UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

SANDRO DE OLIVEIRA

**DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIRRADICALAR
DE PRODUTOS NATURAIS UTILIZANDO-SE A
QUIMILUMINESCÊNCIA DO LUMINOL E ENSAIOS
FOTOMÉTRICOS COM RADICAIS ESTÁVEIS**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

24/08/2011

SANDRO DE OLIVEIRA

DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIRRADICALAR
DE PRODUTOS NATURAIS UTILIZANDO-SE A
QUIMILUMINESCÊNCIA DO LUMINOL E ENSAIOS
FOTOMÉTRICOS COM RADICAIS ESTÁVEIS.

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Ciências, Programa: Química.*

Orientador: Prof. Dr. Josef Wilhelm Baader

São Paulo

2011

Sandro de Oliveira

Determinação da capacidade antirradicalar de produtos naturais utilizando-se a quimiluminescência do luminol e ensaios fotométricos com radicais estáveis.

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título de
Mestre em Ciências, Programa: Química.*

Aprovado em: _____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Agradecimentos

Ao Willi, pela oportunidade, pelo conhecimento transmitido, à sua dedicação e o acompanhamento paciente no desenvolvimento deste trabalho e seu exemplo de ética e compromisso com o ensino.

À minha família, especialmente para minha esposa Jodeniz, pelo apoio e incentivo incomparáveis, aos meus filhos, Felipe e André, pela compreensão da minha ausência.

Aos meus pais (*in memoriam*) pelo exemplo e educação fornecidos.

Ao meu amigo Lincoln pelas portas abertas.

Aos professores, Lique, Luis, Leandro, Cassius, Basito e Massuo, que contribuíram significadamente na realização desse trabalho.

Aos professores Erick e Paulete, pelas informações e ajuda imprescindível.

Aos colegas do laboratório – Cerize, Joey, Lolo, Mônica, Ana, Panda, Marcelo e André – pela ajuda, e amizade.

À Glalci, pela ajuda com os experimentos e pela amizade.

Ao Luiz, ao pessoal da SPG e à Sílvia, por serem sempre prestativos.

Aos amigos da Oswaldo Cruz que sempre estiveram na torcida.

Às professoras Liliana e Antonia por participarem da banca de minha qualificação.

*“a mente que se abre a uma nova ideia jamais
volta ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

Resumo

Oliveira, S. ***Determinação da capacidade antirradicalar de produtos naturais utilizando-se a quimiluminescência do luminol e ensaios fotométricos com radicais estáveis***. 2011. 93p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Os organismos vivos estão expostos à ação oxidativa de espécies reativas de oxigênio (ERO), causando uma série de doenças degenerativas como câncer, aterosclerose, diabetes, artrite e doenças do coração. Estudos têm demonstrado que o consumo de substâncias antioxidantes na dieta diária podem prevenir estes processos oxidativos que provocam o envelhecimento precoce do organismo. Nas últimas décadas tem se destacado o interesse em encontrar antioxidantes naturais para o emprego em produtos alimentícios ou farmacêuticos, com a finalidade de substituir antioxidantes sintéticos, os quais apresentam restrições devido ao seu potencial tóxico.

Nesse trabalho, são comparados os resultados de medidas da capacidade antirradicalar de vários derivados fenólicos incluindo produtos naturais obtidos com os ensaios utilizando o radical estável DPPH• e o cátion radical ABTS•⁺, que apresentam vantagens em relação à simplicidade do método analítico e facilidade na coleta de dados, além da reprodutibilidade dos resultados. Além disso, desenvolveu-se um ensaio com DPPH• para avaliar a capacidade antirradicalar de compostos fenólicos em meio ácido, hidroalcoólico e tamponado, para possibilitar a obtenção de valores da capacidade antirradicalar de flavonoides e compostos análogos em meio aquoso em diferentes estados de ionização.

Também, foi utilizado o ensaio quimiluminescente com luminol/hemina/H₂O₂, desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, para a determinação da capacidade antirradicalar de extratos, fases e frações de *Baccharis regnelli* e proposto o novo parâmetro “Porcentagem de Trolox” para expressar adequadamente esta capacidade em misturas complexas. A sensibilidade do ensaio luminol comprovou ser maior que a de outros métodos e adequado para medir a capacidade antirradicalar de misturas complexas de produtos naturais, auxiliando no isolamento de novas substâncias com atividade antirradicalar.

Palavras-chave: quimiluminescência, luminol, antioxidantes, ensaio antirradicalar, DPPH, ABTS.

Abstract

Oliveira, S. ***Determination of natural product antiradical capacity using luminol chemiluminescence and photometric assays with stable radicals***. 2011. 93p. Master's Dissertation – Graduate Program in Chemistry. Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo.

Living organisms are exposed to the oxidative action of reactive oxygen species (ROS), causing a series of degenerative diseases such as cancer, atherosclerosis, diabetes, arthritis and heart disease. Studies have shown that consumption of antioxidant substances in the daily diet can prevent these oxidative processes that cause premature aging of the organism. Much attention has been paid in the last decades on the discovery of new natural antioxidants for its use in food or pharmaceutical industry, with the aim of replace synthetic antioxidants, which have restrictions due to their toxic potential.

In this study, we compared the results from antiradical capacity determinations of several phenolic derivatives including natural products obtained by two different assays. One of them utilizes the stable radical DPPH• and the other the radical cation ABTS•⁺ as reagents and both have the advantage of a simple analytical method and ease in data collection as well as high data reproducibility. Furthermore, we have developed a method with DPPH• for the evaluation of the antiradical capacity of phenolic compounds in acid and buffered hydroalcoholic media, in order to facilitate the determination of the antiradical capacity of flavonoids and similar compounds in aqueous ambient and to allow differentiation between the capacity of different ionization states of these derivatives.

Finally the chemiluminescent luminol/hemin/H₂O₂ assay, developed by our research group, has been utilized for the determination of the antiradical capacity of extracts, phases and fractions of *Baccharis regnelli* and the new parameter “Trolox Percentage” is being proposed to adequately express the antiradical capacity of complex mixtures. The sensibility of the luminol assay has been found to be higher than that of other methods and is shown to be suitable for the determination of antiradical activity parameters of complex natural product mixtures, contributing to the isolation of new substances with antiradical activity.

Keywords: Chemiluminescence, luminol, antioxidants, anti-radical assay, DPPH, ABTS.

Abreviaturas e símbolos

ABAP	2,2'-azo-bis(2-amidinopropano)
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazila
EC₅₀	Concentração de antirradical capaz de reduzir a concentração de DPPH à metade
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
HAT	<i>"Hydrogen atom transfer"</i> (Transferência de hidrogênio atômico)
HRP	peroxidase de raiz forte
Luminol	5-amino-2,3-diidroftalazina-1,4-diona
<i>n</i>	Número de radicais sequestrados por molécula de antioxidante / capacidade antirradicalar em relação ao trolox ($n = 2$)
<i>n</i>*	Número de radicais absolutos sequestrados por molécula de antioxidante
ORAC	<i>Oxygen radical absorbance capacity</i> (capacidade antioxidante frente a radicais de oxigênio)
PCET	<i>"Proton Coupled Electron Transfer"</i> (Transferência de elétrons acoplada à transferência de próton)
QL	Quimiluminescência ou quimiluminescente
RFC	Reagente de Folin - Ciocalteu
SPLET	<i>"Sequential Proton-Loss Electron-Transfer"</i> (perda sequencial de próton na transferência de elétron)
TEAC	<i>Trolox equivalent antioxidant capacity assay</i> (capacidade antioxidante em equivalentes de trolox)
TRAP	<i>Total radical-trapping potential</i> (Potencial antioxidante total)
Trolox	6-hidroxil-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-óico

Sumário

1. Introdução	10
1.1. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio	10
1.2. Peroxidação lipídica e as defesas do organismo	11
1.3. Compostos antirradicais de potencial antioxidante	13
1.4. Métodos de avaliação da capacidade antirradicalar	21
2. Objetivos	28
3. Parte Experimental	29
3.1. Reagentes e solventes	29
3.2. Instrumentação	29
3.3. Cinéticas de emissão de quimiluminescência	30
3.3.1. Soluções	30
3.3.2. Procedimento do ensaio antirradicalar com luminol	33
3.3.3. Quantificação da capacidade antirradicalar com o ensaio luminol	33
3.3.4. Análise Estatística	36
3.4. Ensaio utilizando-se medidas cinéticas de absorção	36
3.4.1. Soluções	36
3.4.2. Procedimentos dos ensaios da capacidade antirradicalar	39
3.4.3. Quantificação	39
3.4.4. Análise estatística	40
4. Resultados	41
4.1. Determinação da atividade antirradicalar utilizando-se DPPH•	41
4.1.1. Ensaio cinético para a determinação da atividade antioxidante de alguns compostos fenólicos	42
4.2. Determinação da atividade antirradicalar utilizando-se ABTS ⁺ •	47
4.3. Determinação da atividade antirradicalar utilizando a quimiluminescência do Luminol	51
4.4. Determinação da atividade antirradicalar utilizando o sistema DPPH• em meio ácido	56
4.5. Determinação da atividade antirradicalar utilizando o sistema DPPH• em meio aquoso com pH controlado	64

4.5.1. Determinação da atividade antirradicalar com o sistema DPPH• com variação na quantidade de água	64
4.5.2. Determinação da atividade antirradicalar de espécies em meios tamponados	67
5. Discussão	73
5.1. Determinação da atividade antirradicalar utilizando-se DPPH• e ABTS ⁺ •	73
5.2. Determinação da atividade antirradicalar de frações e extratos de Baccharis, utilizando a quimiluminescência do Luminol	74
5.3. Determinação da atividade antirradicalar utilizando o sistema DPPH• em meio ácido	80
5.4. Determinação da atividade antirradicalar utilizando o sistema DPPH• em meio aquoso com pH controlado	81
5.4.1. Determinação da atividade antirradicalar com o sistema DPPH• com variação na quantidade de água	81
5.4.2. Determinação da atividade antirradicalar de espécies em meios tamponados	82
6. Conclusão	85
7. Referências	86

1. Introdução

1.1. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

Organismos aeróbicos necessitam de oxigênio molecular (O_2) para os processos vitais celulares. Como consequência da respiração e atividades enzimáticas, as células podem gerar formas de O_2 parcialmente reduzidas conhecidas como "Espécies Reativas de Oxigênio" (ERO), ou molécula de óxido nítrico gasoso (NO) e seus derivados, também produzido intracelularmente, definindo uma subclasse de ERO denominadas "Espécies Reativas de Nitrogênio" (ERN)¹. A produção de ERO/ERN em excesso pode causar modificação ou degradação progressiva de compostos bioquímicos celulares, incluindo DNA, proteínas, lipídios e carboidratos. Além da produção metabólica que é iniciada em parte pela redução do O_2 , uma multiplicidade de agressores, como drogas, citocinas e fatores ambientais² (ou seja, a radiação solar ultravioleta, radiações ionizantes, e fumaça de cigarro) pode elevar a produção de ERO intracelular. Tais danos cumulativos induzidos por ERO podem levar à perda funcional das células ou morte celular. Por conseguinte, ERO têm sido implicados no processo de envelhecimento precoce e na progressão de diversas patologias, tais como doenças cardiovasculares, distúrbios neurodegenerativos, artrite reumatoide e doenças inflamatórias do pulmão.

O oxigênio molecular, O_2 , é encontrado no estado fundamental triplete que é pouco reativo, e neste contexto pode dar origem a outras espécies mais reativas (Esquema 1), incluindo a produção de radicais livres, que é parte integral do metabolismo normal. Um radical livre é definido como uma molécula com um ou mais elétrons não emparelhados em uma camada de valência periférica. Por esta definição, O_2 é um birradical, já que tem dois elétrons desemparelhados.³

A presença de radicais livres no organismo desencadeia reações com substratos biológicos podendo danificar biomoléculas e, conseqüentemente, afetar a saúde humana. Os danos mais graves são aqueles causados ao DNA e RNA, onde a cadeia do DNA pode ser quebrada e reconectada em outra posição alterando, assim, a ordem de suas bases. Essa é a base da mutação, e o acúmulo de bases danificadas pode desencadear a oncogênese. As ERO incluem a produção de

oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e radicais livres: ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), peroxila ($\text{HOO}^\bullet$) e alcóxila ($\text{RO}^\bullet$). Dentre as ERN estão incluídos o radical óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$), e espécies moleculares ou iônicas como óxido nitroso (N_2O), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^{1-}), nitratos (NO_3^{1-}) e peroxinitritos (ONOO^{1-}). Essas espécies reativas são formadas por rotas que podem ser agrupadas em reações de transferência de energia ou transferência de elétron.¹

Esquema 1: Rotas da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO).

1.2. Peroxidação lipídica e as defesas do organismo

Todos os componentes celulares são alvos das ERO, no entanto, a membrana celular composta por ácidos graxos poli-insaturados é a mais atingida, a princípio, pela existência de dienos conjugados. Os radicais livres centrados no oxigênio ($\text{HO}^\bullet$) atacam a cadeia lipídica em sítios susceptíveis como o grupo metilênico *bis*-alílico onde há abstração de hidrogênio (Esquema 2), convertendo-o em novo centro de radical livre (iniciação). O radical lipídico formado pode reagir com qualquer estrutura da membrana, porém a reação mais provável é com oxigênio (O_2), gerando o radical lipídio-peroxila (propagação), que pode originar peróxidos cíclicos ou abstrair hidrogênio de outro lipídeo levando desta maneira à continuação da reação de cadeia radicalar (Esquema 2).

Esquema 2: Reações envolvidas na peroxidação lipídica de um ácido graxo poli-insaturado.

A peroxidação lipídica pode ser inibida por antioxidantes que interrompem a cadeia de peroxidação reagindo com os radicais peroxila ou alcoxila e, desta forma, gerando um hidroperóxido e um radical livre formado a partir do antioxidante. Entre estes antioxidantes está o α -tocoferol (Figura 1), que interage com o oxigênio singlete e fornece átomos de hidrogênio para o radical peroxila dos ácidos graxos, impedindo desta forma a reação em cadeia que se propaga nas membranas lipídicas.⁴ Existem outras vitaminas antioxidantes, como ácido ascórbico e o β -caroteno (Figura 1), que interrompem a cadeia de peroxidação. O organismo dispõe também de enzimas antioxidantes que possuem nas suas estruturas metais como: Zn, Se, Cu, Fe e o Mn, que atuam na remoção do O_2^{1-} e H_2O_2 .

α -tocoferol (vitamina E)

ácido ascórbico (vitamina C)

β -caroteno (vitamina A)

Figura 1: Alguns exemplos de antioxidantes naturais.

1.3. Compostos antirradicais de potencial antioxidante

Compostos antirradicais com potencial antioxidante são compostos que podem retardar ou inibir a oxidação de lipídios ou outras moléculas, evitando o início ou propagação das reações em cadeia de oxidação. A atividade antioxidante de compostos fenólicos é principalmente devida às suas propriedades de oxirredução, as quais podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres, espécies reativas de oxigênio ou decompondo peróxidos. Em geral, existem duas categorias básicas de antioxidantes: os sintéticos e os naturais.

Antioxidantes podem ser sintetizados observando requisitos específicos, menor energia de ligação H-AH, baixo potencial de redução $\bullet\text{AH}/\text{AH-H}$, a constante de velocidade, energia de ativação da reação e a estabilidade do intermediário.⁵

Antioxidantes sintéticos como o butilidroxianisol (BHA), o butilidroxitolueno (BHT), o propil galato (PG) e o *tert*-butilidroquinona (TBHQ) (Figura 2) são normalmente utilizados como conservantes nas indústrias de óleos e de derivados lipídicos. Entretanto, estudos destes compostos demonstram que podem apresentar alguns efeitos adversos nocivos a saúde em animais⁶, dessa forma nos últimos anos tem havido a preocupação de se obter substâncias naturais que tenham a mesma função e eficiência dos antioxidantes sintéticos, podendo ainda apresentar vantagens na funcionalidade, sobretudo na área de saúde.⁷

Figura 2: Alguns exemplos de antioxidantes sintéticos utilizados na indústria de alimentos.

Antioxidantes naturais são compostos fenólicos de fontes vegetais e podem ser divididos em dois grupos: os flavonoides e os não flavonoides, ambos, metabólitos secundários presentes em frutas e vegetais. Os flavonoides são

compostos de baixo peso molecular, que compartilham um esqueleto comum de difenilpirano $C_6-C_3-C_6$. O esqueleto é composto por dois anéis aromáticos (A e B), ligado através de um anel pirano C (Figura 3). Os antioxidantes naturais denominados de não flavonoides (Figura 4) são classificados como ⁸:

- os derivados das estruturas químicas C_6-C_1 específicas dos ácidos hidroxibenzoico, gálico e elágico;
- os derivados das estruturas químicas C_6-C_3 específicas dos ácidos caféico e *p*-cumárico hidroxicinamatos;
- os derivados das estruturas químicas $C_6-C_2-C_6$ específicas do *trans*-resveratrol, *cis*-resveratrol e *trans*-resveratrol-glucosídeo.

Figura 3: Estrutura geral da classe de antioxidante natural flavonoide.

Figura 4: Estruturas de alguns antioxidantes da classe de naturais não flavonoides.

A distribuição dos flavonoides nos vegetais depende de diversos fatores de acordo como a classe do vegetal, bem como da variação das espécies. Os flavonoides são formados da combinação de derivados sintetizados da fenilalanina (via metabólica do ácido chiquímico) e ácido acético. Os padrões de distribuição dependem do grau de acesso à luminosidade, especialmente raios UVB, que

catalisam a formação dos flavonoides. Consequentemente, em espécies cultivadas em sistemas que bloqueiam os raios UVB, o conteúdo de flavonoides é reduzido.⁹

Os compostos fenólicos são responsáveis pela prevenção de doenças degenerativas, neste sentido, as frutas, principalmente as que apresentam a coloração vermelha/azul, são as mais importantes fontes de compostos fenólicos em dietas alimentares. Especialmente os derivados do ácido hidroxibenzóico e do ácido hidroxicinâmico dentre estes cita-se: as antocianinas, os flavonóis, as catequinas e os taninos (hidrolisados ou condensados) nas quais estão frequentemente presentes. Muitos destes compostos apresentam uma grande gama de efeitos biológicos, incluindo ações antioxidantes, antimicrobiana, anti-inflamatória e vasodilatadora.⁸

Sob o ponto de vista nutricional, as propriedades antioxidantes dos flavonoides são muitas vezes capazes de inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), além de reduzirem significativamente as tendências a doenças trombóticas.¹⁰ Os efeitos bioquímicos e farmacológicos dos flavonoides são muito vastos, dentre estes se destacam as ações antioxidante, anti-inflamatória e antiplaquetária, além de efeitos antialergênicos. Eles podem inibir enzimas destacando-se: a prostaglandina sintetase, a lipoxigenase e a ciclo-oxigenase, todas relacionadas diretamente com a tumorigênese. Também tem poder de induzir enzimas do sistema desintoxicante como a glutadiona transferase. Quando em alimentos, os flavonoides agem de forma a poupar o consumo de vitamina C, evitando a formação de radicais livres.¹¹

Os flavonoides são pigmentos naturais presentes em plantas capazes de proteger o corpo contra danos por agentes oxidantes, tais como os raios ultravioletas, poluição ambiental, produtos químicos nos alimentos, etc. O corpo humano não pode produzir essas substâncias, portanto, deve ser obtida através da dieta ou suplementos.¹²

Embora, eles tornaram-se importantes compostos dietéticos com promissor potencial terapêutico, reportado anteriormente, pouco se conhece sobre a biodisponibilidade, absorção e metabolismo dos polifenóis em humanos, pois seu estudo é complexo e os dados são escassos. Embora, seja difícil uma recomendação de consumo diário de flavonoides, a ingestão de frutas, vegetais e bebidas ricos nestes é indicada. Contudo, pouco se sabe sobre a ingestão crônica de altas doses de flavonoides. Para compreender melhor o atual significado dos

flavonoides presentes nos alimentos, faz-se necessário investigar não apenas a sua biodisponibilidade, mas também, seu mecanismo de ação, o possível sinergismo com outros constituintes da dieta bem como a sua composição nos alimentos.¹³

A atividade antioxidante dos flavonoides depende das propriedades de oxirredução de seus grupos hidroxifenólicos e as relações estruturais entre as diferentes partes da estrutura química (Figura 3, p. 14). Três características estruturais são importantes para a sua função:

- Presença de grupos hidroxila no anel B.
- Presença de ligação dupla em 2,3.
- A presença de grupos hidroxila na posição 3 e 5.

A classe de compostos dos flavonoides apresenta uma ampla série de padrões de substituição dividindo-se em flavonas, flavonóis, flavanonas, catequinas (flavan-3-óis) e antocianinas (Figura 5).

Figura 5: Estruturas gerais das principais grupos de flavonoides.

A quercetina é um flavonoide amplamente estudado devido a sua presença em vários alimentos, seu comportamento como antirradical é favorecido devido à presença de cinco grupos hidroxila, onde a variação do estado de protonação desses grupos é um fator importante na atividade antirradicalar. Contudo, na literatura há divergências sobre o grupo hidroxila primário de desprotonação.

A questão não é completamente esclarecida quanto a primeira desprotonação ocorrer na posição **C4'** ou **C7**. No caso de desprotonação ocorrer na posição **C7**, a carga negativa do fenolato pode ser deslocizada entre os anéis A e C (Esquema 3A). No caso da desprotonação na posição **C4'**, a estrutura é

estabilizada pela ligação de hidrogênio que é estabelecido pelo grupo hidroxila na posição **C3'** e pela ressonância entre os anéis B e C (Esquema 3B).

Esquema 3: Estruturas de ressonância do íon fenóxido formado a partir da perda de um próton do grupo 7-OH (A) e do grupo 4'-OH (B).

A determinação do sítio primário de desprotonação da quercetina é de grande importância na reação do ânion quercetina com um radical. Estudos cinéticos realizados por Grzegorz Litwinienko *et al.* (2009)¹⁴, indicam que o grupo 7-hidroxila é o local mais ácido na quercetina, desempenhando um papel importante como o local primário de ionização e transferência de elétrons, proposta no mecanismo de reação entre a quercetina e DPPH• (Esquema 4). A presença das hidroxilas na posição **C3'** e **C4'** no anel B da quercetina possibilita a formação de ligações de hidrogênio intramolecular.

Figura 6: Valores de pK_a da quercetina para a desprotonação nas posições C7, C3 e C4'.

Neste trabalho os autores, relatam que foram realizadas medidas de RMN adicionais em quercetina e seu sal monossódico, utilizando-se a técnica ^{13}C CP/MAS de estado sólido, que é um método de RMN para análise de sólidos não-cristalinos em pó. Os espectros de RMN obtidos (Figura 7), indicam que os sinais dos átomos

de carbono de **C1'** a **C6'** no anel B da quercetina monodesprotonada se sobrepõem com os sinais de **C1'** a **C6'** para a quercetina neutra, indicando que não ocorreu desprotonação no anel B. Os sinais para os carbonos **C3** e **C5** também se mantêm no mesmo campo para a quercetina neutra e o sal monossódico. Porém, o sinal de **C7** observado em 164 ppm na quercetina neutra sofreu considerável deslocamento para campo menor no sal monossódico sendo observado em $\delta = 168,7$ ppm (Figura 7).

Figura 7: Espectro ^{13}C CP/MAS RMN de quercetina e seus sais monossódicos: neutros (linha preta), e monossódico (linha vermelha) - Grzegorz Litwinienko *et al.* (2009), pág. 2704.

A desprotonação do **C7-OH** produz desblindagem significativa do **C4**, e causa também, um aumento na capacidade do grupo carbonila de aceitar ligações de hidrogênio intramolecular dos grupos hidroxilas em **C3** e **C5**. Consequentemente, os sinais para o **C4** aparecem desdobrados no intervalo entre 172 e 180 ppm. Com base nos dados de RMN expostos sucintamente acima e medidas de pK_a 's, os autores¹⁴ concluem que a desprotonação da quercetina ocorre inicialmente no grupo **C7-OH**.

Esquema 4: Desprotonação primária da quercetina.

Além disso, com os resultados obtidos os autores chegaram às seguintes conclusões gerais: (i) a formação de uma ligação intramolecular de hidrogênio de um grupo H-B doador provoca uma diminuição da acidez do OH (**5-OH** e **3-OH**), (ii) um grupo H-B aceptor não aumentará significativamente a acidez do Grupo OH no catecol (anel B), (iii) o grupo **7-OH** é o local mais ácido na quercetina, e a presença de outras hidroxilas nas posições **C3** e **C5** não alterara consideravelmente a acidez do grupo **7-OH**.

O estudo da capacidade antirradicalar da quercetina baseado em medidas cinéticas das reações com o radical DPPH•, monitoradas espectrofotometricamente em sistema *stopped flow* a 515-517 nm, revelam que em solventes polares há uma dependência significativa da cinética da reação global com o estado de protonação do composto antirradical, que depende da polaridade do solvente.¹⁴ As reações realizadas em metanol e etanol são mais rápidas do que em outros alcoóis ou dioxano acidificado. A capacidade dos flavonoides de reagir rapidamente e eficientemente com radicais deficientes em elétrons, como DPPH•, depende da acidez dos grupos hidroxila fenólicos e da estabilidade do radical formado. Verificou-se que a cinética da reação entre quercetina e DPPH• depende do pH e da polaridade do meio, sendo que a acidez do meio se mostrou mais importante.

A ação de compostos antirradicalares junto com radicais pode ocorrer através de diferentes mecanismos de reação, incluindo a transferência de átomos de hidrogênio e a transferência de elétrons, inclusive dependendo do estado de protonação dos compostos. Os possíveis mecanismos de ação antirradicalar, usando-se quercetina como exemplo, incluem a Transferência de Hidrogênio Atômico (HAT - “Hydrogen Atom Transfer”), a Transferência de Elétron Acoplada à Transferência de Próton (PCET – “Proton Coupled Electron Transfer”) e o mecanismo de Perda de Próton Seguida de Transferência de Elétron (SPLET – “Sequential Proton-Loss Electron-Transfer”) (Esquema 5).

Em solventes altamente polares, a quercetina reage muito mais rapidamente porque o grupo OH ácido na posição **C7** do anel A é desprotonado e o ânion fenolato reage com os radicais. Esta reação deve ocorrer pelo mecanismo SPLET que envolvendo a transferência inicial de elétron a partir do ânion **II** para a formação do radical **III**, o qual sofre perda de um próton, formando um ânion radical estabilizado por ressonância **IV**, expresso pelas estruturas **IVa** e **IVb** (Esquema 5).

Esquema 5: Possíveis mecanismos para reação entre o DPPH• e quercetina.¹⁴

Em solventes apolares que não suportam ionização, um passo HAT ocorre diretamente da quercetina não ionizada (I) para a formação do radical da quercetina V. Este radical é o produto primário da reação com o radical DPPH•, e não deve sofrer desprotonação subsequente nestes meios apolares.

Em solventes moderadamente polares que podem suportar ionização como metanol, a forma neutra da quercetina está em equilíbrio com a forma do monoânion II, e dois caminhos de reação são possíveis: o primeiro é o mecanismo HAT a partir da fração do catecol do ânion II para a formação do ânion radical IV (Esquema 5). Esta reação é fortemente acelerada pelo aumento da densidade de elétrons nos anéis A e C. O segundo, como rota alternativa, é a transferência rápida de um elétron do ânion fenolato II para o radical DPPH• levando à formação do radical III.

Uma vez que os radicais fenoxila são ácidos consideravelmente mais forte do que os fenóis correspondentes, a acidez de todos os grupos hidroxila na estrutura **III** é aumentada. O anel A é fortemente elétron-atraente e, através da conjugação, o catecol do anel B é o local mais provável da desprotonação de **III**, levando à formação do ânion radical **IV**. Essa desprotonação é altamente favorável tendo em vista a possibilidade de conjugação da carga negativa com o anel A conforme indicado pela estrutura de ressonância **IVa**, a qual contém agora uma carga negativa no anel A e o elétron não emparelhado no anel B (radical catecol).

1.4. Métodos de avaliação da capacidade antirradicalar

Nas últimas décadas, a importância de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) tem sido reconhecida e suas reações têm sido amplamente investigadas, descobrindo-se grande quantidade de compostos capazes de sequestrar ou inativar espécies ativas de oxigênio e nitrogênio, prevenindo o estresse oxidativo. Contudo, nem sempre há uma correlação de um composto que apresenta atividade antirradicalar *in vitro* ser capaz de atuar através de um mecanismo antioxidante *in vivo*.¹² Halliwell e Gutteridge¹⁵ avaliaram vários métodos para a determinação da capacidade antioxidante total de substâncias puras e misturas, atribuindo que um antioxidante é uma substância ou mistura que em baixa concentração reduz ou previne a oxidação de um substrato oxidável, indicando que além de se conhecer a fonte de estresse oxidativo é importante reconhecer o mecanismo e o alvo do ataque.¹³ Neste sentido, uma variedade de procedimentos químicos, físicos e bioquímicos têm sido desenvolvidos na investigação e caracterização de antirradicais naturais ou sintéticos com potencial antioxidante, com a finalidade de estabelecer resultados reprodutíveis e comparáveis. Existe na literatura, uma série de abordagens descritas incluindo vários artigos de revisão.¹⁶

A escolha e o desenvolvimento de um método para medida antirradicalar deve-se levar em conta alguns fatores: i) escolha de radicais estáveis de fácil obtenção e manuseio; ii) escolha de antirradicais; iii) simplicidade do método; iv) disponibilidade de equipamento; v) clareza na observação do início e final da reação; vi) reprodutibilidade dos resultados e vii) coleta e tratamento dos dados. Entre os principais métodos estabelecidos podem ser destacados o ORAC (oxygen radical

absorbance capacity), o método Folin-Ciocalteu, o TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity assay), o método DPPH• e técnicas baseadas na quimiluminescência do Luminol.¹⁶

O método ORAC é um ensaio desenvolvido por Cao *et al.*,¹⁷ e envolve a iniciação da peroxidação lipídica através da produção de radicais peroxila hidrossolúveis a uma velocidade constante pela decomposição térmica do hidrocloreto de 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropila) (ABAP) (Esquema 6).

Esquema 6: Reação do composto antirradical AH com radicais peroxila gerados na decomposição térmica de ABAP.

O princípio do ensaio baseia-se na reação dos radicais peroxila (ROO•) com um composto fluorescente, normalmente fluoresceína ou diclorofluoresceína, formando produtos não fluorescentes. A medida antirradicalar é obtida pela variação da intensidade da fluorescência integrada a partir da adição de um composto antirradical até seu consumo total. O valor de ORAC é expresso em equivalente do ácido 6-hidroxil-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-óico (trolox), um antioxidante desenvolvido para preservação de alimentos que apresenta alto potencial antioxidante, com estrutura cromano similar ao α-tocoferol, porém sem a cadeia lateral hidrofóbica. Este ensaio pode ser usado com outras fontes de radicais e solventes, onde há flexibilidade para testar substâncias hidrofílicas e lipofílicas.¹⁸

O método TEAC baseia-se na redução do cátion radical 2,2'-azo-bis-(3-etilbenzotiazolína-6-sulfonato) ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) na presença de um antioxidante (Esquema 7). O cátion radical é obtido pela oxidação de ABTS com persulfato de potássio ou dióxido de manganês. A capacidade antioxidante é definida pela porcentagem de inibição da formação de $\text{ABTS}^{\bullet+}$, monitorada espectrofotometricamente com absorbância máxima em 415, 645, 734 e 815 nm, utilizando-se o trolox como antirradical padrão.¹⁹

Pela simplicidade de operação e fácil obtenção de resultados, o método é muito empregado, além disso, o radical é solúvel em meio aquoso e orgânico podendo ser aplicado em diferentes meios para determinação da capacidade antirradicalar, tanto para substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas encontradas em extratos e fluidos corporais.

Esquema 7: Reação entre o $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e um antioxidante.

O método de Folin-Ciocalteu tem sido utilizado há muitos anos para medir o conteúdo total de fenóis em produtos naturais, os quais contêm compostos polifenólicos. Desenvolvido em 1927,²⁰ nesse método os fenóis reagem com o reagente de Folin-Ciocalteu (RFC) que envolve a mistura de ácidos de molibdênio e tungstênio na qual o molibdênio se encontra no estado de oxidação (VI) (cor amarela no complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados complexos molibdênio-tungstênio azuis $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^4]$, onde é quantificado por espectrofotometria no visível permitindo a determinação da concentração de compostos fenólicos.

A desprotonação dos compostos fenólicos ocorre em meio básico, gerando os ânions fenolatos, a reação de oxirredução entre o ânion fenolato e o reagente de Folin na qual, o molibdênio sofre redução e o meio reacional muda de coloração amarela para azul (Esquema 8).

Esquema 8: Reação do ácido gálico com molibdênio VI, levando à formação de molibdênio V, detectado espectrofotometricamente.

Uma desvantagem do método é que muitas substâncias podem interferir na análise, entre elas a vitamina C, açúcares e aminas aromáticas, portanto é necessário fazer a correção em relação aos interferentes.¹²

O radical estável orgânico 2,2'-difenil-1-picrilidrazila ($\text{DPPH}^\bullet$), de cor púrpura, também é utilizado para a avaliação da capacidade antirradicalar; o método consiste basicamente na habilidade de um antirradical em reduzir a espécie $\text{DPPH}^\bullet$, observada pela alteração da absorbância inicial da solução. O radical $\text{DPPH}^\bullet$ é disponível comercialmente, e não precisa ser gerado como o $\text{ABTS}^{\bullet+}$. A solução desse radical apresenta coloração púrpura, observada em uma banda de absorção característica com máximo em 515 nm. Esse método, proposto inicialmente por Blois²¹ em 1958, está baseado na descoloração da solução de $\text{DPPH}^\bullet$ para amarela pálida pela redução do radical, extinguindo a banda de absorção característica em 515 nm.

A reação entre o radical $\text{DPPH}^\bullet$ e um composto antirradical pode ser monitorada espectrofotometricamente pela variação da absorbância do sistema em 515 nm (Esquema 9). A capacidade antirradicalar do aditivo é comumente expresso com o parâmetro EC_{50} , que corresponde à concentração da amostra que leva a uma redução da concentração de $\text{DPPH}^\bullet$ a 50% da inicial. Entretanto, esta maneira de expressar o resultado depende, obviamente, da concentração inicial do $\text{DPPH}^\bullet$ utilizada e deve, por isso, ser interpretado com o devido cuidado. A principal desvantagem do método $\text{DPPH}^\bullet$ é que a sua reatividade difere fortemente da reatividade dos radicais com importância biológica, que normalmente mostram alta reatividade, como os radicais peroxila. Compostos antirradicalares que reagem

catalisadores, sendo dessa forma aplicados na determinação de diversas espécies orgânicas e inorgânicas. Peroxidases, em particular a HRP, extraída de raiz forte, são comumente consideradas como os catalisadores mais efetivos, trabalhando em um pH = 8 – 10, atuando com um co-oxidante particular, o peróxido de hidrogênio. Essa reação é a base de imunoenaios e biosensores, pois é capaz de quantificar peroxidase ligada a qualquer entidade (proteínas, peptídeos e outras biomoléculas). Além disso, é capaz de quantificar o peróxido de hidrogênio assim que é produzido por uma reação específica, por exemplo, produzido pela oxidação de glicose catalisada pela glicose oxidase.²⁶ Outro tipo comum de aplicação da quimiluminescência do luminol é na determinação de metais de transição, uma vez que esses cátions apresentam efeitos catalíticos ou inibidores (caso de algumas misturas dessas espécies) na reação de oxidação do luminol.²⁷ A determinação do potencial antirradicalar através dessa reação também é possível, uma vez que há supressão da emissão devido ao consumo dos radicais envolvidos na reação.²⁸

Apesar da intensa aplicação analítica, o mecanismo da oxidação do luminol (Esquema 10) (1) não está totalmente estabelecido. Sabe-se que apenas quando o luminol é oxidado sob condições alcalinas é que se observa emissão QL eficiente, e sob qualquer condição, 3- aminoftalato (2) e nitrogênio molecular são os produtos principais da reação.¹⁰

Esquema 10: Oxidação quimiluminescente do luminol em meio aquoso alcalino.

Uma adaptação do ensaio TRAP original proposta por Lissi *et al*,²⁹ baseia-se na supressão da luz emitida em uma reação quimiluminescente pelo consumo de radicais envolvidos nessa reação. O método TRAP quimiluminescente é baseado na oxidação do luminol usando ABAP como fonte de radicais livres. A reação entre antirradicais e os radicais presentes inibem a quimiluminescência do sistema por um tempo diretamente proporcional à concentração total de aditivo (tempo de indução), e a capacidade antioxidante é medida em relação ao antioxidante padrão, trolox.³⁰

O método da quimiluminescência proveniente da oxidação do luminol mede a capacidade antirradicalar, através da inibição da quimiluminescência com a presença de um antirradical; a supressão da luz é proporcional à concentração do antirradical. Foi desenvolvido e estudado um método quimiluminescente pelo nosso grupo de pesquisa, a partir do sistema do luminol/hemina/ H_2O_2 , que apresenta uma emissão constante de decaimento compatível com o sistema luminol/ABAP tendo, no entanto, uma intensidade de emissão mais elevada em menor tempo de resposta.⁵ A emissão pode ser suprimida por substâncias que apresentem atividade antirradicalar (Esquema 11), sendo que a área de supressão apresenta boa correlação com a concentração da amostra; diante disso foi proposto um método TRAP expresso em mg.L^{-1} de antirradical correspondente a área de supressão equivalente ao trolox na concentração de $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Esse método, que hoje está bem estabelecido, é usado na avaliação da capacidade antirradicalar de flavonoides, extratos de produtos naturais.^{28,31} Uma das limitações dele é o fato de ser realizado em meio aquoso e pH alcalino (11,6), onde alguns flavonoides não são solúveis.

Esquema 11: Reação simplificada da quimiluminescente do luminol na presença de um antioxidante.

2. Objetivos

Os objetivos gerais desse trabalho são:

- a) avaliar a capacidade antirradicalar de frações e extratos obtidos de folhas secas da espécie *Baccharis regnelli* utilizando-se o ensaio quimiluminescente com luminol/H₂O₂/hemina, desenvolvido no nosso grupo de pesquisa;
- b) determinação da atividade antirradicalar de flavonoides e derivados fenólicos através do ensaio antirradicalar, utilizando como sonda o radical estável DPPH.
- c) comparar os resultados obtidos com o radical estável DPPH, a partir do ensaio antirradicalar utilizando como sonda o cátion-radical ABTS.
- d) estudar o comportamento do ensaio com radical estável DPPH em meios ácidos, hidroalcoólicos e tamponados para substâncias que apresentam diferentes estados de ionização de acordo com o pH do meio.

3. Parte Experimental

3.1. Reagentes e solventes

Os reagentes a seguir foram utilizados sem prévia purificação: luminol (5-amino-2,3-diidroftalazina-1,4-diona, Sigma, 97%); hemina (cloreto de ferriprotoporfirina IX, Sigma); peróxido de hidrogênio (Peróxidos do Brasil, 60% m/m); trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) foi obtido da Aldrich (Milwaukee, EUA) e utilizado como antirradical padrão; *DPPH* (2,2-difenil-1-picrilhidrazila, Sigma 97%); catecol (1,2-diidroxibenzeno) foi obtido da Acros Organics, *Ácido Ascórbico* da Sigma; *Etanol* 99,5 %, da Synth; rutina (triidrato de rutina, Aldrich, 95%), quercetina (diidrato de quercetina, Aldrich, 98%); resorcinol (1,3-diidroxibenzeno 99%) Aldrich; hidroquinona (1,4-diidroxibenzeno, Sigma); *m*-nitrofenol (1-hidroxi-3-nitrobenzeno); ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), Sigma Aldrich), persulfato de potássio, foi obtido da Merck.

Os solventes usados no preparo das soluções foram o etanol (Synth, 99,5%) tratado com Mg^0 e I_2 e destilado (P.E. $78,3 \pm 0,2$ °C, lit. $78,3$ °C³²); e água desmineralizada (18 M Ω , Milli-Q, Millipore). Os demais reagentes foram utilizados de grau analítico sem purificação adicional.

3.2. Instrumentação

A cinética das reações quimiluminescentes foi acompanhada utilizando-se um espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse com a tensão da fotomultiplicadora de 800 V, fenda de 20 nm e grade na posição de espelho (nesta condição, não há separação espectral da luz incidente e todos os comprimentos de onda de emissão são registrados pela fotomultiplicadora). Os espectros de absorção e as cinéticas do ensaio com *DPPH*• e cátion radical *ABTS*•⁺ foram obtidas em um espectrofotômetro Varian Cary 50 Probe, com *cell holder* com espaço para 18 cubetas.

3.3. Cinéticas de emissão de quimiluminescência

3.3.1. Soluções:

a) Luminol:

A solução estoque de luminol ($\sim 10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) foi preparada dissolvendo-se 45 mg de luminol em 25 ml de solução de NaOH $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, e sua concentração exata determinada espectrofotometricamente em 347 nm ($\epsilon = 7600 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Figura 8: Espectro de absorção de luminol ($\sim 1,0\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em NaOH ($1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

b) Hemina:

A solução estoque de hemina ($0,8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) foi preparada dissolvendo-se 2,5 mg de hemina em 5 mL de NaOH $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, e sua concentração final foi determinada espectrofotometricamente em 385 nm ($\epsilon = 58\,400 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$). Essa solução foi guardada sob abrigo da luz e utilizada no período máximo de 7 dias.

Figura 9: Espectro de absorção da hemina ($\sim 5,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) em NaOH ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

c) Peróxido de hidrogênio:

A solução estoque de peróxido de hidrogênio (cerca de $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) foi preparada a partir de uma solução 60% ($21,2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), diluindo-se 1 mL dessa solução em 20 mL de água. A concentração exata foi determinada espectrometricamente em cubeta de quartzo para absorção, pela adição de 3 mL de uma solução de iodeto de potássio $0,05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em tampão acetato (pH 3,8; $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 6 μL de uma solução de peroxidase HRP VI (Sigma, $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) em água e 6 μL da solução estoque de peróxido de hidrogênio diluída 100 vezes. Nesse método, a quantidade de iodeto oxidado é proporcional à concentração de peróxido, cuja concentração se obtém diretamente pela absorbância em 353 nm ($\varepsilon = 2,55 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) da espécie I_2 formada:

Figura 10: Espectro de absorção obtido da reação de peróxido de hidrogênio ($\sim 2,0 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹) em H₂O com KI (0,05 mol·L⁻¹, em tampão acetato, pH 3,8; 0,1 mol·L⁻¹), catalisada por HRP.

d) Soluções estoque dos compostos antirradicais:

As soluções estoque dos compostos antirradicais foram preparadas imediatamente antes do uso: i) a solução de trolox, utilizado como antirradical padrão, foi preparada a partir do reagente comercial (Aldrich) sem purificação prévia pela dissolução em solução de NaOH 0,01 mol·L⁻¹, na concentração de $4,0 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹; ii) Os extratos de *Baccharis regnelli* analisados foram obtidos e fracionados pela equipe do laboratório de produtos naturais da Universidade Mackenzie. As soluções estoque dos extratos foram preparadas imediatamente antes do uso através da dissolução do sólido em quantidade adequada de etanol (previamente tratado com Mg_(s) e I_{2 (s)} e destilado) sob atmosfera inerte de nitrogênio. Todas as soluções estoque foram estocadas a 4°C por no máximo dez dias, e as soluções de trabalho preparadas a partir delas, foram utilizadas somente no dia de sua diluição.

e) Solução-tampão:

Foram preparadas soluções-tampão fosfato ($\text{Na}_3\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) pH 11,6, pela mistura das soluções dos sais correspondentes na relação adequada para se obter solução com pH = 11,6.

3.3.2. Procedimento do ensaio antirradicalar com luminol:

Em cubeta de quartzo para fluorescência munida de agitação magnética e termostatzada a $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$, foram adicionados 20 μL de solução de luminol $10,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e 20 μL de uma solução de hemina $8,0 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a 1,92 mL de tampão fosfato $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 11,6. A reação quimiluminescente foi iniciada pela adição de 20 μL de uma solução de peróxido de hidrogênio $10,0 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ aos outros componentes. Após cem segundos de reação, foram adicionados 20 μL de uma solução da amostra antirradical com intervalo de concentração de $12,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a $125 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. No início dos ensaios cinéticos os reagentes apresentavam as seguintes concentrações: hemina $80 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, luminol $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, peróxido de hidrogênio $0,1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $0,125 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a $1,25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de composto antirradical em 2,0 mL de volume final. As cinéticas de reação foram registradas durante quinze a vinte minutos.

3.3.3. Quantificação da capacidade antirradicalar com o ensaio luminol

Considerando uma emissão luminosa que varia com o tempo, em um tempo t , o número de fótons emitidos por segundo é $N(t)$. A luz total emitida em uma reação quimiluminescente é proporcional à intensidade de emissão que é demonstrada na Equação 1.

$$L = \int_0^{\infty} N_{(t)} dt = \int_0^{\infty} I dt$$

Equação 1

O decaimento de quimiluminescência da reação depende da concentração total de espécies reativas presentes no meio reacional. Compostos sequestradores

de radicais consomem estas espécies, resultando na diminuição da intensidade de emissão. A diferença entre as áreas obtidas na presença do composto antirradicalar (Figura 11B) e na ausência do mesmo (Figura 11A), denominada de área de supressão, é proporcional ao número de espécies reativas consumidas pelo antirradical³³. Sendo assim, a área de supressão deve ser proporcional à concentração do antirradical adicionado ao sistema quimiluminescente e a sua capacidade (Figuras 11A, 11B à 11C).

Figura 11: A: Cinética de emissão de quimiluminescência da reação de luminol ($0,01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) com peróxido de hidrogênio ($1,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), catalisada por hemina ($6,0 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); B: com a adição do composto antirradicalar após 100 s de reação; C: A área de supressão obtida pela adição do composto antirradicalar é mostrada em destaque.

Os dados obtidos no espectrofotômetro são transportados e tratados com o auxílio do software Microcal Origin[®] 8.0 (2008); onde as curvas cinéticas foram obtidas. A partir da integração dessas curvas, as áreas de supressão de luz foram calculadas para cada concentração de antirradical, obtendo-se uma correlação linear normalizada da variação da área de supressão da luz em função da concentração.

O cálculo da atividade antirradicalar foi obtido pela relação dos coeficientes angulares dessas correlações do antirradical e do padrão trolox (Figura 12). Desta maneira obtém-se o valor correspondente da atividade antirradicalar em porcentagem de trolox ($\%_T$), conforme a Equação 2.

$$\%_T = \frac{\alpha_A}{\alpha_T} \cdot 100$$

Equação 2

Onde: $\%_T$ = Percentual de trolox correspondente a capacidade antirradicalar.

α_A = Coeficiente angular da correlação entre área de supressão e [AOH];

α_T = Coeficiente angular da correlação entre área de supressão e [trolox].

Além dos valores obtidos em porcentagem de trolox, foram calculados os valores de TRAP, parâmetro de sequestro total de radicais (“Total Radical Antioxidant Parameter” [TRAP]).²² Adequado ao sistema luminol/hemina, o valor de TRAP correspondente à concentração do composto antirradical, expressa em $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, que resulta na mesma área de supressão que a concentração de $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de trolox (Figura 12).

Figura 12: Correlação linear da área de supressão e a concentração de um composto antirradical e da área de supressão e a concentração de trolox para o cálculo da capacidade antirradicalar em porcentagem de trolox ($\%_T$) e como valor de TRAP.

3.3.4. Análise Estatística

Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Todos os cálculos e ajustes foram realizados utilizando-se o software Microcal Origin 8.0 (2008).

3.4. Ensaios utilizando-se medidas cinéticas de absorção

3.4.1. Soluções:

a) Ensaio utilizando-se o radical livre DPPH•:

- Soluções estoque de DPPH•

As soluções estoque de DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila, radical livre) foram preparadas a partir de 6,5 mg de DPPH• dissolvidos em 10mL de etanol (previamente purificado com Mg^0 e I_2 , e filtrado com filtro Milli-Q). As concentrações das soluções de DPPH• foram determinadas espectrofotometricamente imediatamente antes da utilização ($\epsilon_{515} = 1,09 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Figura 13: Espectro de absorção de DPPH• ($\sim 7,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) em etanol.

- Soluções de antirradical:

As soluções estoque de trolox, utilizado como antirradical padrão, e os demais antirradicais (ácido ascórbico, catecol, rutina, quercetina, pirogalol, hidroquinona e resorcinol), foram preparados a partir do reagente comercial sem purificação prévia pela dissolução em etanol (previamente tratado com $\text{Mg}_{(s)}$ e $\text{I}_{2(s)}$ e destilado) sob atmosfera inerte de nitrogênio. Todas as soluções estoque foram estocadas a 4°C por no máximo dez dias, e as soluções de trabalho preparadas a partir delas, foram utilizadas somente no dia de sua diluição.

- Soluções-tampão:

Foram preparadas soluções-tampão (Tabela1) pela mistura das soluções dos sais correspondentes na relação adequada para se obter solução com pH's determinados.

Tabela 1: Soluções-tampão utilizadas nos ensaios antirradicalares em pH's restritos.

pH	Solução-tampão
5,0	NaOAc e HOAc 0,1 mol·L ⁻¹
8,0	Na ₂ HPO ₄ e HCl 0,1 mol·L ⁻¹
10,0	Na ₂ HPO ₄ e NaOH 0,1 mol·L ⁻¹
11,6	NaHPO ₄ · 7H ₂ O e Na ₃ PO ₄ mol·L ⁻¹

b) Ensaio utilizando-se o radical livre ABTS^{•+}:

- Soluções estoque de ABTS:

As soluções estoque de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) ($\sim 7,0 \cdot 10^{-3}$ mol·L⁻¹) foram preparadas a partir de 192 mg de ABTS dissolvidos em 50 mL de água Milli-Q, mantida em geladeira (~ 4 °C) abrigada da luz durante, no máximo, um mês. As concentrações exatas das soluções estoque de ABTS foram determinadas espectrofotometricamente imediatamente antes da sua utilização ($\epsilon_{734} = 1,5 \cdot 10^4$ mol⁻¹·L·cm⁻¹).

- Soluções estoque de persulfato de potássio:

A solução estoque de persulfato de potássio ($1,4 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹) foi obtida a partir de 378,4 mg do sal dissolvidos em 10 mL de água Milli-Q. A solução foi mantida abrigada da luz sob condições ambiente até o máximo de um mês.

- Preparação do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$:

As soluções do cátion radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foram preparadas a partir da reação de 5,0 mL de solução de ABTS ($\sim 7,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) com 88 μL da solução estoque de persulfato de potássio ($1,4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), pelo menos 16 h antes dos ensaios cinéticos da determinação da capacidade antirradicalar. A solução foi mantida abrigada da luz sob temperatura ambiente. A concentração exata das soluções foi determinada espectrofotometricamente imediatamente antes da sua utilização ($\epsilon_{734} = 1,5 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Figura 14: Espectro de absorção do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ($\sim 4,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) em etanol.

- Soluções estoque dos compostos antirradicais:

As soluções estoque dos compostos antirradicais (trolox, ácido ascórbico, catecol, rutina, quercetina, pirogalol, hidroquinona e resorcinol), para esse ensaio, foram preparadas em etanol (Synth, previamente tratado com Mg^0 e I_2) e mantidas sob-refrigeração e na ausência de luz. ($\sim 1,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) por até dez dias. As soluções de trabalho foram diluídas nas concentrações ideais imediatamente antes dos ensaios.

3.4.2. Procedimentos dos ensaios da capacidade antirradicalar:

a) Ensaio utilizando-se o radical livre DPPH•:

Em cubetas de quartzo para absorvância com caminho óptico de 10 mm, com volume total de 3,00 mL foram adicionados cerca de 150 µL de solução estoque de DPPH ($1,65 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) seguida da adição de 2,770 a 2,890 mL de etanol. As quantidades exatas dependem da concentração da solução estoque de DPPH•; a concentração final de DPPH• foi ajustada para $8,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. As cubetas foram termostatizadas a $25 \pm 0,6 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e as medidas iniciadas pela adição de 60 a 180 µL da solução do composto antirradical ($5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$). A cinética da reação foi observada pela variação da absorvância da solução em 515 nm durante trinta minutos (Figura 15A).

b) Ensaio utilizando-se o radical livre ABTS•⁺:

Em cubetas de quartzo para absorvância com caminho óptico de 10 mm, com volume total de 3,00 mL foram adicionados cerca de 25 µL de solução estoque de ABTS•⁺ ($3,75 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) seguida da adição de 2,945 a 2,915 mL de etanol. . Como no caso anterior, as quantidades exatas dependem da concentração da solução estoque de ABTS•⁺; a concentração final de ABTS•⁺ foi ajustada para $6,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. As cubetas foram termostatizadas a $25 \pm 0,6 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e as medidas iniciadas pela adição de 30 a 60 µL da solução do composto antirradical ($5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$). A cinética da reação foi observada pela variação da absorvância da solução em 734 nm durante trinta minutos (Figura 15B).

3.4.3. Quantificação

Os dados obtidos no espectrofotômetro a partir dos experimentos cinéticos da reação entre o DPPH ou ABTS•⁺ e os compostos antirradicais foram tratados com o software Microcal Origin® 8.0 (2008); onde as curvas cinéticas foram obtidas. A partir da variação na absorvância dessas curvas, em cada concentração de antirradical, obteve-se uma correlação linear normatizada da variação da absorvância ($\Delta \text{ Abs}$) em função da concentração. O cálculo da atividade antirradicalar foi obtido pela

relação dos coeficientes lineares obtidos destas correlações e os coeficientes obtidos com o padrão trolox (Figura 16).

Figura 15: A – Decaimento da absorção de DPPH ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em 515 nm com o tempo após a adição de um composto antirradicalar. B – Decaimento da absorção de ABTS^{•+} ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em 734 nm com o tempo após a adição de um composto antirradicalar.

Figura 16: Correlação linear da variação da absorbância de DPPH (515 nm) ou ABTS^{•+} (734 nm) em função da concentração de um composto antirradical adicionado.

3.4.4. Análise estatística:

Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Todos os cálculos e ajustes foram realizados utilizando-se o software Microcal Origin[®] 8.0 (2008).

4.1.1. Ensaios cinéticos para a determinação da atividade antioxidante de alguns compostos fenólicos

Foram realizados ensaios espectrofotométricos observando-se a variação da absorbância de DPPH• em função do tempo com diversos compostos fenólicos (Esquema 13). Para a obtenção dos valores da capacidade antirradicalar foram efetuadas três séries de experimentos a 25 °C, onde as Figuras 17 a 19 indicam resultados representativos.

Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico)

Catecol (1,2-diidroxibenzeno)

Quercetina (3,5,7,3',4'-pentaidroxiflavona)

Hidroquinona (1,4-diidroxibenzeno)

Ácido ascórbico ((5*R*)-5-[(1*S*)-1,2-diidroxietil]-3,4-diidroxifuran-2(5*H*)-ona)

Rutina (5,7,3',4'-tetraidroxiflavonol-3-O-rutinosídeo triidratada)

Resorcinol (1,3-diidroxibenzeno)

Pirogalol (1,2,3-triidroxibenzeno)

Esquema 13: Compostos fenólicos estudados pelos métodos DPPH• e ABTS•⁺.

Para a determinação da capacidade antirradicalar o trolox foi utilizado como antirradical padrão. As curvas cinéticas (Figura 17) foram obtidas pela variação da

absorbância do DPPH• em função do tempo, devido à reação com os antirradicais em diferentes concentrações. Em cada ensaio antirradicalar foram monitorados simultaneamente sete cubetas: (1) solvente (linha base), (2) com DPPH• sem a adição de antirradical, (3 – 7) com DPPH e antirradical em diferentes concentrações. Nos ensaios, foi observado que sem adição de composto antirradicalar a concentração do DPPH• apresentou-se constante durante o tempo de monitoramento em 515 nm (Figura 17A), indicando sua estabilidade nesse comprimento de onda. Portanto, nas condições experimentais, qualquer variação na absorbância em função do tempo ocorre através da reação com o antirradical. O valor da absorbância do DPPH• ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) sem a adição de antirradical nos experimentos foi em média 0,87.

Figura 17: Cinética da reação entre DPPH• ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e compostos antirradicais em etanol a 25°C , observada em $\lambda = 515 \text{ nm}$.

As curvas cinéticas obtidas com ácido ascórbico e catecol (Figuras 17B e 17C, respectivamente) mostram a variação da absorbância nas mesmas condições experimentais do trolox, porém com decaimento inicial mais rápido, em seguida a absorbância manteve-se constante durante o restante do período de observação. Na rutina (Figura 17D) as curvas mostram que o decaimento inicial da absorbância é um pouco mais lento que os anteriores, porém as variações de absorbâncias em concentrações equivalentes ao trolox foram idênticas.

As curvas cinéticas obtidas com quercetina (Figura 17E) mostram o decaimento da absorbância mais lento em relação ao trolox, a variação da absorbância de DPPH• é idêntica ao trolox com concentrações de quercetina reduzidas à metade ($5 - 15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). As curvas cinéticas obtidas com resorcinol, em concentrações cinco vezes menores ($2 - 6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) que os utilizados do trolox, mostram um decaimento muito lento da absorbância. Observa-se ainda que tanto a cinética da reação quanto a absorbância final não mostram mudança significativa com o aumento da concentração da resorcinol (Figura 17F). Com hidroquinona as curvas mostram o decaimento da absorbância semelhante ao trolox nas mesmas condições experimentais (Figura 17G). No caso do pirogallol, as curvas cinéticas obtidas mostram o decaimento da absorbância muito lento quando comparada ao trolox, mesmo utilizando-se concentrações maiores neste caso (Figura 17H).

A partir das curvas cinéticas foi possível obter a correlação linear entre a absorbância (Δ Absorbância) e a concentração do composto antirradicalar (Figura 18), usada para determinação da atividade antirradicalar relativa.¹⁸

A curva da variação da absorbância (Δ Absorbância) em função da concentração do trolox (Figura 18A) mostrou correlação linear com um coeficiente angular $\alpha = 0,023 \pm 0,001 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Os antirradicais, ácido ascórbico, catecol e rutina (Figuras 18B, 18C e 18D), demonstram comportamento semelhante ao trolox ($\alpha = 0,023 \pm 0,002 \mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}$, $0,024 \pm 0,001 \mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}$ e $0,021 \pm 0,002 \mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}$ respectivamente). Das correlações para a quercetina e a rutina (Figuras 18E e 18H), determinaram-se atividades antirradicais superiores à do trolox, cerca de duas vezes maiores ($\alpha = 0,048 \pm 0,001 \mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}$ e $\alpha = 0,045 \pm 0,001 \mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}$ respectivamente). No intervalo de concentração estudado para o resorcinol (Figura 18F) não foi observada correlação linear na variação da absorbância em função da sua concentração. Com a hidroquinona (Figura 18G) a curva da variação da

absorbância em função da concentração demonstrou comportamento semelhante à do trolox ($\alpha = 0,019 \pm 0,001 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$).

Figura 18: Correlação linear entre a variação da absorbância de DPPH• ($\lambda = 515 \text{ nm}$) e a concentração do composto antirradicalar em etanol a 25 °C.

Além de efetuar a correlação da concentração do composto antirradicalar com a variação da absorbância, foi também efetuada a correlação desta concentração diretamente com a concentração do radical DPPH• (Figura 19). Desta correlação é possível se obter diretamente o número de radicais de DPPH• sequestrados por molécula de antirradical. Para o caso do trolox foi obtido a partir desta correlação o valor de $n^* = 2,04 \pm 0,05$ (Figura 19A), que coincide com o valor da literatura ($n = 2$). 33, 35, 36.

Os antirradicais, ácido ascórbico, catecol e rutina (Figuras 19B, 19C e 19D), mostraram valores de capacidade antirradicalar semelhantes ao do trolox ($n^* = 2,08 \pm 0,05$, $n^* = 2,17 \pm 0,05$; $n^* = 1,91 \pm 0,04$ respectivamente). Para quercetina e pirogalol (Figuras 19E e 19G), o número de radicais sequestrados foi superiores ao do trolox, obtendo-se valores cerca de duas vezes maiores $n^* = 4,4 \pm 0,1$ e $n^* = 4,1 \pm 0,1$, respectivamente). Para a hidroquinona (Figura 19F) a curva da variação da absorbância em função da concentração demonstrou comportamento semelhante à do trolox ($n^* = 1,73 \pm 0,01$).

Figura 19: Correlação linear da concentração do DPPH• e a concentração do composto antirradicalar adicionada em etanol a 25 °C.

4.2. Determinação da atividade antirradicalar utilizando-se $ABTS^{\bullet+}$

Além de determinar a capacidade antirradicalar utilizando-se o radical estável $DDPH^{\bullet}$, foram efetuados experimentos para a determinação deste parâmetro com o método $ABTS^{\bullet+}$ ¹⁹, usando-se também o trolox como antirradical padrão, para os compostos fenólicos usados anteriormente. Para a obtenção dos valores da capacidade antirradicalar foram efetuadas três séries de experimentos a 25 °C, onde as Figuras 20 a 23 indicam resultados representativos.

O ensaio é baseado na perda da intensidade da cor da solução verde do cátion radical $ABTS^{\bullet+}$, após a reação com um composto antirradicalar (AOH) (Esquema 14).

Esquema 14: Reação entre o cátion radical $ABTS^{\bullet+}$ e um composto antioxidante AOH.

A reação entre o radical $ABTS^{\bullet+}$ e o composto antirradicalar (AOH) foi acompanhada pela absorbância do radical a 734 nm. A cinética da reação foi acompanhada até a absorbância manter-se constante, permitindo o cálculo da variação entre a absorbância inicial e a final (Δ Abs) para cada concentração de antirradical. A partir dessas variações foi possível obter uma curva de comportamento linear da variação da absorbância (Δ Abs) em função da concentração do antirradical, idêntico ao método DPPH $\bullet$. Para cada antirradical estudado, o coeficiente linear (α) obtido foi comparado ao composto de referência (trolox), desta maneira obtendo-se a capacidade antirradicalar.

Em cada ensaio antirradicalar (Figura 20) foram monitorados simultaneamente sete cubetas: (1) solvente (linha base), (2) com $ABTS^{\bullet+}$ sem a adição de antirradical, (3 – 7) com $ABTS^{\bullet+}$, na presença de diferentes concentrações de antirradical. Foi observado que, na ausência de composto antirradicalar, a

concentração do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se mantém constante durante o tempo de monitoramento em 734 nm (Figura 20A), indicando sua estabilidade nestas condições e sob irradiação nesse comprimento de onda. Portanto, nas condições experimentais, qualquer variação na absorbância em função do tempo ocorre através da reação entre o $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e o composto antirradicalar. O valor da absorbância a 734 nm do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) sem a adição de antirradical nos experimentos foi em média 0,85.

Figura 20: Cinéticas da reação entre $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e compostos antirradicalares em etanol a 25°C , observada em $\lambda = 734 \text{ nm}$.

Os dados obtidos na reação entre o $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e os antirradicais, ácido ascórbico e catecol (Figuras 20B e 20C, respectivamente), mostram a variação da

absorbância muito similar à obtida com trolox (Figura 20A), nas mesmas condições experimentais. Nestas curvas cinéticas, o decaimento inicial se mostrou muito rápido, em seguida a absorbância manteve-se constante durante o restante do período de observação. As curvas cinéticas obtidas na presença de rutina mostram um decaimento inicial da absorbância um pouco mais lento que os anteriores, porém as variações de absorbâncias em concentrações equivalentes ao trolox foram muito similares (Figura 20D).

As curvas cinéticas obtidas com quercetina (Figura 20E) mostram o decaimento da absorbância mais lento em relação ao trolox; a variação final da concentração de $ABTS^+ \cdot$ é, novamente, muito similar àquela observada com o trolox, porém, com concentrações menores ($5 - 15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). A sequência de dados obtida com a hidroquinona (Figura 20F) demonstra o decaimento da absorbância semelhante ao trolox nas mesmas condições experimentais. No caso do pirogallol (Figura 20G) as curvas obtidas mostram o decaimento da absorbância muito lento quando comparada ao trolox, as condições experimentais diferem nas concentrações ($2,5 - 7,5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

A partir dos dados mostrados (Figura 20) foram obtidas as correlações lineares da variação final da absorbância (Δ Absorbância) em função da concentração dos compostos antirradicais (Figura 21); obtendo-se do coeficiente angular (α) os valores da capacidade antirradicalar relativa para cada composto.

A correlação da variação da absorbância (Δ Absorbância) em função da concentração do trolox (Figura 21A) demonstrou comportamento linear cujo coeficiente angular $\alpha = 0,031 \pm 0,001 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Os antirradicais, ácido ascórbico, catecol, rutina e hidroquinona (Figuras 21B, 21C, 21D e 21F), demonstram comportamento semelhante ao trolox ($\alpha = 0,023 \pm 0,002 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$, $0,030 \pm 0,001 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$, $0,034 \pm 0,002 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ e $\alpha = 0,036 \pm 0,001 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ respectivamente). A quercetina e o pirogallol (Figuras 21E e 21G) mostram capacidade antirradicalar superior ao trolox, cerca de duas vezes maior ($\alpha = 0,078 \pm 0,002 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ e $\alpha = 0,08 \pm 0,001 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ respectivamente).

Figura 21: Correlação linear entre a variação da absorbância de $ABTS^{\bullet+}$ e a concentração de antirradical em etanol a 25 °C, observada em $\lambda = 734$ nm.

Os dados obtidos (Figura 20) foram também utilizados para se efetuar as correlações diretas entre a concentração do composto antirradicalar e a variação da concentração do $ABTS^{\bullet+}$ (Figura 22), a partir dos quais foi possível determinar diretamente o número de cátions radicais de $ABTS^{\bullet+}$ sequestrados por molécula de antirradical. No caso do padrão trolox (Figura 22A) obtém-se um valor $n^* = 2,04 \pm 0,05$, que coincide com o valor comumente utilizado com o valor de n ($n = 2,0$).^{18,33,35.}

As correlações lineares obtidos com os compostos antirradicalares, ácido ascórbico, catecol, rutina e hidroquinona (Figuras 22B, 22C, 22D e 22F), mostraram-se próximo ao do trolox ($n^* = 1,55 \pm 0,03$, $n^* = 1,96 \pm 0,04$; $n^* = 2,58 \pm 0,04$ e $n^* = 2,3 \pm 0,1$, respectivamente). Para a quercetina e o pirogalol (Figuras 22E e 22G), o

número de radicais sequestrados foi significativamente superior ao do trolox, $n^* = 5,2 \pm 0,1$ e $n^* = 5,7 \pm 0,1$, respectivamente.

Figura 22: Correlação linear entre a variação da concentração final de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e a concentração de antirradical em etanol a 25 °C, observada em $\lambda = 734 \text{ nm}$.

4.3. Determinação da atividade antirradicalar utilizando a quimiluminescência do Luminol.

Com o objetivo de estudar a atividade antirradicalar em extratos de produtos naturais, foram determinados os valores da capacidade antirradicalar de compostos fenólicos, substâncias de grande ocorrência no gênero *Baccharis regnelli* considerados bons marcadores quimiotaxonômicos.³⁷ Os ensaios foram realizados utilizando-se extratos e frações, obtidos a partir do extrato em metanol (Extrato A) de folhas de *Baccharis regnelli* secas, e do extrato em acetato de etila (Extrato B), além

de frações cromatográficas (1 a 8) que foram obtidas com coluna Sephadex a partir do extrato em acetato de etila, utilizando-se metanol como eluente.

Para determinar a atividade antirradicalar dos extratos de *Baccharis* e suas frações, primeiramente foram realizados estudos cinéticos utilizando-se o método DPPH•, porém os resultados obtidos não demonstraram correlação evidente entre a concentração e a atividade antirradicalar; dessa forma, posteriormente, foram realizados ensaios para determinação da atividade antirradicalar utilizando-se a reação quimiluminescente do luminol (5-amino-2,3-diidroftalazina-1,4-diona) com peróxido de hidrogênio, catalisada por hemina (Esquema 15).

Esquema 15: Reação simplificada da quimiluminescente do luminol.

A reação de luminol foi iniciada pela adição da solução de peróxido de hidrogênio após a mistura dos outros reagentes, registrando-se antes disso a intensidade de emissão na ausência de peróxido durante 10 s, para a obtenção de uma linha base. A intensidade de emissão de quimiluminescência foi monitorada com o espectrofluorímetro Varian Eclipse; 100 s após o início da reação foi adicionado a solução estoque do composto antirradicalar, observando-se a diminuição drástica da intensidade de emissão, devido ao sequestro dos radicais formados durante a reação pelo antirradical e a consequente inibição da reação quimiluminescente (Esquema 16). Após diferentes tempos de inibição observa-se o reestabelecimento da emissão com intensidade similar à medida antes da adição da amostra de antirradical, indicando o consumo das moléculas do AOH. As cinéticas de reação foram medidas, em regra, por um tempo total de 1200 s e a intensidade emissão foi registrada em unidades arbitrárias (u.a.) (Figura 23). A partir destas curvas cinéticas (Figura 23) foi possível se obter a área de supressão da emissão causada pela adição do composto antirradicalar que corresponde à diferença entre a emissão total na ausência e na presença do aditivo. Esta área de supressão deve ser proporcional ao número de radicais sequestrados pelo antirradical e com isso depender da sua concentração e da sua capacidade antirradicalar.

Esquema 16: Reação simplificada da quimiluminescente do luminol na presença de um antioxidante.

Figura 23: Cinética de decaimento da intensidade de emissão do sistema luminol/H₂O₂/hemina em tampão fosfato pH 11,6 a 25 °C com a adição de diferentes quantidades de extratos e frações.

A partir das curvas cinéticas medidas foram determinadas as áreas de supressão obtidas pela adição de diferentes concentrações das soluções estoque dos extratos e das frações cromatográficas. A correlação linear entre a área de supressão e a concentração do aditivo leva à obtenção do coeficiente linear (α) o qual é comparado com o coeficiente do composto de referência (trolox), determinando-se assim a capacidade antirradicalar relativa (Figura 24).

Figura 24: Correlação linear entre a variação da área de supressão de luz e a concentração de antirradical do sistema luminol/ H_2O_2 /hemina em tampão fosfato pH 11,6 a 25 °C:

Tabela 2: Capacidade antirradicalar dos extratos e frações de *Baccharis regnelli* determinados utilizando-se o ensaio quimiluminescente com luminol.

Amostra	α (u.a.·L·mg ⁻¹) x 10 ⁻⁴	% trolox ^a	TRAP (mg.L ⁻¹) ^b
Trolox	7,16 ± 0,07	100 ± 1	-
Extrato A	3,6 ± 0,2	51 ± 3	0,49 ± 0,03
Extrato B	4,2 ± 0,4	59 ± 5	0,43 ± 0,04
Fração 1	0,97 ± 0,03	13,6 ± 0,4	1,84 ± 0,06
Fração 2	2,8 ± 0,2	38,6 ± 2,1	0,65 ± 0,07
Fração 3	3,97 ± 0,05	55,4 ± 0,7	0,45 ± 0,03
Fração 4	8,0 ± 1	112 ± 16	0,22 ± 0,03
Fração 5	11 ± 2	155 ± 24	0,16 ± 0,02
Fração 6	7,62 ± 0,78	107 ± 11	0,23 ± 0,02
Fração 7	11,4 ± 0,8	160 ± 12	0,16 ± 0,01
Fração 8	15 ± 2	207 ± 28	0,12 ± 0,02

^a **Porcentagem Trolox** – capacidade antirradicalar medida diretamente em relação ao padrão trolox (100%).

^b **TRAP (“Total Radical Antioxidant Parameter”)** – concentração de antirradical em mg.L⁻¹ com área de supressão equivalente à área de supressão do trolox na concentração de 1 µmol.L⁻¹.

O estudo da capacidade antirradicalar foi realizado em intervalos de concentração idênticos para todas as frações e extratos, permitindo uma melhor comparação dos valores de capacidade antirradicalar. Os extratos e frações analisados eram misturas complexas de várias substâncias; portanto foi necessário utilizar uma metodologia adequada para determinação da capacidade antirradicalar. Para melhor analisar a atividade antirradicalar dessas frações, foi desenvolvida a determinação da atividade antirradicalar expressa em porcentagem de trolox (%_T), a partir da comparação direta dos coeficientes angulares obtidos das correlações lineares entre o antirradical e o trolox; neste método há a vantagem do resultado da atividade antirradicalar ser diretamente proporcional à atividade antirradicalar do padrão trolox, no entanto no método TRAP, quanto menor for a concentração de antirradical referente a área de supressão do trolox 1µmol·L⁻¹ maior a sua capacidade antirradicalar.

Para comparar os resultados, além do percentual trolox foi usado o método do parâmetro de sequestro total de radicais (TRAP) para determinar a capacidade antirradicalar.²²

Os maiores valores de atividade antirradicalar obtidos no estudo cinético dos extratos e frações foram observados nas frações 5, 7 e 8, indicadas pelas maiores porcentagens de trolox, e consequentemente, os menores valores de TRAP.

4.4. Determinação da atividade antirradicalar utilizando o sistema DPPH• em meio ácido.

Compostos fenólicos, principalmente os flavonoides, são amplamente encontrados na natureza e responsáveis pela maioria das colorações azuis, violeta e vermelho das flores e frutos, sendo sua principal utilização na indústria, como corante natural. As antocianinas pertencem à classe dos flavonoides e apresentam atividade antirradicalar devido a sua estrutura química formada por três anéis, com ligações duplas conjugadas e hidroxilas distribuídas ao longo da estrutura que possibilitam o sequestro de radicais livres, que podem causar danos celulares e doenças degenerativas; nesse contexto, apresentam notável atividade anticarcinogênica e antiangiogênica. As antocianinas podem apresentar diferentes formas estruturais, as quais podem assumir diferentes colorações. Essas formas podem sofrer interferências de diversos fatores, destacando-se entre estes a temperatura, o valor do pH e possíveis ligações com outras substâncias químicas. Dados da literatura³⁸ indicam que podem ocorrer quatro estruturas químicas principais em equilíbrio no meio: o cátion flavílio, a base quinoidal, o carbinol pseudobase e a chalcona (Esquema 17).

Com o objetivo de estudar a atividade antirradicalar de alguns derivados fenólicos em meio ácido utilizando-se o sistema de DPPH•,³⁴ foram inicialmente realizados ensaios em etanol (padrão), etanol com 1% em volume de ácido acético glacial e etanol com 10 % de água e 1% em volume de ácido acético glacial. A reação do radical estável DPPH• com compostos antirradicalares em diferentes concentrações foi monitorada espectrofotometricamente observando-se a variação da absorbância do DPPH• em 515 nm.

Esquema 17: Principais espécies de antocianinas produzidas no equilíbrio.

Todas as curvas cinéticas obtidas nestas condições de reação mostram o comportamento típico do ensaio DDPH observado nas condições padrão em etanol, ou seja, decaimento rápido da absorbância, seguido até certo valor que se mantém constante no restante do período de observação. A variação da absorbância (ΔAbs) em função da concentração do composto antirradicalar mostrou correlação linear; do coeficiente linear desta correlação obtém-se a capacidade antirradicalar relativa em comparação com o valor da referência trolox obtido nas condições padrão em etanol (Figuras 25 e 26).

Figura 25: Variação da absorbância ($\lambda = 515 \text{ nm}$) em função do tempo na reação entre DPPH• ($80 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e trolox ($10 - 30 \mu\text{mol.L}^{-1}$), a 25°C . (A) em etanol; (B) em etanol com 1% HOAc; (C) em etanol com 1% HOAc e 10% H₂O.

De acordo com as curvas de decaimento da absorbância obtidas, foi verificada uma redução significativa na velocidade de reação na adição de ácido acético em 1% no volume em meio etanólico (Figura 25B). No experimento com 1% de ácido acético e 10% de água em volume, há também uma redução na velocidade de reação, porém, menos significativa (Figura 25C). Em ambos os casos a variação total de absorbância é idêntica àquele observada na reação padrão (Figura 25A), o que pode ser verificado pela similaridade dos coeficientes angulares obtidos da correlação linear em cada caso (Figura 26).

Figura 26: Correlação linear de $\Delta \text{Abs.}$ do DPPH• ($80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) com a concentração de trolox ($10 - 30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) a 25°C .

(A) em etanol; (B) em etanol com 1% HOAc; (C) em etanol com 1% HOAc e 10% H₂O.

Os dados obtidos anteriormente através da variação da absorbância em função do tempo dos fenóis estudados em meio ácido (Figura 25), também foram utilizados para se obter correlações diretas entre a concentração do composto antirradicalar e a variação da concentração do DPPH•, determinando-se o número de radicais sequestrados por molécula de antirradical (n^*) (Figura 27).

A avaliação do comportamento da atividade antirradicalar em meio ácido e em solvente hidroalcoólico para o catecol foi efetuada de maneira análoga que para o trolox (Figura 28). Observou-se uma maior redução na velocidade de reação na presença de 1% de ácido acético comparado com o meio de etanol puro. Porém, na presença de ácido acético e 10% de água a velocidade se mostrou maior. O coeficiente angular da correlação linear em meio ácido mostrou-se significativamente menor no meio contendo somente ácido acético; quando tem também água presente o coeficiente é mais próximo ao do em condições padrão (Figura 29B).

Figura 27: Correlação linear entre a variação da concentração do DPPH• e a concentração inicial do trolox em etanol ($\lambda = 515 \text{ nm}$) a 25°C .

(A) em etanol; (B) em etanol com 1% HOAc; (C) em etanol com 1% HOAc e 10% H₂O.

Figura 28: Variação da absorbância ($\lambda = 515 \text{ nm}$) em função do tempo na reação entre DPPH• ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e catecol ($10 - 30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) a 25°C .

(A) em etanol; (B) em etanol com 1% HOAc; (C) em etanol com 1% HOAc e 10% H₂O.

Figura 29: Correlação linear de $\Delta \text{Abs.}$ do DPPH• ($80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) com a concentração de catecol ($10 - 30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) a 25°C .

(A) em etanol; (B) em etanol com 1% HOAc; (C) em etanol com 1% HOAc e 10% H₂O.

Figura 30: Correlação linear entre a variação da concentração do DPPH• e a concentração inicial do catecol em etanol ($\lambda = 515 \text{ nm}$) a 25°C .

(A) em etanol; (B) em etanol com 1% HOAc; (C) em etanol com 1% HOAc e 10% H₂O.

Nos experimentos com quercetina foi observado um aumento da velocidade de reação, tanto em meio ácido quanto com 10% de água (Figura 31).

Figura 31: Variação da absorbância ($\lambda = 515 \text{ nm}$) em função do tempo na reação entre DPPH• ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e quercetina ($5 - 15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) a 25°C . (A) em etanol; (B) em etanol com 1% HOAc; (C) em etanol com 1% HOAc e 10% H₂O.

As curvas obtidas da quercetina (Figura 31) em meio ácido e com solvente hidroalcoólico indicaram a presença de mais de uma espécie com capacidade antirradicalar, porém as correlações lineares não sofreram alterações significativas, o que significa que a variação da absorbância total não foi alterada em função do pH e o solvente (Figura 32).

Figura 32: Correlação linear de $\Delta \text{Abs.}$ do DPPH• ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) com a concentração de quercetina ($5 - 15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) a 25°C . (A) em etanol; (B) em etanol e HOAc 1%. (C) em etanol, HOAc 1% e 10% H₂O.

Figura 33: Correlação linear entre a variação da concentração do DPPH• e a concentração inicial da quercetina ($5 - 15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) a 25°C ($\lambda = 515 \text{ nm}$). (A) em etanol; (B) em etanol com 1% HOAc; (C) em etanol com 1% HOAc e 10% H₂O.

4.5. Determinação da atividade antirradicalar utilizando o sistema DPPH• em meio aquoso com pH controlado.

4.5.1. Determinação da atividade antirradicalar com o sistema DPPH• com variação na quantidade de água.

Com a finalidade de verificar eficiência do método DPPH• com maiores teores de água junto ao solvente (etanol) foram registrados espectros de absorção de soluções de DPPH• ($80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) em meios com diferentes quantidades de água (Figura 34), e efetuados ensaios de capacidade antirradicalar com trolox e quercetina nestes meios (Figuras 35 e 36). O objetivo desses ensaios foi verificar a viabilidade do método em meios aquosos tamponados, visando efetuar futura determinação da capacidade antirradicalar de substâncias em meios com valores de pH controlados, para verificar a variação desta grandeza com o estado de ionização das substâncias.

Figura 34: Espectros de absorção de DPPH• ($80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) em diferentes misturas etanol - água.

Tabela 3: Máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) e absorbância máxima ($A_{\lambda_{\text{máx}}}$) de DPPH• ($80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) em diferentes misturas etanol - água.

Meio	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$A_{\lambda_{\text{máx}}}$
Etanol (padrão)	515	0,870
20% H ₂ O	522	0,839
30% H ₂ O	522	0,853
40% H ₂ O	524	0,871
50% H ₂ O	525	0,851

Os espectros de absorção mostram um pequeno deslocamento batocrômico do máximo de absorbância de 515 nm para cerca de 523 nm (Tabela 4). Entretanto, este deslocamento não inviabiliza os ensaios cinéticos da reação do DPPH• com os compostos antirradicais, que foram observadas também nestes meios em 515 nm (Figura 35).

Figura 35: Variação da absorbância ($\lambda = 515 \text{ nm}$) em função do tempo na reação entre DPPH• ($80 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e trolox ou quercetina em misturas etanol – água, a 25°C .

Figura 36: Correlação linear entre a $\Delta \text{ Abs. (515 nm)}$ e a concentração de trolox ou quercetina na reação entre DPPH• ($80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) e trolox ou quercetina em misturas etanol – água, a 25°C .

Não houve alterações significativas nos coeficientes angulares da correlação entre a variação de absorbância e a concentração de trolox, porém, no caso da quercetina houve um aumento no coeficiente angular quando são usados 50% de água (Figura 36) em comparação com o resultado observado em etanol (veja Figura 18E, p.45).

4.5.2. Determinação da atividade antirradicalar de espécies em meios tamponados.

A quercetina, um flavonoide presente em vegetais e frutas, encontrada em vários alimentos, apresenta diferentes valores de pK_a , correspondendo à desprotonação nas posições **C3**, **C4'** e **C7** (Figura 6, p.17). Na ocorrência de desprotonação na posição **C7** há a deslocalização da carga negativa entre os anéis A e C (Esquema 18A). Quando ocorre a desprotonação na posição **C4'**, a estrutura é estabilizada pela ligação de hidrogênio que é estabelecido pelo grupo hidroxila na posição **C3'** e pela ressonância entre os anéis B e C (Esquema 18B). A presença de grupos hidroxila em *orto* é um fator importante para a estabilização da base correspondente. Há também influência da insaturação no anel C; a presença do grupo hidroxila em **C3**; e conjugação com o grupo hidroxila em **C5**. A doação do $H^\bullet$ na reação com DPPH ocorre principalmente nas posições **7-OH** > **4'-OH** > **3-OH**, seguindo a sequência das constantes de ionização.¹⁴ Os flavonoides, devido ao seu caráter fracamente ácido, geralmente encontram-se parcialmente ionizados nas posições **C7** ou **C4'** (Esquema 18). Na formação de um ânion radical pela perda de um $H^\bullet$, a partir do fenolato formado nas posições **C7** ou **C4'**, ocorre estabilização do radical pela ressonância através dos anéis A, B e C (Esquema 19).⁴

Esquema 18: Estruturas de ressonância do íon fenóxido formado: A) a partir da perda de um próton do grupo 7-OH; B) a partir da perda de um próton do grupo 4'-OH.

Esquema 19: Estruturas de ressonância do ânion-radical formado a partir da perda de hidrogênio: A) na posição C4' do íon fenóxido em C7; B) na posição C7 do íon fenóxido em C4'.

Com a finalidade de verificar a eficiência do método DPPH• em meios aquosos tamponados e identificar a atuação das diferentes espécies da quercetina, foram efetuados ensaios da reação entre o DPPH• e quercetina em meios tamponados com diferentes valores de pH. Para isso foram inicialmente medidas os espectros de absorção do DPPH• ($80,0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em solução tampão água / etanol 1:1 em volume (Figura 37).

Figura 37: Espectro de absorção de DPPH• ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em meio de água / etanol 1:1 em volume.

Tabela 4: Máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) e absorbância máxima ($A_{\lambda_{\text{máx}}}$) de DPPH• (80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em meio de água / etanol 1:1 em volume.

Meio	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$A_{\lambda_{\text{máx}}}$
Etanol	515	0,790
pH 5,0	555	0,656
Água (50%)	539	0,733
pH 8,0	550	0,695
pH 10,0	539	0,748
pH 11,6	532	0,743

Houve deslocamento significativo do máximo de absorção do DPPH• em meios com 50 % de água com diferentes valores de pH, comparados ao espectro obtido em etanol (Figura 37). O maior deslocamento e a menor absorbância do pico máximo próximo à leitura padrão do DPPH• (515 nm) ocorre em pH 5 (Tabela 4). Os espectros de absorção em meio tamponado se mostram similares ao obtido em etanol; contudo, observa-se a formação de um ombro próximo a 430 nm em pH 11,6 e em 700 nm em pH 5,0 e 8,0 (Figura 37).

Foram inicialmente realizados ensaios antirradicais com quercetina em meios etanol água (1:1) tamponados nos valores de pH 5,0 e 8,0 (Figura 38). Em pH 5,0 e em meio etanol água (50 %) foram observadas curvas cinéticas regulares que permitiram determinar a variação da absorbância e obter a correlação linear desta variação em função da concentração do aditivo (Figura 39 A e B). Porém, para os meios com valores de pH alcalino (8,0) e nas mesmas condições experimentais anteriores, as curvas cinéticas observadas não indicaram dependência da variação da absorbância com a concentração do aditivo (Figura 38 C), não permitindo a obtenção da correlação entre a variação da absorbância final com a concentração da quercetina (Figura 39 C).

Figura 38: Variação da absorbância ($\lambda = 515 \text{ nm}$) em função do tempo na reação de DPPH• ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) com quercetina em etanol / água 1:1, a 25°C .

Avaliando a curva da absorbância do DPPH• sem a adição de quercetina em função do tempo, observa-se que não houve variação significativa da absorbância até o término de experimento que inviabilizasse a utilização deste ensaio nestas condições experimentais (Figura 38).

Figura 39: Correlação linear da Δ Abs. final (515 nm) com a concentração inicial da quercetina na reação de DPPH• ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) com quercetina em etanol / água 1:1, a 25°C .

Nos ensaios realizados não houve alteração do coeficiente α da correlação linear das reações medidas em pH 5,0 e (Figura 39A) e em pH $\sim 7,0$ não tamponado (Figura 39B), porém em pH 8,0 não foi possível verificar a correlação linear (Figura 39C), houve pequena variação na absorbância no intervalo de concentração utilizado (Figura 38C).

Para avaliar o comportamento da quercetina frente às soluções-tampão utilizadas, foram obtidos espectros de absorção (Figura 40) nas respectivas soluções-tampão com 50% em volume em etanol com quercetina ($9,0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

Figura 40: Espectro de absorção de quercetina ($9,0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em etanol com 50% soluções-tampão ou 50% de água.

A análise do espectro de absorbância (Figura 40) demonstra comportamento semelhante nas curvas referentes a pH ~7,0 (meio não tamponado) e em pH 5,0, demonstrando pico máximo de absorção em ~370 nm, nos demais pH's há desvios significativos; i) em pH 8,0 há deslocamento no pico máximo de absorção para ~380 nm e desenvolve um ombro em ~320 nm; ii) nos pH's 10,0 e 11,6 surge um pico máximo em ~320 nm e aparece um ombro em ~370 nm. Estas divergências podem estar relacionadas com alteração na absorção da reação entre o DPPH• e a quercetina (Figura 38C) demonstrando interações entre a quercetina e o solvente.

5. Discussão

5.1. Determinação da atividade antirradicalar utilizando-se DPPH• e ABTS⁺•

A atividade antirradicalar de alguns compostos fenólicos (Esquema 22), foi medida a partir do ensaio com o radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•),³⁴ onde a perda da intensidade da cor da solução púrpura do radical estável DPPH• (Esquema 20) é proporcional à atividade antirradicalar. Para obtenção dos dados, foi realizado um acompanhamento espectrofotométrico em 515 nm, medindo a variação das concentrações do DPPH• através da reação dos antirradicais em intervalo de tempo suficiente até a absorbância permanecer constante; permitindo a correlação da variação da absorbância (Δ Abs) em função de cada concentração de antirradical. A partir desses valores foram estabelecidas as respectivas atividades antirradicalares.

Esquema 20: Reação entre o radical DPPH• e um composto antioxidante AOH.

Para comparar os resultados obtidos com o sistema DPPH• foram efetuados experimentos utilizando-se o radical ABTS⁺•¹⁹. O ensaio é baseado na perda da intensidade da cor da solução verde do cátion radical ABTS⁺•, após a reação com um composto antirradicalar (AOH) (Esquema 21).

Esquema 21: Reação entre o cátion radical ABTS $\cdot^+$ e um composto antioxidante AOH.

Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico)

Catecol (1,2-diidroxibenzeno)

Quercetina (3,5,7,3',4'-pentaidroxiflavona)

Hidroquinona (1,4-diidroxibenzeno)

Ácido ascórbico ((5*R*)-5-[(1*S*)-1,2-diidroxietil]-3,4-diidroxifuran-2(5*H*)-ona)

Rutina (5,7,3',4'-tetraidroxiflavonol-3-O-rutinosídeo triidratada)

Resorcinol (1,3-diidroxibenzeno)

Pirogalol (1,2,3-triidroxibenzeno)

Esquema 22: Compostos fenólicos estudados.

A reação entre o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e o composto antirradicalar (AOH) foi acompanhado pela variação da absorbância do radical a 734 nm, a qual é proporcional à concentração de antirradical, permitindo também uma correlação da variação da absorbância (ΔAbs) em função de cada concentração de antirradical. Para cada antirradical estudado, o coeficiente linear (α) obtido foi comparado ao composto de referência (trolox), desta maneira obtendo-se a capacidade antirradicalar.

As curvas cinéticas obtidas demonstraram uma boa correlação entre a variação da absorbância e a concentração de antirradical, tanto para ensaios com $\text{DPPH}^{\bullet}$, quanto com $\text{ABTS}^{\bullet+}$, resultando valores de n^* absolutos reprodutíveis (Tabela 5)

Tabela 5: Valores para a atividade antirradicalar de alguns derivados fenólicos determinados pelos métodos com o radical estável de $\text{DPPH}^{\bullet}$ e com $\text{ABTS}^{\bullet+}$.

Substância	n^* absoluto $\text{DPPH}^{\bullet}$	n^* absoluto $\text{ABTS}^{\bullet+}$	n^* absoluto ³¹	n^* Literatura ($\text{DPPH}^{\bullet}$)
Trolox (padrão)	$2,04 \pm 0,05$	$2,04 \pm 0,05$	2,0	$2,0^{39}$
Ácido ascórbico	$2,08 \pm 0,05$	$1,55 \pm 0,03$	-	$1,85^{40}$
Catecol	$2,17 \pm 0,05$	$1,96 \pm 0,04$	3,8	-
Rutina	$1,91 \pm 0,04$	$2,58 \pm 0,06$	-	-
Quercetina	$4,4 \pm 0,1$	$5,2 \pm 0,1$	-	$3,8^{39}$
Hidroquinona	$1,73 \pm 0,04$	$2,3 \pm 0,1$	1,4	-
Pirogalol	$4,1 \pm 0,1$	$5,7 \pm 0,1$	4,5	-

A Tabela 5 apresenta a síntese dos resultados comparando a atividade antirradicalar dos compostos fenólicos estudados (Esquema 23) e o padrão trolox a partir do cálculo do número absoluto de radicais sequestrados pelo antirradical (n^*) e podemos observar a similaridade dos resultados com $\text{DPPH}^{\bullet}$ e $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Quando os resultados deste trabalho foram comparados com os obtidos anteriormente pelo grupo de pesquisa³¹ e na literatura, há boa correlação nos valores de n^* , onde a maior atividade antirradicalar foi observada na quercetina.

5.2. Determinação da atividade antirradicalar de frações e extratos de *Baccharis*, utilizando a quimiluminescência do Luminol.

Para a determinação da atividade antirradicalar dos extratos de *Baccharis* e suas frações foi primeiramente utilizado o método com o radical estável DPPH•. Os resultados iniciais obtidos nos experimentos cinéticos da reação entre DPPH• e extrato, mostraram que a sensibilidade desta metodologia não é suficiente para esta aplicação (Figura 41A). Ainda foi medido o espectro de absorção dos extratos para verificar uma possível banda de absorção que pudesse interferir na medida de absorbância para o acompanhamento da reação, conforme mostrado para o extrato A (Figura 41B). Diante desse resultado, decidiu-se utilizar o ensaio baseado na reação quimiluminescente do luminol com peróxido de hidrogênio e catalisada por hemina, desenvolvida e estabelecida pelo nosso grupo de pesquisa, para quantificar a capacidade antirradicalar das frações e extratos de *Baccharis regnelli* (Esquema 23).⁵

Figura 41: A: cinética da reação entre DPPH• (80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e Extrato A em etanol a 25 °C, observada em $\lambda = 515 \text{ nm}$. B: espectro de absorção do extrato A em etanol a 25 °C.

Esquema 23: Reação simplificada da quimiluminescente do luminol na presença de um antioxidante.

Os ensaios de atividade antirradicalar das frações cromatográficas e extratos revelaram boa correlação linear da variação da área de supressão de luz em função da concentração de antirradicais comparativas ao composto de referência (trolox). Determinou-se assim a capacidade antirradicalar relativa para cada fração e os extratos A e B, as quais foram convertidas em valores de porcentagem de trolox (%_T) para uma melhor avaliação. Neste caso, os resultados expressos em porcentagem trolox permitiu uma comparação rápida da atividade antirradicalar das misturas em relação ao padrão trolox em função do valor em porcentagem ser diretamente proporcional a atividade antirradicalar, ou seja, quanto maior o coeficiente angular α , maior o valor em porcentagem trolox, e consequentemente maior a atividade antirradicalar. Este comportamento é contrário ao mostrado dos valores expressos pelo método TRAP; neste caso, o valor obtido é inversamente proporcional à correlação linear, assim quanto menor for o valor de TRAP, maior a atividade antirradicalar.

Os resultados da atividade antirradicalar observados pela comparação direta em porcentagem trolox (Tabela 6) e através dos valores de TRAP (parâmetro de sequestro total de radicais)²², indicam uma concentração maior de compostos fenólicos com atividade antirradicalar nas frações 5, 7 e 8.

Tabela 6: Capacidade antirradicalar dos extratos e frações de *Baccharis regnelli* determinados utilizando-se o ensaio quimiluminescente com luminol e compostos isolados e identificados a partir destas frações.

Amostra	% trolox	Compostos Isolados
Extrato A	51 ± 3	/
Extrato B	59 ± 5	/
Fração 1	13,6 ± 0,4	/
Fração 2	38,6 ± 2,1	/
Fração 3	55,4 ± 0,7	1
Fração 4	112 ± 16	2
Fração 5	155 ± 24	/
Fração 6	107 ± 11	/
Fração 7	160 ± 12	3 e 4
Fração 8	207 ± 28	/

A extração e o isolamento dos extratos e frações (Esquema 24) foram realizados no Laboratório do Centro de Ciências e Humanidades e Centro de Ciências e Biológicas e da Saúde da Universidade Presbiteriana Mackenzie; onde foram obtidos a partir da dissolução do pó produzido através da trituração das folhas de *Baccharis* secas e desengorduradas com n-hexano (3 x 250 mL) a pasta obtida foi submetida posteriormente à extração com MeOH (15 x 300 mL) à temperatura ambiente.

O extrato metanólico bruto (Extrato A – Tabela 6) foi suspenso em MeOH/H₂O 09:01 e sucessivamente particionado com CH₂Cl₂, AcOEt e n-BuOH. A partição em AcOEt (Extrato B – Tabela 6) foi submetido a filtração em sílica gel C18 sucessivamente eluída com H₂O, H₂O/MeOH, MeOH, MeOH/AcOEt, AcOEt e DCM, originando seis frações (A1-A6). A fração A1 (270 mg) foi submetido à filtração em gel em Sephadex LH-20 eluída com MeOH, fornecendo dezenove frações, que foram agrupadas em oito grupos (frações 1 a 8 – Tabela 6).

A partir destas frações, com base nos seus valores de capacidade antirradicalar (Tabela 6), o grupo de pesquisa do Mackenzie conseguiu identificar quatro compostos, os quais foram caracterizados por espectroscopia de RMN de ¹H ¹³C, além de espectrometria de massas acoplada a CLAE (CLAE-MS). Das frações 3 e 4 foram isolados em forma pura os compostos **1** e **2**, respectivamente,

identificados por seus espectros de RMN de ^1H ^{13}C (Tabela 6, Figura 42). A partir da fração 7, com capacidade antirradicalar alta, foi possível identificar os compostos **3** e **4** (Figura 42) por CLAE-MS, porém, não conseguiu obter os compostos puros. Não foi possível até o momento isolar e identificar compostos a partir das frações altamente ativas 5 e 8.

Ferulato de 4'-O- β -D-glucopiranosil-3',5'-dimetoxibenzoíla (**1**)

Cafeato de 4'-O- β -D-glucopiranosil-3',5'-dimetoxibenzoíla (**2**)

ácido 3,5-O-dicafeoilquinico (**3**)

ácido 3-O-feruloil-5-O-cafeoilquinico (**4**)

Figura 42: Estruturas dos compostos isolados e caracterizados das frações cromatográficas.

Esquema 24: Fluxograma do fracionamento do extrato de folhas de *Baccharis regnelli*, onde os extratos e frações foram submetidas à determinação da capacidade antirradicalar.

5.3. Determinação da atividade antirradicalar utilizando o sistema DPPH• em meio ácido.

Na determinação da atividade antirradicalar de alguns derivados fenólicos, especialmente as antocianinas pertencentes à classe dos flavonoides, devido a sua estrutura química, com ligações duplas conjugadas e hidroxilas distribuídas ao longo da estrutura podem apresentar diferentes formas estruturais, as quais sofrem influência do pH. Para garantir a integridade da sua estrutura química formada por três anéis foram realizados estudos cinéticos utilizando-se o sistema de DPPH• em meio ácido.

Os dados obtidos através das curvas de decaimento da absorbância do DPPH• em função do tempo de alguns fenóis foram utilizados para se analisar correlações lineares entre a variação da absorbância e a variação da concentração do DPPH• em função da concentração do de antirradical; verificamos que tanto os coeficientes lineares, quanto os números absolutos de radicais sequestrados por molécula de antirradical (n^*) (Tabela 7), são compatíveis com os resultados obtidos no ensaio em meio etanólico padrão.

Tabela 7: Valores da capacidade antirradicalar de derivados fenólicos determinados pelo método de DPPH• em diferentes meios de reação.

Anti-radical	α (L x μmol^{-1})	n^* absoluto
Trolox – Padrão	0,024 $\pm$ 0,001	2,16 $\pm$ 0,05
Trolox – 1% HOAc	0,021 $\pm$ 0,001	1,92 $\pm$ 0,04
Trolox – 1% HOAc e 10% H₂O	0,023 $\pm$ 0,001	2,15 $\pm$ 0,05
Catecol – Padrão	0,026 $\pm$ 0,001	2,38 $\pm$ 0,05
Catecol – 1% HOAc	0,019 $\pm$ 0,001	1,74 $\pm$ 0,04
Catecol – 1% HOAc e 10% H₂O	0,023 $\pm$ 0,001	2,13 $\pm$ 0,05
Quercetina – Padrão	0,047 $\pm$ 0,001	4,4 $\pm$ 0,1
Quercetina – 1% HOAc	0,040 $\pm$ 0,001	3,61 $\pm$ 0,08
Quercetina – 1% HOAc e 10% H₂O	0,040 $\pm$ 0,001	3,65 $\pm$ 0,08

A avaliação do comportamento da atividade antirradicalar do trolox em meio ácido e em solvente hidroalcoólico demonstra que não há variação significativa em relação ao padrão, no caso do catecol houve redução na atividade antirradicalar com 1% de ácido acético, com 1% de ácido acético e 10% de água houve redução discreta, na quercetina também houve redução discreta da atividade antirradicalar. Portanto, esses resultados observados nos compostos estudados revelaram que o método é viável, e pode ser usado em compostos que alteram a sua estrutura em diferentes faixas de pH.

5.4. Determinação da atividade antirradicalar utilizando o sistema DPPH• em meio aquoso com pH controlado.

5.4.1. Determinação da atividade antirradicalar com o sistema DPPH• com variação na quantidade de água.

Na determinação da atividade antirradicalar em solvente hidroalcoólico não foram observadas alterações significativas nos coeficientes angulares da correlação entre a variação de absorbância e a concentração de trolox, utilizando-se misturas etanol / água contendo até 50 % de água (v:v) (Tabela 8). Porém, nos estudos utilizando-se quercetina como composto antirradicalar foi observado um aumento no coeficiente angular quando são usados 50% de água em comparação com o resultado observado em etanol (Tabela 8). Esse estudo tem a finalidade de viabilizar o ensaio em meio tamponado, especialmente para compostos polifenólicos que apresentam valores de pK_a variados, em função de diferentes posições para protonação, possibilitando analisar a capacidade antirradicalar característica de cada espécie, de acordo com a faixa de pH.

Tabela 8: Valores da capacidade antirradicalar de trolox e quercetina pelo método de DPPH• em meio hidroalcoólico.

Condições	Trolox ($\alpha \text{ L x } \mu\text{mol}^{-1}$)	Quercetina ($\alpha \text{ L x } \mu\text{mol}^{-1}$)
Padrão	0,020 $\pm$ 0,001	0,048 $\pm$ 0,001
20% H₂O	0,025 $\pm$ 0,001	-
30% H₂O	0,022 $\pm$ 0,001	-
40% H₂O	0,021 $\pm$ 0,001	-
50% H₂O	0,021 $\pm$ 0,001	0,070 $\pm$ 0,002

Os resultados da Tabela 8 demonstram que o trolox manteve a sua capacidade antirradicalar nas diferentes quantidades de água em etanol, contudo no caso da quercetina houve um aumento significativo na capacidade antirradicalar com 50% de água em etanol. Dessa forma o método pode ser usado em misturas variadas de etanol e água, obtendo-se bons resultados.

5.4.2. Determinação da atividade antirradicalar de espécies em meios tamponados.

Alguns polifenóis e antocianinas alteram a estrutura conforme o pH do meio.³⁸ Por exemplo, a quercetina é um flavonoide que possui 5 grupos hidroxila que podem ser dissociados, apresenta desta maneira, a priori, cinco valores de pK_a . Os valores de pK_a da quercetina foram determinados por vários grupos de pesquisa^{41, 42, 43, 44}, obtendo-se inclusive valores discrepantes. Em um recente estudo, Grzegorz Litwinienko e colaboradores atribuíram os valores de pK_a obtidos experimentalmente para a quercetina através da titulação espectrofotométrica, a dissociação dos diferentes grupos fenólicos usando-se espectroscopia de RMN de ^{13}C .¹⁴ Estes estudos, a pesar de não totalmente conclusivos, indicaram que o hidrogênio mais ácido da quercetina deve ser o da posição 7, e o segundo mais ácido da posição 4', seguido pelo próton do OH na posição 3 (Figura 43).

Figura 43: Valores de pK_a nas posições: C7 (pK_{a1}) C4' (pK_{a2}) e C3 (pK_{a3}) de quercetina.

Em vista disso, foram efetuados ensaios da reação entre o DPPH• e quercetina em meios tamponados com diferentes valores de pH. Inicialmente efetuamos espectros de absorção do DPPH• ($80,0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) em solução tampão de água e etanol 1 : 1, em volume. Embora os espectros nos diferentes valores de pH sofreram desvios em relação ao espectro padrão (etanol) há um pico característico

de absorção próximo a 515 nm, que não mostra alteração significativa e permite a observação do branqueamento do radical DPPH• pela reação com do composto antirradicalar (vide Figura 40, Resultados, p. 72).

Nos estudos da reação de quercetina com o radical DPPH• em etanol e água (1:1) e em pH 5,0 observou-se curvas cinéticas regulares, semelhantes aos medidos no ensaio em condições padrão. Além disso, a variação da absorbância em função da concentração da quercetina mostrou uma boa correlação linear, permitindo a obtenção do valor de n^* nesta condição experimental. No entanto, em meio alcalino (pH = 8,0) nas mesmas condições experimentais, não foi obtida boa correlação linear entre a variação da absorbância e a concentração do aditivo (Figura 39C, Resultados, p. 71). Desta maneira não foi possível obter um valor de n para a capacidade antirradicalar da quercetina nesta condição experimental (Tabela 9).

Tabela 9: Valores da capacidade antirradicalar de trolox e quercetina obtidos pelo método de DPPH• em meio hidroalcoólico em diferentes valores de pH.

pH	Quercetina (α L x μmol^{-1})
5,0	$0,071 \pm 0,002$
~7,0	$0,071 \pm 0,002$
8,0	^a

^a Não foi possível obter correlação linear entre a [quercetina] e ΔAbs .

Nos ensaios realizados não houve alteração do coeficiente α da correlação linear das reações medidas em pH 5,0 (Figura 39A Resultados, p. 71) e em pH ~7,0 não tamponado (Figura 39B, Resultados, p. 71), porém em pH 8,0 não foi possível se obter uma correlação linear (Figura 39C, Resultados, p. 71). Nestas condições houve pequena variação da absorbância no intervalo de concentração de quercetina utilizado (Figura 38C, Resultados, p. 70).

Para entendermos o comportamento da quercetina em relação às soluções-tampão utilizadas, foram obtidos espectros de absorção da quercetina ($9,0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) nas respectivas soluções-tampão com 50% em volume em meio etanólico. (Figura 40, Resultados, p. 72)

A semelhança dos espectros obtidos em pH 5,0 e pH ~7,0 (meio não tamponado) indica que as mesmas espécies estão presentes nestas condições (Figuras 38A, 38B, 39A e 39B Resultados, p. 70, 71). Tendo em vista que o primeiro pK_a da quercetina foi determinado como $pK_{a1} = 6,72$ na literatura⁴⁵, devendo tratar-se da espécie totalmente protonada. Pode haver aqui um efeito do solvente que deverá aumentar o valor do pK_a , tendo em vista que o nosso experimento foi efetuado em meio de etanol e água 1:1.

O espectro obtido em pH 8,0 mostra o deslocamento do pico máximo de absorção de ~370 nm para ~390 nm e o aparecimento de um ombro em ~323 nm. Neste caso deve estar presente no meio de reação principalmente a espécie mono-desprotonada com certa contribuição da espécie bidesprotonada ($pK_{a2} = 9,02$), aparentemente indicado pelo aparecimento do ombro em ~323 nm (Figura 40, Resultados, p. 72). Esta banda em ~323 nm virá a ser a banda principal do espectro da quercetina nos pH's 10,0 e 11,6, indicando que esta absorção corresponde principalmente à espécie bidesprotonada. Nestes espectros não foi possível identificar uma banda de absorção que poderia corresponder à espécie tridesprotonada ($pK_{a3} = 11,55$), que já poderia estar presente em uma certa concentração nesta condição.

Este estudo da influência do pH sobre o espectro de absorção da quercetina mostra que não ocorre, em nenhum valor de pH estudado, uma sobreposição do espectro de absorção da quercetina com a banda de absorção do radical DPPH•, indicando que, em princípio este método deveria ser viável também em condições de ensaio mais básicos. Neste sentido devem-se efetuar mais experimentos para verificar condições experimentais adequados para efetuar estes ensaios. Estes estudos serão importantes no sentido de poder verificar uma reatividade e capacidade antirradicalar diferente das espécies de quercetina, dependendo do seu grau de protonação.

6. Conclusão

Os resultados obtidos nesse trabalho na determinação da capacidade antirradicalar de fenóis flavonoides utilizando-se o ensaio DPPH e ABTS demonstram a compatibilidade desses métodos através dos valores confiáveis e pela simplicidade da técnica.

O método quimiluminescente com luminol utilizado em extratos e frações das folhas de *Baccharis regnelli* foi possível identificar a mistura com maior atividade antirradicalar onde foi possível isolar duas substâncias que mostraram considerável atividade antirradicalar. Neste estudo também foi introduzida à medida comparativa da capacidade antirradicalar, expressa em porcentagem de trolox, a qual facilita a interpretação através da leitura direta em relação ao padrão trolox.

Os resultados preliminares do estudo com o ensaio DPPH realizado em meio ácido, ou tamponado, permite a viabilidade de uma avaliação da atividade antirradicalar de substâncias que apresentem diferentes espécies conforme o pH do meio, ou valores variados de pK_a 's, porém os resultados obtidos ainda necessitam de estudo futuros.

7. Referências

- ¹ Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T. D.; Mazura, M.; Telser, J.; Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, (2007); 44–84.
- ² Finkel, T.; Holbrook, N. J.; Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, (2000); 239-247.
- ³ Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.; *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed.; Oxford University Press; Oxford, 2007.
- ⁴ Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M. & David, J. P.; Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova*; 29, (2006); 113-123.
- ⁵ Bastos, E. L. “Desenvolvimento de um ensaio para determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais através da quimiluminescência do luminol”. *Dissertação de Mestrado* – Instituto de Química, Universidade de São Paulo; (2000).
- ⁶ Ito, N.; Fukushima, S.; Tsuda, H.; Carcinogenicity and Modification of the Carcinogenic Response By BHA, BHT and Other Antioxidants. *CRC Critical Rev. Tox.*; 15, (1985); 109-150.
- ⁷ Dorko, C.; Antioxidants used in foods. *Food Technol.*; 48(4), (1994); 33-34.
- ⁸ Melo, E. A.; Guerra, N.B.; Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. *Bol. SBCTA.*; 36, (2002); 1-11.
- ⁹ Aherne, S. A.; O'brien, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and, metabolism. *Nutrition*. 18(1), (2002); 75-81.
- ¹⁰ Rauha, J. P.; Remes, S.; Heinonem, M.; Hopia, A. Kähkönen, M.; Kujala, T.; Pihlaja, K.; Vuorela, H.; Vuorela, P.; Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int. J. Food Microbiol.*; 56, (2000); 3-12.

-
- ¹¹ Koo, H. M.; Suhaila, M.; Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *J. Agric. Food Chem.*; 49, (2001); 3106-3112.
- ¹² Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. & Cross, C.E.; Free Radicals, antioxidants, and Human Disease: Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.*; 119, (1992); 598-620.
- ¹³ Behling, E. B.; Sendão, M.C.; Francescato, H.D.C.; Antunes, L.M.G.; Bianchi, M.L.P. Flavonoid quercetin: General aspects and biological actions. *Alim. Nutr.*; 15 (3), (2004); 285-292.
- ¹⁴ Musialik, M.; Kuzmich, R.; Pawłowski, T. S.; Litwinienko, G.; Acidity of Hydroxyl Groups: An Overlooked Influence on Antiradical Properties of Flavonoids. *J. Org. Chem.*; 74, (2009); 2699–2709.
- ¹⁵ Halliwell, B.; Gutteridge J. M. C.; Commentary: Antioxidant Characterization Methodology And Mechanism. *Biochem. Pharmacol.*; 49; (1995); 1341-1348.
- ¹⁶ Prior, R. L.; Cao, G.; In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Rad. Biol. Med.*; 27, (1999); 1173-1181.
- ¹⁷ Cao, G.; Alessio, H. M.; Cutler, R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.*; 14, (1993); 303-311.
- ¹⁸ Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K.; Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.*; 53, (2005); 4290-4302.
- ¹⁹ Re, R.; Pellegrin, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Ang, M.; Rice-Evans, C.; Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Rad. Biol. Med.*; 26, (1999); 1231-1237
- ²⁰ Folin, O.; Ciocalteu, V. Tyrosine and tryptophan determinations in proteins. *J. Biol. Chem.*, 73, (1927); 627-650.

-
- ²¹ Blois, M. S.; Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*; 181, (**1958**); 1199 – 1200.
- ²² Wayner, D. D. M.; Burton, G. W.; Ingold, K. U.; Locke, S. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Lett.*; 187, (**1985**); 33-37.
- ²³ Romay, C.; Castillo, M. C.; Pascual, C.; Campos, A. M; Escobar, J.; Lissi, E. A.; Evaluation of the total content of antioxidants in complex mixtures. *Cienc. Cult.*; 48, (**1996**); 86-95.
- ²⁴ Ghiselli, A.; Serafinia, M.; Natellaa, F.; Scaccinia, C.; Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Rad. Biol. Med.*; 29, (**2000**); 1106-1114.
- ²⁵ Albrecht, H. O.; Chemiluminescence of aminophthalic hydrazide. *Z. Phys. Chem.*; 135, (**1928**); 321-330.
- ²⁶ Marquette, C. A.; Blum, L. J.; Applications of the luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry. *Anal. Bioanal. Chem.*; 385, (**2006**); 546-554.
- ²⁷ Ferreira, E. C.; Rossi A. V.; A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise. *Quim. Nova*; 25, (**2002**); 1003-1011.
- ²⁸ Bastos, E. L.; Romoff, P.; Eckert, C. R.; Baader, W. J.; Evaluation of antiradical capacity by H₂O₂-Hemin- induced luminol chemiluminescence. *J. Agric. Food Chem.*; 51, (**2003**); 7481-7488.
- ²⁹ Lissi, E.; Pascual, C.; Castillo, M. D.; Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Rad. Res. Comms.*; 17, (**1992**); 299-311.
- ³⁰ Lissi, E.; Salim-Hanna, M.; Pascual, C.; Castillo, M. D.; Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Rad. Biol. Med.*; 18, (**1995**); 153-158.

-
- ³¹ Eckert, C. R. "Determinação da Atividade Anti-radicalar de Flavonóides e Extratos de Espécies de *Baccharis* Através da Reação Quimiluminescente do Luminol", *Dissertação de Mestrado* – Instituto de Química, Universidade de São Paulo; (2006).
- ³² Armarego, W. L. F.; Perrin, D. D.; *Purification of Laboratory Chemicals*; 4^a Ed.; Butterworth Heinemann; 1996, p. 209.
- ³³ Burton, G. H.; Hughes, L.; Ingold, K. U.; Antioxidant Activity of Phenols to Vitamin E – Are There Chain-Breaking Antioxidant Better than α . *J. Am. Chem. Soc.*; 105, (1983); 5950-5951.
- ³⁴ Prior, R. L.; Cao, G.; Comparison of Different Analytical Methods. *Free Rad. Biol. Med.*; 27, (1999); 1173-1181.
- ³⁵ Barclay, L. R. C.; Locke, S.J.; Macneil, J. M.; Vankessel, J.; Burton, G. W.; Ingold, K. U.; Autoxidation of micelles and model membranes. Quantitative kinetic measurements can be made by using either water-soluble or lipid-soluble initiators with water-soluble or lipid-soluble chain-breaking antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.*, 106, (1984); 2479-2481.
- ³⁶ Burton, G. W.; Doba, T.; Gabe, E. J.; Hughes, L.; Lee, F. L.; Prasad, L.; Ingold, K. U.; Autoxidation of biological molecules. 4. Maximizing the antioxidant activity of phenols. *J. Am. Chem. Soc.*; 107, (1985); 7053-7065.
- ³⁷ Emerenciano, V. P.; Militão, J. P. S . L. T.; Campos, C. C.; Romoff, P.; Kaplan, M. A. C.; Zambon, M. & Brandt, A. J. C.; Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. *Biochem. System. & Ecol.*; 29, (2001); 947-957.
- ³⁸ Levi, M. A. B.; Scarminio, I. S.; Poppi, R. J.; Trevisan, M. G.; Three-way chemometric method study and UV-vis absorbance for the study of simultaneous degradation of anthocyanins in flowers of the *Hibiscus rosa-sinensis* species. *Talanta*; 62(2), (2004); 299-305.
- ³⁹ Parejo, I.; Codina, C.; Petrakis, C.; Kefalas, P. Evaluation of Scavenging Activity Assessed by Co(II)/EDTA-Induced Luminol Chemiluminescence and DPPH Center dot (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl) Free Radical Assay. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*; 44, (2000); 507-512.

-
- ⁴⁰ Willians, W. B.; Cuvelier, M. E.; Berset, C.; Use of Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm. Wiss. & Technol*; 28, (1995); 25-30.
- ⁴¹ Thompson, M.; Williams, C. R.; Elliot, G. E.; Stability of flavonoid complexes of copper(II) and flavonoid antioxidant activity. *Anal. Chim. Acta*; 85, (1976); 375–381.
- ⁴² Wolfbeis, O. S.; Leiner, M.; Hochmuth, P.; Geiger, H.; Absorption and Fluorescence Spectra, pK_a Values, and Fluorescence Lifetimes of Monohydroxyflavones and Monomethoxyflavone. *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.* 88, (1984); 759–767.
- ⁴³ Georgievskii, V. P.; Acidic properties of flavonoid compounds and the choice of solvent for performing potentiometric analysis. *Chem. Nat. Compd.*; 16, (1980); 136–141.
- ⁴⁴ Engelmann, M. D.; Hutcheson, R.; Cheng, I. F.; Stability of ferric complexes with 3-hydroxyflavone (flavonol), 5,7-dihydroxyflavone (chrysin), and 3',4'-ihydroxyflavone. *J. Agric. Food Chem*; 53, (2005); 2953–2960.
- ⁴⁵ Jovanovic, S. V.; Steenken, S.; Tosic, M.; Marjanovic, B.; Simic, M. G.; Flavonoids as Antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.*; 116, (1994); 4846–4851.

Súmula Curricular

1. Dados Pessoais:

Sandro de Oliveira.

Ribeirão Pires - SP – 08/08/1967

E-mail – profsandro@usp.br

CVlattes: <http://lattes.cnpq.br/1353468467246182>.

2. Educação:

Graduação:

Licenciatura em Química – FUNDAÇÃO SANTO ANDRÉ/SP – 1993-1997.

Pós Graduação:

Lato Sensu em Química – Faculdades Oswaldo Cruz/SP – 2000/2001.

3. Atuação Profissional:

Professor de Química Orgânica – **FACULDADES OSWALDO CRUZ**. Desde 2005.

4. Publicação:

Bartoloni, F. H., Ciscato, L. F. M., Peixoto, M. M. M., dos Santos, A. P. F., Santos, C. S., Oliveira, S., Augusto, F. A., Pagano, A. P. E., & Baader, W. J. (2011). Luz: um raro produto de reação. *Química Nova*, 34, (2011) n544-554.

5. Participação em Congresso:

1. 33ª reunião anual da Sociedade Brasileira de Química. Sessão de Painéis: *Determinação da Atividade Anti-radicalar de Flavonóides e Fenóis Através do Ensaio com DPPH*. Águas de Lindóia de 28 a 31 de maio 2010.

2. 33ª reunião anual da Sociedade Brasileira de Química. Sessão de Painéis: *Isolamento e avaliação da atividade antirradicalar de derivados de ácido clorogênico de Baccharis regnelli Benth.* Águas de Lindóia de 28 a 31 de maio 2010.
3. 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Sessão de Painéis: *Determinação da atividade anti-radicalar utilizando-se a quimiluminescência do luminol em meios micelares e o radical estável DPPH.* Fortaleza 30 de maio 02 de junho de 2009.
4. 5º Fórum Nacional de Coordenadores de Cursos de Graduação em Química. Estrutura curricular da Licenciatura e a formação atual dos Licenciandos. São Paulo, 19 e 20 de outubro 2009.

6. Atividades Acadêmicas:

Participação em banca examinadora de Trabalhos de Conclusão de Curso de graduação:

1. Sérgio Silva de Oliveira. *Análise de Contaminantes do Ar no Pólo Petroquímico do Grande ABC - Capuava - SP.* 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharel em Química) - Faculdades Oswaldo Cruz.
2. Rodrigo Palma Peral Botey. *Comparação da Determinação de Gordura no Leite Através das Técnicas de Ressonância Magnética Nuclear e Cromatografia Gasosa.* 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharel em Química) - Faculdades Oswaldo Cruz.
3. Daniel Roberto da Silva Souza. *Processo de obtenção de Resinas Alquílicas para aplicação em tintas.* 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharel em Química) - Faculdades Oswaldo Cruz.
4. Régia Elen da Silva. *A Importância dos filmes comestíveis a base de gelatina.* 2007. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharel em Química) - Faculdades Oswaldo Cruz.
5. Andréia da Silva Ferreira. *Ciclodextrina como um bom carregador de princípios ativos.* 2007. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharel em Química) - Faculdades Oswaldo Cruz.

6. Jucélia Gomes Nunes. *Monitoramento de material particulado presente na atmosfera da Barra Funda/SP*. 2005. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharel em Química) - Faculdades Oswaldo Cruz.

7. Silvia Maria da Silva Boffa. *Tratamento de Efluentes Galvânicos com o uso de Resinas Trocadoras de íons*. 2005. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharel em Química) - Faculdades Oswaldo Cruz.

8. Eliane Aparecida Apóstolo. *Perda do Plastificante nos compostos de PVC*. 2005. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharel em Química) - Faculdades Oswaldo Cruz.

Orientação de Trabalhos de Conclusão de Curso de graduação:

1. Giovanni Del Sordo Filho. *Produção de Radioisótopos por meio de Aceleradores de Suas Aplicações na Medicina*. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Bacharel em Química) - Faculdades Oswaldo Cruz.

2. Elber dos Santos Lima. *Características e Obtenções na Indústria de Tinta a Base de água ou Arquitetônicas*. 2007. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Bacharel em Química) - Faculdades Oswaldo Cruz.

3. Marco Aurélio Rovira de Souza. *Uso de Indicadores Naturais para Construção do Conhecimento de Química*. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Bacharel em Química) - Faculdades Oswaldo Cruz.

4. Bruna Lucas Pereira Ignácio. *Anodização de Alumínio*. 2005. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Bacharel em Química) - Faculdades Oswaldo Cruz.

Participação na Organização de Eventos:

1. Semana da Química. 2006. Faculdades Oswaldo Cruz (Graduação em Bacharel em Química).

2. Semana das Licenciaturas 2006. Faculdades Oswaldo Cruz (Graduação em Licenciatura em Química).