalisada por um grande número de enzimas de membrana associadas à cadeia respiratória. A presença de um ou mais elétrons desemparelhados faz dos radicais livres espécies muito reativas.

A doação de um elétron ao oxigênio molecular resulta na produção do **ion radical superóxido** ($O_2^{\bullet -}$). Este radical pode reagir com outras moléculas, incluindo outros metabólitos de oxigênio. Considerando que sua reatividade frente a alvos biológicos é relativamente baixa – dependendo do sítio onde é gerado – pode atuar como precursor de outras espécies que podem levar ao dano biológico através de diversos mecanismos. Em solução aquosa, o superóxido pode agir como base e receber prótons formando o **radical hidróperóxido** ($HO_2^{\bullet}$, Eq. (1)), ou ainda, ser dismutado a **peróxido de hidrogênio** (H_2O_2) e oxigênio molecular (Eq. (2)).

Sua dismutação é extremamente lenta em valores de pH altos ($k < 0,3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) podendo ser favorecida com a diminuição do pH ou catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). Com isso, em ambientes nos quais exista a produção de radicais superóxido, ocorre uma acumulação do produto desta reação, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que pode ser removido facilmente pela ação da enzima catalase, além de várias outras peroxidases. De forma geral, o radical superóxido pode, em ambientes orgânicos, agir como agente redutor ou nucleófilo podendo, ainda, sobre certas condições, servir como agente oxidante capaz de receber elétrons de redutores (Eq. (3)).

O número de oxidação variável dos metais de transição favorece uma catálise efetiva em reações que envolvam oxidação e redução, sendo utilizados com esta finalidade no sítio ativo de diversas enzimas. Dentre as reações que envolvem catálise por metais de transição, a **reação de Fenton** é responsável pela oxidação de diversas moléculas orgânicas. A reação entre peróxido de hidrogênio e ferro (II) é favorecida já que o potencial redox para $H_2O_2/HO^{\bullet}$ é de 0,32 V, enquanto que para íons ferro (II) em meio aquoso em pH=7,0 é 0,11V. A identidade química das espécies oxidantes – além do próprio radical hidroxila – formados durante a reação é incerta; mesmo

espécies de Fe(IV) como (Fe=O)²⁺ são sugeridas, entretanto não existem evidências claras de sua existência neste sistema (Eq. (4)).

Em uma de suas reações mais importantes, o superóxido reage com o produto de sua dismutação, peróxido de hidrogênio, catalisado por metais de transição na chamada **reação de Haber-Weiss**, resultando em **radicais hidroxila** (HO[•]). Na medida em que a constante de velocidade da reação não catalisada é muito baixa, metais de transição reduzidos podem favorecer significativamente a formação destes radicais (Eq. (5)).

O radical hidroxila, dentre as diversas espécies ativas de oxigênio, é capaz de oxidar uma grande variedade de substratos biológicos, o que resulta em um tempo de vida muito curto. A constante de velocidade de segunda ordem para a reação de hidroxil em meio celular é da ordem de 10⁻⁹ M⁻¹s⁻¹, indicando a potencialidade deletéria desta espécie.⁵ Sua reação pode se dar de três formas: (i) abstração de átomos de hidrogênio; (ii) reação de adição e (iii) reações de transferência de elétron. Estas reações ilustram um importante princípio da química de radicais, a reação de um radical com uma espécie não radicalar produz um novo radical livre. Em princípio, este radical pode ser mais, menos ou igualmente reativo quanto a espécie original. Entretanto, radicais produzidos por reações envolvendo HO[•] são, normalmente, menos reativos considerando a atividade desta espécie.

O **óxido nítrico** (NO[•]) é uma das **Espécies Reativas de Nitrogênio**, que vêm sendo estudadas extensivamente nas últimas décadas devido à sua significância biológica.⁶ Este radical livre é sintetizado em organismos vivos pela ação de um grupo de enzimas chamadas oxido nítrico sintetases (NOSs), que convertem o aminoácido L-arginina em NO[•] e outro aminoácido, a L-citrulina. A reação de óxido nítrico com compostos não radicalares é lenta. Por outro lado, esta espécie se apresenta bastante reativa frente a outros radicais livres possuindo constantes de velocidade, para reação com os principais radicais livres de oxigênio, da ordem de difusão (Eq. (7, 8 e 9)).

A reação entre oxido nítrico e o ânion radical superóxido, resulta na formação de **peroxinitrito** (ONOO⁻) – cujo nome oficial é *oxoperoxonitrato (1-)* – com constantes de velocidade da ordem de 7,0. 10⁹ M⁻¹s⁻¹ (Eq. (8)).

Esta reação tem grande significado biológico, na medida em que NO[•] e O₂^{•-} antagonizam as ações biológicas um do outro, considerando a sua afinidade química e, além disso, a formação

4 Introdução

de peroxinitrito – cuja forma protonada (ONOOH) é um poderoso oxidante – uma espécie bastante citotóxica. A adição de ONOO^- a células, tecidos ou fluidos corpóreos leva à sua rápida protonação e consumo de tióis e outros antioxidantes, oxidação de lipídeos, rompimento de fita de DNA, nitração e desaminação de bases nitrogenadas, especialmente guanina, e nitração de resíduos de aminoácidos aromáticos em proteínas. O Esquema 1 apresenta um sumário das reações de propagação de espécies reativas.⁷

• **Esquema 1:** Sumário da propagação de espécies ativas a partir do superóxido.

Além da transferência de elétron, uma maneira alternativa de aumentar a reatividade do oxigênio é mover um de seus elétrons desemparelhados de forma a atenuar restrições de spin. A transferência de energia de excitação a oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$) produz o estado eletronicamente excitado singlete do oxigênio ($^1\Delta_g$; $^1\text{O}_2$). **Oxigênio singlete** não tem elétrons desemparelhados, seu estado de energia mais baixo tem tempo de vida relativamente alto (10^{-6} s em H_2O), o que garante sua reatividade em solução. Diferentemente do oxigênio triplete, $^1\text{O}_2$ pode agir tanto como nucleófilo como eletrófilo. Os tipos de reação de oxigênio singlete incluem: (i) reação do tipo “ene” com olefinas; (ii) adição 1,2 a olefinas ricas em elétrons; (iii) adições 1,4 a dienos e heterociclos; (iv) oxidações de sulfitos a sulfóxido e (v) oxidação de fenóis.⁷ Oxigênio singlete também tem sido indicado como mediador da toxicidade de superóxido, já que existem indícios que ele seja produzido em sua dismutação não enzimática e na reação metal-catalisada de Haber-Weiss. No entanto, dados que suportam estas propostas são esparsos. Apesar disso, em grandes quantidades, $\text{O}_2^{\bullet -}$ pode suprimir $^1\text{O}_2$ através de transferência de elétron (Eq. (9)).⁷

Estes diferentes tipos de reação indicam a reatividade desta espécie frente a alvos biológicos, um processo observado em termo de fotoxidação de lipídeos, aminoácidos, nucleotídeos e outros bioconstituíntes.

O termo **Estresse Oxidativo** é amplamente utilizado sendo, entretanto, definido de diversas formas. Em essência, se refere à situação de um sério desequilíbrio entre a produção de espécies ativas de oxigênio e nitrogênio e defesa antioxidante, resultando em processos citotóxicos – dano a proteínas, peroxidação da membrana lipídica, alteração do material genético, inativação enzimática – e diversas patologias, incluindo carcinogênese química, doenças do coração, danos reperfusivos, artrite reumática, processos inflamatórios e envelhecimento.

A presença de Fe(II) ou Cu(I) associados a algumas espécies ativas de oxigênio em presença de DNA resulta em danos ao material genético, que pode ser reparado *in vivo* por sistemas enzimáticos específicos. A relação entre a velocidade de produção do dano e o seu reparo determina o nível de significância fisiológica da modificação de DNA. Se o processo de replicação ocorrer antes do processo de reparo estar completo, a lesão pode resultar na não incorporação de bases, ou ainda, na eliminação de seqüências de DNA induzindo assim a mutação. O ataque de radicais hidroxila resulta em várias modificações ao material genético, incluindo a formação de bases modificadas, como a 8-hidroxi-guanina. Ensaios para o aduto 8-hidroxi-2'-deoxi-guanosina são particularmente sensíveis e têm sido amplamente utilizados como indicadores de dano oxidativo ao DNA.

A combinação de substâncias redutoras com Fe(III) ou Cu(II) pode inativar enzimas por oxidação de resíduos de aminoácidos chave da proteína. Alguns aminoácidos são particularmente vulneráveis a este processo, como a histidina, lisina, ácido glutâmico e cisteína. A perda de resíduos de aminoácidos correlaciona-se com o aumento de resíduos carbonílicos reativos na proteína, que podem ser quantificados e utilizados como indicadores de oxidação de proteínas.

Na medida em que o dano oxidativo *in vivo* ocorre apenas em alguns sítios ou tecidos, e considerando-se que os produtos de oxidação são sujeitos a processos de detoxificação e ao metabolismo, biomarcadores de estresse oxidativo são encontrados em concentrações suficientemente altas e em condições de serem coletados e quantificados. São apresentados alguns exemplos de alguns produtos de peroxidação lipídica e algumas bases purínicas oxidadas.

Desta forma, marcadores *in vivo* podem ser classificados em três grupos: produtos oxidados de proteínas, DNA e lipídeos, sendo estes últimos – resultado do processo de peroxidação lipídica – os mais amplamente estudados.

Peroxidação Lipídica

O dano peroxidativo induzido por radicais a membranas lipídica tem sido atribuído como um evento inicial crítico que leva a danos celulares. Na presença de um iniciador radicalar ou radical livre, o material biológico, especialmente membranas celulares que contém grande proporção de lipídios poli-insaturados, torna-se suscetível à oxidação. O processo de peroxidação lipídica está associado com a perda de ácidos graxos de membrana e a formação de hidroperóxidos, intermediários radicalares e produtos secundários. A peroxidação de ácidos graxos essenciais pode afetar a estrutura fina das membranas celulares, podendo com isso prejudicar sua permeabilidade e funções, incluindo a ativação de fosfolipase-A₂, o que prejudica a homeostase de cálcio.

O processo de peroxidação lipídica, se não interrompido, pode levar à ruptura das membranas celulares com a liberação de enzimas lisossômicas destrutivas. Os produtos de peroxidação lipídica, como hidroperóxidos, aldeídos e epóxidos podem reagir inativando proteínas essenciais, enzimas e ácido nucléico. Além disso, diversas hipóteses foram postuladas para relacionar a peroxidação lipídica com a deterioração funcional típica do envelhecimento, um dos principais processos deletérios que contam com a participação de radicais livres.⁸ Uma delas cita a mudança de fluidez nas membranas, o que afetaria funções vitais, como a transdução de sinais ou a manutenção da permeabilidade seletiva de íons.⁹ Outras propostas envolvem a produção e a progressiva acumulação de DNA desfuncionalizado ou moléculas de proteína. Estas evidências têm sido reforçadas pela presença de grande quantidade de resíduos de lipídios oxidados nas “manchas senis” originadas da lipofucsina, um pigmento fluorescente que se acumula nos tecidos de idosos.^{10,11}

Existem, no entanto, nos seres vivos compostos capazes de diminuir o efeito do estresse oxidativo. Estes assim chamados antioxidantes são responsáveis pelo processo de inativação de radicais livres atuando na redução dos danos associados às suas reações não só em organismos vivos, mas também em alimentos, óleos, borrachas e diversos outros materiais.^{12,13} De maneira geral, no processo de peroxidação lipídica, um antioxidante (AH) reage com um radical (neste caso um resíduo de ácido graxo da membrana, formado pela abstração de um hidrogênio alílico por um radical oxigênio) através da doação de um hidrogênio, regenerando o resíduo de ácido graxo não alterado. Este radical é estabilizado e não participa na progressão da cadeia radicalar, fato que leva à inibição da reação e a prevenção do processo como um todo.

Antioxidantes

As defesas celulares antioxidantes podem ser divididas em primárias – onde a espécie ativa é desativada antes que o dano oxidativo ocorra – e secundárias, onde substâncias reparam as alterações causadas por espécies oxidantes. Desta forma, antioxidantes, de forma geral, podem atuar como: (i) agentes redutores (doadores de elétrons ou átomos de H); (ii) bloqueadores da cadeia do radical peroxil; (iii) seqüestradores ou inibidores de oxigênio singlete ou (iv) inativadores de metais pró-oxidantes.

A atividade antioxidante de muitos compostos naturais e sintéticos é baseada pela transição redox envolvendo a doação de um único elétron – ou átomo de H – a um radical livre. Durante esta transferência de elétron, o caráter radicalar é transferido ao antioxidante, gerando um radical derivado, de cuja estabilização depende a eficiência do aditivo.

• **Esquema 2:** Estrutura do ácido ascórbico e seus produtos de oxidação, apresentando um exemplo de estabilização do caráter radicalar por antioxidantes. Em pH fisiológico está presente a forma desprotonada (ascorbato) considerando que o pK_{a1} do ácido ascórbico é 4,25.

Duas enzimas intracelulares são capazes de inativar os íons peróxido e superóxido. A superóxido dismutase catalisa a dismutação de dois radicais superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio. A enzima catalase facilita a clivagem do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Outra enzima intracelular, a glutathione peroxidase representa papel importante na remoção de peróxido e outros oxidantes utilizando a glutathione como agente redutor.

• **Esquema 3:** Seqüência de reduções do oxigênio até a água e enzimas que atuam como redutores.

Nos fluidos extracelulares os antioxidantes atuam através de outros mecanismos. Um grande número de proteínas está presente para ligar-se com íons metálicos livres e prevenir sua participação na formação de radicais hidroxila. Esta classe inclui as proteínas ligantes de ferro transferrina e lactoferrina, as proteínas ligantes de cobre ceruloplasmina e albumina, as proteínas ligantes de hemoglobina como a haptoglobina e as proteínas ligantes de heme como a hemopexina. Na medida em que estas substâncias irão seqüestrar rapidamente íons que podem participar da formação de radicais livres elas são virtualmente inefetivas na eliminação de radicais uma vez formados. Esta função é realizada por uma série de pequenas moléculas capazes de reduzir radicais que de outra forma poderiam iniciar e propagar reações em cadeia (antioxidantes bloqueadores de cadeia). O α -tocoferol é uma molécula lipossolúvel que existe na bicamada lipídica da membrana celular e em lipoproteínas. Devido à sua propriedade de doação

α -Tocoferol **Ácido Ascórbico** **Ácido Úrico**

de elétrons a radicais livres ele protege ácidos graxos insaturados da oxidação, que são particularmente susceptíveis ao ataque e subsequente iniciação de reações em cadeia na peroxidação lipídica. Em meio aquoso, o ácido ascórbico é um poderoso agente redutor capaz de doar elétrons a quase todos os oxidantes hidrossolúveis e radicais, além de regenerar o α -tocoferol na interface lipídio-água. Além disso, devido à sua capacidade de regeneração de outros antioxidantes consumidos em reações de óxido-redução, o ácido ascórbico pode ter uma maior influência na função antioxidante total do organismo do que a sugerida pela sua concentração em fluidos biológicos. O ácido úrico é também um excelente antioxidante, e em termos molares é 5 a 10 vezes mais abundante que o ácido ascórbico.

A importância relativa de cada um dos antioxidantes naturais *in vivo* ainda não foi bem entendida. Isto pode ser atribuído, em parte, ao fato da maioria dos experimentos desenvolvidos para explorar antioxidantes biológicos focalizarem-se em um ou mais dos antioxidantes conhecidos de forma isolada.

In vivo os antioxidantes vão atuar de forma sinergista para proporcionar uma proteção mais efetiva ao organismo contra o dano causado por radicais, do que a conseguida com antioxidantes agindo isoladamente.¹⁴

Antioxidantes Sintéticos

Antioxidantes podem ser concebidos através de síntese para atender requisitos específicos. Dentre os parâmetros críticos que podem ser manipulados estão a energia da ligação HA–H, o potencial de redução $^{\bullet}\text{AH}/\text{AH}_2$, a constante de velocidade e a energia de ativação da reação, a estabilidade do intermediário $^{\bullet}\text{AH}$, a solubilidade, a volatilidade e a atividade de superfície.

Compostos fenólicos, como o hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT) e *terc*-butil-hidroquinona (TBHQ) têm sido amplamente utilizados como antioxidantes em alimentos. Entretanto, a possível toxicidade e mutagenicidade destes antioxidantes têm sido alvo de estudos há muitos anos.¹⁵ Dados recentes focalizam a participação de BHA na conversão de material ingerido em substâncias tóxicas ou carcinogênicas devido ao aumento da secreção de enzimas microsomais do fígado e órgãos extra hepáticos, como pulmão e mucosa do trato gastrointestinal.¹⁶ Por isso, o FDA (“Food and Drug Administration”), órgão americano responsável pela regulamentação de substâncias químicas utilizadas em alimentos e medicamentos de uso humano, examina a possibilidade de excluir o BHA da lista de substâncias reconhecidamente seguras (GRAS – “Generally Recognized as Safe”). O TBHQ não é mais aprovado em uso alimentício na Europa, Japão e Canadá. Além disso, ITO *et al.*¹⁶ relataram que BHT é carcinogênico em ratos; este antioxidante também está tendo sua utilização diminuída.

Quando desenvolvidos antioxidantes sintéticos devem obedecer a normas que afirmam que nenhuma substância a ser consumida em alimentos pode induzir câncer, mesmo em baixas concentrações. Por isso, apesar de aminas aromáticas e heterocíclicas satisfazerem os requisitos como antioxidantes eficientes, a sua toxicidade inerente previne seu uso em alimentos. Derivados aromáticos mono e poli-hidroxilados permanecem como a principal fonte de antioxidantes sintéticos, apesar da controvérsia

BHA **BHT** **TBHQ**

a respeito dos efeitos causados por este tipo de substância ao organismo.

O desenvolvimento de novos antioxidantes, na forma de polímeros que não são absorvidos pelo intestino, ou de produtos naturais isolados e seus derivados sintéticos visa suprir as necessidades fisiológicas por antioxidantes sem, no entanto, favorecer o surgimento de patologias. Desta forma, antioxidantes naturais encontrados em organismos vivos – especialmente os de origem vegetal – têm tido sua popularidade aumentada nos últimos anos.

Produtos Naturais

Substâncias polifenólicas encontradas em extratos vegetais apresentam atividade como desativadores de radicais e antilipoperoxidantes, tornando certas espécies resistentes ao estresse oxidativo.¹⁷ O primeiro estudo em profundidade relacionando atividade antioxidante e espécies vegetais foi feito por CHIPAULT em 1952, no qual foram investigadas 32 espécies vegetais.¹⁸ Desde então, diversos pesquisadores têm estudado a atividade antioxidante de uma grande variedade de plantas, utilizando seus tecidos, óleos essenciais, extratos e produtos isolados, identificados e purificados.¹⁹

Grande interesse tem sido atribuído a algumas espécies ou gêneros de plantas consumidas como alimento ou tempero. Curcuminóides extraídos de diversas espécies de *Curcuma* apresentam grande atividade antioxidante, assim como diterpenos fenólicos de *Rosmarinus officinalis*. A excepcional estabilidade de óleo de sésamo de *Sesamum indicum* levou ao isolamento do sesamol, além de diversas lignanas bifurânicas.^{19,20}

Flavonóides são vastamente distribuídos em alimentos e desempenham um papel importante na defesa do organismo contra o estresse oxidativo. A reatividade deste tipo de composto tem sido estudada frente a diversos radicais em diferentes condições experimentais. Estas investigações têm demonstrado que as propriedades antioxidantes de flavonóides devem-se as suas propriedades de seqüestro a radicais superóxido, hidroxil, peroxil, alcóxil, concomitantemente com sua capacidade como quelante de ferro, um metal associado a processos de geração de espécies reativas. Taninas, cumarinas e, mais recentemente, xantonas têm sido também pesquisadas como possíveis antioxidantes. Os resultados indicam forte inibição da autooxidação de ácido ascórbico e linoleato, assim como da peroxidação lipídica em membrana mitocondrial de fígado e microsossomos.²¹⁻²³

O estudo das substâncias isoladas de plantas (em sua maioria das folhas e raízes) revelou que os efeitos benéficos atribuídos por usuários e comunidades primitivas correlacionam-se com a atividade antioxidante destes princípios ativos.²⁴ Neste contexto, antioxidantes naturais despertam um crescente interesse. Além da possível aplicação farmacológica de antioxidantes naturais, seja na indústria cosmética ou no uso medicamentoso, novos antioxidantes têm sido utilizados na indústria de alimentos e na indústria de materiais na estabilização e conservação de seus produtos.²⁵

Photomorphe umbellata

A *Photomorphe umbellata* (*Heckeria umbellata*, *Piper umbellata*) é uma espécie arbustiva que atinge a altura de 2 a 3 metros, com folhas ovais de cerca de 20 a 25 cm de largura por 18 a 20 cm de comprimento. De distribuição pantropical e originária da América, é conhecida

popularmente pelos nomes de “pariparoba”, “caapeva” e “jaguarandi”. Suas raízes e folhas são utilizadas em medicina popular para males do fígado, resfriados, úlceras, hipertensão arterial e tratamento de epilepsia.^{26,27}

Diferentes extratos desta planta demonstraram serem efetivos na redução do estresse oxidativo quando testadas em modelos de peroxidação lipídica *in vitro*.²⁸ Esta atividade tem sido atribuída à presença de um derivado catecol, o 4-nerolidilcatecol (4-NC), presente também em outras espécies.²⁹⁻³¹

Determinação do Potencial Antioxidante

Uma grande variedade de testes, incluindo métodos químicos, físicos e bioquímicos têm sido utilizados na investigação e caracterização de antioxidantes naturais e sintéticos. Algumas destas abordagens foram descritas em diversos artigos de revisão, em particular por BORS *et al.*^{32,33} Metodologias e mecanismos de caracterização de antioxidantes foram discutidos recentemente por HALLIWELL.³⁴

Juntamente com a desativação de estados excitados singlete, quelação de metais de transição e processos de ativação e inativação de enzimas, o sequestro de radicais livres é um dos mecanismos básicos de inibição de processos oxidativos. Ensaio que utilizam o sequestro de radicais envolvem dois aspectos fundamentais: a geração de radicais de teste e o monitoramento das reações radicalares.

Radicais livres podem ser gerados através de processos físico-químicos, químicos ou enzimáticos. Os métodos físico-químicos utilizam técnicas como a fotólise ou a oxidação fotodinâmica. Métodos químicos incluem sistemas de Fenton, que contém um agente redutor e um íon metálico, termólise de azo-iniciadores e autooxidação de hemina. Sistemas enzimáticos utilizam frequentemente as reações de xantina oxidase e de NAD(P)H oxidase.

Para o monitoramento de reações radicalares o método que utiliza ressonância de spin de elétron (ESR) combinado com a estabilização das espécies radicalares muito reativas através de “spin trapping” proporciona dados bastante informativos, entretanto esta metodologia nem sempre está disponível. Por outro lado, existem também diversos métodos colorimétricos que podem ser utilizados no monitoramento de reações radicalares. Eles incluem reações entre radicais de maior estabilidade como o 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) ou galvinoxil e o clareamento de carotenóides e *p*-nitrosodimetilanilina.

Diversos procedimentos espectrofotométricos foram desenvolvidos para monitorar a peroxidação lipídica através da detecção de produtos de degradação de ácidos graxos, em particular dienos conjugados e malondialdeído (MDA). Métodos cromatográficos incluem cromatografia gasosa (CG) da produção de etileno e a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) dos produtos de oxidação de ácidos graxos. Eles fornecem informações necessárias na caracterização dos produtos e acerca dos rendimentos das reações. O teste de atividade antioxidante em substâncias não purificadas utiliza como modelo a peroxidação lipídica. Os procedimentos incluem o ensaio de tiobarbitúrico para malondialdeído (MDA) e determinação da concentração de peróxidos. Alguns testes para caracterizar propriedades antioxidantes também envolvem a degradação oxidativa de proteínas e sua inibição por antioxidantes.³⁵

Técnicas quimiluminescentes têm sido amplamente utilizadas no desenvolvimento de sistemas analíticos para substâncias com interesse clínico. Elas oferecem vantagens consideráveis sobre os métodos convencionais como grande sensibilidade com instrumentos relativamente simples, rápida obtenção de dados analíticos e linearidade da resposta luminescente mesmo através de várias ordens de magnitude.

Métodos analíticos relacionados ao fato da quimiluminescência do luminol ser induzida por radicais livres ou processos de oxirredução avaliam diferentes tipos de espécies ativas de oxigênio e a especificidade e eficiência de aditivos seqüestradores destes radicais. Dados obtidos no estudo da emissão do luminol induzida pelos radicais superóxido, hidroxil, alcoxil e hidroperoxil, e oxigênio singlete, mostram que existe um certo grau de especificidade em relação a um determinado aditivo, dependendo da espécie de oxigênio ativo que se forma inicialmente no meio de reação.^{14, 36}

Ensaio TRAP

Atividade antioxidante é a habilidade de um composto em reduzir espécies pró-oxidantes ou espécies reativas de significância patológica. Muitos métodos, que têm sido definidos como métodos de inibição, envolvem espécies reativas, que normalmente são radicais livres. O parâmetro de seqüestro total de radicais ("Total Radical Antioxidant Parameter" [TRAP]) desenvolvido por WAYNER *et al.*¹⁴ é o método mais amplamente utilizado para medir a capacidade antioxidante de plasma durante a última década.

Esta técnica envolve a iniciação da peroxidação lipídica através da produção de radicais peroxíla hidrossolúveis a uma velocidade constante pela decomposição térmica de cloreto de 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) (ABAP). No Esquema 4 é apresentado o mecanismo de iniciação radicalar a partir da termólise de azocompostos.

• **Esquema 4:** Mecanismo de iniciação radicalar a partir da termólise de azocompostos. A reação de um radical alquil com oxigênio possui uma constante de segunda ordem da ordem de $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ sendo assim, o radical peróxido é normalmente considerado a espécie responsável pela abstração de hidrogênio de um substrato LH oxidável.

Este processo é inibido por antioxidantes encontrados em fluidos como o plasma, e o tempo de indução observado na iniciação da peroxidação lipídica, medido pelo consumo de oxigênio, pode ser comparado com o obtido quando da utilização de uma solução padrão de **Trolox** (6-hidroxil-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-óico), um antioxidante originalmente desenvolvido para preservação de alimentos, que tem uma estrutura cromano similar à encontrada no α -tocoferol, mas sem a

cauda hidrofóbica, e que vem apresentando alto potencial antioxidante, atuando com sucesso na prevenção de enfartes do miocárdio e prevenção da necrose do fígado.

• **Esquema 5:** A estrutura do Trolox apresenta os requisitos para uma ação antioxidante efetiva: um fenol impedido com um oxigênio de éter em posição *para* em um sistema de anel cuja estrutura proporciona estabilização estereoeletrônica do radical fenoxil resultante, na transferência do átomo de hidrogênio a um radical de oxigênio, como o peroxil. Devido a esta estrutura de cromanol, que proporciona a característica antioxidante e o grupo carboxílico, que confere moderada solubilidade em meio aquoso, o Trolox apresenta vantagens em relação a outros antioxidantes.

Apesar do ensaio TRAP original ser sensível a todos os antioxidantes de interrupção de cadeia, sua realização é relativamente complexa e demanda muito tempo requerendo algum grau de especialização e experiência. Este procedimento tem sido modificado empregando-se outras fontes de radicais livres, além de outras técnicas para monitorar a velocidade do processo.

Ensaio TRAP Baseado em Luminol

METSÄ-KETELA *et al.* desenvolveram um ensaio TRAP baseado em quimiluminescência em 1991, recentemente descrito em detalhes por ALHO e LEINOMEM.³⁷ O princípio do método baseia-se na reação de oxidação do luminol pelos radicais peroxil formados pela termólise de ABAP que resulta em uma emissão quimiluminescente. Antioxidantes na amostra inibem esta quimiluminescência por um tempo diretamente proporcional à concentração total de aditivo. O valor obtido é, então, comparado com o antioxidante padrão, Trolox, e reportado como a capacidade antioxidante da amostra.

LISSI *et al.*³⁸ utilizando um método de avaliação de TRAP, muito similar estendeu o procedimento para a avaliação da capacidade do aditivo em diminuir a concentração de radicais livres no estado estacionário, originando um novo índice antioxidante conhecido como TAR (Reatividade Antioxidante Total).

WHITEHEAD *et al.* relataram um ensaio quimiluminescente aperfeiçoado para medir a capacidade antioxidante em fluidos biológicos em 1992.¹² O princípio deste método baseia-se na oxidação de luminol por peróxido de hidrogênio ou perborato catalisada por peroxidase de raiz forte (HRP), que resulta em uma baixa intensidade emissão e altas constantes de decaimento. As características da reação podem ser alteradas substancialmente com a adição de um amplificador, como o *p*-iodo-fenol, que resulta em uma emissão mais estável, intensa e prolongada, e que permanece sensível à interferência de substâncias antioxidantes. Quando na presença de uma substância potencialmente redutora, a emissão de luz é inibida, sendo restabelecida apenas após o total consumo do antioxidante.

Cálculo do Conteúdo Antioxidante Total (TRAP)

O dano infligido a um tecido ou a degradação de biomoléculas por radicais livres será proporcional à concentração de radicais livres no estado estacionário no local do evento. Esta é determinada pela velocidade de todas as reações que removem estes radicais, expressa pela

constante de velocidade de reação de pseudoprimeira ordem (k), e pela velocidade de formação dos radicais (R_p).

$$[Radicais]_{EE} = \frac{R_p}{k} \quad \bullet \text{Eq. (10)}$$

Na presença de antioxidantes eficientes, apenas após o consumo total de todos os antioxidantes, ocorrerão processos de degradação envolvendo radicais livres. Em outras palavras, o valor de k na presença de inibidores é tão alto que a concentração de radicais livres no estado estacionário é pequena e a velocidade do processo mediado pelos radicais livres é negligível.^{13,38,39} O processo na presença de um inibidor, apresenta então um tempo de indução (t), definido como o tempo necessário para o consumo de todo(s) o(s) antioxidante(s) presente(s) na amostra. Assumindo-se que todos os radicais foram seqüestrados e que um dado antioxidante $(XH)_i$ é capaz de seqüestrar n_i radicais, tem-se:

$$t = \frac{\sum n_i [XH]_i}{R_p} \quad \bullet \text{Eq. (11)}$$

O potencial antioxidante total da amostra (TRAP) é a concentração de radicais livres que podem ser seqüestrados pela amostra, implicando que:

$$TRAP = \sum n_i [XH]_i = t_{amostra} \cdot R_p \quad \bullet \text{Eq. (12)}$$

Seu valor pode ser obtido através da medida do tempo de indução, se a velocidade de produção dos radicais livres (R_p) é conhecida. Uma alternativa a este procedimento envolve o uso de um inibidor cujo comportamento é conhecido.

Um grande número de antioxidantes solúveis em água podem ser usados como referência para determinação de índices. Dentre os mais utilizados estão o Trolox, um derivado hidrossolúvel do α -tocoferol (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C) e ácido úrico, os dois últimos os antioxidantes mais abundantes em fluidos extracelulares (Tabela I).

• **Tabela I:** Número de radicais (n) seqüestrados por molécula de aditivo.¹³

Antioxidante	Intervalo de Concentração	n
Trolox	79-790 nM	2,00
Ácido úrico	0,18-1,7 μ M	1,20
Ácido ascórbico	0,4-1,9 μ M	0,44
Cisteína	2,1-12 μ M	~0,13**

**Valor médio. Para este composto, n diminui com a concentração.

Sabe-se que uma molécula de Trolox seqüestra dois radicais e observa-se que os valores de TRAP para a amostra podem ser expressos em termos de equivalentes à sua concentração o que favorece a comparação com outros índices como o TAR (reatividade antioxidante total) e ORAC (capacidade de absorção de radicais de oxigênio). O tempo de indução fornecido pela adição do Trolox será dado por:

$$t_{Trolox} = \frac{n_{Trolox} [Trolox]}{R_p} \quad \bullet \text{Eq. (13)}$$

onde n_{Trolox} é o número de radicais livres seqüestrados por cada molécula de Trolox consumida. Se t' é o tempo de indução provocado por uma concentração de $1\mu\text{M}$ de Trolox, o TRAP da amostra pode ser determinado medindo-se o tempo de indução (t) provocado por uma alíquota do fluido (Trolox $1\mu\text{M}$):

$$TRAP(\mu\text{M}) = n_{Trolox} \cdot f \cdot \frac{t}{t'} \quad \bullet \text{Eq. (14)}$$

onde f é o fator de diluição igual à variação entre o volume da amostra e o volume da alíquota utilizada para a obtenção de t e t' . O TRAP obtido é a medida do conteúdo total de antioxidantes presentes na amostra e é expresso em μM . Um valor de $TRAP = X \mu\text{M}$ de uma certa amostra quer dizer que esta contém uma quantidade de antioxidantes que é capaz de seqüestrar $X \mu\text{M}$ de radicais livres.^{12, 13, 38, 39, 40}

Os valores de TRAP podem variar segundo a fonte, pois podem ser expressos em termos de equivalentes da concentração de Trolox ou em termos do número de radicais livres que podem ser seqüestrados pela amostra. Sendo que uma molécula de Trolox pode seqüestrar dois radicais ($n_{Trolox} = 2$), os valores de TRAP definidos em termos de equivalentes da concentração de Trolox são menores por um fator de dois (2) em relação aos expressos pelo número de radicais que podem ser seqüestrados pela amostra.^{12, 13}

Ensaio TEAC

O ensaio de capacidade antioxidante em equivalentes de trolox ("Trolox Equivalent Antioxidant Capacity" [TEAC]) foi desenvolvido inicialmente por MILLER *et al.*⁴¹ e, em seguida, modificado por RE *et al.*⁴². O ensaio é baseado na inibição da formação do cátion radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazoline-6-sulfonato) (ABTS), o qual tem um espectro de absorção característico com máximos em 645, 734 e 815 nm.

O cátion radical de ABTS na versão original do ensaio, que tem sido comercializada pelo Laboratório Randox (São Francisco, CA, USA), é formado pela interação de ABTS com o radical ferrilmioglobina, gerado pela ativação de metilmioglobina com peróxido de hidrogênio. O ensaio TEAC original mede a habilidade de um composto em reduzir o radical de ABTS, apesar do composto em análise poder também reduzir os radicais ferrilmioglobina. No ensaio TEAC aperfeiçoado, os radicais ABTS são gerados pela oxidação de ABTS com persulfato de potássio. O radical formado é estável por dois dias na ausência de luz e em temperatura ambiente. O ensaio TEAC original produziu informações úteis em relação à atividade antioxidante de produtos naturais.^{43,44} Utilizando o ensaio original indicou-se

que a capacidade antioxidante do plasma aumenta em pacientes com infarto agudo do miocárdio,⁴⁵ e diminui em crianças prematuras⁴⁶. No entanto, o menor TEAC de plasma encontrado em crianças prematuras deve-se principalmente ao baixo conteúdo de proteínas no plasma. O índice atribuído ao plasma de crianças prematuras será significativamente maior, não menor, do que o encontrado em crianças ou adultos se os dados forem associados ao conteúdo total de proteína no sangue.

Cálculo da Capacidade Antioxidante (TEAC)

O TEAC de misturas, como extratos vegetais, representa a concentração da solução de Trolox que possui a mesma capacidade antioxidante da mistura. Para isso, prepara-se uma curva de calibração com diferentes concentrações do antioxidante padrão (0-10 μM), medindo sua variação de absorbância durante os seis primeiros minutos, corrigidos com os valores obtidos do solvente:

$$\Delta A_{\text{Trolox}} = (A_{\text{Trolox}, t=0} - A_{\text{Trolox}, t=6}) - \Delta A_{\text{solvente}(0-6 \text{ min})} \quad \bullet \text{Eq. (15)}$$

O coeficiente de regressão (α) é calculado a partir da curva de calibração:

$$\Delta A_{\text{Trolox}} = \alpha \times [\text{Trolox}] \quad \bullet \text{Eq. (16)}$$

o valor encontrado para Trolox deve ser aproximadamente 0,028 μmol^{-1} . Para estabelecer o TEAC de compostos desconhecidos deve-se medir a variação de absorbância da amostra, dividindo o coeficiente obtido pelo do padrão, o que resulta na relação entre o potencial antioxidante da substância frente ao trolox.

Ensaio TOSC

WINSTON *et al.*⁴⁷ relataram recentemente o Ensaio de Capacidade Total de Seqüestro de Oxirradicais – TOSC (“Total Oxyradical Scavenging Capacity”). O método é baseado na oxidação do ácido α -ceto- γ -mutiolbutírico (KMBA) a etileno por radicais peroxíla produzidos na termólise de ABAP. A formação de etileno, que é parcialmente inibida pela presença de antioxidantes, é monitorada por análise por cromatografia gasosa, de amostras colhidas do espaço vazio do balão de reação.

O índice TOSC é calculado de acordo com a equação:

$$\text{TOSC} = 100 - \left(\frac{\int \text{Amostra}}{\int \text{Controle}} \times 100 \right) \quad \bullet \text{Eq. (17)}$$

onde a área sobre a curva cinética foi matematicamente calculada através da integral da equação que melhor define os valores experimentais tanto do padrão quanto da amostra. Desta forma, uma substância que não apresenta capacidade de seqüestro de radicais originará uma área igual à obtida com a reação controle, resultando em um índice TOSC igual a zero.

Objetivos

A flora brasileira é particularmente rica em plantas medicinais que têm sido empregadas em vários propósitos, muitos deles sem estudos químico-farmacológicos. Nosso objetivo é, pois, desenvolver um ensaio de baixo custo e simples procedimento, baseado na oxidação quimiluminescente de luminol por peróxido de hidrogênio catalisada por hemina, para investigar a presença de substâncias que possuam capacidade antioxidante em misturas complexas, extratos de plantas e seus produtos isolados, e quantificar a atividade antioxidante.

Resultados

Com o objetivo de definir as condições ideais do sistema luminol/H₂O₂/hemina para determinação da atividade antioxidante e tentar estabelecer o mecanismo de ação dos aditivos frente ao sistema, foi realizado um estudo cinético sistemático alterando-se a concentração de um dos reagentes enquanto a dos demais era fixada. Visando obter-se uma concentração constante de radicais no estado estacionário, utilizou-se como modelo de emissão o decaimento quimiluminescente do sistema luminol/ABAP, amplamente utilizado em ensaios de determinação de atividade antioxidante devido à sua velocidade constante de geração de radicais; $k_{obs} = 1,1 \times 10^{-6}$ para a decomposição térmica a 37 °C (Figura 2).³²

• **Figura 2:** Curva cinética da emissão de quimiluminescência obtido utilizando-se ABAP. [Luminol]: 0,10 mM e [ABAP]: 65 mM, em tampão fosfato pH=11,6 (n = 1).

Influência da Concentração dos Reagentes Sobre a Cinética de Emissão

Inicialmente variou-se a concentração de luminol, fixando a concentração de peróxido de hidrogênio em 0,1 mM e a concentração de hemina em 0,33 µM. O efeito qualitativo da variação da concentração de luminol sobre a emissão de quimiluminescência pode ser observado na Figura 3.

• **Figura 3** : Cinética de decaimento do sistema luminol/ H_2O_2 /hemina com diversas concentrações de luminol. $[\text{H}_2\text{O}_2]$: 0,1 mM, $[\text{Hemina}]$ 0,33 μM e $[\text{Luminol}]$: (–,A) 10 mM, (–,B) 5 mM, (–,C) 1 mM, (–,D) 0,5 mM, (–,E) 0,1 mM, (–,F) 0,05 mM, (–,G) 0,01 mM, (–,H) 0,005 mM, em tampão fosfato pH=11,6 ($n = 5$).

A intensidade de emissão (I_{max}) tem seu máximo em baixas concentrações de luminol (0 – 0,5 mM), diminuindo drasticamente conforme o aumento da concentração do reagente (Figura 4) .

• **Figura 4**: Correlação entre a intensidade máxima (I_{max}) e a concentração de luminol. $[\text{H}_2\text{O}_2]$: 0,1 mM e $[\text{Hemina}]$ 0,33 μM , em tampão fosfato pH=11,6. As barras indicam o desvio padrão obtido de 5 medidas.

Os valores de intensidade (I_{MAX}) apresentados indicam o valor máximo de emissão, em unidades relativas de luz por segundo (RLU/s), e dependem da concentração dos reagentes presentes no sistema. Com isso, estão diretamente relacionados à velocidade de uma reação quimiluminescente (*vide* discussão). Além disso, foram calculadas as constantes de decaimento quimiluminescente (k_{obs}) utilizando-se um ajuste não linear de primeira ordem sobre as curvas de decaimento, obtidas quando se varia a concentração de algum dos reagentes.

Os resultados obtidos com a variação da concentração de luminol mostram que este reagente afeta dramaticamente a constante de velocidade da reação, alterando também a

intensidade máxima da emissão. Verificou-se que em baixas concentrações de luminol (0 – 0,5 mM) k_{obs} é inversamente proporcional ao aumento da concentração, enquanto que em maiores concentrações k_{obs} , após um pequeno aumento, permanece praticamente constante. (Figura 5)

• **Figura 5:** Dependência da constante de velocidade observada (k_{obs}) com a concentração de luminol. $[H_2O_2]$: 0,1 mM e [Hemina] 0,33 μ M, em tampão fosfato pH=11,6. As barras indicam o desvio padrão obtido de 5 medidas.

Variou-se as concentrações de hemina, fixando-se as concentrações de peróxido de hidrogênio e luminol em 0,1 mM. Foram realizados duas séries de experimentos com concentrações de hemina entre 1,4 e 5,2 μ M (Figura 6A) e entre 0,14 e 0,52 μ M (Figura 6B). Em todos os casos as regiões de decaimento podem ser ajustadas utilizando-se uma equação de decaimento monoexponencial.

• **Figura 6:** (A) Cinética de decaimento do sistema luminol/ H_2O_2 /hemina com diversas concentrações de hemina. $[H_2O_2]$: 0,1 mM, [Luminol]: 0,1 mM em tampão fosfato pH=11,6 ($n=7$). (B) Cinética de decaimento do sistema luminol/ H_2O_2 /hemina com concentrações de hemina uma ordem de grandeza inferior. $[H_2O_2]$: 0,1 mM, [Luminol]: 0,1 mM em tampão fosfato pH=11,6 ($n=7$).

A intensidade máxima varia em baixas concentrações de hemina (0,1 – 0,6 μ M) proporcionalmente ao aumento da concentração, mantendo-se constante em intensidades mais altas. (Figura 7)

• **Figura 7:** Correlação entre a intensidade máxima ($I_{\max}$) e a concentração de hemina. $[H_2O_2]$: 0,1 mM e $[Luminol]$ 0,10 mM, em tampão fosfato pH=11,6. As barras indicam o desvio padrão obtido de 5 medidas.

A análise da constante de velocidade observada (k_{obs}) indicou que em concentrações mais baixas de hemina (0 – 0,9 μM), seu valor diminuía com o aumento da concentração de hemina. Em concentrações mais altas do catalisador (1 – 6 μM), a variação ocorre de forma diretamente proporcional. (Figura 8)

• **Figura 8:** Dependência da constante de velocidade observada (k_{obs}) com a concentração de hemina. $[H_2O_2]$: 0,1 mM e $[Luminol]$ 0,10 mM, em tampão fosfato pH=11,6. Os gráficos menores apresentam as regiões de concentração separadas por uma ordem de grandeza. As barras indicam o desvio padrão obtido de 5 medidas.

A variação da concentração de peróxido de hidrogênio afeta não somente a intensidade máxima de emissão ($I_{\max}$) como o aspecto do decaimento. Em concentrações de peróxido de hidrogênio entre 0,05 e 0,1 mM, obtém-se uma cinética de decaimento de primeira ordem da qual podem ser obtidos os valores de k_{obs} . Entretanto, nas concentrações de peróxido de hidrogênio de 0,5 mM e 1 mM, a curva cinética apresenta uma região inicial na qual a intensidade de emissão permanece praticamente constante (patamar) por cerca de 5 e 7 minutos, respectivamente,

seguindo por um decaimento de primeira ordem (Figura 9). Para melhor investigar esta observação, foram realizados experimentos com variação da concentração de peróxido de hidrogênio entre 0,1 e 1,0 mM. Os resultados obtidos mostram que a região de patamar varia entre 0,3 – 1 mM, atingindo um máximo de aproximadamente 10 minutos de intensidade constante para uma concentração de 0,3 mM de peróxido de hidrogênio.

• **Figura 9:** Cinética de decaimento do sistema luminol/ H_2O_2 /hemina com diversas concentrações de H_2O_2 . [Hemina] 0,33 μM , [Luminol]: 0,10 mM e [H_2O_2]: (–,A) 0,005 mM, (–,B) 0,01 mM, (–,C) 0,05 mM, (–,D) 0,1 mM, (–,E) 0,5 mM e (–,F) 1 mM, em tampão fosfato pH=11,6 ($n=3$).

Entretanto, em concentrações entre 0,3 e 0,1 mM, a região de patamar diminui, obtendo-se com 0,1 mM de peróxido de hidrogênio uma curva de decaimento simples (Figura 10).

• **Figura 10:** Cinética de decaimento do sistema luminol/ H_2O_2 /hemina com diversas concentrações de H_2O_2 . [Hemina]: 0,33 μM , [Luminol]: 0,10 mM e [H_2O_2]: (–) 1 mM, (–) 0,9 mM, (–) 0,8 mM, (–) 0,7 mM, (–) 0,6 mM, (–) 0,5 mM, () 0,4 mM, (–) 0,3 mM, (–) 0,2 mM, (–) 0,1 mM, em tampão fosfato pH=11,6. As barras de desvio padrão foram omitidas, entretanto são apresentadas as médias de 5 medidas.

A intensidade máxima (I_{max}) aumenta proporcionalmente com a concentração de peróxido de hidrogênio entre 0,005 e 0,1 mM, permanecendo constante em concentrações entre 0,1 e 1 mM. (Figura 11)

• **Figura 11:** Correlação entre a intensidade máxima (I_{MAX}) e a concentração de H_2O_2 . [Hemina]: $0,33 \mu M$ e [Luminol] $0,10$ mM, em tampão fosfato pH=11,6. As barras indicam o desvio padrão obtido de 3 medidas.

A constante de velocidade observada (k_{obs}) apresenta um aumento não linear até atingir uma concentração de $0,8$ mM, permanecendo constante entre $0,8$ e 1 mM. Os resultados apresentados na Figura 12 foram calculados ajustando um decaimento monoexponencial ao intervalo de decaimento de cada curva de emissão apresentada na Figura 10.

• **Figura 12:** Dependência da constante de velocidade observada (k_{obs}) com a concentração de H_2O_2 . [Hemina]: $0,33 \mu M$ e [Luminol] $0,10$ mM, em tampão fosfato pH=11,6. As barras indicam o desvio padrão obtido de 3 medidas.

Interessante notar, que a região de k_{obs} praticamente constante até $0,1$ mM coincide com aquela na qual I_{MAX} mostrou aumento com a concentração de peróxido de hidrogênio, e que na mesma região (entre $0,2$ e $0,3$ mM) ocorre a mudança de uma cinética usual de decaimento por um comportamento cinético complexo.

Tentativa de Estabelecimento das Condições Padrão do Sistema

Os resultados apresentados acima mostram que não foram encontradas condições experimentais onde fosse observada uma cinética lenta de decaimento. Com isso, decidiu-se por diminuir a concentração de peróxido de hidrogênio em uma ordem de grandeza – o que resultou em uma concentração final de oxidante de 10 μM – e realizar novos ensaios para a obtenção de condições ideais no sistema luminol/ H_2O_2 /hemina. O efeito qualitativo da variação da concentração de hemina sobre a emissão de quimiluminescência pode ser visto na Figura 13.

• **Figura 13:** Cinética de decaimento do sistema luminol/ H_2O_2 /hemina com concentrações de hemina uma ordem de grandeza inferior. $[\text{H}_2\text{O}_2]$: 10 μM , $[\text{Luminol}]$: 0,12 mM e $[\text{Hemina}]$: (—) 0,28 μM , (—) 0,57 μM , (—) 0,81 μM , (—) 1,14 μM , (—) 1,38 μM , (—) 1,70 μM , (—) 2,44 μM , em tampão fosfato pH=11,6.

Observou-se que, diminuindo-se a concentração de peróxido de hidrogênio de 0,1 mM para 10 μM , a intensidade máxima de emissão é linearmente proporcional à concentração de hemina. Foram calculadas as constantes de decaimento quimiluminescente (k_{obs}) utilizando-se um ajuste não linear de primeira ordem. O resultado indica que k_{obs} aumenta linearmente com o aumento da concentração de hemina. Porém, em baixas concentrações de hemina obtém-se valores de k_{obs} que representam um decaimento mais lento, compatível com o sistema modelo luminol/ABAP (Figura 14).

• **Figura 14:** (A) Correlação entre a intensidade máxima (I_{max}) e a concentração de hemina. (B) Dependência da constante de velocidade observada (k_{obs}) com a concentração de hemina. [luminol] 0,10 mM; [H_2O_2]: 10 μ M em tampão fosfato pH 11,6 (n=2). Pontos entre parênteses não foram considerados no ajuste linear.

Diminuindo-se a concentração de hemina, foi atingido um valor de constante de decaimento suficientemente baixa para poder utilizar essa condição experimental como sistema padrão para o estudo da capacidade antioxidante ([luminol]: 0,1 mM; [H_2O_2]: 10 μ M e [hemina]: 50 nM). A Figura 15 apresenta a cinética de decaimento do sistema luminol/ABAP, o sistema inicial e o sistema com baixas concentrações de peróxido e hemina.

• **Figura 15:** Cinética de decaimento do sistema ABAP ([ABAP]: 65 mM; [luminol]: 0,1 mM em tampão fosfato pH 11,6); do sistema padrão inicial (I) ([H_2O_2]: 0,1 mM; [luminol]: 0,1 mM; [hemina]: 0,33 μ M, em tampão fosfato pH 11,6) e do sistema padrão posterior (II) ([H_2O_2]: 10 μ M; [luminol]: 0,1 mM; [hemina]: 50 nM, em tampão fosfato pH 11,6).

Foi estudado o efeito da adição de diversas concentrações de trolox ao sistema padrão, para verificar o efeito de substâncias com potencial antioxidante sobre o novo sistema. O aditivo foi adicionado durante a reação em concentrações variando de 0,1 a 5 μ M. O efeito qualitativo do antioxidante sobre a cinética de decaimento é apresentado na Figura 16A.

Foram calculados os tempos de supressão da luz, através da diferença entre o tempo da adição do antioxidante e o momento onde sua intensidade atingiu 50% do valor inicial.¹³ O

coeficiente angular obtido na correlação entre o tempo de supressão e a concentração de trolox (Figura 16B) possibilita, quando comparado ao valor obtido com outros antioxidantes, o cálculo do índice TRAP.

• **Figura 16:** (A) Efeito da adição de diversas concentrações de trolox, 100 s após o início da reação, sobre a cinética de emissão. [H₂O₂]: 10 μM; [luminol]: 0,1 mM; [hemina]: 50 nM; (–,A) Curva Padrão, (–,B) 0,1 μM, (–,C) 1 μM, (–,D) 2 μM, (–,E) 3 μM e (–,F) 4 μM, em tampão fosfato pH 11,6 (n=1). (B) Dependência entre a concentração de trolox e o tempo de supressão medido através da diferença entre o instante da adição do antioxidante e o momento onde sua intensidade atingiu 50% do valor inicial

Entretanto, os resultados obtidos com este novo sistema padrão não se mostravam reprodutíveis. Variações na intensidade máxima de emissão e constante de velocidade entre experimentos utilizando as mesmas concentrações dos reagentes fez com que fossem avaliadas as condições experimentais como agitação, temperatura, ordem de adição dos reagentes e maneira de preparação das soluções, visto que foi verificado que a cinética da reação depende drasticamente do procedimento de preparação da solução estoque de hemina.

Estabilização da Hemina

Observou-se que o sistema podia ser reproduzido se a solução estoque de hemina fosse preparada uma semana antes dos experimentos, o que – juntamente com dados da literatura⁴⁸ – nos levou a acreditar em uma possível formação de agregados de hemina em solução aquosa contendo oxigênio. Através de testes com diversos solventes para a hemina, constatou-se uma mudança espectral na região entre 400 e 600 nm quando utilizava-se NaOH (1 M) como solvente, em lugar de tampão fosfato (μ=0,1) em pH = 11,6, o novo espectro de absorção é similar ao obtido com hemina envelhecida.⁴⁸ (Figura 17).

• **Figura 17:** Espectro de absorção da hemina em (—) NaOH 1 M e (---) tampão fosfato pH 11,6. O gráfico inserido apresenta o resultado obtido por Brown *et al.* Utilizando hemina envelhecida (---) e fresca (—). Extraído de BROWN, S.B.; JONES, P.; SUGGETT, A.; *Trans Faraday Soc.*, **64**; 986-993 (1968).

Em solução aquosa básica, a espécie de hemina preponderante é uma forma dimérica conhecida como complexo μ -oxo de hemina.⁴⁸ Através de procedimento descrito anteriormente⁴⁹ foi possível preparar duas soluções contendo predominantemente o dímero em solução NaOH (1M) e o monômero de hemina em dimetilsulfóxido (DMSO). Foram preparadas soluções de hemina onde se variou o solvente partindo de DMSO puro à NaOH puro. Observou-se um aumento da intensidade da banda em 400 nm e o desaparecimento do sinal em 450 nm (Figura 18). Com isso, estabeleceu-se um procedimento para preparação de hemina que garante uma relação monômero/dímero constante, garantindo reprodutibilidade ao sistema. (*vide* Parte Experimental)

• **Figura 18:** Espectro de absorção obtido com varias relações DMSO/NaOH 1M como solvente. Foram dissolvidos 2,5 mg de hemina em 5 mL do solvente.

Definição do Sistema Padrão

Com o estudo sobre as propriedades da solução estoque de hemina foi possível estabelecer as condições experimentais para o sistema padrão II, obtendo-se resultados reprodutíveis. Entretanto, devido à baixa concentração de radicais no estado estacionário, resultando em longos tempos de supressão (Figura 16), e de uma relação sinal-ruído baixa, optou-se por aumentar a concentração de hemina, o que resultou em tempos mais curtos de supressão e, portanto um método analítico mais dinâmico. O sistema padrão final ficou definido como: [luminol]: 0,1 mM; [H₂O₂]: 10 µM e [hemina]: 0,9 µM. (Figura 19)

• **Figura 19:** Cinética de decaimento do sistema padrão final. [H₂O₂]: 10 µM; [luminol]: 0,1 mM; [hemina]: 0,9 µM, em tampão fosfato (µ=0,1) pH 11,6.

Estudo Cinético Utilizando Sistema Padrão

Após a estabilização do catalisador e estabelecimento de um novo sistema padrão, tomou-se necessário um novo estudo cinético. Inicialmente optou-se variar a concentração de hemina, verificando o comportamento da curva de emissão obtida para três diferentes concentrações de peróxido.

Observou-se uma intensidade máxima que aumenta rapidamente em concentrações de hemina até 1 µM, mantendo este comportamento – porém de forma muito mais lenta – para maiores concentrações da porfirina. Além disso, pôde-se observar um aumento da intensidade de emissão conforme aumentava-se a concentração de peróxido (Figura 20). Nos experimentos com concentração de peróxido de hidrogênio 200 µM a concentração de hemina máxima utilizada foi de 2 µM pois nestas condições foi atingido uma intensidade de emissão no limite da capacidade da fotomultiplicadora.

• **Figura 20:** Correlação entre a intensidade máxima (I_{max}) e a concentração de hemina, em diversas concentrações de peróxido de hidrogênio. [Luminol] 0,10 mM, em tampão fosfato pH=11,6. As barras indicam o desvio padrão obtido de 7 medidas.

O cálculo da constante de velocidade através de um ajuste não linear monoexponencial resultou em valores de k_{obs} em acordo com os resultados anteriores. Para concentrações de hemina até 1 μM , o aumento da concentração diminui k_{obs} , que volta a aumentar para maiores concentrações de hemina. O efeito da concentração de peróxido é mais pronunciado em baixas concentrações de hemina, sendo que em concentrações do catalisador maiores que 2 μM os valores de k_{obs} obtidos são similares para concentrações de peróxido entre 10 e 100 μM . (Figura 21).

• **Figura 21:** Dependência da constante de velocidade observada (k_{obs}) com a concentração de hemina, para diversas concentrações de peróxido de hidrogênio. [Luminol] 0,10 mM, em tampão fosfato pH=11,6. As barras indicam o desvio padrão obtido de 7 medidas.

A variação da concentração de luminol resultou em um aumento da intensidade máxima de emissão em concentrações do substrato até 60 μM , diminuindo entre 70 μM e 0,7 mM (Figura 22, Tabela II). Este comportamento é similar àquele obtido em experimentos anteriores

utilizando-se um concentração de peróxido de hidrogênio dez vezes maior (Figura 4), porém, naqueles experimentos não foram utilizadas concentrações de luminol baixas o suficiente para que o aumento inicial da intensidade conforme o aumento da concentração de luminol pudesse ser observado.

• **Figura 22:** Correlação entre a intensidade máxima ($I_{\max}$) e a concentração de luminol. $[H_2O_2]$: 10 μ M e [Hemina] 0,9 μ M, em tampão fosfato pH=11,6. As barras indicam o desvio padrão obtido de 5 medidas.

• **Tabela II:** Correlação entre a intensidade máxima ($I_{\max}$) e a concentração de luminol. $[H_2O_2]$: 10 μ M e [Hemina] 0,9 μ M, em tampão fosfato pH=11,6.

[Luminol] (mM)	$I_{\max}$ (RLU/s)	$k_{\text{obs}} \times 10^3$ (s ⁻¹)
0,668	118598 ± 29	1,67 ± 0,004
0,334	218966 ± 214	1,43 ± 0,003
0,167	350782 ± 225	1,28 ± 0,001
0,083	387270 ± 561	1,17 ± 0,005
0,040	392376 ± 568	1,10 ± 0,009
0,020	290881 ± 251	1,05 ± 0,009
0,013	248970 ± 235	0,96 ± 0,008
0,010	199039 ± 145	0,91 ± 0,009
0,004	123298 ± 25	0,90 ± 0,008
0,002	89341 ± 125	0,87 ± 0,008

A constante de velocidade diminui com o aumento da concentração de luminol até 70 mM, tornando-se praticamente constante após esta concentração (Figura 23).

• **Figura 23:** Dependência da constante de velocidade observada (k_{obs}) com a concentração de luminol. $[H_2O_2]$: 10 μM e $[Hemina]$ 0,9 μM , em tampão fosfato pH=11,6. As barras indicam o desvio padrão obtido de 5 medidas.

Efeito da Adição de Diversos Antioxidantes ao Sistema Padrão

Estabelecido o sistema padrão, antioxidantes com valores de TRAP reportados na literatura foram testados com o objetivo de aferir a metodologia. É apresentado na Figura 24 o comportamento do trolox em concentrações ente 1 e 4 mM, frente ao novo sistema padrão, quando o antioxidante é adicionado durante a emissão

• **Figura 24:** Efeito da adição após 100 s do início do decaimento de diversas concentrações de trolox, sobre a cinética de emissão do sistema padrão. $[H_2O_2]$: 10 μM ; $[luminol]$: 0,1 mM; $[hemina]$: 0,9 μM , em tampão fosfato pH 11,6.

O efeito da adição de trolox sobre a cinética de decaimento é marcado tanto por uma rápida supressão da emissão, quanto pela rápida retomada da emissão após o tempo de supressão observado apresenta correlação linear com a concentração de trolox utilizado (1 – 4 μM). Além disso, com a utilização do sistema padrão atual, foram obtidos intervalos mais curtos de supressão (Figura 25), compatíveis com os métodos existentes.

• **Figura 25:** Dependência entre a concentração de trolox e o tempo de supressão medido através da diferença entre o instante da adição do antioxidante e o momento onde sua intensidade atingiu 50% do valor inicial (n=5).

Diferentemente do trolox, o ácido úrico proporciona um retorno lento da intensidade de emissão e, além disso, tempos de supressão menores nas mesmas concentrações do antioxidante padrão. Porém, utilizando-se a mesma metodologia aplicada anteriormente para o trolox, foi obtida correlação linear entre o tempo de supressão e a concentração de aditivo, o que permite o cálculo da atividade antioxidante de ácido úrico em relação ao trolox. (Figura 26)

• **Figura 26:** Efeito da adição de diversas concentrações de ácido úrico, 100 s após o início do decaimento, sobre a cinética de emissão do sistema padrão; e dependência entre a concentração de ácido úrico e o tempo de supressão.

Diversos experimentos foram realizados com o objetivo de verificar o efeito do ácido ascórbico (vitamina C) sobre o sistema. Os resultados obtidos mostram, além de uma variação do tempo de supressão com a concentração de antioxidante menor que a apresentada pelo trolox e pelo ácido úrico, um aumento da intensidade de emissão após o consumo do antioxidante proporcional à quantidade de antioxidante adicionado para altas concentrações de ácido ascórbico (Figura 27).

• **Figura 27:** Efeito da adição de diversas concentrações de ácido ascórbico, 100 s após o início do decaimento quimiluminescente, sobre a cinética de emissão do sistema padrão; e dependência entre a concentração de ácido ascórbico e o tempo de supressão medido através da diferença entre o instante da adição do antioxidante e o momento onde sua intensidade atingiu 50% do valor inicial. $[H_2O_2]$: 10 μM ; [luminol]: 0,1 mM; [hemina]: 0,9 μM , em tampão fosfato pH 11,6.

Padronização do Sistema através da Área de Supressão

Devido às diferenças entre o comportamento de diversos antioxidantes frente ao sistema padrão, a utilização do tempo de supressão – cujo cálculo é baseado no tempo necessário para que a emissão retorne em 20 ou 50% de seu valor inicial – cria um erro intrínseco que pode ser evitado utilizando-se a área de supressão da luz, a qual é diretamente relacionado ao número de radicais seqüestrados pelo antioxidante. Uma metodologia similar foi proposta por CAO *et al.* no ensaio ORAC.⁵⁰

Foram realizados experimentos, baseados em um novo procedimento na preparação das soluções de antioxidantes, (*vide* Parte Experimental) que visa reduzir o erro na medida causado pelos produtos de oxidação gerados em presença de oxigênio (Figura 28, Figura 29, Figura 30). Para os antioxidantes utilizados na padronização: trolox, ácido úrico e ácido ascórbico obtiveram-se boas correlações entre a área de supressão e a concentração do aditivo, apresentando erro mínimo quando ajustado em relação à origem dos eixos. Os coeficientes obtidos permitem o cálculo do índice TRAP e do número de radicais seqüestrado por molécula de antioxidante (n).

• **Figura 28:** Dependência entre a concentração de trolox e a área de supressão obtida. [H₂O₂]: 10 µM; [luminol]: 0,1 mM; [hemina]: 0,9 µM, em tampão fosfato pH 11,6 (n=7).

• **Figura 29:** Dependência entre a concentração de ácido úrico e a área de supressão obtida. [H₂O₂]: 10 µM; [luminol]: 0,1 mM; [hemina]: 0,9 µM, em tampão fosfato pH 11,6 (n=7).

• **Figura 30:** Dependência entre a concentração de ácido ascórbico e a área de supressão obtida. [H₂O₂]: 10 µM; [luminol]: 0,1 mM; [hemina]: 0,9 µM, em tampão fosfato pH 11,6 (n=7).

Utilização do Método para Avaliação de Produtos Naturais

Durante o procedimento de extração e purificação do 4-nerolidilcatecol (4-NC) a partir das raízes de *Photomorphe umbellata*, o método foi utilizado para identificar substâncias com possíveis propriedades antioxidantes. Considerando a grande quantidade de 4-NC em relação aos outros antioxidantes presentes no extrato bruto, foi possível apenas identificar as frações com maior conteúdo de 4-NC e, após purificação deste, avaliar sua atividade antioxidante e expressá-la em termos do índice TRAP.

A presença de 4-nerolidilcatecol nas diversas frações foi verificada qualitativamente por cromatografia de camada delgada (TLC) e, posteriormente, por cromatografia líquida de alta eficiência (“high performance liquid chromatography” – HPLC). Observou-se, utilizando detecção UV-visível (254 nm), a presença de diversas substâncias no extrato bruto (Figura 31 A – em cima), enquanto que o detector de índice de refração indicou a presença de aparentemente apenas uma substância (Figura 31 A – em baixo) na maioria das frações. Cabe ressaltar, que os sinais obtidos por detecção UV-visível são proporcionais não apenas à concentração mas também à absortividade molar do composto. Nestes termos, a detecção por índice de refração apresentaria uma melhor aproximação quando se pretende estimar as quantidades relativas de diversas substâncias em uma mistura.⁵¹ Na análise de 4-nerolidilcatecol puro por HPLC, foi obtido uma maior absorção de uma substância com tempo de retenção de 21,5 minutos (Figura 31 B – em cima) e de algumas impurezas de menor tempo de retenção em quantidades aparentemente apreciáveis. Entretanto, obteve-se apenas um pico com tempo de retenção de 21,9 no cromatograma utilizando-se detector de índice de refração (Figura 31 B – em baixo). Com base nestes resultados preliminares pode-se atribuir o pico obtido com tempo de retenção de 21,5 min ao 4-nerolidilcatecol; conclui-se, além disso, que as impurezas observadas com detecção no UV devem estar presentes em quantidades pequenas (não foram detectados picos referentes a estas impurezas na detecção pelo índice de refração) e possui altos coeficientes de absortividade molar em 254 nm. Deve-se mencionar ainda que os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C não mostram a presença de impurezas (*vide* Anexos).

• **Figura 31:** Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência para (A) extrato bruto de *Photomorphe umbellata* e (B) 4-nerolidilcatecol puro. São apresentadas as intensidades dos picos, obtidos por detecção espectroscópica de UV-Visível em 254 nm (em cima) e índice de refração (em baixo).

Foi realizada uma separação por cromatografia de coluna do extrato bruto, utilizando sílica como fase estacionária e acetato de etila/hexano 7:3 como eluente. Foram obtidas 30 frações, reunidas em 4 grupos utilizando como critério cromatografia de camada delgada. As frações foram

então reunidas como 1-9, 10-16, 17-23 e 24-30, denominadas A, B, C e D, respectivamente (*vide* Parte Experimental). A Figura 32 apresenta os cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência para as frações A, B, C e D.

• **Figura 32:** Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência para **(A)** fração cromatográfica A (frações de 1 a 9), **(B)**) fração cromatográfica B (frações de 10 a 16), **(C)**) fração cromatográfica C (frações de 17 a 23 e **(D)**) fração cromatográfica D (frações de 24 a 30). São apresentadas as intensidades dos picos, obtidos por detecção espectroscópica de UV-Visível em 254 nm (em cima) e índice de refração (em baixo). Os tempos de retenção podem mostrar pequenas variações.

Para a fração A observa-se no HPLC com detecção no UV a presença de três picos principais, com tempos de retenção de 14,1, 16,4 e 22,2 minutos (Figura 32 A – em cima). Utilizando índice de refração como método de detecção observa-se um pico principal em 20,8 e dois sinais de baixa intensidade em 12,7 e 14,8 (Figura 32 A – em baixo). Para a fração B e C foram obtidos resultados semelhantes, diferindo apenas na intensidade dos picos com tempo de retenção entre 10 e 20 minutos (Figura 32 B e C – em cima). Além disso, para estas frações, apresenta-se apenas um sinal em 21,9 min utilizando-se índice de refração como meio de detecção (Figura 32 B e C – em baixo). Para a fração D, observa-se um aumento da intensidade das substâncias com tempo de retenção entre 15 e 20 minutos, enquanto que os picos com tempos de retenção maiores diminuem (Figura 32 D – em cima). No cromatograma utilizando índice de refração observa-se o surgimento de um novo pico em 20,0 min e o aparente desdobramento do pico em 21,7 min em dois (Figura 32 D – em baixo). As frações A a D foram submetidos aos testes de atividade antioxidante. Os resultados são apresentados na Tabela III.

• **Tabela III:** Atividade relativa a 1 μM de trolox atribuída ao extrato bruto, às frações cromatográficas e ao 4-nerolidilcatecol

	Concentração	Atividade (μM de Trolox)
Extrato Bruto	0,32 mg/L	0,58
Fração A (1 – 9)	0,32 mg/L	0,27
Fração B (10 – 16)	0,32 mg/L	0,51
Fração C (17 – 23)	0,32 mg/L	0,60
Fração D (24 – 30)	0,32 mg/L	0,42
4-Nerolidilcatecol	1 μM = 0,32 mg/L	0,47

Os resultados foram calculados baseados no valor de $n_{4\text{-NC}} = 0,95$ obtido pela dependência da área de supressão com a concentração de 4-nerolidilcatecol, onde se observou correlação linear entre a concentração de antioxidante e a área de supressão obtida. A Figura 33 apresenta o efeito qualitativo da adição de 4-nerolidilcatecol ao sistema padrão, enquanto a Figura 34 mostra a dependência linear da área de inibição com a concentração de 4-NC, comparado com os resultados obtidos com trolox.

• **Figura 33:** Efeito da adição após 50 s do início do decaimento de 4-nerolidilcatecol, sobre a cinética de emissão do sistema padrão. $[\text{H}_2\text{O}_2]$: 10 μM ; $[\text{luminol}]$: 0,1 mM; $[\text{hemina}]$: 0,9 μM ; $[\text{4-NC}]$: 1,1 μM , em tampão fosfato pH 11,6.

• **Figura 34:** Dependência entre a concentração de 4-nerolidilcatecol e a área de supressão obtida. $[H_2O_2]$: $10\ \mu M$; [luminol]: $0,1\ mM$; [hemina]: $0,9\ \mu M$, em tampão fosfato pH 11,6 ($n=5$).

Alguns estudos relacionados à atividade antilipoperoxidante de hesperidina indicam sua potencialidade como antioxidante de uso comercial.^{21,22} Presente no bagaço da laranja, que é eliminado como resíduo pelas indústrias de beneficiamento de suco, apresentou-se como um bom exemplo para testar a metodologia com outra substância de origem natural.

Da área de supressão obtida pôde-se calcular o valor de $n = 0,65$ para a hesperidina, supondo-se uma correlação linear entre a área de supressão e a concentração. A Figura 35 apresenta o resultado qualitativo obtido pela adição de $1,18\ \mu M$ de hesperidina purificada.

• **Figura 35:** Efeito da adição após 50 s do início do decaimento de hesperidina, sobre a cinética de emissão do sistema padrão. $[H_2O_2]$: $10\ \mu M$; [luminol]: $0,1\ mM$; [hemina]: $0,9\ \mu M$; [hesperidina]: $1,18\ \mu M$, em tampão fosfato pH 11,6.

Discussão

Influência das Concentrações dos Reagentes Sobre a Curva de Emissão

A oxidação acompanhada de emissão quimiluminescente da 5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinodiona (luminol) tem sido alvo de estudo desde sua descoberta por Albrecht em 1928 até os dias atuais. O mecanismo conhecido envolve a formação de um ânion radical ($L^{\bullet -}$), que é rapidamente oxidado a uma diazaquinona (L) que, reagindo com peróxido de hidrogênio, sofre eliminação de nitrogênio com abertura de anel, levando o aminofталato ao estado excitado, que decai ao estado fundamental com emissão de luz.⁵²

• **Esquema 6:** Mecanismo simplificado da quimiluminescência do luminol em meio aquoso, oxidado por peróxido de hidrogênio.

A aplicação de luminol no estudo da atividade antioxidante deve-se à diminuição da intensidade de emissão pelo sequestro de espécies radiculares no sistema por estes aditivos.

Entretanto diversas formas de oxidação do luminol podem ser empregadas, incluindo o uso de amplificadores de emissão e diversos catalisadores, em sua maioria compostos metálicos de ferro e cobre.⁵³ Conforme o sistema utilizado, observa-se um comportamento diferente frente ao antioxidante. A supressão da emissão pode, portanto, ser produzida pela inativação do catalisador metálico, pela redução de espécies radiculares, por reações de consumo do oxidante ou mesmo pelo sequestro (“quenching”) do estado excitado.⁵⁴

Baseado em mecanismos de reação entre peróxido de hidrogênio e hemina e nos resultados da literatura a respeito do sistema,⁵⁵⁻⁵⁸ pôde-se postular um esquema mecanístico simplificado, que favorece a compreensão do efeito da adição de antioxidante sobre a cinética de emissão. (Esquema 7)

• **Esquema 7:** Proposta mecanística simplificada do sistema luminol/ H_2O_2 /hemina, frente a substâncias redutoras.

Inicialmente, em uma reação lenta, forma-se um cátion radical da porfirina, conhecido como hemina-Fe(V), análogo ao composto I da peroxidase de raiz forte (HRP). Em uma reação rápida, esta hemina-Fe(V) reage com a hemina-Fe(III), originando duas moléculas de hemina-Fe(IV), análogo ao composto II. O ânion luminol reagindo com esta espécie, produz luminol ânion-radical, que é oxidado tanto por peróxido de hidrogênio quanto por espécies ativas derivadas, resultando no aminoftalato excitado com rendimentos quânticos de quimiluminescência (Φ_{CL}) em torno de $1,24 \cdot 10^{-2}$.⁵⁹ A competição entre o luminol e outros substratos redutores pelo intermediário oxidante, representa um dos fundamentos da metodologia.

Algumas considerações a respeito do comportamento cinético de uma reação quimiluminescente genérica devem ser feitas, com o objetivo de tornar mais clara a compreensão dos resultados obtidos. Tendo-se uma reação de reagentes A e B, formando um intermediário reativo $\text{C}^\#$ que, em seguida, forma um produto excitado D^* que decai ao estado fundamental com emissão de luz, podem ser apresentadas três constantes hipotéticas de velocidade: k_n , k_{EX} e k_f .

Supondo-se k_n como constante representativa da etapa lenta da reação, tem-se a intensidade de emissão proporcional à concentração do intermediário C, na medida em que a constante de excitação (k_{EX}) e de fluorescência (k_F) são muito maiores. Considerando o passo k_n como etapa lenta definimos a velocidade de reação como:

$$v = k_n[A][B]$$

considerando-se o reagente A como limitante (B em excesso, $[B] \gg [A]$) temos:

$$v = k_{obs}[A]$$

e portanto:

$$k_{obs} = k_n[B]$$

Ou seja, de forma geral a velocidade de reação (v), relacionada à intensidade máxima de emissão, depende da concentração de ambos os reagentes, enquanto que a constante de decaimento de pseudo-primeira ordem observada depende da concentração do reagente em excesso.

A reação quimiluminescente de luminol com peróxido de hidrogênio catalisada por hemina pode ser representada, de maneira simplificada, em três passos que levam à formação do endoperóxido I, o intermediário reativo (Esquema 8). Seguindo uma tendência genérica para reações de quimiluminescência, os passos 1 a 3 podem ser os passos lentos, sendo que a discussão dos resultados será focalizada nos passos 1 e 2 (k_1 e k_2) como etapas lentas, dependendo das condições experimentais utilizadas.

• **Esquema 8:** Mecanismo simplificado da quimiluminescência do sistema luminol/ H_2O_2 /hemina.

Efeito da Concentração de Luminol

Nos experimentos iniciais foram utilizadas condições onde a faixa de concentração de luminol era próxima à concentração de peróxido de hidrogênio. Em concentrações de luminol inferiores à concentração de H_2O_2 a intensidade de emissão é proporcional à concentração de luminol (Figura 22), enquanto a constante de velocidade (k_{obs}) diminui rapidamente com o aumento da concentração (Figura 23), o que indica que a constante de velocidade de decaimento

está relacionado ao consumo do luminol. Nestas condições (baixa concentração de luminol), o passo 2 (Esquema 8) deve ser o limitante da reação.

Quando o intervalo de concentração de luminol é próximo à concentração de peróxido de hidrogênio, observa-se intensidade de emissão e k_{obs} constantes, indicando o passo 1 (Esquema 8) como nova etapa lenta, ou seja, a velocidade de reação – a qual é proporcional a intensidade de emissão – não depende mais da concentração de luminol. Além disso, a constante de velocidade de decaimento, a qual indica o esgotamento de um dos reagentes (reagente limitante “estequiometricamente”) não depende da concentração de luminol (Figura 4, Figura 5). A constante de velocidade permanece constante em concentração de luminol maior que a de oxidante (Figura 5, Figura 23). Entretanto, a intensidade de emissão diminui com o aumento da concentração de luminol (Figura 4, Figura 22), fato que pode ser ocasionado por um eventual seqüestro ou inibição do luminol sobre o aminoftalato excitado.

Efeito da Concentração de Peróxido de Hidrogênio

Em concentrações de peróxido de hidrogênio inferiores à de luminol, a intensidade de emissão aumenta proporcionalmente com a concentração de oxidante (Figura 11), sugerindo o passo 1 (Esquema 8) como etapa lenta.

O peróxido de hidrogênio é capaz de realizar uma oxidação de um elétron tanto na hemina quanto na hematina, o produto de substituição hexacoordenado, originando espécies ativas de oxigênio. Em seguida, o catalisador oxidado será regenerado pelo monoânion luminol, que ao reduzir o metal da porfirina ao seu estado inicial, torna-se um ânion-radical que é atacado por espécies oxidantes formando em diversos passos o produto excitado. Sendo assim, pode-se facilmente entender que a intensidade aumenta com a concentração de H_2O_2 . O fato da constante de velocidade se apresentar constante neste intervalo de concentração (Figura 12) indica que o H_2O_2 é, nestas condições, o reagente limitante. Estes resultados estão de acordo com os obtidos variando-se a concentração de luminol.

Quando a concentração de peróxido de hidrogênio é maior que a de luminol observa-se intensidade de emissão constante, o que indica uma nova etapa lenta na reação (passo 2), que independe da concentração de H_2O_2 . A constante de velocidade observada aumenta proporcionalmente com a concentração de peróxido de hidrogênio em concentrações entre 0,2 e 0,8 mM. Com H_2O_2 em excesso temos:

$$k_{obs} = k[H_2O_2]$$

enquanto que o aumento da concentração de radicais no estado estacionário faz com que o luminol seja destruído mais rapidamente. Este fato está de acordo com observações de LEE e SELINGER que, em 1972, postularam que o rendimento quântico de quimiluminescência (Φ_{CL}) do sistema hemina/ H_2O_2 /luminol é independente da concentração inicial de peróxido de hidrogênio, desde que este reagente esteja em excesso em relação ao substrato.⁵⁹

Em concentrações de peróxido acima de 0,8 mM observa-se constante de decaimento constante. Este fato poderia ser explicando supondo-se a desativação da hemina por altas concentrações de peróxido. Porém, o desvio da hemina não pode ser observado por espectrofotometria. Por outro lado, em solução aquosa, a hemina apresenta comportamento bastante complexo, estando em equilíbrio tanto com sua forma hidroxilada conhecida como

hematina, quanto com o dímero formado por uma ponte oxo entre os ferros pentacoordenados, o que contribui na dificuldade em se obter resultados reprodutíveis com o sistema.⁴⁹

Entretanto, o patamar de intensidade observado em concentrações de peróxido de hidrogênio em valores superiores a 0,1 mM não pode ser observado nas mesmas condições experimentais utilizando outro fotômetro (dados não apresentados). Além disso, para concentrações superiores a 1 mM, onde se esperava um patamar de maior duração, observa-se saturação da fotomultiplicadora. Este fato foi surpreendente, na medida em que a intensidade atribuída à emissão pelo aparelho é, aproximadamente, 3 ordens de grandeza menor que o limite da fotomultiplicadora. Com o objetivo de verificar uma mudança na interpretação dos resultados, foi realizado um novo tratamento matemático sobre as curvas de emissão apresentadas na Figura 10, onde eliminou-se o patamar, extrapolando a curva até que o eixo das ordenadas indicasse uma nova intensidade máxima (Figura 36).

• **Figura 36:** Extrapolação das curvas cinéticas do sistema luminol/ H_2O_2 /hemina com diversas concentrações de H_2O_2 . [Hemina]: 0,33 μM , [Luminol]: 0,10 mM e [H_2O_2]: (—) 1 mM, (—) 0,9 mM, (—) 0,8 mM, (—) 0,7 mM, (—) 0,6 mM, (—) 0,5 mM, (—) 0,4 mM, (—) 0,3 mM, (—) 0,2 mM, (—) 0,1 mM, em tampão fosfato pH=11,6.

Com isso foi possível verificar um comportamento que pode ser interpretado de forma semelhante aos dados originais, onde em concentrações de peróxido de hidrogênio inferiores à de luminol, a intensidade de emissão aumenta proporcionalmente com a concentração de oxidante (Figura 11), sugerindo o passo 1 (Esquema 8) como etapa lenta. Entretanto observa-se, após atingidos valores eqüimolares de luminol e hemina, um aumento da intensidade de emissão proporcional à concentração de peróxido, o que não acontecia com os dados originais (Figura 37). Entretanto, também com este tratamento de dados obtém-se uma curva de saturação, porém em concentrações de peróxido de hidrogênio mais altas.

• **Figura 37:** Correlação entre a intensidade máxima calculada (I_{MAX}) e a concentração de H_2O_2 . [Hemina]: $0,33 \mu\text{M}$ e [Luminol] $0,10 \text{ mM}$, em tampão fosfato $\text{pH}=11,6$.

Efeito da Concentração de Hemina

O aumento da intensidade de luz e, portanto da velocidade de reação, conforme o aumento da concentração de hemina (Figura 7, Figura 14-A, Figura 20), poderia ser explicado supondo-se o conjunto das reações envolvendo hemina (Fe(III)) e peróxido de hidrogênio para formação de hemina (Fe(IV)) como o passo lento da reação (passo 1). Com concentração de peróxido menor que a de luminol observa-se uma maior correspondência linear entre a concentração de hemina e a intensidade máxima de emissão. Conforme a concentração de peróxido é aumentada, observa-se comportamento linear apenas em baixas concentrações do catalisador. O desvio da linearidade em altas concentrações de peróxido e hemina poderia ser explicado como uma mudança da etapa lenta da reação. Neste sentido, o passo 2 (Esquema 8) poderia ser o limitante.

Em baixas concentrações de hemina observa-se uma alta constante de velocidade, fato que deve estar associado à destruição do catalisador pelo peróxido de hidrogênio.⁶⁰ Entretanto em concentrações próximas a $1 \mu\text{M}$ a constante de velocidade permanece praticamente constante, condições interessantes para o ensaio. A constante de velocidade torna-se proporcional à concentração de catalisador quando esta é superior a $2 \mu\text{M}$. Indicando que, nestas condições, a concentração de radicais no estado estacionário depende da concentração de catalisador. Sendo assim, o que se observa é o consumo de luminol, que se torna mais rápido conforme o aumento da concentração de radicais, indicando o passo 2 como limitante (Figura 7, Figura 14, Figura 20).

Padronização de Hemina

Nos experimentos com o sistema padrão II, verificou-se uma baixa reprodutibilidade. Observou-se que as condições de preparação da solução estoque de hemina afetava drasticamente o comportamento do sistema. Com isso, optou-se por realizar um estudo mais elaborado sobre as propriedades da hemina em solução, com o objetivo de estabelecer condições ideais de preparação do reagente. Resultados da literatura indicam que o equilíbrio entre o monômero de hemina e seu dímero é afetado pela força iônica e pH do meio. Em pH alcalino a hemina tende a apresentar-se

em sua forma dimérica, cujo poder catalítico é menor que o da forma monomérica. Com isso, alterações na relação monômero/dímero em solução afetam o efeito do catalisador sobre o sistema.

Através da metodologia descrita por BROWN *et al.*⁶¹ foi possível obter pequenas quantidades de monômero e de dímero de hemina separadamente. Utilizando soluções de hemina em DMSO e NaOH (1M), onde há predominantemente monômero e dímero, respectivamente, nosso objetivo era estabelecer uma condição de preparação do catalisador, garantindo uma relação monômero/dímero constante, conferindo reprodutibilidade ao sistema. O Esquema 9 apresenta alguns dos diversos equilíbrios envolvendo hemina em solução aquosa alcalina.

• **Esquema 9:** Diversos equilíbrios envolvendo hemina. (A) Equações e pK_a s para equilíbrio entre hemina e hematina e entre hemina monômero e hemina dímero; (B) Provável estrutura de ponte oxo envolvendo o ferro central da porfirina na formação do dímero.

Em outro artigo, BROWN *et al.*⁴⁹ avaliaram o efeito do envelhecimento sobre a oxidação não destrutiva de hemina, e seus experimentos eram reprodutíveis apenas se utilizada hemina preparada há pelo menos uma semana antes do ensaio, fato confirmado em nossas medidas durante o desenvolvimento do sistema padrão. O estudo do espectro de absorção de hemina fresca e hemina envelhecida uma semana, apresentou mudanças significativas entre 450 e 600 nm, compatíveis com os resultados obtidos por nós quando se comparou o espectro obtido empregando-se NaOH 1M ou tampão fosfato pH 11,6 (Figura 17). Optou-se pela utilização de uma solução de NaOH 1M como solvente em lugar de tampão fosfato pH 11,6 pois seu espectro corresponde ao espectro de hemina envelhecida, garantindo reprodutibilidade. (*vide* Parte Experimental)

Estabelecimento das Condições Padrão do Sistema

As condições do sistema padrão foram definidas visando-se a obtenção de altos valores de intensidade com a menor constante de velocidade possível. Com este propósito foram graficadas as relações intensidade/ k_{obs} , sendo definidas como padrão as concentrações onde se obtinham valores máximos (Figura 38).

• **Figura 38:** Relação Intensidade/ k_{obs} para várias concentrações de luminol e hemina. Foram definidas para o sistema padrão as concentrações nas regiões de máximo. $[H_2O_2]$: 10 μM .

A concentração de peróxido de hidrogênio escolhida não é a região de máximo indicada pela relação entre intensidade/ k_{obs} , (Figura 39) pois com uma concentração uma ordem de grandeza menor, uma constante de decaimento menor, mantendo-se uma relação sinal-ruído satisfatória.

• **Figura 39:** Relação Intensidade/ k_{obs} para várias concentrações de peróxido de hidrogênio. Foi definida para o sistema padrão uma concentração dez vezes menor do que a região de máximo. [luminol]: 0,1 mM; [hemina]: 0,9 μM .

Efeito da Adição de Antioxidantes ao Sistema Padrão

A forma como um determinado aditivo interage com os reagentes e intermediários do sistema é refletida na cinética de emissão durante a ação do antioxidante. Conforme pode ser observado nas figuras 28, 30 e 31, tanto no caso de trolox quanto no caso do ácido ascórbico, a intensidade de emissão mostra um aumento relativamente rápido após o período de supressão. Com isso, a determinação do tempo de supressão não apresenta dificuldade. Para efeito de padronização, foi utilizado o tempo no qual a intensidade atinge 50% do valor inicial. Já no caso do ácido úrico, a cinética mostra um comportamento diferente; após uma supressão inicial, a intensidade aumenta gradualmente até chegar, ao valor esperado do sistema sem antioxidante (Figura 26). Entretanto, também neste caso foi obtido uma correlação linear do tempo de supressão com a concentração do antioxidante (Figura 40).

• **Figura 40:** Compilação da dependência entre a concentração de trolox (●), ácido úrico (▲) e ácido ascórbico (■) e o tempo de supressão. $[H_2O_2]$: 10 μM ; [luminol]: 0,1 mM; [hemina]: 0,9 μM , em tampão fosfato pH 11,6.

Padronização do Sistema Através da Área de Supressão

A partir dos resultados obtidos com a adição de diversos antioxidantes ao sistema, e em base na proposta mecanística apresentada, três formas de ação do aditivo podem ser postuladas: (i) o sequestro de espécies ativas de oxigênio, geradas pela reação entre hemina e peróxido, impedindo a formação do aminofalato excitado; (ii) uma competição entre o luminol e outros substratos redutores por uma espécie reativa, análoga ao composto II do sistema luminol/HRP/ H_2O_2 , formada na reação de hemina com peróxido de hidrogênio e (iii) o efeito quelante da substância sobre o ferro, o que modificaria o ciclo catalítico.

Com o objetivo de desenvolver uma metodologia de tratamento de dados independente do comportamento do aditivo utilizado, adotou-se o cálculo da área referente à supressão como parâmetro antioxidante, já que esta mede diretamente a quantidade de fótons suprimida da emissão quando da adição de substâncias que apresentam atividade antioxidante. Inicialmente, o valor foi obtido pela diferença entre a área obtida pela integração da intensidade de emissão em função do tempo sem a adição de antioxidante e com a adição de uma concentração conhecida de aditivo. Devido a pequenas variações da intensidade do sistema, a área calculada da emissão sem aditivo eventualmente contribui para o aumento do erro da medida. Cogitou-se então o cálculo da área durante apenas o período de supressão da luz, resumindo os resultados obtidos e mostra que para os três casos estudados foram obtidos correlações lineares (Figura 41).

• **Figura 41:** Compilação da dependência entre a concentração de trolox (●), ácido úrico (▲) e ácido ascórbico (■) e a área calculada pela integral da supressão. [H₂O₂]: 10 μM; [luminol]: 0,1 mM; [hemina]: 0,9 μM, em tampão fosfato pH 11,6.

Os valores de TRAP podem variar segundo a fonte, pois podem ser expressos em termos de equivalentes da concentração de trolox ou em termos do número de radicais livres que podem ser sequestrados pela amostra. Sendo que uma molécula de trolox pode sequestrar dois radicais ($n_{\text{Trolox}} = 2$), os valores de TRAP definidos em termos de equivalentes da concentração de trolox são menores por um fator de dois (2) em relação aos expressos pelo número de radicais que podem ser sequestrados pela amostra.

A Tabela IV mostra os valores de n obtidos dos estudos com antioxidantes, utilizando-se trolox como padrão e assumindo-se um valor de $n = 2$, para o último. Os valores de n para o ácido ascórbico e ácido úrico foram obtidos simplesmente pela divisão das inclinações dos gráficos pela inclinação do padrão, multiplicado por 2. Porém, o valor reportado por Lissi *et al.* foi obtido com um método similar ao utilizado por nós para os valores de n . O valor de TRAP obtido para o ácido úrico está em conformidade com os valores encontrados na literatura. Entretanto, os valores reportados para o ácido ascórbico apresentam grande variação, sendo o valor calculado próximo ao reportado por Lissi *et al.*

• **Tabela IV:** Número de radicais sequestrados (n) por molécula de antioxidante em diversos ensaios utilizando métodos de consumo de oxigênio, picoeritina e quimiluminescência.

	TRAP ¹⁴ Eletrodo de Oxigênio	TRAP ⁶² Picoeritina	TRAP ³⁸ Luminol/ABAP	TOSC ⁴⁷ KMBA	ORAC ⁵⁰ Picoeritina	TRAP Luminol/ Hemina/H ₂ O ₂
Trolox	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Ácido Úrico	1,3	1,7	1,2	1,4	1,8	1,4
Ácido Ascórbico	1,7	1,5	0,4	0,9	1,0	0,5

Utilização do Método para Avaliação de Produtos Naturais

O estudo a atividade de 4-nerolidilcatecol foi realizado através de uma dependência da área de supressão na concentração de antioxidante. A inclinação da reta é comparada com a obtida utilizando-se trolox assumindo-se que este seqüestre 2 radicais por molécula. O valor de n obtido para o 4-nerolidilcatecol foi de 0,958 radical por molécula, o que equivale dizer, que sua atividade é próxima a metade da atividade de trolox. Vale ainda ressaltar que, este valor reflete a atividade e não a reatividade do antioxidante.

4-Nerolidilcatecol

Foram realizados testes com as frações de cromatografia resultantes dos produtos de extração do extrato bruto de *Photomorphe umbellata*. O objetivo é acompanhar as diversas etapas do processo de purificação do extrato bruto, identificando as regiões onde mais provavelmente poderiam ser encontradas substâncias com potencial antioxidante significativo. (Esquema 10)

• **Esquema 10:** Procedimento de isolamento de princípios ativos de produtos naturais, avaliando-se a atividade antioxidante em diversas etapas do processo.

Neste sentido, a avaliação da atividade antioxidante nas frações A, B C e D inicialmente demonstrou que é possível rastrear o aditivo, mesmo na fase preliminar de purificação. O fato de o extrato bruto possuir maior atividade que o 4-nerolidilcatecol indica que outras substâncias presentes no extrato também possuem atividade antioxidantes.

A atividade da fração A pode ser atribuída como proporcional a atividade de 0,27 μM de trolox, enquanto que os valores para as frações B, C e D são de 0,51, 0,60 e 0,42, respectivamente. O fato da fração A apresentar menor atividade, enquanto a fração B, C e D aparentemente apresentarem maior atividade pode ser justificado pela menor quantidade relativa de outras substâncias antioxidantes em relação ao 4-nerolidilcatecol, atribuído como tendo tempo de retenção 21,5 min.

Estes resultados mostram que o ensaio antioxidante pode ser utilizado para o acompanhamento da extração e da separação cromatográfica de produtos naturais.

Conclusão

Foi desenvolvido um ensaio para a determinação do efeito antioxidante de produtos naturais, misturas complexas e substâncias isoladas. Os resultados indicam a viabilidade da metodologia, a qual foi aplicada à antioxidantes padrão como o ácido ascórbico e ácido úrico sendo os valores de TRAP obtidos (0,5 e 1,4, respectivamente) de acordo com os valores da literatura. Para o 4-nerolidilcatecol o valor obtido foi de 0,95 radicais por molécula de antioxidante.

Parte Experimental

Materiais e Métodos

Reagentes

Luminol (Merck), Hemina (Sigma), foram dissolvidos em solução de NaOH 1M; Trolox (Aldrich), Ácido Ascórbico (Merck) e Ácido Úrico (Sigma), em solução de NaOH 0,1M, todos foram utilizados sem nenhuma purificação anterior. O peróxido de hidrogênio (60% Peróxidos do Brasil e 30% Fluka) foi diluído em água milli-Q e colocado em vidraria lavada com EDTA. A hespiridina foi doada pelo Prof. Massayoshi Yoshida (Laboratório de Produtos Naturais - IQ-USP) e foi dissolvida em tampão fosfato pH = 11,6.

Solventes

O acetato de etila utilizado foi purificado deixando-o por 1 dia sob CaCl_2 , 30 min de agitação na presença de NaOH a 0°C, 1 dia sob peneira molecular de 4 Å, destilação lenta (PE 77 °C), armazenamento sob peneira molecular de 4 Å.

Produtos Naturais

O extrato de *Potomorphe umbellata* foi preparado em duas vezes, a primeira para purificação de 4-nerolidilcatecol e a segunda para o rastreamento da atividade antioxidante. Na primeira extração foram realizadas 3 extrações com acetato de etila onde se obteve uma massa total de 5,32 g de extrato. Foram obtidas 40 frações de uma coluna cromatográfica de silicagel 60 (50 g de SiO_2 / g de extrato) utilizando-se, uma mistura de hexano/acetato de etila na proporção de 7:3. Por cromatografia de camada delgada com a mesma mistura de solventes foram obtidos 5 frações finais, denominadas: A, B, C, D e E. O 4-nerolidilcatecol foi purificado através de cromatografia de placa preparativa a partir da fração e identificado por RMN ^1H e ^{13}C (*vide* Anexos)

Na segunda extração foram realizadas três extrações em rotaevaporador onde se obteve uma massa total de 8,44 g de extrato. Foram obtidas 30 frações de uma coluna cromatográfica de silicagel 60 (50 g de SiO_2 / g de extrato) utilizando-se, uma mistura de hexano/acetato de etila na proporção de 7:3. Por cromatografia de camada delgada com a mesma mistura de solventes foram obtidos 4 frações finais, denominadas: A, B, C, D que foram testadas quanto à sua atividade antioxidante.

4-Nerolidilcatecol

(3,7,11-trimetil-3-(3',4'-diidroxifenil)- $\Delta^{1,6,10}$ -dodecantrieno)

RMN – ^1H (300 MHz) $\delta(\text{ppm})$ (Anexos 1 e 2)

6,75 (d, H-2', $J_{2'-6'} = 2,0$ Hz); 6,69 (d, H-5', $J_{5'-6'} = 8,3$ Hz); 6,64 (dd, H-6', $J_{2'-6'} = 2,0$ Hz, $J_{5'-6'} = 8,3$ Hz); 5,87 (dd, H-2, $J_{2-1a} = 10,7$, $J_{2-1b} = 17,4$); 5,00 (t, H-6, H-10, $J_{5-6} \sim J_{9,10} = 8,2$ Hz); 4,95 (dd, $J_{1a-1b} = 1,2$, $J_{2-1a} = 10,2$), 4,91 (dd, $J_{1a-1b} = 1,2$, $J_{2-1b} = 17,4$), 2,00 – 1,83 (m, H-4, H-8); 1,79 – 1,71 (m, H-5, H-9); 1,6 (s, CH_3 – 7); 1,5 (s, CH_3 – 11); 1,42 (s, H – 12); 1,22 (s, CH_3 – 3)

RMN – ^{13}C (75 MHz) $\delta(\text{ppm})$ (Anexo 3)

C-1' (141,24)	C-1 (111,45)	C-7 (134,91)	CH_3 (15,85)
C-2' (115,13)	C-2 (146,92)	C-8 (39,63)	CH_3 (17,62)
C-3' (143,10)	C-3 (43,67)	C-9 (26,65)	CH_3 (24,84)
C-4' (140,90)	C-4 (41,07)	C-10 (124,52)	
C-5' (114,33)	C-5 (23,13)	C-11 (131,31)	
C-6' (119,09)	C-6 (124,34)	C-12 (25,63)	

Ensaios Cinéticos

Solução de Luminol

Dissolveram-se 45 mg de luminol em 25 ml de solução de NaOH 1M, obtendo-se uma solução estoque de concentração de 10,15 mM ($\epsilon_{357} = 7600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A solução estoque foi diluída antes do uso até as concentrações desejadas.

Solução de H_2O_2

A concentração da solução estoque de peróxido de hidrogênio é aproximadamente 10 mM, tendo sido diluída no momento do experimento em água deionizada (Micropore Milli-Q) a partir de uma solução inicialmente 60% (21,16 M), sendo a concentração final determinada espectrofotometricamente segundo o método descrito por COTTON e DUNFORD.⁶³ Em uma cubeta de quartzo adiciona-se 6 μL da solução estoque de peróxido diluída 100 vezes em água deionizada e 3 μL de solução de HRP (peroxidase de raiz forte) 10 nM a uma solução de KI em tampão acetato (pH 3,8, $\mu=0,01$), completando-se o volume para 3 mL. Mede-se a absorbância em 353 nm utilizando um $\epsilon = 2,55 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, calculando, em seguida a concentração da solução estoque.⁶³

Solução de Hemina

A solução de hemina foi preparada pela diluição de hemina em NaOH 1M até a concentração desejada. A solução estoque de hemina tem durabilidade de poucos dias, se mantida sob refrigeração. Obteve-se o coeficiente de extinção molar da hemina para diversas condições, sendo que para pH variando entre 9,9 e 11,7 o valor é de $63,1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para um comprimento de onda (λ) de 388 nm e $3,98 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 600 nm.⁶⁴

Padronização da Preparação de Hemina

Método A

Aproximadamente 13 mg de hemina (PFH) é dissolvida em 1 mL de uma solução 0,2 M de NaOH, completa-se o volume para 500 mL com tampão $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 1/15 M com o pH necessário. A solução tem concentração final de $5 \cdot 10^{-5}$ M. Ajustou-se a força iônica com NaCl.

Método B

Adicionam-se 13 mg de hemina (PFH) a um frasco cônico contendo 100 mL de solução 1/15 M de Na_2HPO_4 . O frasco é tampado e a mistura é agitada durante a noite, até que todo o sólido esteja dissolvido. Completa-se o volume a 500 mL com a adição da quantidade adequada de M/15 HClO_4 , M/15 NaClO_4 e água destilada, para obter o pH desejado e uma força iônica de 0,04 M.

Preparação e Purificação de Dímero e Monômero

Dímero: Adição de NaOH(s) a hemina em solução alcalina aquosa. O dímero precipita com cor verde. Uma metodologia alternativa consiste na adição lenta de hidróxido de sódio 1 M a uma solução quente (80 °C) de hemina e DMSO.

Monômero: Adição rápida de NaOH ou uso de DMSO frio levam a um precipitado vermelho-amarronzado. O aquecimento leva a uma formação lenta do sólido, característico do dímero.

Aparelhagem

Os experimentos de quimiluminescência iniciais foram feitos em dois fluorímetros. O SPEX FLUORLOG 1681 (fenda: 1 mm, reflexão total, tensão da fotomultiplicadora 750 kW) e um PERKIN-ELMER LS-5 (escala: 0,5, reflexão total, modo fosforescência), ambos com monocromador operando em comprimento de onda de emissão em 420 nm. Entretanto os experimentos de variação de concentração dos reagentes foram realizados em um luminômetro EG&G Berthold Microplat LB 96V. Um espectrofotômetro HITACHI U2000 e um Shimadzu Multispec foram utilizados para determinação das concentrações de hemina, peróxido de hidrogênio e luminol, todos na região do visível. Os experimentos de cromatografia líquida de alta eficiência foram realizados em um cromatógrafo Shimadzu (modelo CLASS-LC10) com programa de análise para cromatografia líquida com detecção em UV-Visível e Índice de Refração e colunas SUPELCO ABZ+PLUS. Fluxo de 0,5 mL/min em metanol. As constantes de velocidade, áreas e regressões foram calculadas pelo programa Origin 5.0 - Microcal®(1998).

Procedimentos

Os experimentos realizados nos fluorímetros Spex Fluorlog e LS-5, foram feitos em células de fluorescência de 3 mL, caminho ótico 10 mm, numa temperatura de $25,0 \pm 0,5$ °C. Para os realizados no luminômetro EG&G, foram utilizadas microplacas de 96 células com volume final de 0,3 mL cada.

No fluorímetros Spex Fluorlog (tensão da fotomultiplicadora: 750 kW, right angle, 350 – 420 nm e abertura de fenda: 4mm) e no LS-5, para a obtenção da curva de emissão em condições

padrão adiciona-se rapidamente 150 μL de H_2O_2 (10 mM) a uma cubeta de fluorescência contendo 3 ml de solução 0,1 mM de luminol em tampão fosfato e sob agitação constante, seguida pela adição de 30 μL de solução estoque de hemina $9 \cdot 10^{-4}$ M e 50 μL do solvente puro da amostra (tampão fosfato ou acetato de etila).

Nas determinações dos efeitos dos antioxidantes, repete-se o procedimento acima, substituindo o solvente puro por 30 μL de amostra, antes do início ou durante o percurso da reação quimiluminescente.

Para o luminômetro EG&G, 220 μL de luminol foram colocados em cada célula sendo que, 30 μL de hemina e 30 μL de peróxido de hidrogênio são adicionados mecanicamente para iniciar a reação, em uma temperatura de $28 \pm 0,5$ °C. Para o estudo do comportamento cinético foram utilizadas diversas concentrações dos reagentes e adicionou-se 20 μL de tampão para completar o volume. Nos ensaios de adição de antioxidante substituiu-se o tampão pelo aditivo.

Para os ensaios com antioxidantes em acetato de etila como solvente, 20 μL de aditivo foram adicionados à cela antes da adição dos reagentes, devido às limitações do aparelho em relação à solventes orgânicos.

Operações Matemáticas

Medida de Intensidade Máxima (I_{MAX})

As medidas de intensidade máxima foram obtidas diretamente do gráfico de intensidade em função do tempo.

Cálculo de Constante de Velocidade (k_{obs})

Foi realizado um ajuste de curva não linear baseado na equação:

$$y = y_0 + \sum_i^n A_i e^{-\left(\frac{x-x_0}{t_i}\right)}$$

onde: n é o número de exponenciais envolvidas na reação. Para o sistema utilizado n varia entre 1 e 2.

Cálculo do Tempo de Supressão

Foi medido o tempo de supressão através da diferença entre os instantes da adição do antioxidante e do retorno de 50% da intensidade luminosa.

Cálculo da Área de Supressão

Da curva cinética resultante da adição de um antioxidante (I em RLU/s *versus* tempo em s) é subtraída uma linha reta que intercepta os instantes onde o antioxidante foi adicionado e o de retorno da intensidade luminosa ao sistema padrão. Com isso, obtém-se uma área de integração variando de 0 a $-I$, equivalente à diferença entre a integral da curva de decaimento padrão e a curva obtida com a adição de antioxidante.

O valor em módulo da área obtida representa a medida em RLU equivalente a radicais consumidos por todo o conteúdo antioxidante presente na amostra.

Cálculo Estatísticos

Os cálculos de médias, variâncias e desvios-padrão foram realizados utilizando o programa Microcal Origin 5.0 que utiliza metodologia ANOVA de cálculo estatístico.

Anexos

- **ANEXO 1:** ESPECTRO EXPANDIDO DE RMN DE ^1H (300 MHz, CDCl_3) DE 4-
NEROLIDILCATECOL..... 61
- **ANEXO 2:** ESPECTRO EXPANDIDO DE RMN DE ^1H (300 MHz, CDCl_3) DE 4-
NEROLIDILCATECOL..... 62
- **ANEXO 3:** ESPECTRO EXPANDIDO DE RMN DE ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) DE 4-
NEROLIDILCATECOL..... 63

• Anexo 1: Espectro expandido de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de 4-nerolidilcatecol.

• Anexo 2: Espectro expandido de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de 4-nerolidiic catecol.

• Anexo 3: Espectro expandido de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de 4-nerolidilcatecol.

Referências Bibliográficas

- ¹ HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C.; CROSS, E.E.; "Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now?" *J. Lab. Clin. Med.*; **119**; 598-620 (1992)
- ² MAX, J. L.; "Oxygen free radicals linked to many diseases"; *Science*; **235**; 529-31 (1987)
- ³ SIES, H.; GROOT, H.; "Role of reactive oxygen species in cell toxicity" *Toxicol. Lett.* **64/65**, 547-551 (1992)
- ⁴ BRIERLEY, E. J.; JOHNSON, M. A.; JAMES, O. F. W.; TURNBULL, D. M. "Mitochondrial involvement in the ageing process. Facts and controversies" *Molec. Cell. Biochem.*; **174**; 325-328 (1997)
- ⁵ AUGUSTO, O., HIX, S., MORAIS, M. S., VASQUES-VIVAR, J.; "Free Radical Reactions: Formation of Adducts with Biomolecules and Their Biological Significance" *Ciênc. Cult. São Paulo*, **47**, 280-287 (1995)
- ⁶ RADI, R., RUBBO, H., FREEMAN, B. A.; "The Double-Edged Action of Nitric Oxide on Free Radical-Mediated Oxidations" *Ciênc. Cult. São Paulo*, **47**, 288-296 (1995)
- ⁷ HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C.; *Free Radical in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford (1999)
- ⁸ CAMPANELLI, L.C.; Theories of aging In: LEWIS, C.B.; *Aging, the health care challenge*; Oxford Press; 4-17; (1996)
- ⁹ YU, B.P.; Putative intervention. In: MASORO, E.J., ed. *Handbook of physiology, sect. 11. Aging*. New York: Oxford University Press; 613-631; (1995)
- ¹⁰ MEDEIROS, M. H. G.; CARVALHO, V. M.; FARIAS, L. P.; LOUREIRO, A. P. M.; "DNA damage induced by secondary lipid oxidation products" *Ciênc. Cult. São Paulo*; **47**; 336-339 (1995)
- ¹¹ BRUNK, U. T.; JONES, C. B.; SOHAL, R. S.; *Mutat. Res.* **275**: 395-403; 1992.
- ¹² WHITEHEAD, T. P.; THORPE, G. H. G.; MAXWELL, S. R. J.; "Enhanced Chemiluminescent Assay for Antioxidant Capacity in Biological Fluids" *Anal. Chim. Acta*; **266**; 265-277 (1992).
- ¹³ LISSI, E.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M.D.; ROMAY, C.; CAMPOS, A.M.; ESCOBAR, J.; "Evaluation of the Total Content of Antioxidants in Complex Mixtures" *Ciênc. Cult. São Paulo*; **48**; 86-95 (1996).
- ¹⁴ WAYNER, D. D. M.; BURTON, G. W.; INGOLD, K. U.; BARCLAY, L. R. C. AND LOCKE, S. J. "The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma" *Biochim. Biophys. Acta*, **924**, 408-19 (1987)
- ¹⁵ BRANEN, A. C.; "Toxicology and Biochemistry of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene" *J. Am. Oil Chem. Soc.*; **52**; 59-63 (1975)
- ¹⁶ ITO, N.; FUKUSHIMA, S.; TSUDA, H.; "Carcinogenicity and Modification of the Carcinogenic Response by BHA, BHT and Other Antioxidants"; *CRC Critical Rev. Tox.*; **15**; 109-150 (1985)
- ¹⁷ CONSTANTINO, L.; ALBASINI, A.; RASTELLI, G.; BENVENUTI, S.; "Activity of Polyphenolic Crude Extracts as Scavengers of Superoxide Radicals and Inhibitors of Xanthine Oxidase" *Planta Med.*; **58**; 342-344 (1992).
- ¹⁸ CHIPAULT, J. R.; MIZUNO, G. R.; HAWKINS, J. M., AND LUNDBERG, W. O. "The antioxidant properties of natural species" *Food. Res.*; **17**, 46-55 (1952).

-
- ¹⁹ POTTERAT, O.; "Antioxidants and Free Radical Scavengers of Natural Origin" *Current Org. Chem.*; **1**; 415-440 (1997).
- ²⁰ OSAWA, T.; "Protective Role of Dietary Polyphenols in Oxidative Stress" *Mech. Aging Develop.*; **111**; 133-139 (1999).
- ²¹ VINSON, J. A.; YOUSEF, A. DABBAGH; MAMDOUTH, M. SERRY; JINHEE, J.; "Plant Flavonoids, Especially Tea Flavonols, are Powerful Antioxidants Using an in vitro Oxidation Model for Heart Disease" *J. Agric. Food. Chem.*; **43**; 2800-2802 (1995).
- ²² SAJJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, F.; CASTELLI, F.; Flavonoids as Antioxidant Agents: Importance of Their Interaction with Biomembranes" *Free Rad. Biol. Med.*; **19**, 481-486 (1995).
- ²³ SAWA, T.; NAKAO, M.; AKAIKE, T.; ONO, K.; MAEDA, H.; "Alkylperoxyl Radical-Scavenging Activity of Various Flavonoids and Other Phenolic Compounds: Implications for the Anti-Tumor-Promoter Effect of Vegetables" *J. Agric. Food. Chem.*; **47**; 397-402 (1999).
- ²⁴ KIM, S. Y.; KIM, J. H.; KIM, S. K.; OH, M. J.; JUNG, M. Y.; "Antioxidant Activities of Selected Oriental Herb Extracts" *J. Am. Oil Chem. Soc.*; **71**(6); 633-640 (1994).
- ²⁵ OSAWA, T.; "Plant Antioxidants: Protective Role Against Oxygen Radical Species" *Cosm. Toil.*; **109**, 77-81 (1994).
- ²⁶ SILVA, R. A. D. Pharmacopéia dos Estados Unidos do Brasil., Cia Ed Nacional, SP (1926).
- ²⁷ CALLE, A. J.; "Contribución al estudio de algunas especies de la familia Piperaceae" *Rev. Colomb Ci Quim Farm*; **4**; 47-57 (1983).
- ²⁸ BARROS, S. B. M.; TEIXEIRA, D. S.; AZNAR, A. E.; MOREIRA JR., J. A.; ISHII, I.; FREITAS, P. C. D.; "Antioxidant Activity of Ethanolic Extracts of *Potomorphe umbellata* L. Miq. (Pariparoba)" *Ciênc. Cult. São Paulo*; **48**; 111-116 (1996).
- ²⁹ KIJJOA, A.; GIESBRECHT, A. M.; AKISUE, M. K.; GOTTLIEB, O. R.; GOTTLIEB, H. E.; "4-Nerolidylcatechol from *Photomorphe umbellata*" *Planta Med.*; **39**; 85-87 (1980).
- ³⁰ LARSON, R. A.; "The Antioxidants of Higher Plants" *Phytochemistry*; **27**; 969-978 (1988).
- ³¹ DESMARCHELIER, C.; BARROS, S.; REPETTO, M.; LATORRE, L. R.; KATO, M. J.; CAOUSSIO, J.; CICCIA, G.; "4-Nerolidylcatechol from *Pothomorphe* Spp. Scavenges Peroxyl Radicals and Inhibits Fe(II)-Dependent DNA Damage" *Planta Med.*; **63**; 561-563 (1997).
- ³² BORS, W.; SARAN, M.; MICHEL, C. Assays of Oxygen Radicals Methods and Mechanisms, in Superoxide Dismutase vol II, Oberley Ed. CRC Press: Boca Raton, 31-62
- ³³ BORS, W.; SARAN, M.; ELSTNER, E. F. *Modern Methods Plant Anal. New Ser.*; **13**, 277 (1992)
- ³⁴ HALLIWELL, B. *Biochem. Pharmacol.*, **49**, 1341 (1995)
- ³⁵ KELLER, R. J.; HALMES, N. C.; HINSON, J. A.; PUMFORD, N. R. *Chem. Res. Toxicol.*, **6**, 430 (1993);
- ³⁶ GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; MAIANI, G.; AZZINI, E.; FERRO-LUZZI, A.; "A fluoresce-based method for measuring total plasma antioxidant capability" *Free Rad. Bio. & Med.*; **18**(1); 29-36 (1995).
- ³⁷ ALHO, H.; LEINONEN, J.; "Total Antioxidant Activity Measured by Chemiluminescence Methods" *Meth. Enzymol.*, **299**, 3-14 (1999)
- ³⁸ LISSI, E.; SALIM-HANNA, M.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M. D.; "Evaluation of Total Antioxidant Potential (TRAP) and Total Antioxidant Reactivity from Luminol-Enhanced Chemiluminescence measurements" *Free Rad. Biol. Med.*; **18**(2); 153-158 (1995).
- ³⁹ LISSI, E.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M. D.; "Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis" *Free Rad. Res. Comms*; **17**(5), 299-311 (1992).

-
- ⁴⁰ CANDY, T. E. G.; HODGSON, M.; JONES, P.; "Kinetics and Mechanism of a Chemiluminescent Clock Reaction Based on the Horseradish Peroxidase Catalysed Oxidation of Luminol" *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*; **2**; 1385-1388 (1990).
- ⁴¹ MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J.; GAPINATHAN, V.; MILNER, A.; "A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates" *Clin. Sci.*; **84**; 407-12 (1993).
- ⁴² RE, R.; PELLEGRIN, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; ANG, M.; RICE-EVANS, C. "Antioxidant capacity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay" *Free Radic. Biol. Med.*; **26**; 1231-7 (1999).
- ⁴³ RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; BOLWELL, P. G.; BRAMLEY, P. M.; PRIDHAM, J. B.; "The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids" *Free Radic. Res.*; **22**; 375-83 (1995).
- ⁴⁴ SALAH, N.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G.; TIJBURG, L.; BOLDWELL, G. P.; RICE-EVANS, C.; "Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.*; **322**; 339-46 (1995)
- ⁴⁵ GÜLER, K.; PALANDUZ, S.; ADEMOGLU, E.; SAHNAYENLY, N.; GÖKKUSU, C.; VATANSEVER, S.; "Total antioxidant status, lipid parameters, lipid peroxidation and glutathione levels in patients with acute myocardial infarction" *Med. Sci. Res.*; **26**; 105-6 (1998)
- ⁴⁶ MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J.; GAPINATHAN, V.; MILNER, A.; "A novel method for measuring antioxidant capacity and its applications to monitoring the antioxidant status in premature neonates" *Clin. Sci.*; **84**; 407-12 (1993)
- ⁴⁷ WINSTON, G. W.; REGOLI, F.; DUGAS JR., A. J.; FONG, J. H.; BLANCHARD, K. A.; "A Rapid Gas Chromatographic Assay for Determining Oxyradical Scavenging Capacity of Antioxidants and Biological Fluids" *Free Rad. Biol. Med.*; **24**(3), 480-493 (1998)
- ⁴⁸ BROWN, S.B.; DEAN, T.C.; JONES, P.; "Reaction Between H₂O₂ and Hemin" *Trans. Faraday Soc.*; **64**; 986-993 (1968)
- ⁴⁹ BROWN, S. B.; JONES, P.; LANTZKE, I. R.; "Infrared Evidence for an Oxo-bridged (Fe-O-Fe) Haemin Dimer" *Nature*; **223**; 960-961 (1969).
- ⁵⁰ CAO, G.; ALESSIO, H. M.; CUTLER, R. G. "Oxygen-Radical Absorbance Capacity Assay for Antioxidants" *Free Rad. Biol. Med.*; **14**; 303-311 (1993)
- ⁵¹ SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. "Fundamentals of Analytical Chemistry" Saunders College Publishing, 7th ed., (1996).
- ⁵² GUNDERMANN, K. D.; MCCAPRA, F.; "Chemiluminescence in Organic Chemistry" New York-Germany; Springer-Verlag; p.77-108 (1975).
- ⁵³ CAMPBELL, A. K.; "Chemiluminescence: principles and applications in biology and medicine" England; VCH & Ellis Horwood; (1988).
- ⁵⁴ FREW, J. E.; JONES, P.; "Assay of Some Clinically Important Reductants By a Chemiluminescence-Delay Technique" *Anal. Lett.*; **18**; 1579-1592 (1985).
- ⁵⁵ EWETZ, L.; THORE, A.; "Factors Affecting the Specificity of the Luminol Reaction with Hematin Compounds" *Anal. Biochem.*; **71**; 564-570 (1976).
- ⁵⁶ OLSSON, T.; EWETZ, L.; THORE, A.; "Catalytic action and destruction of Photohematin During Peroxide Dependent Luminol Chemiluminescence" *Photochem. Photobiol.*; **38**; 223-229 (1983).
- ⁵⁷ FREW, J. E.; JONES, P.; "Assay of Some Clinically Important Reductants by a Chemiluminescence-Delay Technique" *Anal. Lett.*; **18**; 1579-1592 (1985).
- ⁵⁸ JONES, P.; SCOWEN, N. R.; "Kinetics and Mechanism of Catalysis by Ferrihaems in the Chemiluminogenic Oxidation of Luminol by Hydrogen Peroxide" *Photochem. Photobiol.*; **45**; 283-289 (1987).

-
- ⁵⁹ LEE, J.; SELIGER, H. H.; "Quantum Yields of the Luminol Chemiluminescence Reaction in Aquous and aprotic Solvents" *Photochem Photobiol.*; **15**; 227-237 (1972).
- ⁶⁰ BROWN, S. B.; DEAN, T. C.; JONES, P.; "Catalatic Activity of Iron(III)-Centred Catalysts: Role of Dimerization in the Catalytic action of Ferrihaems" *Biochem. J.*; **117**; 741-744 (1970).
- ⁶¹ BROWN, S.B.; DEAN, T.C.; JONES, P.; "Catalatic Activity of Iron(III)-Centred Catalysts – Role of Dimerization in the Catalytic Action of Ferrihaems" *Biochem. J.*; **117**; 741-744 (1970).
- ⁶² DE LANGE, R.J.; GLAZER, A. N.; "Phycoerythrin Fluorescence-Based assay for Peroxyl Radicals: A screen for Biologically Relevant Protective Agents" *Anal. Biochem.*; **177**; 300-306 (1989).
- ⁶³ COTTON, M. L.; DUNFORD, H. B.; "Studies on Horseradish Peroxidase. XI. On the Nature of Compounds I and II as Determined from the Kinetics of the Oxidation of Ferrocyanide" *Can. J. Chem.*; **51**; 582-587 (1973).
- ⁶⁴ *Organic Electronic Spectral Data*, Vol. II, H. E. Ungnade, Ed., p/846 (1960).
-