UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

Atividade Antioxidante de Extratos Vegetais da Flora Brasileira: Estudo com Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) e Teoria do Funcional da Densidade (TFD).

Adevailton Bernardo dos Santos

Tese apresentada a Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para concorrer ao título de doutor, pelo curso de pós-graduação em Física Aplicada a Medicina e Biologia.

São Paulo
2006

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

Atividade Antioxidante de Extratos Vegetais da Flora Brasileira: Estudo com Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) e Teoria do Funcional da Densidade (TFD).

Adevailton Bernardo dos Santos

Tese apresentada a Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para concorrer ao título de doutor, pelo curso de pós-graduação em Física Aplicada a Medicina e Biologia.

Orientador: Oswaldo Baffa Filho

São Paulo
2006

Adevailton Bernardo dos Santos.
Atividade Antioxidante de Extratos Vegetais da Flora Brasileira: Estudo com Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) e Teoria do Funcional da Densidade (TFD)./ Adevailton Bernardo dos Santos. Ribeirão Preto, 2006.

Tese de doutorado apresentada a Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto / USP – Área de concentração: Física Aplicada a Biologia e Medicina.
Orientador: Oswaldo Baffa Filho.

1.Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE). 2.Antioxidante. 3.Radicais livres. 4.Extrato vegetal. 5.TEMPOL. 6.DMPO. 7.Reação de Fenton. 8.DPPH. 9.Teoria do Funcional da Densidade (TFD).

Dedico este trabalho a minha esposa e filhas, que souberam entender a minha ausência e a importância deste trabalho, a minha mãe que sempre está presente em meus pensamentos, e todos amigos e parentes que, direta ou indiretamente, me auxiliaram.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Oswaldo Baffa Filho pelo apoio e ajuda fornecido para a conclusão deste trabalho.

A Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva pelas discussões e por ceder os extratos vegetais. Ao Prof. Tomé Mauro Schmidt pelo auxilio no desenvolvimento das simulações computacionais.

Aos professores do Departamento de Física e Matemática que sempre estiveram prontos a ajudar e através de suas aulas e conselhos, souberam dividir seus conhecimentos e experiências.

Aos colegas do grupo de pesquisa Ressomat que me acompanharam durante a realização deste trabalho, principalmente Dr. João Borim, que me ajudou dividindo sua experiência em discussões de química.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Física e Matemática, que sempre se mostraram companheiros de trabalho, auxiliando-me em tudo que necessitei.

A CAPES, a Universidade Federal do Tocantins (UFT), ao Departamento de Física e Matemática (DFM), e a Instituto de Física da Universidade Federal de Uberlândia pelo suporte financeiro e/ou material dado a este projeto.

A todos que de alguma forma, direta ou indireta, me auxiliaram na execução deste projeto.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.

RPE – Ressonância Paramagnética Eletrônica.

EPR – Electron Paramagnetic Resonance.

TFD – Teoria do Funcional da Densidade.

DFT – Density Functional Theory.

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio.

ROS – Reactive Oxygen Species.

EDL – Energia de Dissociação de Ligação.

ΔEDL – Variação da Energia de Dissociação de Ligação devido a um substituinte.

BDE – Bond Dissociation Energy.

HOMO – Highest Occupied Molecular Orbital.

LUMO – Lowest Unoccupied Molecular Orbital.

$^1O_2$ – oxigênio singleto.

$O_2^{\bullet-}$ - radical superóxido.

H_2O_2 – peróxido de hidrogênio.

$OH^{\bullet}$ - radical hidroxila.

TEMPOL – 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-1- piperidiniloxil.

DPPH – 1,1-diphenil-2-picril-hidrazil.

DMPO – 5,5-dimetil-1-pirroline N-óxido.

SIESTA – Spanish Initiative for Electronic Simulations with Thousands of Atoms.

ADL – Aproximação da Densidade Local.

LDA – Local Density Approximation.

GGA – Generalized Gradient Approximation.

RL – Radical Livre.

F – Fenol.

GSH – Glutationa.

GSH-Px – Glutationa peroxidase.

GSSH – Glutationa oxidada.

Cat – Catalase.

Sod – Superóxido dismutase.

RESUMO

SANTOS, A. B. **Atividade Antioxidante de Extratos Vegetais da Flora Brasileira: Estudo com Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) e Teoria do Funcional da Densidade (TFD).** 2006. 91p. Tese Doutoramento – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Há, no Brasil, uma enorme diversidade de espécies vegetais, e um conhecimento popular de várias propriedades medicinais das mesmas. Dentre os estudos realizados com extratos de plantas, há um interesse especial na atividade antioxidante. Este trabalho, focado em atividade antioxidante, é dividido em duas partes: a primeira, utiliza a técnica de RPE para estudar a ação dos antioxidantes neutralizando os radicais livres, enquanto que a segunda utiliza a TFD para, em simulação computacional, ajudar a entender os resultados obtidos na primeira parte. Foram analisados 10 extratos vegetais: *Swartzia langsdorffii*, *Machaerium villosum, Pterogyne nitens*, *Maytenus ilicifolia* (casca de raiz), *Pera glabrata*, *Aegiphyla sellowiana*, *Copaifera langsdorffii*, *Chrysophyllum inornatum*, *Iryanthera juruensis* (folhas e sementes), *Didymopanax vinosum*. O estudo da atividade antioxidante com RPE utiliza dois métodos diferentes: o primeiro método mede a atividade antioxidante por meio do controle da quantidade de radicais livres, TEMPOL e DPPH, em contato com o extrato vegetal, enquanto que o segundo método utiliza o *spin trap* DMPO em conjunto com a reação de Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^{\bullet} +$

HO^-) para analisar a ação dos extratos vegetais contra o radical hidroxila ($OH^\bullet$). A simulação computacional dos compostos TEMPOL, DPPH e DMPO é realizada em um método de primeiros princípios na Teoria do Funcional da Densidade, com uso de pseudopotenciais. O código utilizado é o SIESTA. As conclusões indicam que o extrato de *Iryanthera juruensis*, tanto de folhas quanto de sementes, exibe atividades antioxidantes bastante acentuadas, em todos os métodos utilizados. A simulação computacional aponta o TEMPOL menos reativo que o DPPH, devido a menor energia liberada em sua reação de redução. Sabendo que algumas destas espécies já são usadas popularmente por propriedades medicinais, estudos futuros para a correta identificação do agente antioxidante e seu possível uso, tanto na indústria alimentícia quanto na farmacêutica, deverão ser realizados.

Palavras-chave: Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE), antioxidante, radicais livres, extrato vegetal, TEMPOL, DMPO, reação de Fenton, DPPH, Teoria do Funcional da Densidade (TFD).

ABSTRACT

SANTOS, A. B. **Antioxidant Activity of Plant Extracts from Brazilian Flora: Study of Electron Paramagnetic Resonance (EPR) and Density Functional Theory (DFT).** 2006. 91p. Tese doutoramento – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

There is, in Brazil, a great diversity of vegetable species, and a popular knowledge of several medicinal properties of the some of them. In studies carried out with plants' extracts, there is special interest in antioxidant activities. This work, focused in antioxidant activity, is divided in two parts: the first uses EPR technique to study the antioxidant activities neutralizing free radicals, while the second one uses DFT, in computational simulation, to understand the results obtained from the first part. Ten vegetable extracts were analyzed: *Swartzia langsdorffii*, *Machaerium villosum*, *Pterogyne nitens*, *Maytenus ilicifolia* (bark root extracts), *Pera glabrata*, *Aegiphyla sellowiana*, *Copaifera langsdorffii*, *Chrysophyllum inornatum*, *Iryanthera juruensis* (leaves and seeds), *Didymopanax vinosum*. The study with EPR uses two different methods: the first method measures the antioxidant activity by monitoring the amount of free radicals, DPPH and TEMPOL, that are in contact with the plant extract, the second method uses spin trap DMPO with Fenton reaction ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^{\bullet} + HO^{-}$) for the study of the plant extract antioxidant activity against the hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$). The computational simulation of TEMPOL, DPPH and DMPO is carried out using a method of first principles within the Density Functional Theory and pseudopotentials. The code is SIESTA. The conclusions indicate that the

Iryanthera juruensis extract, as of leaves as of seeds, exhibits accentuated antioxidants activities, in all of the used methods. The computational simulation indicated that the TEMPOL is less reactive than the DPPH, because the lower energy in its reduction reaction. As some of these species are already used popularly by medicinal properties, future studies for correct identification of the antioxidant compounds and its possible use, as in the food industry as in the pharmaceutical industry, should be realized.

Key-words: Electron Paramagnetic Resonance (EPR), antioxidant, free-radicals, vegetal extract, TEMPOL, DMPO, DPPH, Fenton reaction, Density Functional Theory (DFT).

Sumário

1. Introdução.....1
2. Revisão da literatura.....7
2.1. Radicais livres.....7
2.1.1. Radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$).....9
2.1.2. Oxigênio singleto ($^1O_2$).....9
2.1.3. Radical hidroxila ($OH^{\bullet}$).....11
2.1.4. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2).....11
2.2. Antioxidantes.....11
2.2.1. Antioxidantes enzimáticos. 12
2.2.2. Antioxidantes não enzimáticos.....13
A) Vitaminas.....14
B) Compostos fenólicos.....15
C) Carotenóides.....18
2.3. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE). 18
2.3.1. Fator g. 22
2.3.2. Absorção de energia e relaxação spin-rede. 24
2.3.3. Interação hiperfina nuclear.....26
A) Interação hiperfina com vários núcleos equivalentes.....29
B) Interação hiperfina com núcleos não equivalentes.....30
2.4. Fundamentos da Teoria do Funcional da Densidade (TFD). 32
2.4.1. Relação de Thomas-Fermi. 33
2.4.2. Teoremas de Hohenberg e Kohn. 35
2.4.3. Equações de Khon-Sham. 35
2.4.4. Aproximação da Densidade Local (ADL). 38
2.4.5. Pseudopotenciais.....39
3. Atividade antioxidante dos extratos vegetais. 42
3.1. Materiais e métodos. 43
3.1.1. Seleção das plantas e preparação dos extratos. 43
3.1.2. Reagentes. 44
3.1.3. Espectrômetro RPE banda-X.....44

3.1.4. Medida da sensibilidade do espectrômetro e de referência. 45
3.1.5. Teste de neutralização de DPPH.....46
3.1.6. Teste de neutralização de TEMPOL. 47
3.1.7. Teste de neutralização do radical hidroxila ($OH^{\bullet}$). 48
3.2. Resultados e discussões.....50
3.2.1. Medida da sensibilidade do espectrômetro e de referência. 50
3.2.2. Teste de neutralização de DPPH.....52
3.2.3. Teste de neutralização de TEMPOL. 54
A) Teste de neutralização de TEMPOL – extratos em solução de etanol. ..54
B) Teste de neutralização de TEMPOL – extratos em solução de água.....55
C) Teste de neutralização de TEMPOL em maior concentração. 57
3.2.4. Teste de neutralização do radical hidroxila ($OH^{\bullet}$). 62
A) Determinação da concentração da solução tampão de fosfato.....63
B) Teste de neutralização do radical hidroxila ($OH^{\bullet}$).....65
4. Simulação computacional.....67
4.1. Metodologia. 67
4.2. Resultados e discussões.....69
4.2.1. Fenol e *p*-aminofenol. 69
4.2.2. DPPH. 72
4.2.3. TEMPOL. 74
4.3.3. DMPO. 77
5. Conclusão. 80
6. Referências. 83
Anexo 1. Fotos de algumas plantas. 90

1. Introdução.

O Brasil possui uma vasta flora, estimada em mais de 40.000 espécies, havendo conhecimentos populares de propriedades medicinais de várias delas. Por outro lado, apesar dos esforços, pesquisas científicas que possibilitem o bom aproveitamento deste potencial que o país possui, ainda não são produzidas em volume suficiente. Uma das possibilidades de estudos, sobre a qual foi desenvolvido este trabalho, é a atividade antioxidante.

Devido à sua importância, alimentos, ervas, temperos e chás, têm sido pesquisados em sua ação antioxidante (Velioglu et al., 1998; Calliste et al., 2001). Os benefícios do uso de alimentos com ação antioxidante já são conhecidos, e sabe-se que auxiliam na eliminação de radicais livres e principalmente as espécies reativas de oxigênio (ERO) gerados pelo metabolismo, tais como, oxigênio singleto ($^1O_2$), o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH^\bullet$).

Radicais livres são moléculas instáveis, pelo fato de possuírem um número ímpar de elétrons. Para atingir a estabilidade, estas moléculas necessitam adquirir elétrons e, portanto, reagem com a maioria dos compostos vizinhos, oxidando-os (Sanchez-Moreno, 2002). Há uma relação quanto à presença destas substâncias no organismo humano e o desenvolvimento da vários problemas de saúde dentre os quais podemos destacar vários tipos de neoplasias, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, artrite, diabetes, danos à estrutura do DNA, processos inflamatórios com a redução do poder das células de defesa; e ainda existe uma relação com o processo de envelhecimento (Yen & Chen, 1995; Pieta et al., 1998; Chow, 2002; Hsu & Guo, 2002). É importante lembrar que o metabolismo humano, ao utilizar o oxigênio, é uma fonte de radicais livres.

O processo de oxidação se resume no fato de um determinado composto perder um elétron. Ao sofrer oxidação, compostos como lipídios, açúcares e proteínas podem se decompor em aldeídos, cetonas, ésteres e vários outros produtos. Possuindo propriedades diferentes das iniciais, os compostos perdem a sua funcionalidade e importância. No caso do organismo humano, células e tecidos podem sofrer danos irreversíveis, enquanto que na conservação de alimentos há uma perda do sabor, qualidade e frescor.

Nos organismos vivos, a função dos antioxidantes é impedir que radicais livres danifiquem células e tecidos (Fogliano et al., 1999; Polovka et al., 2003). Na indústria alimentícia o uso de antioxidantes não é recente, no entanto nota-se um movimento com finalidade de substituir antioxidantes artificiais por naturais. Esta tendência se deve à própria exigência do mercado, que evita consumir alimentos industrializados que contenham grande quantidade de aditivos e na toxicidade de alguns agentes antioxidantes sintéticos (Valentão et al., 2002; Amarowicz et al., 2004).

As principais classes de antioxidantes presentes nos alimentos são vitaminas, polifenóis, flavonóides e carotenóides (Velioglu et al., 1998; Polyakov et al., 2001; Amarowicz et al., 2004). A ação destes antioxidantes pode se dar por uma reação de oxiredução onde eles próprios entram como reagentes ou por interação com metais de transição, principalmente ferro e cobre.

A técnica de espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) não foi, até onde temos informações, utilizada no estudo de propriedades antioxidantes de plantas da flora brasileira, apesar de ser uma técnica seletiva para a detecção de radicais livres, podendo fazer análises tanto sobre a cinética quanto sobre a estequiometria das reações. Apesar da técnica de RPE detectar e quantificar radicais livres, ela não é eficiente para identificar a substância antioxidante, desta forma, o estudo pode requerer outras formas de análises, como por exemplo, espectroscopia ótica na região espectral do infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Estas outras formas de espectroscopia auxiliam a identificar os tipos de substâncias antioxidantes presentes nas amostras, uma vez que na preparação das amostras, principalmente na forma de extratos, quase todos os componentes da planta original são extraídos.

Atualmente, são vários os estudos produzidos com compostos antioxidantes, principalmente os fenólicos, sendo que a utilização de TEMPOL (4-hydroxi-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxil), DPPH (1,1-diphenil-2-picril-hidazil), e do *spin trap* DMPO (5,5-dimetil-1-pirroline N-óxido) (figura 1) para testes de atividades antioxidante é grande. Diversos estudos têm sido realizados com finalidade de determinar os melhores compostos fenólicos antioxidantes, bem como também substituintes que incorporados à estrutura melhorem a atividade do mesmo (Wright et al., 2001; McPhail et al., 2003; de Souza & de Giovani, 2004; Lithoxoidou & Bakalbassis, 2005). Apesar dos diversos estudos envolvendo os compostos antioxidantes, pouca atenção se tem dado aos radicais livres estáveis usados nos testes. O conhecimento da estrutura e das propriedades dos compostos utilizados pode auxiliar na compreensão dos resultados obtidos e na correta utilização dos mesmos.

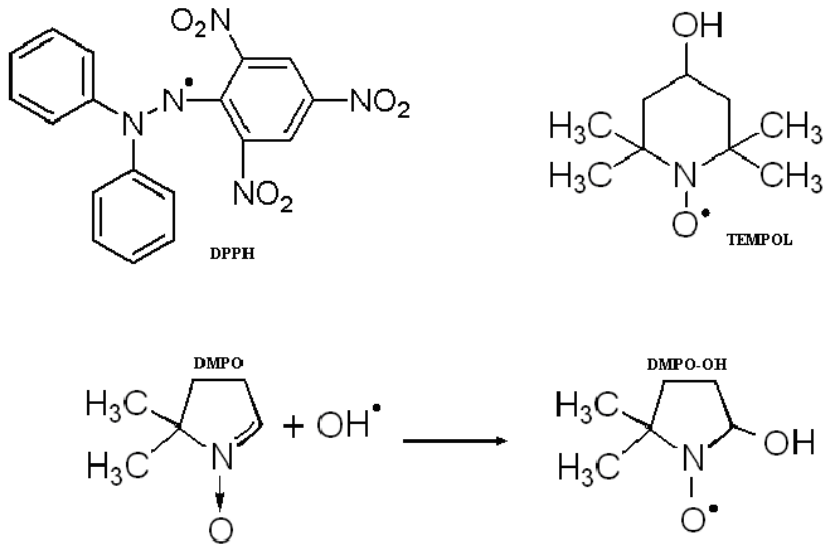

Figura 1. Esquemas mostrando as estruturas moleculares dos radicais livres DPPH e TEMPOL; e do *spin trap* DMPO e o respectivo aduto de spin DMPO-OH.

Este trabalho pode ser dividido em duas partes: (1) a primeira tem como objetivo realizar uma análise comparativa da atividade antioxidante de algumas espécies da flora brasileira, na forma de extratos, previamente selecionados. As espécies utilizadas foram: *Swartzia langsdorffii*, *Machaerium villosum*, *Pterogyne nitens*, *Maytenus ilicifolia* (extrato da casca da raiz), *Pera glabrata*, *Aegiphyla*

sellowiana, *Copaifera langsdorffii*, *Chrysophyllum inornatum*, *Iryanthera juruensis* (extratos das folhas e da semente) e *Didymopanax venosum*, sendo que algumas fotos destas plantas estão no final desta publicação (anexo 1); (2) a segunda tem como objetivo, a partir de simulações computacionais, entender teoricamente a dinâmica de neutralização de alguns compostos utilizados nos testes de atividades antioxidante, mais especificamente, os que foram utilizados na primeira parte.

Para as medidas das atividades antioxidantes dos extratos vegetais, foi utilizado dois procedimentos diferentes: o primeiro consiste em medir a ação antioxidante do extrato por meio do controle da quantidade de radicais livres colocados em uma solução do mesmo, no caso, foi feito o monitoramento de uma solução do extrato misturada com TEMPOL e com DPPH que são compostos disponíveis no mercado, que apresentam elétrons desemparelhados; o segundo método utilizou a técnica de *spin trapping*, consistindo em gerar radicais livres, normalmente de vida curta e colocá-los em contato simultaneamente, com uma solução contendo o extrato vegetal e outra solução contendo *spin trap*. O *spin trap* é um composto, que após reagir com o radical livre, forma um composto mais estável, chamado de aduto de spin, podendo então ser medido por RPE. A reação usada para gerar os radicais livres foi a reação de oxidação do ferro, conhecida como reação de Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^{\bullet} + HO^{-}$) e o *spin trap* utilizado foi DMPO (Finkelstein et al, 1980; Figueiredo et al. 1993; Calliste et al., 2001; Sanchez-Moreno, 2002). Para obter dados sobre a ação do solvente sobre a ação antioxidante, o procedimento utilizando o TEMPOL foi realizado com os extratos em solução de etanol e em solução aquosa.

A respeito das plantas estudadas é importante citar alguns estudos já realizados: *Maytenus ilicifolia* possui atividades antioxidantes estudadas e é usada em tratamento anti-úlceras e de problemas estomacais (Leite et al., 2001; Corsino et al., 2003; Jorge et al., 2004); *Pterogyne nitens* foi estudada quanto a presença de alcalóides com propriedades antitumorais (Bolzani et al., 1995); *Swartzia langsdorffii* devido a presença de triterpenos bioativos com propriedades anti-schistossomiais (Magalhães et al., 2003); oléo de *Copaifera langsdorffi* foi estudado focando propriedades antioxidantes com atividades anti-úlceras (Paiva et al., 2004); e

Iryantera juruensis teve seus frutos pesquisados devido a presença de antioxidantes lipofílicos (Silva et al., 2001).

Os resultados indicaram que os extratos de *Iryanthera juruensis* apresentaram ótimas atividades antioxidantes, tanto para folha quanto para semente, em todos os testes, apesar de outros extratos também mostrarem bons resultados. A maioria dos resultados foram compatíveis e similares em todos os testes, sendo que uma das exceções, o resultado do extrato de *Chrysophyllum inornatum*, apresentou a melhor atividade antioxidante contra o radical TEMPOL, uma das melhores contra o DPPH, e, no entanto o pior resultado contra o radical hidroxila, no teste utilizando a técnica de *spin trapping*.

Na segunda parte deste trabalho, com o objetivo de melhor entender os resultados obtidos nos testes antioxidantes, os compostos utilizados – TEMPOL, DPPH e DMPO – foram simulados computacionalmente em gás-fase. A simulação utilizou a Teoria do Funcional da Densidade (TFD) (termo em inglês – DFT – Density Functional Theory), com aproximação da densidade local (ADL) (termo em inglês – LDA – Local Density Approximation) em um método de primeiros princípios (*ab initio*), auto-consistente e com uso de pseudopotencial (Vianna et al., 2004). O código utilizado foi o SIESTA (*Spanish Initiative for Eletronic Simulations with Thousands of Atoms*) (Ordejón et al. 1995, 1996) e os pseudopotenciais foram gerados usando a norma de Troullier-Martins (Troullier & Martins, 1991). Fenol e *p*-aminofenol também foram simulados com a finalidade de servirem de referência.

Dentre os resultados obtidos na simulação, há uma especial atenção para a diferença de energia total entre o composto inicial e o respectivo composto reduzido, obtido pela incorporação de um átomo de hidrogênio. Estes valores podem ser comparados com os valores da energia de dissociação de ligação do hidrogênio (EDL) (termo em inglês – BDE – Bond Dissociation Energy) que é usada para medir a eficiência de um antioxidante e já foi determinada para diversos compostos (Wright et al. 2001; McPhail et al. 2003; Lithoxoidou & Bakalbassis, 2005). Esta comparação pode indicar se uma possível reação entre o composto simulado e um dado antioxidante (que tem EDL conhecida) ocorre com aumento ou diminuição de energia total. O resultado geral mostrou que o TEMPOL possui uma variação de

energia menor ao ser reduzido que o DPPH, o que ajuda explicar a sua menor reatividade.

Este trabalho defende a possibilidade de realizar testes comparativos com extratos vegetais, utilizando a técnica de RPE, mostrando as vantagens da rapidez, facilidade de aplicação, e baixa quantidade de amostra. Alem disto, há a proposta de mostrar a importância de se realizar mais de um teste, inclusive com solventes diferentes, pois nem sempre um extrato vegetal que possui maior eficiência em determinado teste é eficiente em outro. O principal método utilizado para testes comparativos similares ao empregado neste trabalho é o seqüestro de DPPH medido por meio de espectroscopia ótica.

No capítulo 2 é feita uma revisão bibliográfica: radicais livres, antioxidantes, os conceitos que, quando aplicados, possibilitam a espectroscopia de RPE, e a a Teoria do Funcional da Densidade são os assuntos tratados.

O capítulo 3 é dedicado à descrição dos testes da atividade antioxidante dos extratos vegetais. Primeiramente são descritos os materiais e métodos utilizados e em seguida apresentado os resultados obtidos e a discussão dos mesmos. Na parte de descrição dos materiais e métodos é relatado a origem dos extratos vegetais e dos reagentes utilizados, bem como as técnicas e metodologias empregadas; sendo também descrito um teste para determinar a sensibilidade do aparelho de espectroscopia RPE. Na parte da apresentação e discussão dos resultados são descritas as atividades antioxidante dos extratos testados, separados por cada teste, as similaridades e diferenças entre eles, a importância do solvente empregado e a eficiência do emprego da técnica RPE neste estudo.

O capítulo 4 traz o relato do trabalho de simulação computacional. Primeiramente é descrito o processo utilizado para o cálculo e em seguida a apresentação e a discussão dos resultados obtidos. A discussão é conduzida em valores de EDL, comparativamente com resultados de outros autores, relacionando com a reatividade dos compostos e os resultados obtidos nos testes antioxidantes; alem disto outros dados importantes, tais como a diferença de energia HOMO-LUMO, a polaridade dos compostos e a geometria molecular também são apresentados e discutidos.

O capítulo 5 traz as conclusões do trabalho.

2. Revisão da literatura.

2.1. Radicais livres.

Os radicais livres são compostos cuja estrutura química possui um ou mais elétrons desemparelhados, sendo desta forma muito instáveis, altamente reativos, e de meia vida curta. Os principais compostos são os originados por reações do oxigênio molecular, denominadas de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), sendo que este termo é uma denominação coletiva, não só para radicais livres como também substâncias capazes de reagir quimicamente e gerá-los.

A geração destas espécies pode ocorrer durante os processos oxidativos biológicos, dentre os quais destaca-se a fosforilação oxidativa, reação que ocorre na mitocôndria e gera energia nos organismos dos mamíferos (figura 2). A molécula de oxigênio (O_2) que entra na reação recebe 4 elétrons, reduzindo-se até formar água. Do oxigênio consumido, parte não é reduzido completamente (2-5%) produzindo ERO como produtos intermediários (Salvador & Henriques; 2004).

Outro exemplo de geração de ERO, e até certo ponto benéfico à saúde, é a fagocitose. Os leucócitos polimorfonucleares, com o aumento do consumo de oxigênio, denominado de "explosão respiratória", constituem-se em uma fonte importante de ERO, principalmente com ação bactericida.

Existem ainda algumas fontes exógenas de radicais livres, tais como radiação, fumo e diversas substâncias tóxicas, como solventes, herbicidas e drogas.

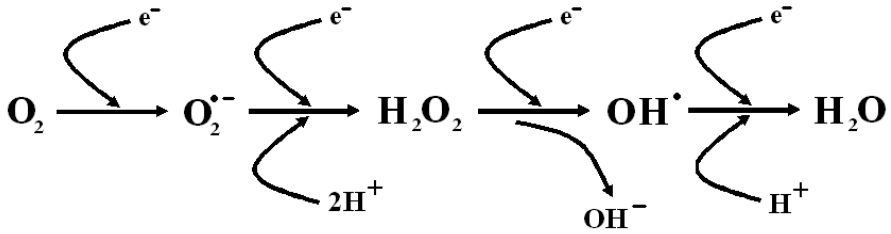

Figura 2. Geração de ERO a partir da redução do oxigênio molecular na reação de fosforilação oxidativa.

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERO. Porém, a membrana celular é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade, perdendo a seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (Ferreira & Matsubara, 1997). A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Estas etapas estão apresentadas nas reações seguintes, onde L representa o lipídio polinsaturado da membrana celular, com a estrutura R-CH=CH-CH_2-R.

$LH + OH^{\bullet}$ (ou $LO^{\bullet}$) $\rightarrow$ $L^{\bullet} + H_2O$ (ou LOH)	Iniciação
$L^{\bullet} + O_2 \rightarrow LOO^{\bullet}$	Propagação
$LH + LOO^{\bullet} \rightarrow L^{\bullet} + LOOH$	Propagação
$LOO^{\bullet} + L^{\bullet} \rightarrow LOOL$	Terminação
$LOO^{\bullet} + LOO^{\bullet} \rightarrow LOOL + O_2$	Terminação

A reação acima se inicia com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo polinsaturado (LH) da membrana celular. Tal seqüestro pode ser realizado pelo $OH^{\bullet}$ ou pelo $LO^{\bullet}$ (radical alcoxila), com conseqüente formação do $L^{\bullet}$ (radical lipídico). Na primeira equação de propagação, o $L^{\bullet}$ reage rapidamente com o O_2, resultando em $LOO^{\bullet}$ (radical peroxila), que, por sua vez, seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo polinsaturado, formando novamente o $L^{\bullet}$ na segunda equação de propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais ($L^{\bullet}$ e $LOO^{\bullet}$) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até se auto destruírem.

O estudo sobre os mecanismos de lesão oxidativa tem, progressivamente, confirmado a ação catalítica dos metais nas reações. O papel dos metais na formação das ERO é confirmado pelas reações de Fenton e de Haber-Weiss (Ferreira & Matsubara, 1997) que produzem ERO:

Reação de Fenton:

$Fe^{++} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+++} + OH^- + OH^\bullet$

Reação de Haber-Weiss:

$O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^\bullet + OH^-$

Embora o íon de cobre possa também catalisar a reação de Haber-Weiss, o ferro é o metal pesado mais abundante no organismo e está biologicamente mais capacitado para catalisar as reações de oxidação de biomoléculas.

2.1.1. Radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$).

O radical superóxido é o mais comum e abundante na célula, sendo formado principalmente através da cadeia de elétrons ou por ação de células fagocitárias para defesa antibacteriana. Este radical não é uma espécie particularmente lesiva, sendo que seu principal papel é ser a fonte para gerar peróxido de hidrogênio (figura 2) e como redutor de íons de metais de transição (Ferreira & Matsubara, 1997). Em pH baixos, o superóxido irá protonizar para formar o radical per-hidroxila ($HO_2^\bullet$), uma espécie mais oxidativa e reativa, no entanto, em pH fisiológico, menos de 1%, estará nesta forma (Cheeseman & Slater, 1996).

2.1.2. Oxigênio singleto ($^1O_2$).

O oxigênio singleto, cuja meia vida é de menos de 50 a 700 µs, dependendo do solvente (Min & Boff, 2002), pode ser gerado por células fagocitárias, por indução luminosa, e por outras diversas reações, dentre as quais podem-se destacar as catalisadas por peroxidases. Corresponde à forma excitada do oxigênio tripleto, não possui restrição na transferência de elétrons e reage com facilidade com compostos ricos em elétrons com duplas ligações.

A figura 3 abaixo indica os diagramas de energia dos orbitais atômicos do átomo de oxigênio, do oxigênio molecular tripleto (O_2) e do oxigênio singleto ($^1O_2$),

facilitando a compreensão do fato do oxigênio singleto ser mais energético que sua forma molecular tripleto.

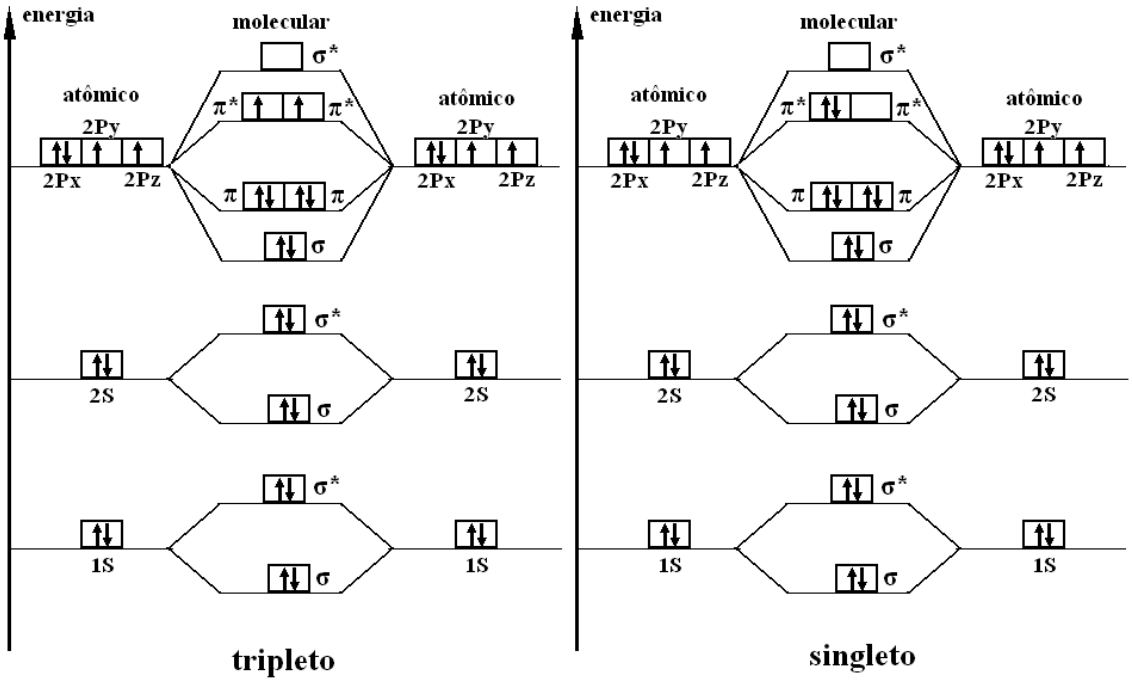

Figura 3. Diagrama de energia dos orbitais atômicos do átomo de oxigênio, do oxigênio molecular tripleto (lado esquerdo) e singleto (lado direito) (adaptado de Min, D. B. & Boff, J. M. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1, pág. 59).

O átomo de oxigênio apresenta em sua última camada dois elétrons desemparelhados, na figura 3 representados pelos orbitais $2p_y$ e $2p_z$. Ao formar o oxigênio molecular, a distribuição eletrônica preenche os orbitais moleculares até o orbital π* (antiligante), que fica incompleto. Pela regra de Hund, os elétrons são distribuídos com o mesmo spin até completar os orbitais e depois distribui os elétrons de spin oposto. Nesta configuração, o estado tripleto fica com spin total S=1, e sua multiplicidade, obtida pela expressão 2S+1, é 3. O estado singleto, que é uma violação da regra de Hund, possui os elétrons do orbital π* emparelhados, spin total S=0, e sua multiplicidade é 1. A diferença de energia entre os dois estados é 22,5 Kcal/mol (Min & Boff, 2002).

2.1.3. Radical hidroxila ($OH^{\bullet}$).

O radical hidroxila é extremamente reativo, com meia vida da ordem de milessegundos, pode lesar o DNA, inativar proteínas oxidando seus grupos sulfidrilas (SH), reagir com carboidratos e lipídeos, inclusive iniciando o processo de lipoperoxidação de lipídeos polinsaturados de membrana celular (Ferreira & Matsubara, 1997).

A formação deste radical pode se dar pela ação das radiações ionizantes, através do processo de radiólise da água, pela reação de Haber-Weiss, envolvendo o radical superóxido, e por reações envolvendo íons de metais de transição, como, por exemplo, a reação de Fenton. Como o organismo humano não possui nenhum sistema enzimático de defesa contra este radical, a sua capacidade de lesar células é superior aos demais (Salvador & Henriques, 2004).

2.1.4. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

O peróxido de hidrogênio não é propriamente um radical livre, mas é um importante ERO pela sua capacidade de gerar radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), principalmente em presença de íons metais de transição. Este composto tem vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao Fe^{++}, sendo desta forma altamente tóxico para as células (Ferreira & Matsubara, 1997; Salvador & Henriques, 2004).

2.2. Antioxidantes.

Antioxidantes são compostos que possuem o potencial de neutralizar os radicais livres, retardando ou inibindo a sua ação de oxidação. Os antioxidantes estão em constante atividade nos organismos vivos, necessitando estar em quantidades

suficientes para neutralizar os efeitos tóxicos dos radicais livres que são constantemente produzidos. Quando esta equivalência não existe, dizemos que há o estresse oxidativo.

Nos organismos há um sistema de defesa contra o estresse oxidativo formado, principalmente pelos antioxidantes enzimáticos. Auxiliando este sistema, ainda existe o sistema não enzimático, composto principalmente, pelas vitaminas, polifenois, flavonóides, carotenóides e licopeno (Velioglu et al. 1998; Polyakov et al.,2001; Amarowicz et al., 2004). A ação destes antioxidantes pode se dar por uma reação de oxiredução onde eles próprios entram como reagentes ou por interação com metais de transição, principalmente ferro e cobre.

2.2.1. Antioxidantes enzimáticos.

O estresse oxidativo tem seus danos minimizados pela ação do sistema de defesa enzimático, composto por proteínas que se localizam no interior das células e agem tanto na prevenção da oxidação gerada pelos radicais livres quanto na reparação dos danos causados (Ferreira & Matsubara, 1997).

Apesar da ação deste sistema ainda não estar completamente elucidada, ela se mostra como um campo de alto interesse, principalmente na prevenção das doenças que podem ser causadas pelo estresse oxidativo (Salvador & Henriques, 2004).

A glutationa-peroxidase (GSH-Px) é uma enzima capas de inativar peróxidos, a custa da conversão da glutationa reduzida (GSH) a glutationa oxidada (GSSG). O consumo de GSH nos organismo é alto, no entanto, a enzima glutationa redutase (GSH-Rd), que funciona dependente de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH), faz com que a forma oxidada de glutationa (GSSG) retorne a forma reduzida (GSH) (Ferreira & Matsubara, 1997; Salvador & Henriques, 2004). A figura 4 mostra esquematicamente o sistema formado pela glutationa.

A catalase (Cat) é uma hemeproteína citoplasmática cuja função é catalizar a redução de H_2O_2 em H_2O e O_2, sendo também NADPH dependente. A ação da catalase também está representada na figura 4.

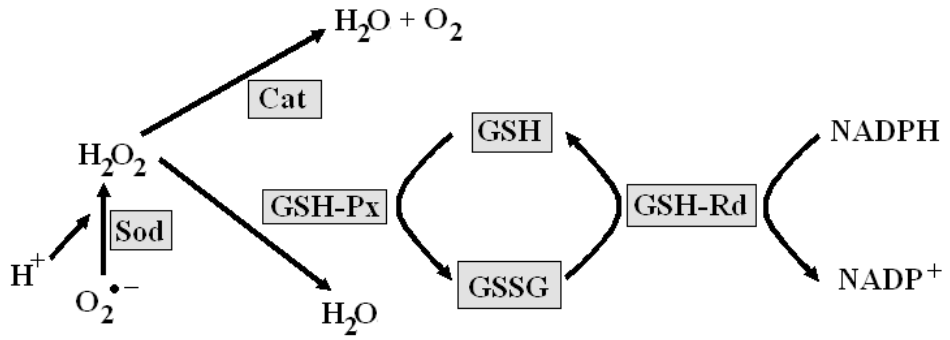

Figura 4. Esquema indicando a ação enzimática da glutationa (GSH), catalase (Cat) e superóxido dismutase (Sod), agindo sobre ERO H_2O_2 e $O_2^{\bullet -}$. Importante lembrar que se estas espécies permanecem no organismo dão origem a radical hidroxila $OH^{\bullet}$ por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss (adaptado de Salvador, M. & Henriques, J. A. P., Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo., Ed. ULBRA – pág 47).

A superóxido dismutase (Sod) corresponde a um grupo de enzimas com diferentes grupos protéicos, cuja função principal é catalisar a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2, na presença do próton H^+ (figura 4). A forma Sod-cobre-zinco está presente principalmente no citosol, enquanto que Sod-manganês está localizada primariamente na mitocôndria. Tem-se ainda ECSod que age no espaço extracelular e Sod-ferro encontrada em algas, bactérias e vegetais superiores (Ferreira & Matsubara, 1997; Salvador & Henriques, 2004).

2.2.2. Antioxidantes não enzimáticos.

Os antioxidantes não enzimáticos podem ser de origem endógena ou exógena, mas independente da origem, eles apresentam uma grande capacidade de defesa, atuando de maneira direta ou indireta, a fim de manter o equilíbrio celular. As ações destes compostos são principalmente a de neutralizar radicais livres, quelar metais e bloquear a ação de espécies reativas, principalmente a de oxigênio.

A dieta é uma importante fonte de antioxidantes, e sabe-se que vegetais e frutos são ricos em vitaminas, compostos fenólicos e diversas substâncias que

auxiliam a manter a saúde celular inibindo a instalação de patogenias ligadas ao estresse oxidativo.

A) Vitaminas.

A vitamina A não é obtida diretamente pela dieta, mas obtida pela clivagem de carotenóides e retinóides, que são obtidos de diversos produtos animais e vegetais. Os carotenóides, precursores da vitamina A, são tidos como antioxidantes, mas estudos indicam que em algumas situações se apresentam também como pró-oxidante (Burton & Ingold, 1984; Polyakov et al., 2001) aumentando a quantidade de radicais livres no sistema. O β-caroteno é um dos mais importantes carotenóides, sua estrutura e a clivagem que sofre para formar a vitamina A_1 (retinol) está indicada na figura 5.

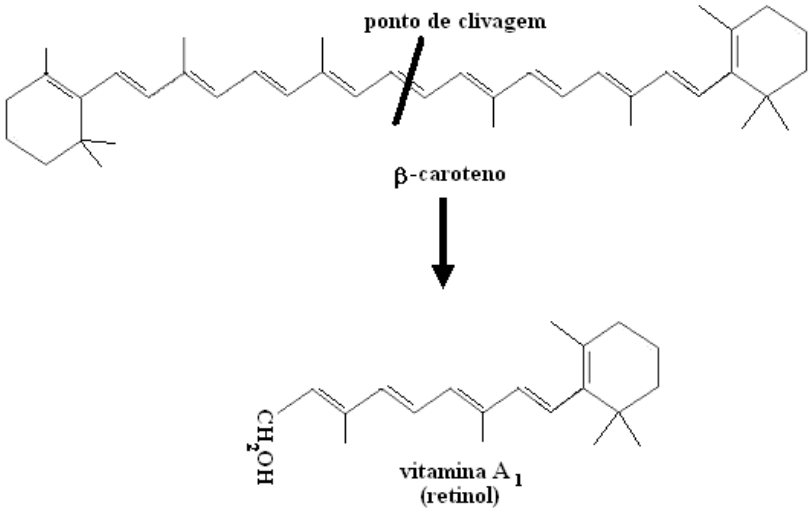

Figura 5. Estrutura molecular do β-caroteno e sua clivagem para formar vitamina A_1 (retinol).

A vitamina C (ácido L-ascórbico) é encontrada em quantidades significativas em diversos frutos e vegetais, sendo sintetizada a partir da glicose. Devido ao seu baixo peso molecular, é capaz de neutralizar rapidamente ERO por transferência de elétrons, inibindo a lipoperoxidação (Hsu & Guo, 2002), e como a sua ação antioxidante ocorre principalmente por doação de um elétron, é um agente redutor. Os humanos não são capazes de sintetizá-la, obtendo-a a partir da dieta. O radical ascorbil formado é bastante estável e ainda se discute bastante os seus efeitos pró-

oxidantes (Salvador & Henriques, 2004). Alem de ser um antioxidante, a vitamina C atua como o principal doador de elétrons ao radical da vitamina E, α-tocoferil, promovendo a regeneração do α-tocoferol. A figura 6 indica a estrutura molecular da vitamina C.

A vitamina E designa todos os tocoferóis, e são provavelmente os inibidores mais importantes na reação em cadeia da peroxidação lipídica em animais. A alta atividade dos tocoferóis contra a oxidação de lipídeos se explica por ser liposolúvel atuando e protegendo a membrana celular. A figura 6 indica a estrutura molecular da vitamina E.

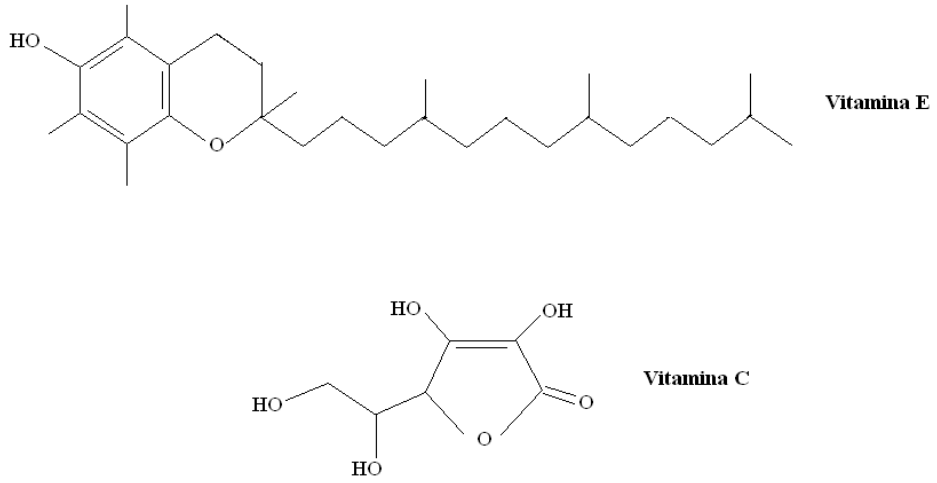

Figura 6. Estrutura molecular da vitamina E (α-tocoferol) e vitamina C (ácido L-ascórbico).

B) Compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos são formados por um ou mais anéis aromáticos carregando grupos hidroxilas, sendo capazes de quelar metais e eliminar radicais livres. A presença dos elétrons-π, que auxiliam na estabilização do radical formado pela oxidação do fenol ao perder um átomo de hidrogênio, ajuda a explicar a grande atividade antioxidante destes compostos.

A ação antioxidante dos compostos fenólicos pode se dar de duas formas: pelo mecanismo de transferência de hidrogênio (1) ou pelo mecanismo de transferência de próton combinado com transferência eletrônica (2) (Zhang et al.,

2002). As reações indicadas abaixo (1 e 2) representam os dois mecanismos, sendo que F indica o composto fenólico e L indica um lipídeo, composto que é alvo comum da ação dos radicais livres e que após ser oxidado leva a uma reação em cadeia com diversas outras oxidações semelhantes (reações descritas no item 2.1).

$$LOO^{\bullet} + FOH \rightarrow LOOH + FO^{\bullet} \qquad (1)$$

$$LOO^{\bullet} + FOH \rightarrow ROO^{-} + FOH^{\bullet +} \rightarrow LOOH + FO^{\bullet} \qquad (2)$$

O primeiro mecanismo é o mais estudado, sendo que cálculos teóricos do valor da energia de dissociação da ligação do hidrogênio (EDL) (termo em ingles – BDE – Bond Dissociation Energy) são feitos, juntamente com estudos que tentam predizer a modificação que substituintes, ligados ao anel aromático, podem produzir (ΔEDL) (Brinck et al., 1997; Wright et al., 2001; Lucarini et al., 2003).

Outro mecanismo que auxilia a ação antioxidante dos compostos fenólicos é a estabilização adquirida pela formação de ligação intramolecular de hidrogênio (figura 7), quando ocorre a sua oxidação. Caso haja mais de uma hidroxila no composto, este fator aumenta a estabilidade do radical formado e diminui o valor de EDL, sendo que vários trabalhos citam o número de hidroxilas como um fator importante no aumento da atividade antioxidante (Rice-Evans et al., 1997; Wrigth et al., 2001; Lucarini et al., 2003; Butkovic et al., 2004; de Souza & de Giovani, 2004, Lithoxoidou & Bakalbassis, 2005).

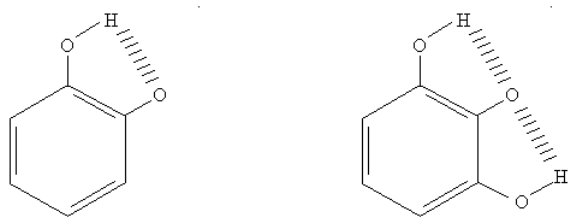

Figura 7. Lado esquerdo indica a estabilização do radical pela ligação com o hidrogênio intramolecular e o lado direito mostra uma maior estabilização, pois ocorrem duas ligações com hidrogênio. O valor de EDL é menor quando se forma a estrutura do lado direito.

Os compostos fenólicos de origens vegetais podem ser divididos em dois grupos: os flavonóides e os não flavonóides. Dentre os compostos não flavonóides, podemos destacar os derivados da estrutura química C_6-C_3, específicas dos ácidos

cafêico e p-cumárico e os derivados da estrutura química C_6-C_2-C_6, pertencentes ao grupo do resveratrol, presente em uvas e vinhos (Rice-Evans et al., 1997).

Já os flavonóides, que constituem um numeroso e poderoso grupo de antioxidantes, estão presentes nos vegetais, principalmente em frutas, verduras, temperos e chás. A estrutura básica comum, descrita como C_6-C_3-C_6, está baseada em um núcleo que consiste de dois anéis fenólicos, A e B, ligados por uma cadeia de 3 átomos de carbono. Esta cadeia, por sua vez, fecha-se em um terceiro anel, C, heterocíclico do tipo pirano, com um átomo de oxigênio (figura 8).

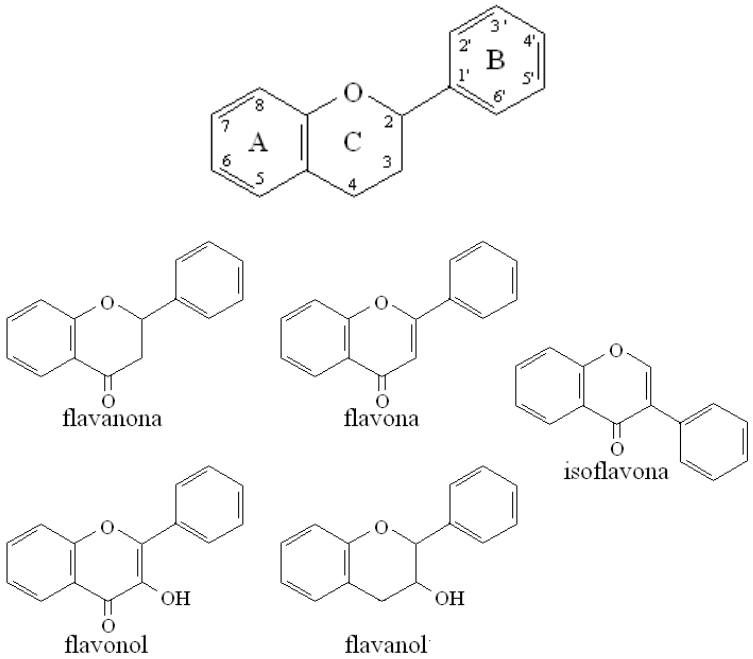

Figura 8. No alto vê-se a estrutura básica dos flavonóides e o sistema de numeração.Em baixo tem-se as variações estruturais dos flavonóides e sua nomenclatura.

Variações estruturais nos anéis subdividem os flavonóides (figura 8). Caso haja uma carbonila no carbono 4, temos as flavanonas; se a carbonila vir junto com uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3, temos as flavonas; caso haja além da carbonila e da dupla ligação uma hidroxila no carbono 3 temos os flavonóis. Ainda temos os flavanóis (flavan-3-ol) onde não há carbonila e nem dupla ligação, somente a hidroxila no carbono 3; e as isoflavonas com o anel B ligado no carbono 3.

A ação antioxidante dos flavonóides surge devido ao extenso sistema de conjugação dos elétrons-π e das hidroxilas que se ligam a estrutura básica. Estas hidroxilas, por ligarem em diferentes posições, diferenciam os diferentes compostos,

com diferentes atividades antioxidantes (Rice-Evans et al., 1997; Gardner et al., 1998).

A quercetina, um dos flavonóides mais abundante nos alimentos, é um flavonol com quatro hidroxilas ligadas aos carbonos 5, 7, 3' e 4'. Pelo fato de também ser um dos flavonóides mais estudados, será usado em nosso estudo como um composto de referência.

A atividade antioxidante dos flavonóides também pode ser associada a sua capacidade de quelar metais. A atividade antixidante de alguns flavonóides, após formar complexo com íons metálicos foi estudada, sendo que as conclusões apontaram que a atividade antioxidante dos complexos metálicos é superior a do flavonóide puro, e a quercetina e seus complexos como os compostos de melhor desempenho. (de Souza & de Giovani, 2004).

C) Carotenóides.

Os carotenóides são compostos naturais que formam grupos de pigmentos coloridos, normalmente amarelados ou róseos, encontrados em plantas e tecidos de alguns animais marinhos, tipo lagosta. Dos mais de 600 tipos de carotenóides, cerca de 50 são precursores da vitamina A, mas podemos destacar β-caroteno, α-caroteno e licopeno. A clivagem do β-caroteno para formar a vitamina A está indicada na figura 5.

2.3. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE).

A técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) é uma das mais importantes para análise da estrutura da matéria. Suas aplicações estão relacionadas com dosimetria das radiações ionizantes; datação de fósseis (dentes, ossos e conchas), rochas e materiais arqueológicos (principalmente calcita); microscopia (Swartz, 1972; Ikeya, 1993); e análises de radicais livres e atividades antioxidantes (Figueiredo et al., 1993; McPhail, 2003; Polovka et al., 2003). Estes procedimentos

decorrem da especialidade da técnica em gerar um sinal com intensidade proporcional a quantidade de spins desemparelhados.

Na dosimetria das radiações ionizantes, materiais como hidroxiapatita (principal constituinte dos tecidos duros dos mamíferos), dentes, ossos (Kinoshita et al., 2003; Santos et al. 2005) e aminoácidos como a alanina (Chen et al., 2002; Rossi et al. 2005) são usados. Na datação de fósseis e materiais arqueológicos utilizam-se principalmente calcita, conchas, ossos e dentes (Kinoshita et al., 2002 e 2005). Nestes casos, além de utilizar para o resultado a intensidade do sinal, utiliza-se também o fato da dose da radiação ser proporcional à quantidade de radicais livres gerados e o método das doses aditivas.

O método das doses aditivas, desenvolvido por Ikeya, 1993, consiste em medir inicialmente o sinal de RPE da amostra irradiada com dose desconhecida – no caso de dosimetria – ou da amostra que recebeu radiação natural por um longo período de tempo – no caso de datações. A seguir irradia-se a amostra com doses sucessivas de uma fonte calibrada, e mede-se o sinal de RPE após cada irradiação – o aumento da dose aumenta a quantidade de radicais livres e conseqüentemente a amplitude do sinal de RPE. Com a determinação da intensidade do sinal constrói-se o gráfico de crescimento do sinal de RPE, proporcional ao crescimento da quantidade de radicais livres, com a dose de laboratório. Ajustando os pontos experimentais temos a curva de crescimento do sinal com a dose, e a partir desta curva podemos determinar a dose inicial que é proporcional à intensidade do sinal medido inicialmente. No caso de dosimetria esta dose inicial é o que se procura e no caso de datações pode-se determinar por quanto tempo a amostra ficou exposta à radiação natural, ou seja, a data de sua origem ou de algum processo, como o aquecimento ou cristalização do material que determina a origem do tempo.

A figura 9 exemplifica o método: as doses D_1, D_2, D_3 e D_4 foram aplicadas após a medida inicial, I_0, e produziram as intensidades I_1, I_2, I_3 e I_4 respectivamente. Ao ajustar os valores obtidos em um gráfico, o resultado é uma variação linear, que após o devida análise obtém-se o valor de DA como sendo a dose desconhecida que gerou o valor inicial I_0 antes das irradiações de laboratório.

Para se medir um sinal de RPE, proporcional a quantidade de spins desemparelhados presentes na amostra, a aplicação da técnica se fundamenta na

análise do espectro de absorção de radiação (microondas) pelos momentos de dipolo magnético do spin do elétron, o qual é obtido medindo-se a atenuação da radiação em função do campo magnético. A absorção de energia ocorre quando o elétron transiciona entre os níveis energéticos de seus momentos de dipolos magnéticos, sendo que a degenerescência entre os níveis energéticos é eliminada por um campo magnético externo agindo sobre a amostra. A energia de um fóton (**h.ν**) da radiação deve ser igual à diferença de energia entre dois níveis energéticos dos momentos de dipolos magnéticos. Importante citar que a forma do espectro corresponde aproximadamente à primeira derivada de um espectro de absorção característico.

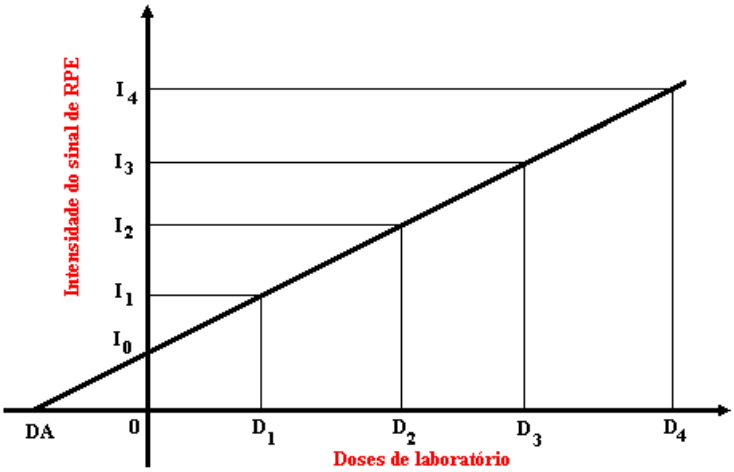

Figura 9. Figura exemplificando o método das doses aditivas, sendo que DA indica a dose que é determinada após as sucessivas irradiações de laboratório.

Em uma visão clássica, o dipolo magnético do spin do elétron é gerado devido à rotação do elétron sobre o seu próprio eixo. A direção deste dipolo é paralela ao eixo de rotação (figura 10).

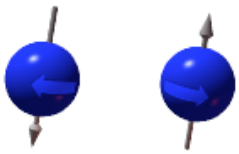

Figura 10. Desenho indicando a rotação de uma partícula eletrizada em torno de seu próprio eixo e o dipolo magnético gerado devido a esta rotação.

As moléculas da amostra a ser analisada devem possuir elétrons desemparelhados (presentes em radicais livres) para que o spin produza um dipolo magnético não nulo. Quando há elétrons emparelhados, estes rotacionam em sentidos opostos e o dipolo magnético resultante é nulo.

Ao aplicarmos um campo magnético $\vec{\mathbf{H}}$ na amostra com elétrons desemparelhados, criamos um vetor magnetização devido à direção preferencial do alinhamento dos dipolos magnéticos na direção de $\vec{\mathbf{H}}$, sendo que estes anteriormente possuíam alinhamento aleatório (figura 11).

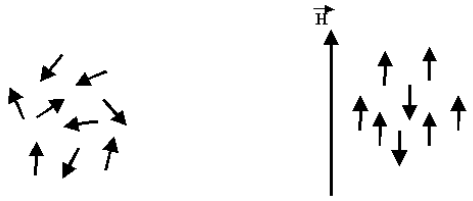

Figura 11. Desenho indicando a direção dos dipolos magnéticos: na esquerda temos direções aleatórias enquanto que na direita temos os dipolos alinhados devido ao campo magnético externo.

A energia **W** associada a cada momento de dipolo magnético $\vec{\mu}$ é dada pelo produto escalar entre o campo magnético $\vec{\mathbf{H}}$ e o momento do dipolo:

$$\mathbf{W} = -\vec{\mu} \cdot \vec{\mathbf{H}} = -\mu \mathbf{H} \cos\theta$$

Nesta equação θ indica o ângulo entre o vetor dipolo magnético e o vetor campo magnético. No caso dos dipolos magnéticos estarem na mesma direção do campo magnético teremos o ângulo θ igual a 0º ou 180º, e a energia **W** fica reduzida a dois possíveis valores:

$$\mathbf{W} = -\mu \,.\, \mathbf{H} \,.\, \cos 0^{\circ} = -\mu \,.\, \mathbf{H}$$

$$\mathbf{W} = -\mu \,.\, \mathbf{H} \,.\, \cos 180^{\circ} = \mu \,.\, \mathbf{H}$$

O momento magnético possui uma relação com o momento angular que é dado pela expressão:

$$\vec{\mu} = \gamma . \vec{\mathbf{p}} = (-\mathbf{e} / 2\mathbf{mc}) . \vec{\mathbf{p}}$$

Onde γ é chamada de razão de giromagnética e vale **8,79409 x 10^{10} $s^{-1}T^{-1}$**.

O momento angular total, $\vec{\mathbf{p}}$, é expresso pela soma dos momentos angular orbital e momento angular devido ao spin do elétron, no entanto, na maioria dos casos o momento angular orbital contribui muito pouco para o momento angular

total. Considerando que o momento angular total seja apenas o momento angular devido ao spin do elétron (sistema com **S=1/2**), os seus valores para projeções em uma dada direção são:

$$\mathbf{p = m_s \, . \, \hbar \qquad e \qquad m_s = \pm 1/2}$$

Ao associarmos as equações acima obtemos que em uma dada direção o módulo do momento de dipolo magnético vale:

$$\boldsymbol{\mu = m_s \, . \, (-e\hbar/2mc)}$$

O termo **eħ/2mc** é chamado de magnéton de Bohr e será representado por **β**:

$$\boldsymbol{\beta = e\hbar/2mc = 9{,}27401 \times 10^{-24} \ J/T}$$

Ainda é associado um fator na expressão, chamado de fator **g**. Este fator é requerido para os casos diferentes daqueles que envolvem momento angular puro. Com isto, o momento de dipolo magnético do spin do elétron $\vec{\mu}$ e a sua energia associada, **W,** podem ser calculados por:

$$\boldsymbol{\mu = - g \, . \, \beta \, . \, m_s}$$

$$\mathbf{W = g \, . \, \beta \, . \, m_s \, . \, H}$$

Os níveis de energia para os possíveis valores de $\mathbf{m_s = \pm 1/2}$, são chamados de energia de Zeeman e valem:

$$\mathbf{W = \pm g \, . \, \beta \, . \, H \, . \, 1/2}$$

No caso de um elétron fazer a transição entre os dois níveis energéticos de Zeeman, a diferença de energia entre estes dois níveis deve ser igual à quantidade de energia fornecida por meio de radiação eletromagnética (**h.ν),** ou seja:

$$\mathbf{h \, . \, \nu = \Delta W = g \, . \, \beta \, . \, H}$$

Esta última equação resume as condições para que ocorra a ressonância do spin do elétron.

2.3.1. Fator g.

O fator **g** é característico para cada tipo de composto (no caso de um elétron livre **g=2,00232**) e pode ser obtido pela equação:

$$\mathbf{g = h \, . \, \nu \, / \, \beta \, . \, H = 0{,}07144775067 \, . \, \nu(GHz) \, / \, H(T)}$$

Este fator é anisotrópico para cristais e para substâncias que possuem uma direção preferencial de orientação. Há alguns compostos que se tornam isotrópicos por fatores físicos não moleculares, como por exemplo, substâncias diluídas em líquidos de baixa viscosidade ou pó de cristais triturados. Nestes casos a isotropia é obtida devido à orientação randômica, seja das moléculas no líquido ou das partículas de pó do cristal.

Para descrever propriedades de ressonância paramagnética eletrônica em sistemas anisotrópicos, atribuímos que o fator **g** é dependente do ângulo entre o campo magnético e o eixo da amostra ou molécula. Quando o campo magnético tiver a direção do eixo x da molécula, ele será denominado de $\mathbf{H_x}$, e o fator **g** será:

$$g_{xx} = h \,.\, \nu \,/\, \beta \,.\, H_x$$

O mesmo ocorre para os eixos y e z onde teremos:

$$g_{yy} = h \,.\, \nu \,/\, \beta \,.\, H_y \quad \text{e} \quad g_{zz} = h \,.\, \nu \,/\, \beta \,.\, H_z$$

Deste modo podemos expressar o fator **g** como um tensor de segunda ordem:

$$g = \begin{pmatrix} g_{xx} & g_{xy} & g_{xz} \\ g_{yx} & g_{yy} & g_{yz} \\ g_{zx} & g_{zy} & g_{zz} \end{pmatrix}$$

A energia total do sistema:

$$W = \beta \,.\, m_s \,.\, g \,.\, H$$

$$W = \beta \begin{pmatrix} m_{s_x} & m_{s_y} & m_{s_z} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} g_{xx} & g_{xy} & g_{xz} \\ g_{yx} & g_{yy} & g_{yz} \\ g_{zx} & g_{zy} & g_{zz} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} H_x \\ H_y \\ H_z \end{pmatrix}$$

Para um radical, com sinal isotrópico $g_{xx} = g_{yy} = g_{zz} = g_{ef.}$, onde g_{ef} corresponde ao **g** efetivo.

Alguns sistemas possuem uma simetria axial onde $g_{xx} = g_{yy} \neq g_{zz}$, ou seja, os eixos x e y são equivalentes e apenas o eixo z possui anisotropia. Nestes casos o valor de g_{zz} é chamado de $g_{\parallel}$, enquanto que g_{xx} e g_{yy} são denominados de $g_{\perp}$. Sistemas sem nenhum tipo de isotropia, ou seja, $g_{xx} \neq g_{yy} \neq g_{zz}$, são chamados de ortorrômbicos.

2.3.2. Absorção de energia e relaxação spin-rede.

A interação de uma radiação eletromagnética, fótons de energia **h.ν**, com um elétron desemparelhado, sobre o qual atua um campo magnético $\vec{\mathbf{H}}$, faz com que este elétron sofra uma transição do nível inferior de energia **(- g . β . H . 1/2)** para o nível superior **(+ g . β . H . 1/2)**. Do mesmo modo pode ocorrer o contrário, ou seja, o mesmo elétron sofrer uma relaxação do nível superior para o nível inferior (figura 12), liberando energia para o meio que o cerca (rede).

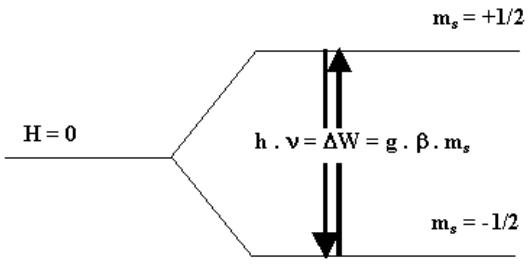

Figura 12. Esquema mostrando as transições do elétron entre os dois possíveis níveis de energia, provocada devido à absorção de energia (nível inferior para o superior) ou pela relaxação da rede (nível inferior para o superior).

Na presença do campo magnético $\vec{\mathbf{H}}$, existirá no sistema de spins, uma diferença de população **(n_0)** entre os dois níveis de energia, considerando o equilíbrio termodinâmico em uma temperatura **T**. A relação entre a quantidade de elétrons que estão no nível superior **(N_+)** e a quantidade de elétrons que estão no nível inferior **(N_-)** será obtida pela distribuição de Boltzmann:

$$\frac{N_+}{N_-} = e^{\left(-\frac{\Delta W}{kT}\right)} = e^{\left(-\frac{g\beta H}{kT}\right)}$$

Como existe uma diferença de população quando o sistema se apresenta em equilíbrio termodinâmico, podemos concluir que o sistema não pode ganhar energia indefinidamente, sendo que à medida que o sistema absorve a energia da radiação eletromagnética, o excesso deve ser liberado para a rede. Este processo é chamado de mecanismo de relaxação spin-rede. Toda vez que o valor de N_+ supera o valor de equilíbrio, devido à absorção de energia, o mecanismo de relaxação restabelece o

equilíbrio, permitindo assim, que ocorra a absorção da radiação de forma contínua e o mecanismo da ressonância seja observado. A principal característica do mecanismo de relaxação spin-rede é o tempo de relaxação, denominado de $\mathbf{T_1}$, que caracteriza a taxa de transferência de energia do sistema para a rede.

Pode-se analisar o processo de relaxação com base nas probabilidades de que um elétron desemparelhado sofra a transição entre os níveis energéticos possíveis. Chamaremos de $\mathbf{P\uparrow}$ a probabilidade por unidade de tempo de que o elétron experimente uma transição do nível inferior para o nível superior devido à absorção de radiação, e $\mathbf{P\downarrow}$ a probabilidade contrária. A taxa de mudança para o nível superior (devido à absorção da radiação) é dada por:

$$\frac{dN_+}{dt} = N_- P\uparrow - N_+ P\downarrow$$

Sendo $\mathbf{N} = \mathbf{N_+} + \mathbf{N_-}$ o número total de spins e, $\mathbf{n} = \mathbf{N_+} - \mathbf{N_-}$ a diferença de população entre os dois níveis, então:

$$N_+ = 1/2\ (N + n) \quad \text{e} \quad N_- = 1/2\ (N - n)$$

Combinando as duas equações acima podemos escrever:

$$\frac{dn}{dt} = 2\frac{dN_+}{dt} = N\left(P\uparrow - P\downarrow\right) - n\left(P\uparrow + P\downarrow\right)$$

Assumindo que $\mathbf{P\uparrow} = \mathbf{P\downarrow} = \mathbf{P}$, podemos concluir:

$$\frac{dn}{dt} = -2nP$$

Onde a probabilidade $\mathbf{P}$ está relacionada com a intensidade da radiação eletromagnética.

Se considerarmos agora $\mathbf{W\uparrow}$ como sendo a probabilidade por unidade de tempo para que a relaxação spin-rede produza uma transição do nível inferior para o superior e, $\mathbf{W\downarrow}$ a probabilidade contrária, então, a taxa de mudança do nível superior (causada pela relaxação) é dada por:

$$\frac{dN_+}{dt} = N_- W\uparrow - N_+ W\downarrow$$

Seguindo o mesmo raciocínio descrito anteriormente, como nas transições devido à absorção de radiação, chegamos ao seguinte resultado:

$$\frac{dn}{dt} = 2\frac{dN_+}{dt} = N(W\uparrow - W\downarrow) - n(W\uparrow + W\downarrow)$$

Substituindo na equação acima o valor $T_1 = 1 / (W\uparrow + W\downarrow)$ que representa o tempo característico de relaxação spin-rede e, $n_0 = N (W\uparrow - W\downarrow) / (W\uparrow + W\downarrow)$ que representa a diferença de população em equilíbrio termodinâmico, (observar que neste caso $W\uparrow \neq W\downarrow$, pois senão n_0 seria zero) a equação acima fica:

$$\frac{dn}{dt} = \frac{n_0 - n}{T_1}$$

Combinando as duas taxas de transição, a que ocorre devido à absorção de radiação com a que ocorre devido à relaxação spin-rede, podemos obter a taxa de transição total:

$$\frac{dn}{dt} = \frac{n_0 - n}{T_1} - 2nP$$

Como no caso estacionário $dn/dt = 0$, pode-se concluir:

$$n = n_0 / (1 + 2 P T_1)$$

Caso $2 P T_1 << 1$, então $n \cong n_0$ e a absorção de radiação não perturba em muito a diferença de população de seu valor quando em equilíbrio termodinâmico. No entanto, se $2 P >> 1 / T_1$, a diferença de população tende a zero $(n \rightarrow 0)$, pois o sistema de spins não pode liberar o excesso de energia absorvida para a rede de modo suficientemente rápido. Esta condição é conhecida como saturação de microondas. Como a probabilidade **P** depende da potência da radiação, a forma de evitar a saturação é utilizar os menores valores possíveis para a potência, porém lembrando que o aumento da potência aumenta a precisão da medida. Devem-se fazer testes para medir a potência para qual a amostra sofre o processo de saturação, pois deste modo obtém-se a melhor precisão sem atingir a saturação (Poole, 1983; Ikeya, 1993).

2.3.3. Interação hiperfina nuclear.

O fato do elétron desemparelhado em uma amostra sofrer a ação dos campos magnéticos que agem sobre ele, constitui a principal condição para que possamos

analisar o efeito da ressonância magnética. A ação de um campo magnético externo sobre o elétron já foi analisada anteriormente, no entanto este mesmo elétron pode sentir também a ação do campo magnético gerado pelos núcleos vizinhos, sendo que este se adiciona ao campo magnético externo. Esta interação é chamada de interação nuclear hiperfina e faz com que os níveis de energia do elétron (figura 13) sofram um desdobramento criando uma estrutura espectral chamada de estrutura hiperfina (Poole, 1983).

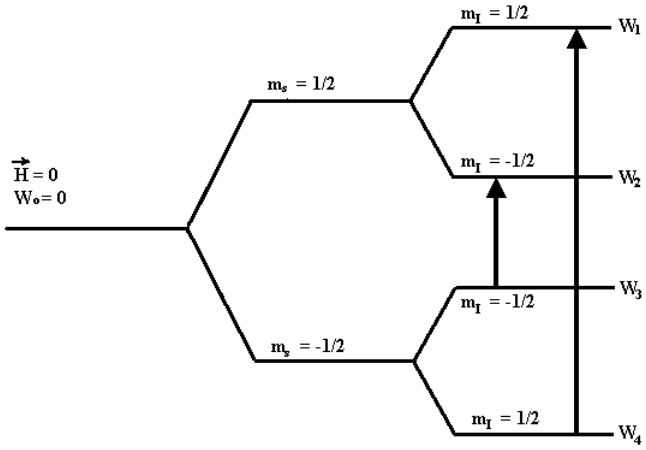

Figura 13. Esquema dos níveis de energia para um sistema com **S = I = 1/2**. As setas mostram as possíveis transições energéticas que o elétron pode sofrer, sendo que cada transição origina uma linha no espectro de ressonância magnética.

O spin nuclear é caracterizado pelo número quântico **I**, e como no caso do elétron, a sua projeção na direção do campo magnético aplicado é quantizada e representada pelo número quântico $\mathbf{m_I}$. Para um núcleo com spin **I**, $\mathbf{m_I}$ pode adquirir **2I+1** valores possíveis.

O campo magnético efetivo, que age sobre o elétron, é constituído da soma entre o campo magnético externo e o campo magnético gerado pelo núcleo, sendo que este último pode assumir **2I+1** valores. Deste modo, existirá **2I+1** campos magnéticos diferentes agindo sobre os elétrons desemparelhados (um tipo de campo magnético por elétron), gerando então **2I+1** linhas de igual intensidade no espectro de ressonância, conhecidas como linhas de desdobramento hiperfino. A separação entre as linhas é chamada de constante de desdobramento hiperfino, representada pela letra **a**, e corresponde a uma medida da intensidade da interação entre o elétron e o núcleo.

Por exemplo, no caso do átomo de hidrogênio, com um elétron desemparelhado (**S = 1/2**) e um núcleo de spin **I = 1/2**, o núcleo possui dois possíveis estados dados por $\mathbf{m_I = \pm 1/2}$. Neste caso a ressonância pode ser observada para dois valores de campo magnético externo e, o espectro é constituído de duas linhas de absorção produzidas pelas transições indicadas pelas setas da figura 13. O espectro é mostrado na figura 14, sendo a constante de desdobramento hiperfino **a = 50,68 mT** **(**Wertz, 1972).

Um outro exemplo é o caso do átomo de nitrogênio, cujo spin nuclear **I = 1**, possuindo um elétron desemparelhado (**S = 1/2**). Um composto que possui esta característica é o TEMPOL cuja estrutura está mostrada na figura 15, juntamente com seu espectro característico. Note que a estrutura faz com que a condição de ressonância apareça para 3 valores de campo magnético, ou seja, um tripleto, com 2I+1 linhas.

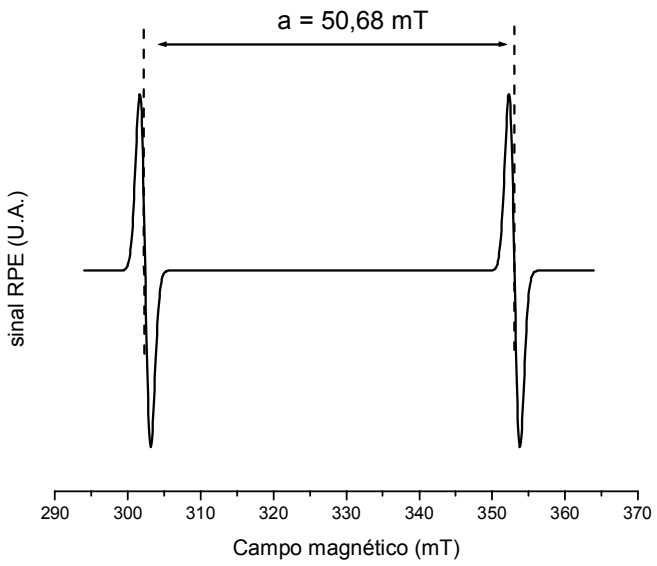

Figura 14. Espectro simulado de RPE para hidrogênio atômico com constante de desdobramento hiperfino de 50,68 mT. O software usado para a simulação é o SimFonia fornecido pela Bruker.

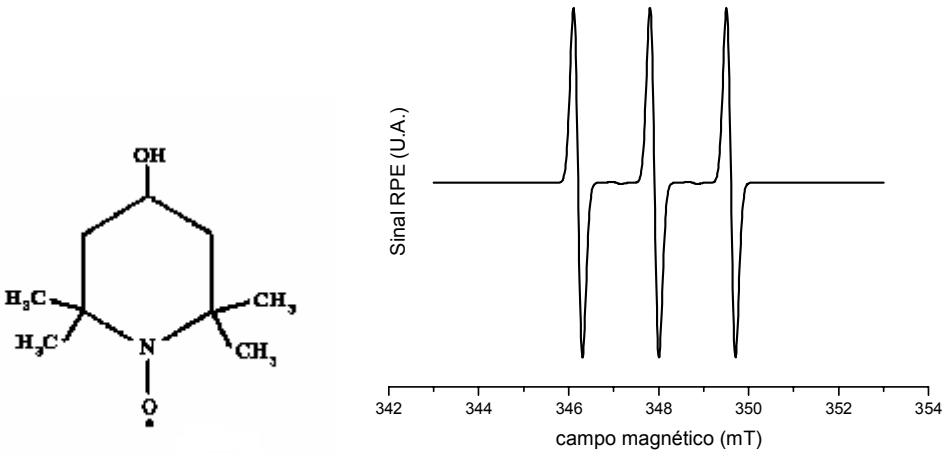

Figura 15. À esquerda a estrutura molecular do TEMPOL e a direita o seu espectro simulado, com o desdobramento hiperfino em três linhas (2I + 1), devido ao spin nuclear I = 1 do átomo de nitrogênio. O software usado para a simulação é o SimFonia fornecido pela Bruker

A) Interação hiperfina com vários núcleos equivalentes.

Devido à extensão espacial da função de onda de um elétron desemparelhado, é freqüente observar interação hiperfina com mais de um núcleo. Desta forma, a interpretação da estrutura hiperfina permite conhecer o estado do elétron. Existem dois casos limites: a) quando o elétron desemparelhado está localizado principalmente em um íon central rodeado de átomos pertencentes a moléculas vizinhas, predomina a interação com o núcleo central, sendo que as outras interações possuem menor intensidade; b) quando o elétron desemparelhado interage igualmente com núcleos equivalentes (comum em radicais orgânicos).

Neste último caso cada núcleo equivalente multiplica por 2I+1 o número de linhas geradas anteriormente. Se I=1/2, o espectro terá um número total de linhas simples igual a $\mathbf{2^n}$ (n é o número de núcleos). No entanto, levando-se em conta que ocorre equivalência entre algumas destas linhas, o número total de linhas que aparece no espectro é menor e estas possuem intensidades diferentes.

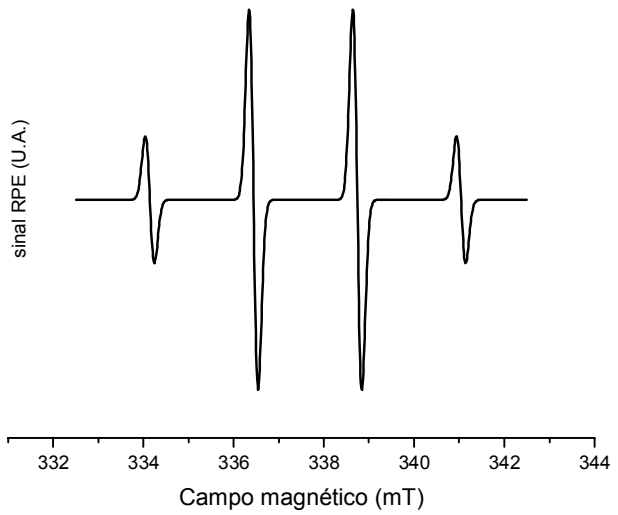

Figura 16. Espectro simulado de RPE do radical metil. Notar as quatro linhas na relação de intensidade 1:3:3:1 e constante de desdobramento hiperfino de 2,3 mT. O software usado para a simulação é o SimFonia fornecido pela Bruker.

Um exemplo é o radical metil (**CH_3**), onde o elétron desemparelhado apresenta interação com os três núcleos equivalentes de hidrogênio: haveria uma produção de 8 linhas simples, no entanto, o espectro aparece com quatro linhas (figura 16) na relação de intensidade 1:3:3:1. Duas linhas do espectro aparecem como sendo a superposição de 3 linhas simples equivalentes (intensidade 3 vezes maior). No caso geral de **n** núcleos equivalentes de spin **I = 1/2** observam-se **n+1** linhas, enquanto que as intensidades são proporcionais aos coeficientes do binômio de Newton (Wertz, 1972; Poole,1983).

B) Interação hiperfina com núcleos não equivalentes.

Podem ocorrer casos com núcleos que não possuem constantes hiperfinas iguais, ou ainda, casos onde existam núcleos diferentes interferindo sobre o elétron desemparelhado (s = 1/2). Nestes casos a análise pode ser dificultada pela superposição dos espectros.

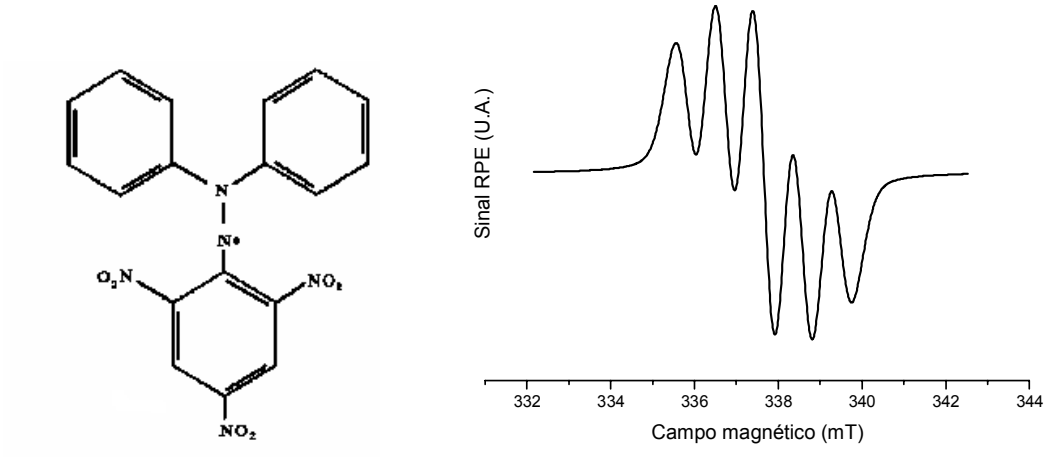

Figura 17. A esquerda a estrutura molecular do DPPH e a direita o seu espectro simulado, com cinco linhas, devido a superposição das linhas geradas pelo desdobramento hiperfino do elétron com 2 núcleos de nitrogênio, de spin nuclear, I = 1. O software usado para a simulação é o SimFonia fornecido pela Bruker.

Um exemplo é o DPPH, que possui dois núcleos de nitrogênios de spin I = 1. A interação do elétron com o primeiro núcleo gera três linhas com constante de 0,82 mT. Cada uma destas 3 linhas se desdobra em 3 outras linhas devido a interação com o segundo núcleo, com constante de 0,97 mT. Como a largura da linha é cerca de 6,7 G, há uma superposição destas 9 linhas e o espectro, um pouco mais complexo, apresenta cinco linhas com intensidades diferentes (figura 17).

Outro exemplo é o caso do aduto de spin DMPO-OH, obtido pela reação do radical livre hidroxila ($OH^{\bullet}$) com o *spin trap* DMPO. Neste caso o elétron sofre interferência de 2 núcleos, um de nitrogênio (I = 1) e outro hidrogênio (I = 1/2): o núcleo de nitrogênio gera 3 linhas, e o núcleo de hidrogênio faz com que cada uma delas se desdobre em duas, totalizando 6 linhas. No entanto as constantes hiperfinas são muito próximas, a_N = 1,49 mT e a_H = 1,48 mT, produzindo uma superposição. O espectro é constituído de 4 linhas nas intensidades 1:2:2:1, conforme indicado na figura 18.

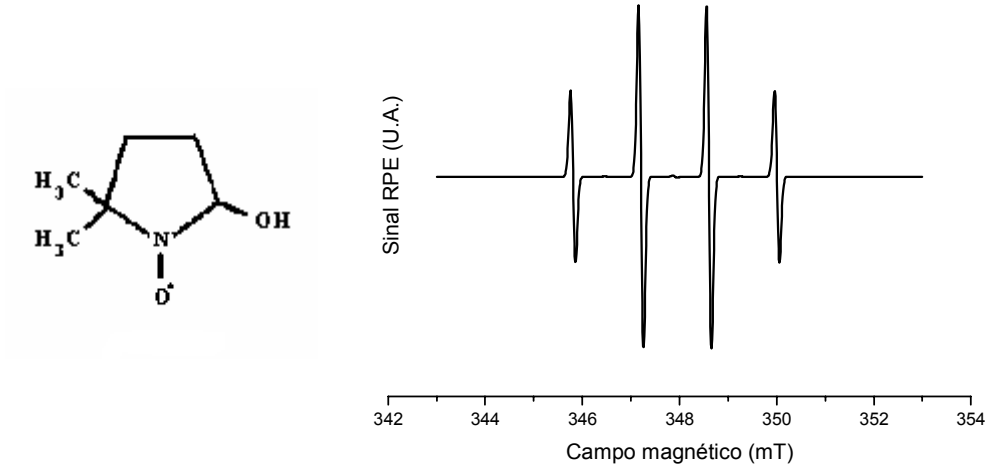

Figura 18. À esquerda a estrutura molecular do DMPO-OH e a direita o seu espectro simulado, com quatro linhas, na intensidade 1:2:2:1, devido a superposição das linhas geradas pelo desdobramento hiperfino do elétron com 1 núcleos de nitrogênio, de spin nuclear, I = 1, e outro de hidrogênio, I = 1/2. O software usado para a simulação é o SimFonia fornecido pela Bruker.

2.4. Fundamentos da Teoria do Funcional da Densidade (TFD).

A Teoria do Funcional da Densidade é uma aproximação autoconsistente, de primeiros princípios, possuindo uma ampla aplicação em sólidos e moléculas. Sua aplicação vem crescendo bastante e tem se mostrado muito eficiente para cálculo de propriedades eletrônicas e estruturais do estado fundamental (Vianna et al., 2004). O desenvolvimento desta teoria, cujo objetivo é resolver um sistema de N elétrons em função da densidade eletrônica ρ, encontrando suas propriedades eletrônicas, é mostrado, de forma resumida, a seguir.

2.4.1. Relação de Thomas-Fermi.

Os primeiros trabalhos na direção de usar a densidade eletrônica ρ é formulação conhecida como aproximação de Thomas-Fermi, cuja idéia é substituir a complicada função de onda de N elétrons e a equação de Schrödinger:

$$\left[\sum_{i}^{N}\left(-\frac{\hbar^2\nabla^2}{2m}+v(r_i)+\frac{1}{2}\sum_{i\neq j}U(r_i,r_j)\right)\right]\psi(r_1,r_2,....,r_N)=E\psi(r_1,r_2,....,r_N)$$

com $v(r_i)$ como sendo um potencial externo, $U(r_i, r_j)$ a interação elétron-elétron; pela equação que determina a energia E em função da densidade eletrônica ρ que é muito mais simples:

$$E(\rho)=C_F\int\rho(r)^{\frac{5}{3}}d^3r+\int\rho(r)v_N d^3r+\frac{1}{2}\int\frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{|r_1-r_2|}d^3r_1d^3r_2+U_{NN}$$

onde a primeira integral representa a energia cinética com $C_F=(3/10)(3\pi^2)^{2/3}$ sendo uma constante; a segunda integral representa a energia devido a interação elétron-núcleo com v_N sendo o potencial devido aos núcleos; a terceira integral representa a energia devido a interação elétron-elétron; e o termo U_{NN} indica a interação núcleo-núcleo (Hohenberg & Kohn, 1964, Vianna et al., 2004). Note que nestas expressões ainda não está indicado o termo de energia de troca (*Exchange*), que equivale a energia devida a interações de spin, com base no principio de exclusão de Pauli.

A grande vantagem da aproximação de Thomas-Fermi é permitir determinação da densidade eletrônica ρ em função do potencial v(r), sem passar pela função de onda. Se considerarmos um gás de elétrons livres confinados em uma caixa cúbica de lado L, um elétron livre tem a solução da equação de Schorödinger dada por ondas planas:

$$\psi_k(r)=\frac{1}{V^{1/2}}e^{ikr}$$

com a energia:

$$E_k=\frac{\hbar^2k^2}{2m}$$

Impondo as condições de contorno:

$$e^{ik_xL}=e^{ik_yL}=e^{ik_zL}=1$$

obtemos que $k_x = n_x 2\pi/L$, $k_y = n_y 2\pi/L$, $k_z = n_z 2\pi/L$, com n_x, n_y, n_z inteiros. Logo os vetores de onda permitidos são aqueles que no espaço dos k são dados por múltiplos de $2\pi/L$, sendo que ponto k ocupa um volume $(2\pi/L)^3$, isto é,

$$\Omega_k = \left(\frac{2\pi}{L}\right)^3$$

sendo que o volume total será dado por uma esfera de raio k_F (os elétrons mais energéticos):

$$\Omega_t = \frac{4}{3}\pi k_F^3.$$

O número N de elétrons, considerando que cada estado k tenha 2 elétrons com spins opostos, será:

$$N = 2\frac{\Omega_t}{\Omega_k} = \frac{k_F^3 L^3}{3\pi^2}$$

enquanto a densidade eletrônica:

$$\rho = \frac{N}{L^3} = \frac{k_F^3}{3\pi^2}.$$

A energia E de qualquer elétron em dado estado **k**, onde v(r) é o potencial eletrostático, em qualquer volume dentro do átomo, está ligada a relação:

$$E_F = \frac{\hbar^2 k_F^2}{2m} - ev(r).$$

Considerando um elétron ligado a um átomo de raio R, cujo potencial na sua superfície é dado por v(R), em um estado k máximo, $k = k_F$. Este elétron não pode ter energia menor que a energia potencial na superfície, ou seja:

$$\frac{\hbar^2 k_F^2}{2m} = e[v(r) - v(R)].$$

Substituindo nesta equação a relação entre k_F e ρ ($k_F^3 = 3\pi^2\rho$), obtém-se a expressão:

$$\rho(r) = \frac{1}{3\pi^2}\left(\frac{2me}{\hbar^2}\right)^{\frac{3}{2}}(v(r) - v(R))^{3/2}$$

que em conjunto com a equação de Poisson:

$$\nabla^2 v(r) = -4\pi\rho(r)$$

permite determinar a densidade eletrônica ρ em função do potencial v(r), sem passar pela função de onda.

Este resultado é o principal atrativo do modelo de Thomas-Fermi.

2.4.2. Teoremas de Hohenberg e Kohn.

O desenvolvimento da TFD está alicerçado em dois teoremas propostos por Hohenberg e Kohn (Hohenberg & Kohn, 1964):

TEOREMA 1: O potencial externo v(r) sentido pelos elétrons é um funcional único da densidade eletrônica ρ(r).

Este teorema nos diz que a densidade eletrônica do estado fundamental $\rho_0(r)$ deve conter as mesmas informações que a função de onda do estado em questão, ou seja, um observável físico designado pelo operador Ô é determinado da seguinte forma:

$$O = \langle \psi | \hat{O} | \psi \rangle = O[\rho(r)]$$

TEOREMA 2: A energia do estado fundamental $E_0[\rho]$ é mínima para a densidade eletrônica ρ(r) verdadeira do estado fundamental do sistema eletrônico.

Por meio destes dois teoremas de comprovação simples, ficou demonstrado que se pode usar a densidade eletrônica ρ como variável básica no estudo de sistemas de muitos elétrons.

2.4.3. Equações de Khon-Sham.

Khon e Sham (Kohn & Sham, 1965) foram os primeiros a apresentar uma estratégia para o cálculo de estrutura eletrônica de sistemas envolvendo muitas

partículas com o uso de E(ρ). Neste método é incluído, pela primeira vez, de forma explicita um termo para o cálculo da energia de troca e de correlação eletrônica (*Exchange e Correlation*). O termo de troca surge devido ao principio de exclusão de Pauli. O termo de correlação corresponde a uma correção que aparece devido ao tratamento das interações elétron-elétron serem consideradas de uma forma média, ou seja, cada elétron participa do potencial que dá origem ao movimento de todos os elétrons, não havendo um tratamento detalhado onde cada elétron é correlacionado com o movimento de todos os outros.

O funcional de energia pode ser escrito da seguinte forma:

$$E(\rho) = \int \rho(r) v(r) d^3r + \frac{1}{2}\int \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{|r_1 - r_2|} d^3r_1 d^3r_2 + T_0(\rho) + \int \rho(r) E_{xc}(\rho) d^3r$$

onde $T_0(\rho)$ é a energia cinética de um sistema de elétrons não interagentes com densidade $\rho(r)$ e $E_{xc}(\rho)$ indica o funcional de troca e correlação de um sistema interagente com densidade $\rho(r)$, e não é conhecido devido a complexidade do sistema.

Para obter o mínimo do funcional de energia devemos minimizar $E(\rho)$ introduzindo os multiplicadores de Lagrange ε, com o vínculo de que o número total de elétrons N é constante:

$$\int \rho(r) d^3r = N = \text{constante}$$

$$\delta\left(E(\rho) - \varepsilon\left(\int \rho(r) d^3r - N\right)\right) = 0$$

a partir da qual se obtém:

$$\int \delta\rho(r)\left\{\frac{\delta T_0}{\delta\rho} + v(r) + \int \frac{\rho(r')}{|r - r'|} d^3r' + v_{xc}(\rho) - \varepsilon\right\} d^3r = 0$$

escrevendo v^{KS} como sendo o potencial efetivo de Kohn-Sham, e correspondendo a soma:

$$v^{KS} = v(r) + \int \frac{\rho(r')}{|r - r'|} d^3r' + v_{xc}(\rho)$$

obtém-se a equação:

$$\frac{\delta T_0}{\delta\rho} + v^{KS}(\rho) = \varepsilon$$

que pode ser solucionada resolvendo a equação de Schrödinger de uma partícula:

$$\left(-\frac{1}{2}\nabla^2 + v^{KS}(\rho)\right)\psi_i(r) = \varepsilon_i\psi_i(r).$$

Sendo $T_0(\rho)$:

$$T_0(\rho) = -\frac{1}{2}\sum_i \int \psi_i^* \nabla^2 \psi_i d^3 r$$

e assumindo a função de onda ψ_i não ser degenerada, define-se $\rho(r)$ pela equação:

$$\rho(r) = \sum_{i=1}^{N} |\psi_i(r)|^2$$

sendo o somatório feito em todos os orbitais ocupados, e todos os N orbitais obtidos pela equação de Schrödinger monoeletrônica.

Note que v^{KS} depende de ρ que dependerá de v^{KS}, e desta forma a solução deve ser obtida por um cálculo autoconsistente, cujo ciclo esta mostrado na figura 19.

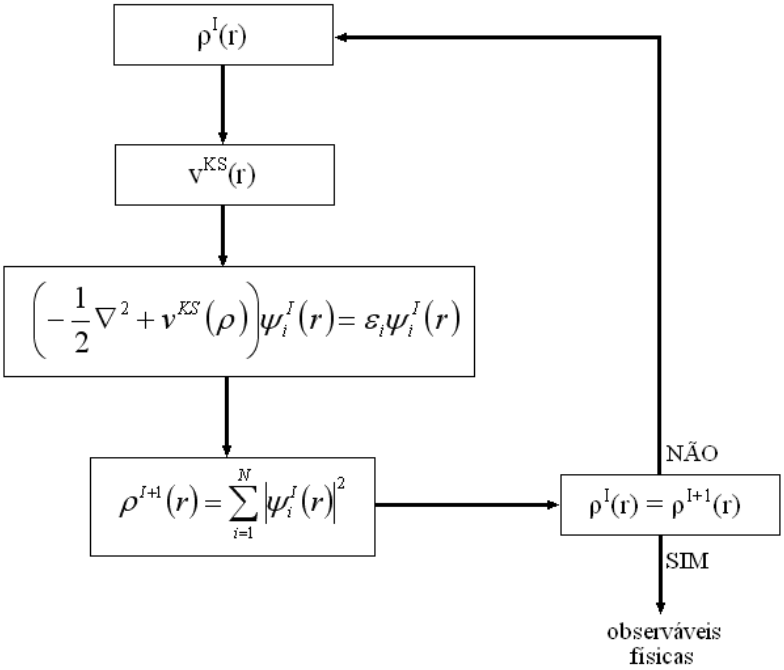

Figura 19. Ciclo de autoconsistência para solução das equações de Kohn-Sham (adaptado de Vianna, J. D. M.; Fazzio, A.; Canuto, S.; Teoria Quântica de Moléculas e Sólidos.; Ed. Liv. da Física – pág 227).

2.4.4. Aproximação da Densidade Local (ADL).

Para termos o potencial de Kohn-Sham $v^{KS}(\rho)$ inicial para o cálculo autoconsistente haverá a necessidade da escolha do funcional de troca e correlação $E_{xc}(\rho)$. Kohn e Sham (Kohn e Sham, 1965), considerando que ρ varia lentamente com a posição, propuseram o uso de uma aproximação onde o funcional $E_{xc}(\rho)$ em um dado ponto é considerado igual ao funcional de troca e correlação de um gás homogêneo de elétrons com mesma densidade. Essa aproximação levou o nome de Aproximação da Densidade Local (ADL) (termo em inglês – LDA – Local Density Approximation). O funcional de troca e correlação de um gás homogêneo pode ser escrito como sendo:

$$E_{xc}(\rho) = \int \rho(r)\varepsilon_{xc}[\rho(r)]d^3r \,.$$

O termo ε_{xc}, pode ser dividido em $\varepsilon_{xc} = \varepsilon_x + \varepsilon_c$, onde é separado a energia de troca da energia de correlação. A energia de troca pode ser determinada facilmente para um gás homogêneo e vale:

$$\varepsilon_x = -\frac{3}{4}\left(\frac{3}{\pi}\right)^{1/3}\rho^{4/3}$$

enquanto que o mesmo não ocorre com a energia de correlação, que é bastante complexa. Alguns trabalhos tem sido desenvolvidos com finalidade de determinar a energia de correlação em função da densidade eletrônica, sendo que alguns casos se consegue grande precisão (Vianna et al., 2004).

Há outras aproximações, dentre as quais, a Aproximação Generalizada em termos de Gradientes (GGA - termo em inglês Generalized Gradient Approximation) expressa o funcional de troca e correlação em termos de gradiente de variação de carga, sendo usada em casos onde a densidade de carga é fortemente não uniforme.

2.4.5. Pseudopotenciais.

A solução da equação de Schrödinger, independente do método utilizado, para sistemas periódicos é um problema de interesse desde os primórdios da mecânica quântica. O método do pseudopotencial usado dentro da teoria de Khon-Sham parece ser indicado para todos estes problemas.

Um método bastante utilizado, para solução de sistemas periódicos é o método de expansão em ondas planas, sendo que neste enfoque as condições de contorno, que aparecem nas fronteiras da célula unitária são automaticamente satisfeitas. Uma autofunção da forma:

$$\psi = e^{i(k+G)r}$$

onde G é um vetor de translação da rede recíproca. Para um dado estado eletrônico k, a função pode ser expandida na forma:

$$\psi_k = \sum_G C_{k+G} e^{i(k+G)r}$$

e a equação de schrödinger pode ser escrita da forma:

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2m}\nabla^2 + \hat{V}(r)\right]\left(\sum_G C_{k+G} e^{i(k+G)r}\right) = \varepsilon\left(\sum_G C_{k+G} e^{i(k+G)r}\right)$$

sendo que $\hat{V}(r) \equiv \hat{V}(r+R)$, com R sendo um vetor translacional.

Na solução deste método, quanto maior o número de ondas planas, melhor será o resultado obtido, porem com um custo computacional alto. A questão é, portanto, reduzir este número de ondas planas, mantendo o método preciso e aplicável.

O método proposto por Herring, 1940, conhecido como ondas planas ortogonalizadas, utiliza uma combinação linear de estados de caroço (núcleo mais elétrons de camadas internas). As ondas planas neste caso são construídas superpostas aos estados de caroço. Nesta construção as funções de onda ortogonalizadas se comportam como ondas planas em pontos distantes dos átomos, mas possuem características atômicas perto deles.

Os pseudopotenciais *ab initio* de norma conservada, são os mais utilizados nos cálculos com a Teoria do Funcional da Densidade (DFT) e possuem as seguintes propriedades:

a) os autovalores de energia obtidos para os estados de valência atômicos devem ser por construção iguais aos autovalores obtidos com o pseudopotencial;
b) as autofunções relativas à "solução exata" e à solução obtida com o pseudopotencial devem ser iguais para distâncias r acima de um raio de corte r_c devidamente escolhido;
c) as integrais de 0 a r, $r < r_c$ das densidades de carga da "solução exata" devem ser iguais às das soluções com pseudopotenciais (norma conservada);
d) a pseudofunção de onda obtida através do pseudopotencial não pode conter nodos, garantindo assim uma configuração suave para o pseudopotencial.

A substituição da função de onda verdadeira pela pseudofunção, e dos potenciais verdadeiros pelos pseudopotenciais, faz com que a solução de sistemas periódicos seja feita de forma rápida e confiável.

Para o uso do método em sistemas moleculares monta-se uma rede com apenas uma unidade molecular, mas com parâmetros grandes comparados as dimensões da molécula estudada, sendo que desta forma o sistema é periódico e as moléculas se comportam como se estivessem sozinhas, ou seja, em gás-fase. A figura 20 exemplifica o sistema molecular periódico.

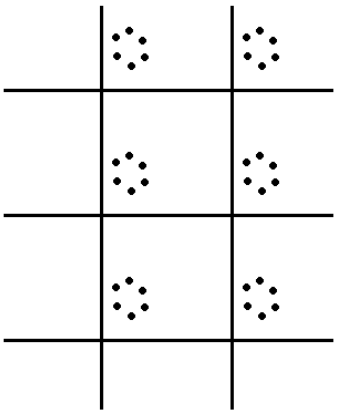

Figura 20. Representação esquemática de um sistema molecular periódico.

A figura 21 mostra as funções de onda, montada com todos os elétrons, chamada de função de onda real da "solução exata", e a pseudofunção de onda para o

átomo de oxigênio usando apenas os elétrons de valência, sendo o raio de corte de 1,55 Bohr. Notar que para $r > r_c$ as duas funções são iguais.

Ainda na mesma figura é mostrado o gráfico das densidades de cargas, integradas angularmente, em função do raio, comparativamente com as pseudodensidades de cargas, para o átomo de oxigênio.

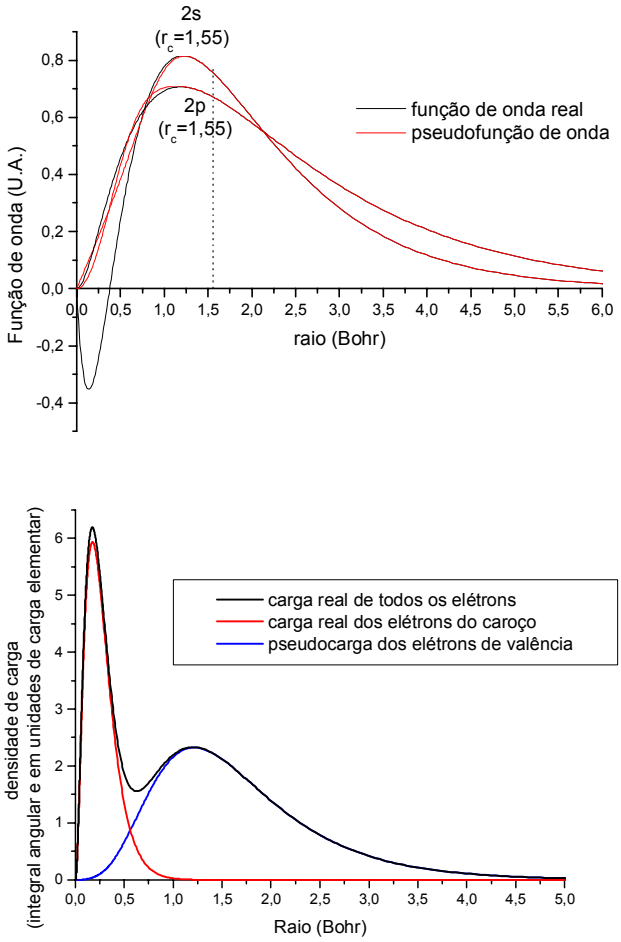

Figura 21. O gráfico acima mostra as funções de onda e as pseudofunções de onda do átomo de oxigênio e o gráfico abaixo a densidade de carga e a pseudodensidade de carga para o mesmo átomo.

3. Atividade antioxidante dos extratos vegetais.

Neste capitulo serão apresentados os procedimentos para a realização dos testes para medir as atividades antioxidantes de extratos vegetais de algumas plantas da flora brasileira, utilizando a espectroscopia de RPE, alem dos resultados obtidos e a discussão dos mesmos. As espécies vegetais testadas foram: *Swartzia langsdorffii*, *Machaerium villosum*, *Pterogyne nitens*, *Maytenus ilicifolia* (extrato da casca da raiz), *Pera glabrata*, *Aegiphyla sellowiana*, *Copaifera langsdorffii*, *Chrysophyllum inornatum*, *Iryanthera juruensis* (extratos das folhas e da semente) e *Didymopanax venosum*.

O primeiro procedimento, aplicado nos dois primeiros testes, foi implementado misturando uma solução do extrato vegetal com soluções de radicais livres: DPPH, TEMPOL. Neste caso mediu-se a capacidade do extrato de neutralizar os radicais livres, monitorando a concentração resultante dos radicais por meio da espectroscopia de RPE.

O segundo procedimento utilizou a técnica de *spin trapping* para medir a atividade dos extratos vegetais contra o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$). Neste caso o *spin trap* utilizado foi o DMPO e a reação de Fenton gerou os radicais hidroxilas. A espectroscopia de RPE mediu a quantidade do aduto de spin DMPO-OH formado após misturar os compostos da reação de Fenton (H_2O_2 e $FeSO_4$) com uma solução contendo DMPO e o extrato vegetal.

3.1. Materiais e métodos.

3.1.1. Seleção das plantas e preparação dos extratos.

As plantas foram coletadas no Parque Estadual de Mogi Guaçu (Cerrado), no Parque Estadual Jureia-Itatins (Floresta Atlântica) e na Reserva do Mocambo (Floresta Amazônica) e identificadas pelos botânicos Inês Cordeiro e Nelson Rosa. Espécimes formam depositados no Museu Paraense Emílio Goeldi, PA, e Herbário do Instituto de Botânica - SEMA, SP.

A preparação dos extratos seguiu o seguinte procedimento: casca de raiz (50 g) de *Maytenus ilicifolia*, folhas e sementes de *Iryanthera juruensis* (50 g de cada), folhas de *Swartzia langsdorffii, Machaerium villosum, Pterogyne nitens, Pera glabrata*, *Aegiphila sellowiana*, *Copaifera langsdorffii*, *Chrysophyllum inornatum*, *Didymopanax venosum* (50 g de cada) foram secas, picadas, amassadas e submetidas para extração com etanol (3x). Cada solução de etanol foi evaporada sobre baixa pressão, originando os extratos usados neste trabalho.

A escolha dos extratos foi baseada no resultado do teste preliminar de descoloração do β-caroteno em cromatografia em fina camada (TLC) (Pratt & Miller, 1984). Todos os extratos analisados evidenciaram a presença de antioxidantes polares após a observação das manchas amarelas em Rf 0,2-0,8 usando $CHCl_3/MeOH/H_2O$ (13:6:1) como eluente, exceto o extrato da semente de *Iryanthera juruensis*, que apresentou antioxidantes apolares em Rf 0,7-0,8 usando Hexano/Ethil Acetato (4:1) como eluente.

Todo este desenvolvimento foi realizado no Instituto de Química, Departamento de Química orgânica, da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), unidade de Araraquara, pelo grupo de pesquisa da profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva, sendo que este trabalho de extração e análise foi de responsabilidade do grupo da referida professora.

3.1.2. Reagentes.

DPPH, TEMPOL, DMPO e quercetina foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. Etanol absoluto e peróxido de hidrogênio a 30% (H_2O_2) foi adquirido da Labsynth LTDA – Brasil. O Sulfato ferroso ($FeSO_4$) foi adquirido da Vetec LTDA – Brasil. Os reagentes foram utilizados sem prévia purificação.

A solução tampão de fosfato foi preparada utilizando fosfato dibásico de sódio (Na_2HPO_4) e fosfato monobásico de sódio (NaH_2PO_4) adquiridos da Vetec LTDA – Brasil.

3.1.3. Espectrômetro RPE banda-X.

O espectrômetro Banda-X, Varian E-4, é equipado com uma cavidade ressonante retangular TE-102, modelo E-231. O controle do espectrômetro é realizado por meio de uma interface com um microcomputador Pentium através de uma placa GPIB (General Purpose Interface Board) e software escrito em ambiente HP-VEE. Esse software permite ao usuário a escolha dos parâmetros de aquisição do espectro: quantidade, tempo e largura de varreduras, intensidade e freqüência de modulação. A sensibilidade do amplificador lock-in é ajustada automaticamente, de acordo com o sinal de entrada. O valor da freqüência de microondas é lida por um freqüêncimetro e registrado em arquivo.

Durante a aquisição dos dados, os espectros são mostrados na tela do computador, sendo possível cancelar a varredura atual e também visualizar a média entre as várias varreduras realizadas. Essas características contribuem para a obtenção de espectros com melhor relação sinal/ruído. A cavidade ressonante recebe um fluxo ininterrupto de nitrogênio, a fim de mantê-la seca, evitando assim a degradação do fator de qualidade da cavidade. A figura 22 mostra uma fotografia do sistema.

Figura 22. Espectrômetro Banda-X. Vista geral mostrando os componentes. A direita se vê um garrafão para gerar o fluxo de nitrogênio gasoso seco na cavidade ressonante. Vê-se à esquerda o microcomputador controlador do sistema.

3.1.4. Medida da sensibilidade do espectrômetro e de referência.

Com finalidade de determinar a sensibilidade do espectrômetro RPE, preparou-se 100mL de solução com o radical livre TEMPOL em água a 1,1 mM, e a partir desta solução, realizou-se várias medidas, variando-se a concentração. Utilizaram-se capilares de diâmetro 1,0mm cheio desta solução, que ao serem colocados no interior da cavidade ressonante, que possui um comprimento de 2,29 cm, geram um espectro relativo a um volume de amostra de aproximadamente 18µL. Para o caso da solução inicial, haverá, dentro da cavidade, 1,2 x 10^{16} radicais livres gerando o espectro. Os tubos capilares, após serem preenchidos com a solução, foram lacrados e colocados dentro de um tubo de quartzo padronizado para RPE

(diâmetro interno 3.00mm) para, em seguida serem levados para a cavidade ressonante do espectrômetro. Os resultados são apresentados como a soma da amplitude das 3 linhas do espectro (figura 15). Para cada concentração, as medidas foram repetidas 3 vezes, e com o valor médio obtido, foi elaborado o gráfico da concentração de TEMPOL, que é proporcional à quantidade de spins na cavidade, pela intensidade do sinal. Este resultado serve como uma referência e indica a sensibilidade do sistema.

3.1.5. Teste de neutralização de DPPH.

O teste da atividade antioxidante contra o radical livre presente no DPPH foi implementado do seguinte modo. Foram preparadas soluções dos extratos em etanol, em diversas concentrações. Alíquotas de 40 μL de solução de DPPH em etanol (1mM) e 40 μL da solução de extrato foram misturadas, em seguida, agitou-se a solução resultante por 10s e a mesma foi transferida para um tubo capilar. O tubo capilar foi lacrado e colocado dentro de um tubo quartzo padronizado para RPE (diâmetro interno 3.00 mm) e finalmente o conjunto foi levado à cavidade ressonante do espectrômetro. O procedimento, desde o começo da mistura até o início da aquisição de espectro leva 3 minutos e foi feito em temperatura ambiente (~25º C). Para a medida de referência a solução de extrato foi substituída para 40 μL de etanol. O procedimento foi repetido por 3 vezes para cada extrato e o resultado apresentado corresponde a média. O procedimento foi repetido com a quercetina, em solução de etanol, para teste comparativo.

Na análise dos resultados, a partir da média dos espectros de RPE obtidos, foi gerado um espectro de mesma intensidade e forma, simulado pelo programa Winsim. Baseado no fato que a área sobre a integral do espectro é proporcional a quantidade de spins dentro da cavidade ressonante (Poole, 1983), a dupla integral do sinal foi avaliada como o correspondente da concentração do radical livre (figura 23). O espectro simulado, por não apresentar ruídos e nem variações na linha de base, possibilita uma melhor avaliação de sua integral. Os resultados foram colocados em um gráfico da intensidade da dupla integral contra a concentração do extrato, e

através de regressão linear a concentração que reduz a intensidade inicial do sinal a metade de seu valor inicial - IC50 - foi determinado.

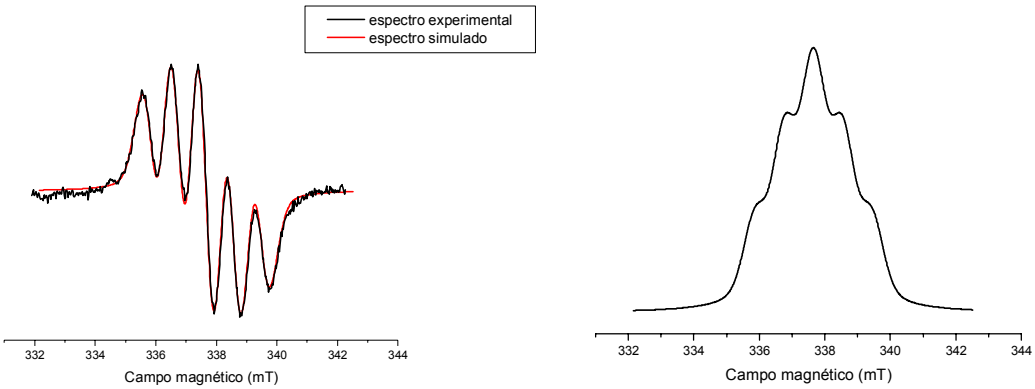

Figura 23. Vê-se à esquerda o espectro simulado pelo programa Winsim juntamente com o respectivo espectro experimental, do DPPH e à direita a integral do espectro simulado, cuja área é proporcional a quantidade de spins na cavidade ressonante do espectrômetro.

Cada espectro foi obtido por 3 varreduras com 30 s cada, as outras condições do espectrômetro foram: potência de microondas 50 mW, amplitude de modulação 0,4 mT e constante de tempo 50 ms.

3.1.6. Teste de neutralização de TEMPOL.

O teste da atividade antioxidante contra o radical livre presente no TEMPOL foi implementado com soluções dos extratos vegetais em etanol e em água. O procedimento teve a seguinte metodologia: foram preparadas soluções dos extratos em etanol e água deionizada, em concentração de 20 mg/mL. Alíquotas de 40 µL de solução de TEMPOL em água deionizada (11µM) e 40 µL da solução de extrato foram misturadas, em seguida agitou-se a solução resultante por 10s e a transferiu para um tubo capilar. O tubo capilar foi lacrado e colocado dentro de um tubo de quartzo padronizado para RPE (diâmetro interno 3.00 mm) e finalmente o conjunto foi levado a cavidade ressonante do espectrômetro. O procedimento, desde o começo da mistura até o início da aquisição de espectro leva 3 minutos e foi feito em

temperatura ambiente. Os espectros foram repetidos após intervalos de 1h, 2hs e 24hs. Para a medida de referência a solução de extrato foi substituída para 40 µL de etanol ou água deionizada. O procedimento foi repetido com a quercetina, em solução de etanol e de água deionizada (2mg/ml), para teste comparativo.

O extrato de *Chrysophyllum inornatum*, tanto em solução de etanol quanto em solução de água deionizada, por ter fornecido bons resultados para atividade de antioxidante no procedimento anterior, foi testado utilizando TEMPOL em concentrações mais altas e intervalos de tempo mais longos. Misturou-se 40 µL da solução de TEMPOL em água (0,11mM) e 40 µL da solução do extrato em etanol ou 40 µL da solução do extrato em água deionizada (20mg/ml). Na medida de referência a solução de extrato foi substituída para 40 µL de etanol ou água. A solução foi agitada e levada à cavidade ressonante de modo igual ao descrito no procedimento anterior, sendo agora monitorada por intervalo de tempo maior, até que a concentração de TEMPOL atingisse valores próximos do mínimo detectável.

Os resultados são apresentados como a soma da amplitude das 3 linhas do espectro (figura 15), a partir do qual é obtida a porcentagem de neutralização do TEMPOL. Esta medida é calculada através da equação abaixo:

$$P = \frac{ref - ext}{ref - bg}$$

Onde *P* é a porcentagem de diminuição do sinal, *ref* é a intensidade do sinal de referência, *ext* é a intensidade do sinal da mistura do radical livre com a solução de extrato e *bg* é o sinal de fundo.

3.1.7. Teste de neutralização do radical hidroxila ($OH^{\bullet}$).

Devido à meia-vida do radical hidroxila ser pequena, utilizou-se neste trabalho, para medir a atividade antioxidante dos extratos contra este radical, o método de *spin trapping*. A reação usada para gerar os radicais livres foi a reação de Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^{\bullet} + HO^{-}$) e o *spin trap* utilizado foi DMPO, que

após capturar o radical hidroxila forma o aduto de spin DMPO-OH, de meia-vida maior e detectável em espectrômetro de RPE.

Antes de testar a atividade antioxidante dos extratos, foi testado a estabilidade do aduto de spin DMPO-OH e também a influência da concentração da solução tampão de fosfato de sódio sobre esta estabilidade e a amplitude do sinal obtido. Misturou-se 20µL de solução de H_2O_2 em concentrações de 100mM; 20µL de solução de $FeSO_4$ a 10mM, 20µL DMPO a 50mM em solução tampão de fosfato de sódio (10mM e 100mM – ambas em pH 7,4). A solução resultante foi agitada por 10s e transferida a um tubo capilar, que depois de lacrado e colocado dentro de um tubo quartzo padronizado para RPE (diâmetro interno 3.00 mm) foi levada à cavidade ressonante do espectrômetro. O procedimento, desde o começo da mistura até o início da aquisição de espectro, leva 3 minutos e foi feito à temperatura ambiente. Espectros do aduto de spin DMPO-OH foram adquiridos com uma varredura de 30 s, potência de microondas de 50 mW, amplitude de modulação 0,1 mT, constante de tempo 50 ms. Em um segundo momento, foram feitos vários espectros – parâmetros idênticos ao procedimento anterior – para medir o decaimento, com intervalos de 1,5 minutos, até que a intensidade do sinal fosse próxima ao mínimo detectável; sendo o resultado indicado pela soma da amplitude do sinal em função do tempo.

Para o estudo da atividade antioxidante dos extratos, soluções de extratos em água de deionizada foram preparadas em diversas concentrações. Misturou-se 20µL de solução de H_2O_2 (100mM), 20µL de solução de $FeSO_4$ (10mM), 20µL de solução de extrato e 20µL DMPO a 50mM em solução tampão de fosfato de sódio (10mM). Para a medida de referência a solução de extrato foi substituída por 20 µL água deionizada. O restante do procedimento para aquisição das medidas é idêntico ao indicado anteriormente, incluindo os parâmetros do espectrômetro. O procedimento foi repetido três vezes para cada medida. Os resultados foram calculados como a soma da intensidade das quatro linhas do espectro (figura 18), e então colocados em um gráfico da intensidade total do sinal contra concentração do extrato, e por análise deste gráfico foi determinada a concentração de extrato que reduz o sinal radical a metade do valor da intensidade inicial - IC50.

3.2. Resultados e discussões.

3.2.1. Medida da sensibilidade do espectrômetro e de referência.

A partir dos resultados encontrados montou-se a tabela 1, onde temos a correspondência entre a amplitude do sinal de RPE e a concentração do radical livre TEMPOL. Com base nos dados da tabela 1 montou-se o gráfico e a reta de regressão linear indicado na figura 24.

Tabela 1. Relação obtida entre a concentração de TEMPOL e a amplitude de sinal no espectrômetro de EPR.

Concentração TEMPOL	Amplitude RPE (U.A.)
1,1 µM	$0,635 \times 10^{-5}$
11 µM	$6,86 \times 10^{-5}$
110 µM	$61,8 \times 10^{-5}$
550 µM	$313,2 \times 10^{-5}$
1.100 µM	$620,9 \times 10^{-5}$

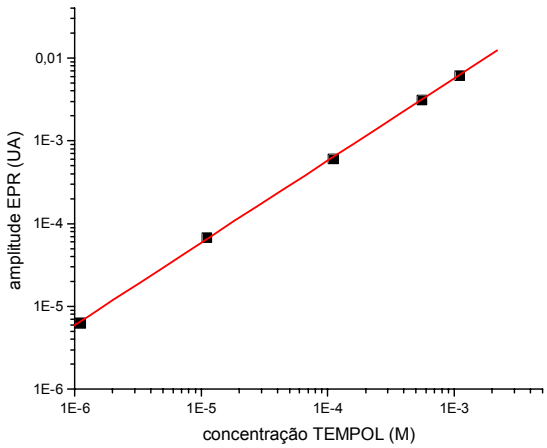

Figura 24. Gráfico obtido pela relação entre concentração de TEMPOL e amplitude do sinal de EPR, indicados na tabela 1.

A menor concentração de TEMPOL utilizada neste estudo foi de 1,1μM, cujo espectro obtido pode ser visto na figura 25. Esta concentração indica de aproximadamente 1,2 x 10^{13} spins dentro da cavidade ressonante do espectrômetro.

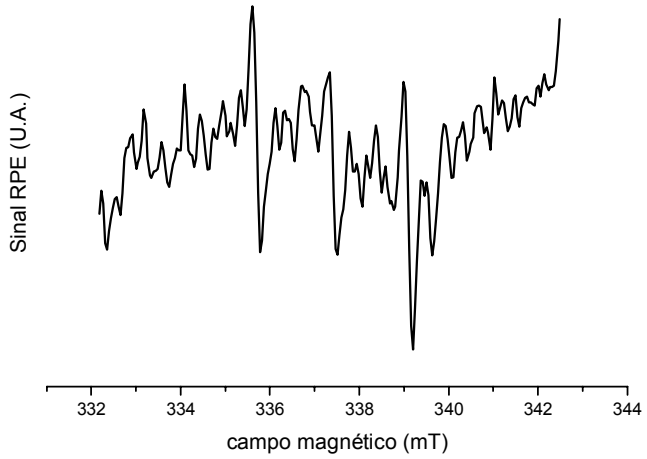

Figura 25. Espectro EPR obtido com amostra de TEMPOL a concentração de 1,1μM.

A reta de regressão linear obtida com a relação concentração por amplitude EPR mostra uma boa correlação linear, com coeficiente de correlação linear R=0,99 e, portanto pode ser usada como referência para medir a quantidade de radicais livres existentes em soluções estudadas.

É importante ressaltar que existe um valor mínimo de detecção. Ao analisar o espectro obtido com a menor concentração de TEMPOL (1,1μM) e comparar a relação sinal ruído nota-se que a amplitude do sinal, caso seja reduzida a metade, ainda será maior que o ruído que o aparelho apresenta. Com base nestes resultados pode-se concluir que o limite mínimo de detecção do aparelho ocorre quando houver na cavidade ressonante uma quantidade aproximada de 6,0 x 10^{12} radicais livres, correspondendo a uma concentração de 0,55μM. Caso haja uma quantidade menor pode ser difícil detectar se há ou não radicais livres na solução.

Este resultado é bastante significativo, pois poucas técnicas convencionais conseguem detectar, com pequenas quantidades de amostra, da ordem de microlitros, concentrações baixas, da ordem de décimos de micromolar.

3.2.2. Teste de neutralização de DPPH.

O teste de DPPH é de fácil execução, seguro e reprodutível, e por estes motivos tem sido usado amplamente para análise de atividades de antioxidante, tanto pela espectroscopia RPE, como pela técnica de descoloração, por meio de absorção ótica. Uma solução de DPPH gera absorção óptica na região de comprimento de onda 515-517nm, sendo que a intensidade desta absorção é proporcional à concentração da solução (Sanchez-Moreno, 2002). A figura 26 mostra um espectro de absorção ótica característico de uma solução de DPPH.

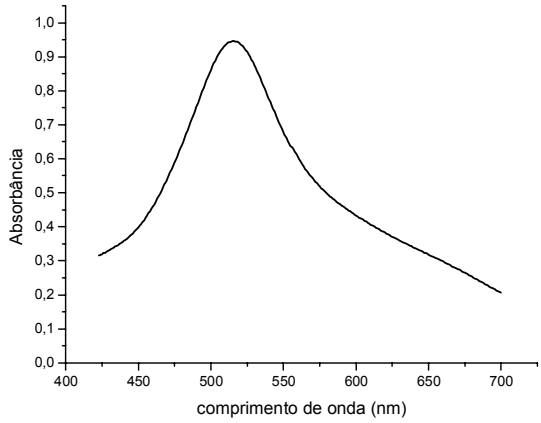

Figura 26. Absorbância de uma solução de DPPH, em etanol, a 1mM.

O espectro de DPPH em um espectrômetro RPE, quando misturado a um extrato vegetal, é constituído apenas por suas 5 linhas de absorção, e isto, em conjunto com o fato do produto gerado em uma reação redução, não produzir nenhum sinal, constitui vantagens em relação à espectroscopia ótica. Na espectroscopia ótica, além de se aparecer absorções devido aos constituintes do extrato, o DPPH ao reagir recebendo um hidrogênio e reduzir para sua respectiva hidrazina (DPPH-H), gera um incremento na absorção ótica em 320 nm (Yordanov e Christova, 1997).

O resultado da atividade antioxidante dos extratos vegetais testados está indicado na figura 27, na forma de IC 50.

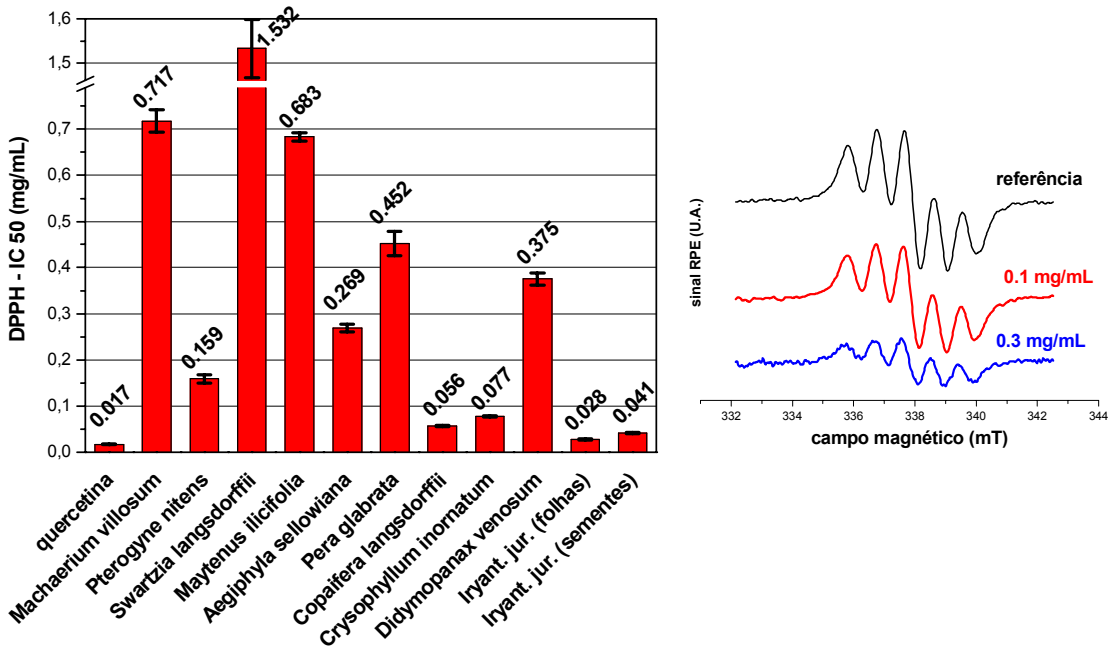

Figura 27. O gráfico à esquerda indica IC 50 para neutralização do DPPH, por extrato vegetal, e a direita espectros comparativos da ação do extrato de *Pterogyne nitens*, em diferentes concentrações, em uma solução de DPPH.

Extratos de *Iryanthera juruensis* (folha e semente) mostraram a maior atividade de antioxidante neste teste, inclusive com resultados mais eficientes que os obtidos para *Filipendula ulmaria*, uma planta originária da França, em um experimento semelhante (Trouillas et al., 2003). Os valores de IC50 obtidos para o extrato de folhas (0.028 mg/mL) e o extrato de sementes (0.041 mg/mL) de *Iryanthera juruensis*, quando comparado ao obtido para quercetina (0.0169 mg/mL) indica que a principal constituição destes extratos é de substâncias antioxidantes. Extratos de *Copaifera langsdorffii*, *Chrysophyllum inornatum* e *Pterogyne nitens* também possuem baixo valores de IC50, indicando alta capacidade antioxidante, sendo que trabalhos fotoquímicos com algumas destas espécies indicam a presença de substâncias antioxidantes (Bolzani et.al., 1995; Paiva et. al., 2004).

3.2.3. Teste de neutralização de TEMPOL.

Aqui o cálculo de IC50 não foi aplicado porque testes preliminares indicaram ser necessário grandes concentrações de extrato para gerar resultados significativos. Desta forma se optou por monitorar soluções do extrato em concentração alta (20 mg/mL) neutralizando o radical livre TEMPOL em concentração de 11µM, ao longo do tempo. O fato da solução de TEMPOL estar em água e parte do teste ser feito com o extrato solubilizado em água, torna o experimento mais semelhante com as situações encontradas *in vivo*, em oposição ao DPPH que estava em uma solução de etanol. O radical livre TEMPOL é mais estável que o radical DPPH e apesar de ser capaz de reagir com radicais livres nos organismos, apresentando uma atividade antioxidante (Polovka et al., 2003), sua aplicação em espectroscopia RPE, monitorando atividades antioxidantes, principalmente em sistemas hidrossolúveis é de grande importância (Yordanov e Ranguelova, 2000; Brezová et al., 2002).

A) Teste de neutralização de TEMPOL – extratos em solução de etanol.

A fração de neutralização de TEMPOL pela ação do extrato, ao longo do tempo, está indicada na figura 28. O extrato que tem a eficiência maior é o de *Chrysophyllum inornatum*, sendo que neste caso, em 2 horas a concentração de TEMPOL diminuiu de 5,5 µM para um valor menor do que 0,55 µM que é a concentração mínima que nosso espectrômetro pode detectar.

Os extratos de *Machaerium villosum*, *Pterogyne nitens*, *Pera glabrata*, *Iryantera juruensis* (folhas), and C*opaifera langsdorffii* mostraram resultados muito semelhantes, com porcentagens em torno de 70%-80%. Nestes casos o decréscimo na quantidade de radicais livres é próximo ao do mínimo detectável (cerca de 90%). O resultado para o extrato da casca de raiz de *Maytenus ilicifolia*, que neste teste mostrou baixa atividade antioxidante, não está em concordância com o teste contra o DPPH, o mesmo ocorre com os extratos de *Iryantera juruensis* (tanto folha quanto semente) que mostraram média atividade, e no teste do DPPH foram os mais eficientes.

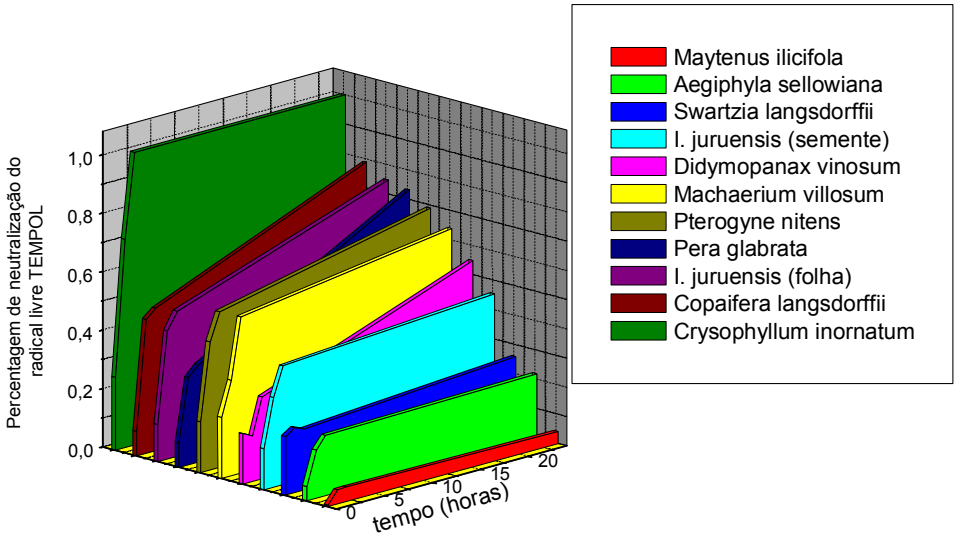

Figura 28. Fração de neutralização de TEMPOL, por extrato e por tempo (extratos em solução de etanol).

Na análise da diminuição de concentração de TEMPOL em contato com o extrato de *Swartzia langsdorffii*, inicialmente há uma diminuição para em seguida, entre 1h e 2h, haver um pequeno aumento. Foi descrito que TEMPOL pode ser reduzido a uma hydroxilamina e esta substância pode ser re-oxidada novamente a TEMPOL (Brezová et al., 2002), o que pode explicar este comportamento. O similar acontece com extrato de *Didymopanax venosum* entre 0h e 1h.

B) Teste de neutralização de TEMPOL – extratos em solução de água.

A fração de neutralização de TEMPOL pelos extratos e ao longo do tempo está indicada em figura 29. Novamente, o extrato que teve a maior eficiência neutralizando o radical livre TEMPOL foi o de *Chrysophyllum inornatum*, repetindo o desempenho no teste onde solução de etanol foi empregada.

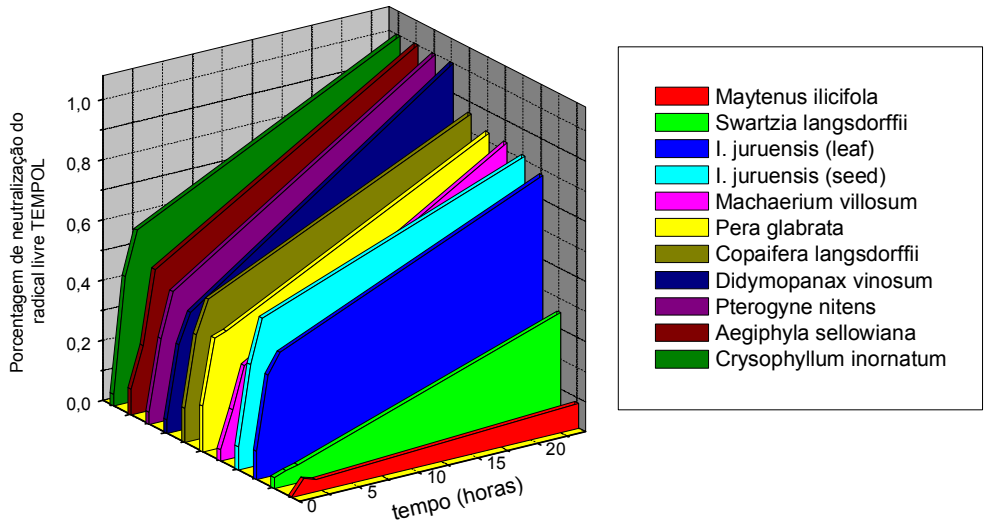

Figura 29. Fração de neutralização de TEMPOL, por extrato e por tempo (extratos em solução de água).

As maiores diferenças observadas, em relação ao teste contra o TEMPOL e os extratos em solução de etanol, ocorreram com os extratos de *Aegiphyla sellowiana* e *Didymopanax venosum*. Enquanto que em solução de etanol, estes extratos não apresentaram boa atividade antioxidante: *Aegiphyla sellowiana* – 22% e *Didymopanax venosum* – 55%, em solução aquosa eles reduziram, após 24 hs, a concentração de TEMPOL a valores abaixo do mínimo detectável, sendo que o extrato de *Aegiphyla sellowiana* foi o segundo mais eficiente e o de *Didymopanax venosum* o quarto.

As diferenças observadas nas atividades dos extratos da casca de raiz de *Maytenus ilicifolia* e dos extratos de *Iryantera juruensis* (tanto folha quanto semente) quando em solução de etanol, em relação ao teste do DPPH foram novamente observadas, ou seja, no teste do DPPH eles foram mais eficientes.

Em geral, o resultado obtido aqui foi similar ao obtido quando foram solubilizados em etanol, mas nota-se que a saturação da atividade antioxidante é menor. Ao visualizar os gráficos, fica claro que se os testes fossem expandidos no tempo, com maior concentração de TEMPOL, a porcentagem de neutralização, com os extratos em solução aquosa, aumentaria um pouco mais, enquanto que, em

solução de etanol, para tempos mais longos não haveria aumentos significativos, uma vez que as curvas, menos inclinadas, aparentam possuir uma saturação mais rápida. Este resultado indica que o desempenho da atividade antioxidante, para a maioria dos extratos, quando estão em soluções de água é mais lento, apesar dessa diferença ser pequena. O teste com concentrações de TEMPOL maiores e tempos maiores, usando o extrato de *Chrysophyllum inornatum*, conjuntamente com o teste utilizando quercetina, ajudou a entender esta conclusão.

C) Teste de neutralização de TEMPOL em maior concentração.

Os resultados do teste com concentrações de TEMPOL maiores e tempos maiores, usando o extrato de *Chrysophyllum inornatum*, é mostrado em figura 30 e aponta, depois de 40 horas de análise, que ocorre um decaimento exponencial de segunda ordem, com uma componente rápida e outra com ação mais lenta, conforme mostrado na equação abaixo:

$$\mathbf{INTENSIDADE(RPE) = Ae^{-k_A t} + Be^{-k_B t}}$$

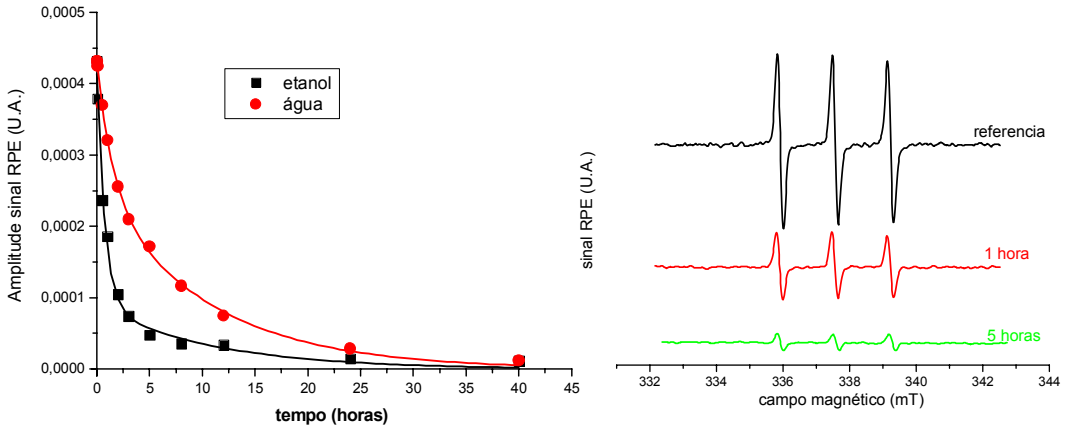

Figura 30. À esquerda, gráfico mostrando o declínio da intensidade do sinal de RPE, proporcional a concentração de TEMPOL, ao longo do tempo, quando misturado com extrato de *Crysophyllum inornatum*, solubilizado em água e em etanol e suas respectivas curvas de decaimento exponencial de segunda ordem. A direita, espectros de TEMPOL misturados com extratos de *Crysophyllum inornatum* após 1h, 5h, e o espectro de referência.

Os valores obtidos para as constantes de decaimento na análise gráfica foram k_A=0,694 h^{-1} e k_B=0,097 h^{-1} para o extrato em etanol e k_A=1,316 h^{-1} e k_B=0,093h^{-1}

para extrato solubilizado em água. A principal diferença acontece nas constantes A e B: os valores da relação entre estas constantes em etanol é A/B = $3{,}24x10^{-4}/8{,}98x10^{-5}$ = 3,61 e em água A/B = $1{,}75x10^{-4}/2{,}57x10^{-4}$ = 0,68.

Este resultado sugere que a neutralização do TEMPOL ocorre por duas vias distintas – reação A e reação B, com constantes cinéticas diferentes, k_A e k_B, mas sendo ambas dependentes da concentração de dois grupos de antioxidantes [A] e [B], respectivamente. Estas duas reações são de primeira ordem, e considerando independentes entre si, pode-se concluir que obedecem as equações (Russel, 1994):

$$\frac{\Delta[A]}{\Delta t} = -k_A[A]$$

$$\frac{\Delta[B]}{\Delta t} = -k_B[B]$$

Considerando a variação das concentrações em quantidades infinitesimais e fazendo a integração em um dado intervalo de tempo, temos:

$$[A] = [A]_0 e^{-k_A t}$$

$$[B] = [B]_0 e^{-k_B t}$$

onde $[A]_0$ e $[B]_0$ são as concentrações iniciais dos dois tipos diferentes de antioxidantes.

Considerando que: 1) a concentração do antioxidante A, que possui a constante cinética maior, $k_A > k_B$, seja menor que a concentração total de TEMPOL, mas que as concentrações dos dois juntos, A e B, seja suficiente para neutralizar todo o TEMPOL presente na solução; e 2) que há uma relação direta entre a variação de concentração de TEMPOL Δ[T] e as variações de concentração dos antioxidantes Δ[A] e Δ[B] podemos concluir que:

$$[T] \propto [A] + [B] = [A]_0 e^{-k_A t} + [B]_0 e^{-k_B t}$$

Sabendo que a intensidade do sinal de RPE é proporcional a concentração de TEMPOL, podemos analisar o resultado obtido conforme a equação mostrada inicialmente:

$$\mathbf{INTENSIDADE(RPE)} = Ae^{-k_A t} + Be^{-k_B t}$$

onde A e B são as concentrações iniciais dos antioxidantes $[A]_0$ e $[B]_0$ e a soma A+B equivale a concentração inicial de TEMPOL $[T]_0$.

É importante citar que, possivelmente, neste extrato existem mais de dois compostos antioxidantes, mas, por questões de ajuste, no nosso estudo, eles foram relacionados em dois grupos, que reagem pelas vias A e B.

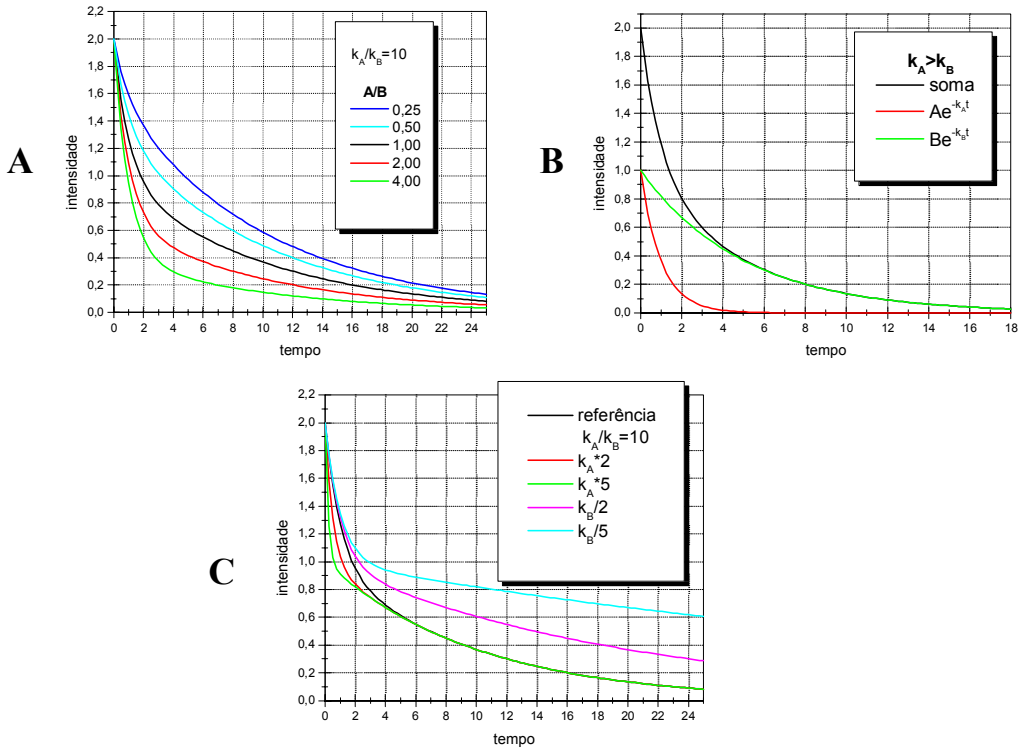

Figura 31. gráficos comparativos de funções de decaimento exponencial de segunda ordem: A) comparativo entre diversos valores A/B; B) comparativo entre a função de constante k_A rápida e k_B lenta; C) comparativo entre diversos valores de k_A e k_B.

Para melhor visualizar o resultado obtido, a figura 31 mostra alguns gráficos de funções exponenciais com diferentes valores de A, B, k_A e k_B. Com base nestes gráficos podemos notar que o decaimento é mais intenso no iní.cio da reação quanto maior for a relação A/B (figura 31-A), sendo que o valor de A é proporcional a concentração dos antioxidantes que reagem mais rapidamente, enquanto que o valor de B é proporcional a concentração dos antioxidantes que reagem mais lentamente. Nota-se ainda que a parte inicial da reação é dominada pela exponencial de decaimento rápido (apesar de haver influência da decaimento lento), constante cinética k_A, enquanto que a parte final é dominada pela exponencial de decaimento

lento, constante cinética k_B (figura 31-B). Por fim pode-se concluir que variações em k_A modificam a parte inicial do gráfico enquanto que variações em k_B altera a parte final do gráfico (figura 31-C).

Comparando o resultado obtido (figura 30), pode-se concluir que em etanol a concentração do antioxidante responsável pela reação rápida, maior constante cinética k_A, é superior a sua concentração quando solubilizado em água. Os motivos desta diferença, apesar do experimento não ser conclusivo, apontam nas seguintes direções: 1) o antioxidante que possui constante cinética maior é menos solúvel em água que em etanol; 2) alguns antioxidantes presentes na solução reagem mais rapidamente em etanol que em água; 3) etanol torna o TEMPOL mais reativo, incrementando a reação que possui constante cinética maior.

As componente lentas de decaimento (k_B) não apresentaram diferenças significativas, enquanto que as componentes rápidas (k_A), apesar de possuírem uma diferença mais significativa, ao longo de 40hs, não seriam muito importantes, como pode ser notado, comparando com a figura 31-C. Isto confirma o fato que a diferença é perceptível e a atividade de antioxidante de extratos em etanol é mais rápida para saturação.

Este resultado é compatível com a ação de várias substâncias antioxidantes, com cinéticas de reações diferentes, e esperado para um extrato bruto. Para ter uma noção da diferença existente entre as velocidades de reação dos compostos antioxidantes podemos citar o trabalho de McPhail et al., 2003, que em um estudo da cinética das reações de diversos flavonóides com o radical livre galvinoxil mostrou que a constante cinética pode variar de 5 $dm^3mol^{-1}s^{-1}$ até 14.463 $dm^3mol^{-1}s^{-1}$; em outro estudo, de mesma natureza, mas utilizando o radical livre DPPH, Butkovic et al., 2004, mostrou um resultado com intervalo menor, mas ainda bastante grande, de 75 $dm^3mol^{-1}s^{-1}$ até 4.400 $dm^3mol^{-1}s^{-1}$.

Outro fato que contribui para este resultado é o fato dos flavonóides, assim como outros compostos fenólicos, após reagir com os radicais livres, formarem quinonas, e esta reação ocorrer em dois passos (Foti & Ruberto, 2001; McPhail et al. 2003). Como as velocidades de reação destes passos são diferentes é de se esperar decaimentos exponenciais diferentes. A figura 32 mostra a neutralização de dois radicais livres por uma molécula da substância antioxidante.

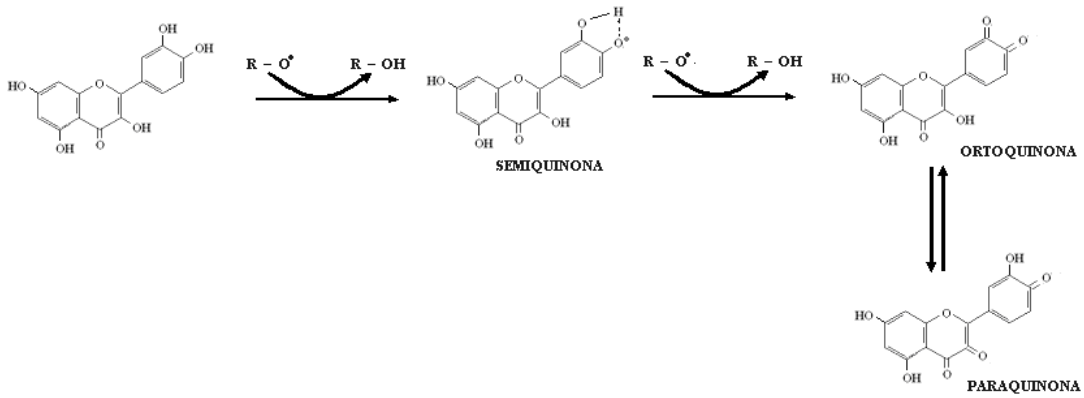

Figura 32. Dois estágios da oxidação da quercetina por moléculas de radicais livres (R – O•) e as respectivas quinonas formadas (adaptado de McPhail, D. B.; Hartley, R. C.; Gardner, P. T.; Duthie, G.G. : *J. Agric. Food Chem.,* 51:6, pag. 1687).

Finalmente, o estudo com quercetina indica que este flavonóide não possui boa atividade antioxidante contra o TEMPOL. O resultado obtido está indicado na figura 33 e mostra que após 24 horas da mistura da solução de TEMPOL (11µM) com a solução de quercetina (2mg/mL), há uma redução em cerca de 50% na concentração de TEMPOL, e em concordância com resultados anteriores, a quercetina em solução de etanol agiu mais rapidamente sobre o radical livre.

Há um consenso sobre a importância do solvente em reações antioxidantes, principalmente com combinações de compostos fenólicos. A atividade de antioxidante dos compostos fenólicos é maior em solventes de orgânicos apolares e diminui quando o HBA (aceptor de ligações de hidrogênio) do solvente aumenta (Jovanovic et al., 1994; Foti e Ruberto, 2001; Lucarini et al., 2003). Além disso, deve-se levar em consideração a baixa solubilidade dos flavonóides, principalmente em água. Estas propriedades ajudam para entender a diferença na atividade antioxidante dos extratos e da quercetina quando ocorre a variação do solvente.

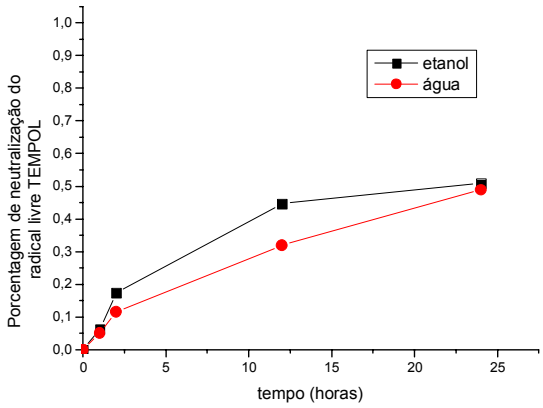

Figura 33. Porcentagem de neutralização do radical livre TEMPOL por quercetina em etanol e água, ao longo do tempo.

3.2.4. Teste de neutralização do radical hidroxila ($OH^{\bullet}$).

Para implementação do teste contra o radical de hidroxila, o método mais comum usa o *spin trap* DMPO e reação de Fenton (Finkelstein et al., 1980; Burkitt, 1993), mas alguns comentários são importantes. O resultado é obtido a partir do sinal de RPE relativo à quantidade do aduto de spin DMPO-OH presente na solução, indicando a quantidade de radical hidroxila que reagiu com o *spin trap*. Este método, porém, não indica, como ocorre a inibição deste sinal, apontado como o resultado de ações antioxidantes (Amarowicz et al, 2004; Li et al., 2004).

É importante citar que o aduto de spin formado não é um composto muito estável ao longo do tempo, sendo que sua estabilidade é função da concentração de peróxido de hidrogênio – maior estabilidade em menores concentrações – e sua meia vida foi medida em 2,6 horas em 0,6% de peróxido de hidrogênio e pH 7,4 (Finkelstein et al., 1980).

A) Determinação da concentração da solução tampão de fosfato.

A amplitude do sinal do aduto de spin em função da concentração de solução tampão de fosfato está indicada na figura 34. Foram feitas medidas com concentrações de 10mM e 100mM.

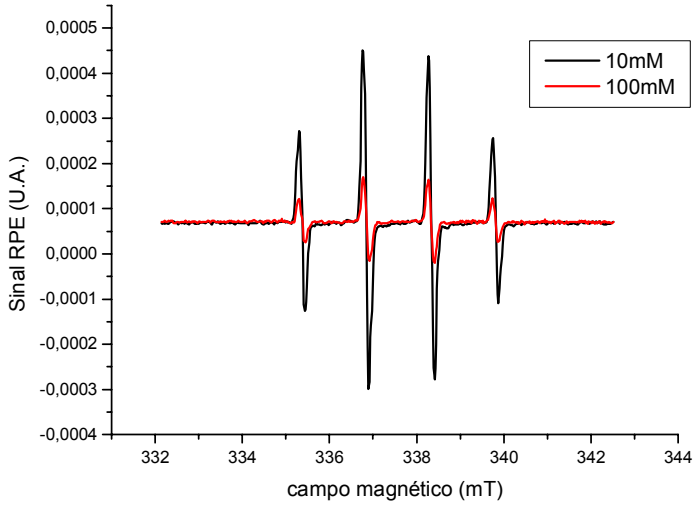

Figura 34. Gráfico comparativo indicando a relação entre os espectros do aduto de spin DMPO-OH, manipulado em soluções tampão de fosfato a 10mM e 100mM.

A intensidade do sinal obtido com solução tampão de fosfato a 10mM é cerca de quatro vezes maior que a obtida com solução tampão a 100mM. Este fator já indicaria a preferência de uso para a concentração menor, no entanto esta concentração pode não ser suficiente para tamponar a reação e com disponibilidade de íons positivos na solução, o aduto de spin seria rapidamente reduzido. Li et al. em 2003, utilizando solução tampão de fosfato a 10mM em pH 6,15 e 7,4 mostrou que o sinal obtido em pH maior é mais intenso.

Testando o decaimento do sinal do aduto de spin, para verificar o efeito da concentração da solução tampão, foram feitos espectros ao longo do tempo, com intervalos de 1,5 minutos, até que a intensidade do sinal fosse próxima ao mínimo detectável. O resultado obtido está indicado na figura 35, juntamente com o ajuste das curvas para um decaimento exponencial de primeira ordem.

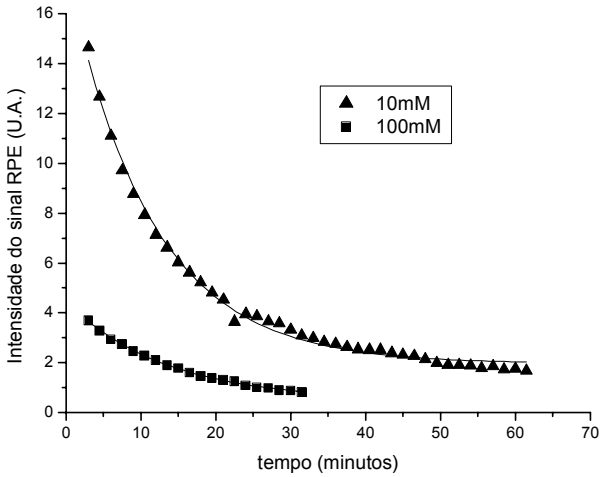

Figura 35. Gráfico mostrando o decaimento na intensidade do sinal de RPE com diferentes concentrações da solução tampão de fosfato (10mM e 100mM), com os respectivos ajustes para decaimento exponencial de primeira ordem.

O decaimento exponencial de primeira ordem segue a seguinte expressão:

$$\mathbf{I = A + Be^{-kt}}$$

onde I indica a intensidade do sinal de RPE, A e B são constantes com a mesma dimensão da intensidade e k é a constante de decaimento medida em min^{-1}. Para a concentração tampão de 10mM os valores obtidos são A=1,94 U.A., B=15,89 U.A. e k=0,089min^{-1}; enquanto que para 100mM A=0,45 U.A., B=4,00 e k=0,075min^{-1}. As constantes de decaimento permitem calcular o tempo de meia vida do aduto de spin: para concentração de 10mM é de 7,79 minutos e para concentração de 100 mM é de 9,24 minutos. A diferença de cerca de um minuto e meio é explicada pelo melhor tamponamento da solução quanto a concentração do tampão é maior. A diferença no tempo de meia vida, apesar de ser significativa, não é suficiente para compensar a diferença de amplitude iniciais dos sinais, mais importante para as medidas quantitativas das atividades antioxidantes dos extratos. Desta forma os testes foram realizados utilizando soluções tampão de fosfato a 10mM.

O resultado obtido para o tempo de meia vida do aduto de spin é bem inferior ao indicado por Finkelstein et al. em 1980, que foi de 2,6 hs. O mesmo autor cita que a concentração de H_2O_2 também é um fator importante, sendo que maiores concentrações diminuiriam a estabilidade, no entanto as concentrações que usamos

foram inferiores àquelas que o autor cita. Por fim a única explicação para esta diferença, para qual o autor simplesmente cita como "a estabilidade é altamente dependente das condições de reação" é que as "condições de reação" usadas em nosso experimento são diferentes da utilizada pelo autor citado.

B) Teste de neutralização do radical hidroxila ($OH^{\bullet}$).

O resultado obtido para o índice IC50, para a neutralização de radical hidroxila, está indicado na figura 36, podendo-se notar diferenças em relação aos testes anteriores. Assim como no teste contra o DPPH, os extratos de *Iryanthera juruensis* (folha e semente) mostraram a melhor atividade antioxidante. O extrato da casca de raiz de *Maytenus ilicifolia* apresentou uma atividade antioxidante muito baixa não permitindo determinar com precisão o índice IC50. A principal diferença encontrada, em relação aos testes anteriores, foi a baixa atividade do extrato de *Chrysophyllum inornatum*, que apresentou a menor dentre os extratos pesquisados ao contrário do teste do TEMPOL, onde foi o melhor e o teste do DPPH, onde aparece entre os melhores.

Entre as formas de inibição do sinal podemos citar: (1) doação de um próton ou elétron para o aduto de spin formado; (2) competição entre as substâncias antioxidantes e o *spin trap* na captura do radical hidroxila; (3) supressão da formação do radical hidroxila ou seqüestro de um dos componentes da reação de Fenton (H_2O_2 ou Fe^{2+}) (Amarowicz et al., 2004; Li et al., 2004). Apesar das dificuldades em determinar o caminho de reação, está claro que dos três modos citados, é possível medir uma atividade de antioxidante, ou em relação ao radical hidroxila ou para a capacidade do extrato como quelante do ferro. Os resultados obtidos aqui estão em concordância com outros trabalhos que estudaram outros extratos e polifenois (Matthäus, 2002; Trouillas et al., 2003; Amarowicz et al., 2004).

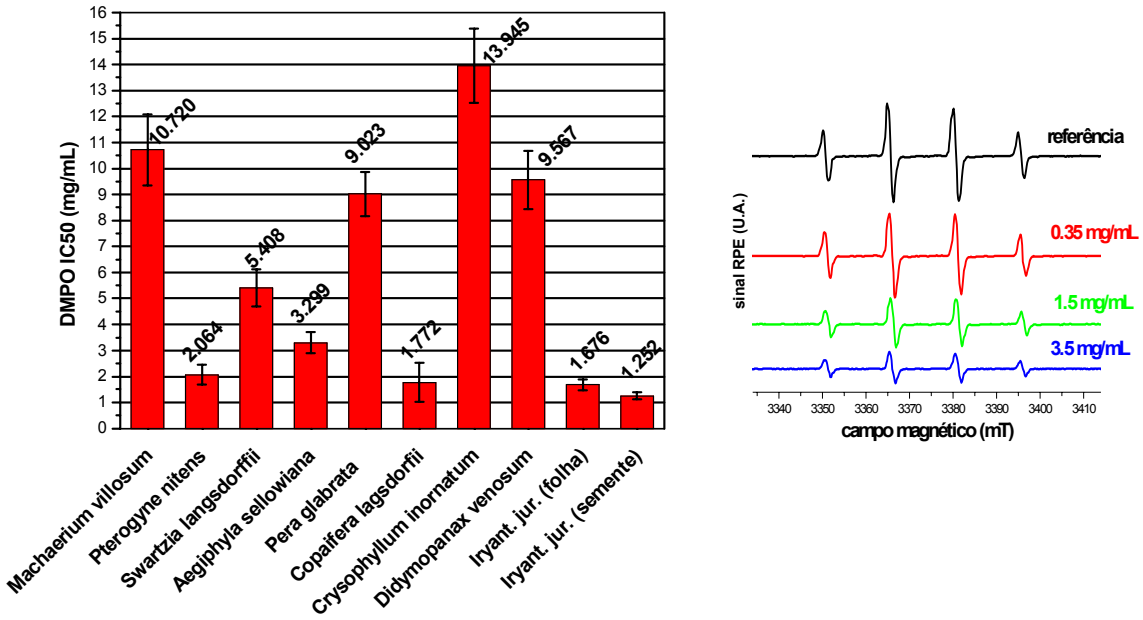

Figura 36. Atividade antioxidante contra o radical hidroxila, resultado indicado pelo índice IC50 (esquerda). Espectros RPE do aduto de spin DMPO-OH com extratos de *Pterogyne nitens* em diferentes concentrações e o espectro de referência. (direita).

O flavonóide quercetina foi testado de forma semelhante, sendo que sua solubilidade em água foi baixa, e os resultados apresentaram baixa atividade antioxidante, impossibilitando a medida do índice IC50.

4. Simulação computacional.

Com a finalidade de melhor compreender as diferenças obtidas nos testes das atividades antioxidantes, os compostos utilizados TEMPOL, DPPH e DMPO, foram simulados computacionalmente em gás-fase. A simulação é baseada na Teoria do Funcional da Densidade (TFD) (termo em inglês – DFT – Density Functional Theory), com aproximação da densidade local (ADL) (termo em inglês – LDA – Local Density Approximation) em um método de primeiros princípios, auto-consistente e com uso de pseudopotencial (Vianna et al., 2004). Fenol e *p*-aminofenol também foram simulados com a finalidade de servirem de referência.

Aqui serão apresentados os procedimentos utilizados na simulação, os resultados obtidos e a discussão dos mesmos. O maior enfoque será dado as diferenças de energia entre o composto original e seu análogo reduzido, e com base nisto tentar predizer algumas de suas propriedades.

4.1. Metodologia.

O procedimento geral em todas as simulações é baseado em um método recursivo de primeiros princípios (*ab initio*) com uso de pseudopotenciais de norma conservada (Vianna et al., 2004). O código utilizado foi o SIESTA (*Spanish Initiative for Eletronic Simulations with Thousands of Atoms*) (Ordejón et al. 1995, 1996) e os pseudopotenciais são gerados usando a norma de Troullier-Martins

(Troullier & Martins, 1991). Todo o trabalho foi desenvolvido utilizando o cluster do Laboratório de Física Computacional (LFC) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Para iniciar a simulação determinam-se os pseudopotenciais dos átomos constituintes do composto. Em um segundo passo, o programa SIESTA, com base em dados iniciais das posições atômicas e dos pseudopotenciais, gera uma densidade eletrônica ρ e um funcional da densidade eletrônica $F_0[\rho]$ (método de primeiros princípios), que em seguida, serve para determinar um nova densidade eletrônica e novo funcional da densidade eletrônica $F_1[\rho]$. Caso a diferença entre $F_0[\rho]$ e $F_1[\rho]$ seja grande em relação a dado parâmetro, repete-se o procedimento determinando novo funcional $F_2[\rho]$ a partir de $F_1[\rho]$ (método auto-consistente). A repetição ocorre até que a convergência para um resultado ocorra e o parâmetro estabelecido para a diferença entre os funcionais $F_i[\rho]$ e $F_{i+1}[\rho]$ seja alcançado. Para a otimização da estrutura molecular, é determinada, após a convergência do método, a média das forças interatômicas, sendo que se o resultado não for satisfatório, estipula-se novas posições atômicas e repete-se todo o procedimento desde o inicio. Na determinação de novas posições, toma-se o cuidado para que a energia total do sistema não aumente.

Em todos os cálculos foi usada a Aproximação Local de Densidade (ALD), com energia de corte de 140 Ry, considerando a base para autofunções de onda como combinação de orbitais atômicos (dzp – double-zeta polarization).

O procedimento descrito foi utilizado inicialmente para simular o DPPH, TEMPOL, DMPO. Em um segundo momento foram simulados, utilizando o mesmo método, os mesmos parâmetros e os mesmos pseudopotenciais o aduto de spin DMPO-OH e os respectivos compostos reduzidos DPPH-H, TEMPOL-H e DMPO-OH-H. Os resultados obtidos servem para comparações de energias, obtenção da diferença HOMO-LUMO, o dipolo elétrico da molécula e a estrutura molecular. Para visualizar as estruturas moleculares e obter os valores das distâncias interatômicas e os ângulos de ligação utilizou-se o programa RASWIN de uso livre (http://www.umass.edu/microbio/rasmol/index2.htm).

As moléculas de Fenol e *p*-aminofenol também foram simuladas com a finalidade de serem usadas como referência nas medidas de energia e para servir de parâmetro de eficácia do método.

Para o cálculo da energia liberada ao incorporar um hidrogênio, foi feito o balanço energético da reação $RL^{\bullet} + H^{\bullet} \rightarrow RL\text{-}H$ (RL = radical livre). Para completar este cálculo foi necessário determinar a energia total de um átomo de hidrogênio isolado, utilizando método equivalente ao do cálculo das moléculas estudadas.

4.2. Resultados e discussões.

4.2.1. Fenol e *p*-aminofenol.

O fenol foi escolhido como composto de referência devido a larga descrição de suas propriedades antioxidantes e pelo fato de ser utilizado com grande freqüência com esta finalidade (Brinck et al., 1997; Lucarini et al., 2003; Lithoxoidou & Bakalbassis, 2005). Quanto ao *p*-aminofenol, o expressivo valor de ΔEDL comparado ao EDL do fenol, a facilidade de simulação devido a semelhança com o fenol, e a presença de todos os átomos que constituem os radicais livres estudados fizeram com que fosse o segundo composto escolhido como referência.

O resultado de EDL obtido em nosso trabalho, calculado pelo balanço da reação $F\text{-}OH \rightarrow F\text{-}O^{\bullet} + H^{\bullet}$, está indicado na tabela 2 juntamente com um comparativo de outros valores. Apesar de não haver uma total concordância, os nossos resultados são coerentes com os resultados experimentais. Brinck et al. 1997, mostra que os resultados teóricos calculados para EDL do fenol podem variar de 222,7378 $kJ.mol^{-1}$ a 485,2501 $kJ.mol^{-1}$, e os valores de ΔEDL para o *p*-aminofenol 11,7208 $kJ.mol^{-1}$ a 40,19328 $kJ.mol^{-1}$, dependendo do método utilizado.

Tabela 2. EDL do fenol e ΔEDL do *p*-aminofenol (kJ.mol^{-1}) comparativamente com o resultado obtido em nosso trabalho.

	teóricos	Experimentais	Nosso resultado
Fenol (EDL)	364,6703[a] 370,6574[b]	369,2758[e] 369,6944[c] 395,6526[d]	434,7711
p-aminofenol (ΔEDL)	- 39,3559[a] - 35,8390[g]	- 53,1724[e] - 36,8438[f]	- 47,2104

[a]Wright et al., 2001; [b]Lithoxoidou et al., 2005; [c]Lucarini et al., 1996 ; [d]Valor corrigido por Brinck et al., 1997 a partir do resultado de Wayner et al., 1995; [e]Lind et al., 1990; [f]Lucarini et al., 2003 ; [g]Zhang et al., 2002. ΔEDL=EDL(*p*-aminofenol)-EDL(fenol).

Tabela 3. Distâncias interatômicas (Å) e ângulos entre as ligações (graus) para as moléculas de fenol, fenoxil, *p*-aminofenol e p-aminofenoxil, obtidos após a simulação computacional.

		fenol	fenoxil	*p*-aminofenol	p-aminofenoxil
Distâncias interatômicas (Å)	1H - O	0,972	-	0,974	-
	O - 1C	1,352	1,254	1,358	1,251
	1C - 2C	1,403	1,452	1,400	1,452
	2C - 3C	1,399	1,382	1,396	1,376
	3C - 4C	1,398	1,412	1,409	1,423
	4C - 5C	1,400	1,409	1,409	1,423
	5C - 6C	1,393	1,383	1,394	1,373
	6C - 1C	1,399	1,450	1,397	1,453
	4C - N	-	-	1,387	1,358
	N - 7H	-	-	1,021	1,024
	N - 8H	-	-	1,022	1,022
Ângulos entre as ligações (graus)	1H - O - 1C	109,4	-	109,2	-
	O - 1C - 2C	122,5	121,5	122,9	122,0
	O - 1C - 6C	117,8	121,4	118,1	122,2
	1C - 2C - 3C	119,9	120,9	120,5	122,1
	2C - 3C - 4C	120,4	120,1	121,0	120,2
	3C - 4C - 5C	119,4	120,9	117,9	119,5
	4C - 5C - 6C	120,6	119,9	121,1	120,4
	5C - 6C - 1C	120,1	121,1	120,6	122,1
	6C - 1C - 2C	119,7	117,1	119,0	115,8
	3C - 4C - N	-	-	121,2	120,2
	5C - 4C - N	-	-	120,9	120,3
	4C - N - 7H	-	-	117,3	120,8
	4C - N - 8H	-	-	116,9	121,2
	7H - N - 8H	-	-	114,3	118,0

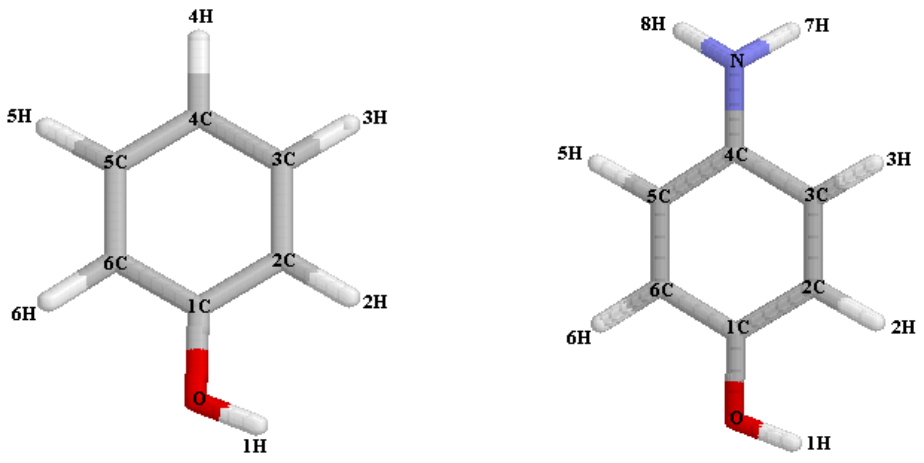

Figura 37. Arranjo espacial das moléculas de fenol e *p*-aminofenol obtidas após a dinâmica molecular e a nomenclatura utilizada.

As estruturas moleculares obtidas na simulação estão apresentadas na figura 37. As estruturas do fenol, fenoxil e p-aminofenoxil são planares, incluindo os radicais hidroxila e amino, no entanto a estrutura do *p*-aminofenol não, uma vez que os hidrogênios do radical amino não pertencem ao plano do anel aromático, como pode ser notado observando os ângulos 4C-N-7H, 4C-N-8H e 7H-N-8H na tabela 3. A nuvem eletrônica formada pelos elétrons-π do anel aromático fazem variar os ângulos das ligações do N. O ângulo da ligação N-H na molécula de NH_3 é de 107º (Russel, 1994), e esperava-se valores próximos, no entanto a presença das nuvens eletrônicas em ambos os lados do anel aromático faz com que ocorra um aumento deste valores na estrutura do *p*-aminofenol, aproximando de uma estrutura planar. O p-aminofenoxil apresenta uma estrutura ainda mais planar, o que pode ser explicado pelo deslocamento eletrônico da nuvem de elétrons-π devido a presença do radical oxil, sendo que a redução na distância interatômica da ligação 4C-N indica claramente isto.

4.2.2. DPPH.

As estruturas moleculares do DPPH e DPPH-H, obtidas após a dinâmica molecular, indica que os anéis ligados aos nitrogênios centrais apresentam configurações planares, como esperado para anéis benzeno, sendo que estes planos não são paralelos entre si. A figura 38 mostra a configuração espacial obtida para a molécula de DPPH-H e a nomenclatura usada neste trabalho para os átomos. A tabela 4 mostra as distâncias interatômicas e os ângulos das ligações moleculares obtidas para ambas as moléculas.

O rearranjo da molécula de DPPH ao ser reduzida a sua respectiva hidrazina DPPH-H, com a ligação de um átomo de hidrogênio ao átomo de nitrogênio central, não produz alterações significativas a estrutura molecular, mantendo a mesma disposição dos anéis em torno dos átomos centrais e as distâncias interatômicas praticamente inalteradas, como pode ser constatado. As maiores diferenças ocorrem nas medidas que envolvem os átomos 1O, 1C do anel A e 1C do anel B, por serem os mais próximos do hidrogênio incorporado. Os radicais NO_2, que eram esperados em posições paralelas ao anel A, pela disposição da nuvem de elétrons-π, fogem desta configuração pela proximidade dos hidrogênios dos anéis B e C. A forma reduzida ainda apresenta uma diferenciação: o oxigênio 1O que ficava próximo ao hidrogênio 2H do anel C (2,35Å) na molécula de DPPH é deslocado e passa a ficar mais próximo do hidrogênio central HC (1,61Å) na molécula de DPPH-H, devido a rotação do radical NO_2 em torno da ligação 2C-2N.

Em relação ao balanço energético a variação de energia calculada para a reação $RL^{\bullet} + F\text{-}OH \rightarrow RL\text{-}H + F\text{-}O^{\bullet}$, onde RL representa o radical livre (neste caso o DPPH) foi de +31,0690 $kJ.mol^{-1}$ (tabela 5). Este resultado indica que a reação do fenol com o DPPH não ocorre de maneira espontânea, fato comprovado experimentalmente pela relação de estequiometria onde são necessários cerca de 270 mols de F-OH para neutralizar um mol de DPPH (Brand-Williams et al., 1995). Seguindo a mesma lógica e substituindo o fenol pelo *p*-aminofenol a reatividade aumenta pois o ΔEDL de -47,2104 $kJ.mol^{-1}$ (tabela 5) deste composto faz com que a reação com o DPPH tenha uma variação de energia de -16,1414 $kJ.mol^{-1}$.

Tabela 4. Distâncias interatômicas (Å) e ângulos entre as ligações (graus) da molécula de DPPH e DPPH-H.

Distancias interatômicas (Å) e ângulos entre as ligações (graus) – DPPH e DPPH-H								
ANEL A			ANEL B			ANEL C		
	DPPH	DPPH-H		DPPH	DPPH-H		DPPH	DPPH-H
2NC - 1C	1,355	1,347	1NC - 1C	1,390	1,393	1NC – 1C	1,423	1,408
1C - 2C	1,431	1,445	1C - 2C	1,403	1,400	1C - 2C	1,402	1,403
2C - 3C	1,383	1,390	2C - 3C	1,390	1,397	2C - 3C	1,392	1,398
3C - 4C	1,396	1,385	3C - 4C	1,400	1,398	3C - 4C	1,399	1,395
4C - 5C	1,391	1,396	4C - 5C	1,404	1,402	4C - 5C	1,400	1,399
5C - 6C	1,390	1,388	5C - 6C	1,393	1,394	5C - 6C	1,393	1,393
6C - 1C	1,433	1,433	6C - 1C	1,407	1,406	6C - 1C	1,401	1,401
2C - 2N	1,451	1,436	2C - 2H	1,110	1,111	2C - 2H	1,114	1,109
4C - 4N	1,443	1,443	3C - 3H	1,107	1,106	3C - 3H	1,110	1,108
6C - 6N	1,445	1,448	4C - 4H	1,110	1,108	4C - 4H	1,108	1,110
2N - 1O	1,241	1,263	5C - 5H	1,109	1,110	5C - 5H	1,110	1,109
2N - 2O	1,236	1,230	6C - 6H	1,111	1,113	6C - 6H	1,110	1,114
4N - 3O	1,238	1,240	1NC - 1C - 2C	118,3	119,8	1NC - 1C - 2C	117,9	119,9
4N - 4O	1,238	1,237	1NC - 1C - 6C	120,9	120,2	1NC - 1C - 6C	120,4	120,0
6N - 5O	1,236	1,235	1C - 2C -3C	119,5	120,0	1C - 2C -3C	118,7	119,7
6N - 6O	1,240	1,240	2C - 3C - 4C	120,3	120,3	2C - 3C - 4C	120,4	120,3
3C - 3H	1,108	1,108	3C - 4C - 5C	119,9	119,6	3C - 4C - 5C	120,0	119,8
5C - 5H	1,109	1,112	4C - 5C - 6C	120,3	120,5	4C - 5C - 6C	120,5	120,4
2NC – 1C - 2C	117,9	118,9	5C - 6C - 1C	119,2	119,6	5C - 6C - 1C	118,6	119,8
2NC – 1C - 6C	127,2	125,8	6C - 1C - 2C	120,7	120,0	6C - 1C - 2C	121,7	120,1
1C – 2C -3C	123,8	122,4						
2C – 3C - 4C	118,3	119,3						
3C – 4C - 5C	121,3	121,2	ÁTOMOS CENTRAIS					
4C – 5C - 6C	119,6	119,6		DPPH	DPPH-H			
5C – 6C - 1C	122,1	122,2	1NC – 2NC	1,319	1,359			
6C – 1C - 2C	114,8	115,0	2NC – HC	-	1,066			
1C – 2C - 2N	119,3	121,9	2NC – 1C(A)	1,355	1,347			
2N – 2C - 3C	116,6	115,7	1NC – 2NC – HC	-	121,8			
3C – 4C - 4N	119,1	119,3	HC – 2NC – 1C(A)	-	111,9			
4N – 4C - 5C	119,5	119,5	1C - 2NC - 1NC (A)	117,6	124,2			
5C – 6C - 6N	115,4	115,7	1C - 2NC - 1NC (B)	118,2	117,6			
6N – 6C - 1C	122,2	121,7	1C - 2NC - 1NC (C)	119,9	118,1			
1O – 2N - 2O	125,2	122,9						
3O – 4N - 4O	125,6	125,6						
5O – 6N - 6O	124,9	125,6						

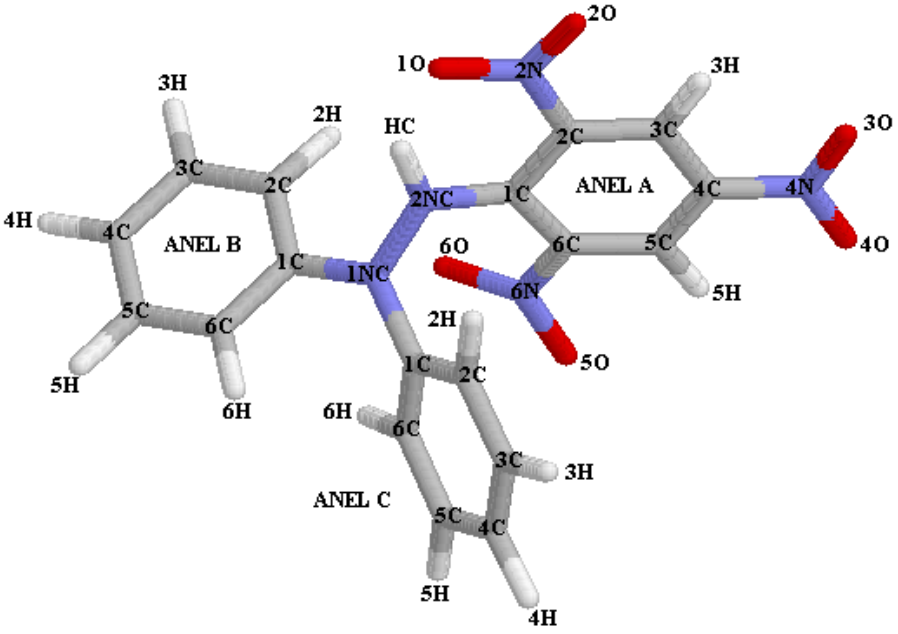

Figura 38. Arranjo espacial da molécula de DPPH-H obtida após a dinâmica molecular e a nomenclatura utilizada.

Tabela 5. Diferenças de energia HOMO-LUMO, dipolo elétrico e a variações de energias para as reações $RL^{\bullet} + H^{\bullet} \rightarrow RL\text{-}H$ e $RL^{\bullet} + F\text{-}OH \rightarrow RL\text{-}H + F\text{-}O^{\bullet}$ (reação com o fenol) obtidas para as moléculas após a dinâmica molecular.

	HOMO – LUMO (eV)	Dipolo elétrico (a.u.)	Δenergia ($kJ.mol^{-1}$) $RL^{\bullet} + H^{\bullet} \rightarrow RL\text{-}H$	Δenergia ($kJ.mol^{-1}$) (reação com fenol)
DPPH	1,02	2,4434	- 403,7021	+ 31,0690
DPPH-H	1,03	1,7486		
TEMPOL	4,52	0,9722	- 323,4769	+ 111,2942
TEMPOL-H	5,03	0,9607		
DMPO-OH	5,03	1,1470	- 337,8567	+ 96,9144
DMPO-OH-H	5,44	0,5340		

4.2.3. TEMPOL.

A estrutura molecular do TEMPOL pode ser imaginada de várias formas, pois a configuração do anel pode ter as extremidades - átomo de nitrogênio e carbono 3C

– em lados opostos ou do mesmo lado e ainda a possibilidade de rotação da ligação entre as hidroxilas e o anel, colocando os hidrogênios 1H e 2H em diversas posições em relação ao anel. Algumas destas estruturas foram analisadas e a forma mais estável, de mais baixa energia, esta indicada na figura 39, com a numeração utilizada para a identificação dos átomos. A tabela 6 mostra as distâncias interatômicas e os ângulos das ligações moleculares obtidas após a simulação computacional.

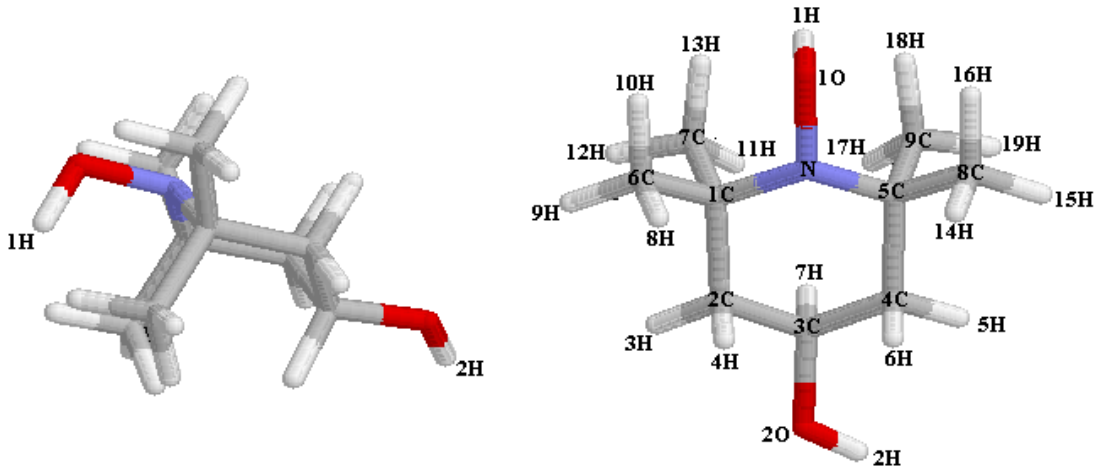

Figura 39. Figura em bastões do arranjo espacial da molécula de TEMPOL-H em visão lateral e superior, obtida após a dinâmica molecular e a nomenclatura utilizada.

Tabela 6. Distâncias interatômicas (Å) e ângulos entre as ligações (graus) das moléculas de TEMPOL e TEMPOL-H.

Distâncias interatômicas (Å)			Ângulos entre as ligações (graus)		
	TEMPOL	TEMPOL-H		TEMPOL	TEMPOL-H
1O - 1H	-	0,994	1H - 1O – N	-	107,1
1O – N	1,277	1,402	1O - N - 1C	115,4	109,8
2O - 2H	0,975	0,975	1O - N - 5C	115,5	109,7
2O - 3C	1,403	1,412	2H - 2O - 3C	109,6	109,1
N - 1C	1,484	1,471	2O - 3C - 2C	106,1	106,3
1C - 2C	1,519	1,523	2O - 3C - 4C	112,4	112,5
2C - 3C	1,510	1,512	N - 1C - 2C	110,5	107,5
3C - 4C	1,510	1,510	1C - N - 5C	123,8	120,4
4C - 5C	1,520	1,527	1C - 2C - 3C	113,6	113,2
5C – N	1,477	1,466	2C - 3C - 4C	108,3	108,4
1C - 6C	1,520	1,517	3C - 4C - 5C	113,6	113,1
1C - 7C	1,526	1,525	4C - 5C – N	110,4	107,3
5C - 8C	1,517	1,519	6C - 1C - 7C	109,0	108,8
5C - 9C	1,524	1,528	8C - 5C - 9C	109,2	108,7

As diferenças notadas entre as estruturas moleculares do TEMPOL e sua forma reduzida TEMPOL-H são pequenas e ficam localizadas nas vizinhanças do átomo de nitrogênio, principalmente nos ângulos de suas ligações. O radical oxil gera uma modificação na estrutura eletrônica no átomo de nitrogênio e com isso há um valor maior para os ângulos 1O–N–1C e 1O–N–5C. Com o radical neutralizado na estrutura do TEMPOL-H estes ângulos diminuem para um valor próximo do ângulo da molécula de NH_3, que é de aproximadamente 107º.

Quanto a análise energética, nota-se que para o TEMPOL reagir com o fenol são necessários 3,6 vezes mais energia que o DPPH (tabela 5). Este motivo faz com que o TEMPOL seja notadamente menos reativo, ajudando a explicar o seu uso em menor escala se comparado ao uso do DPPH. Apesar desta diferença, o teste do TEMPOL é importante, pois, comparativamente ao teste utilizando o DPPH, ajuda a definir com maior precisão a ação do composto.

Um dos flavonóides mais estudados, quercetina, possui ΔEDL, conforme a hidroxila analisada, variando de -122,4955 $kJ.mol^{-1}$ a -19,1013 $kJ.mol^{-1}$ (Trouillas et al., 2004) e isto indica uma alta reatividade com o DPPH, cuja reação liberaria uma energia de -81,9948 $kJ.mol^{-1}$, fato este verificado experimentalmente (Rice-Evans et al., 1996). Esta comparação deve ser feita com cuidado pois o método utilizado não é idêntico ao nosso. Apesar da possibilidade do resultado, comparado ao nosso, apresentar diferenças, pode atribuir a baixa reatividade da quercetina com o TEMPOL, devido a pequena energia liberada na reação que é avaliada em -11,2013 $kJ.mol^{-1}$.

Um outro fato importante é a pequena diferença nos valores obtidos para o dipolo elétrico do TEMPOL e sua forma reduzida TEMPOL-H. Como a molécula de TEMPOL possui um elétron desemparelhado, esperava-se que seu dipolo elétrico fosse maior, como ocorre com os outros compostos estudados (tabela 5). Isto sugere que o efeito da polaridade dos solventes é pequeno sobre o TEMPOL, ou seja, este efeito não interfere na reatividade do mesmo, e qualquer efeito de solvente deve ser atribuído apenas sobre os outros compostos envolvidos na reação.

Observando o resultado obtido para a atividade antioxidante dos extratos de *Iryanthera juruensis*, nota-se algo que pode ter alguma relação com a pouca variação do dipolo elétrico do TEMPOL. Estes extratos tiveram moderada reatividade contra

o TEMPOL, mas o melhor desempenho nos outros testes, sendo que o extrato da semente foi o único que indicou a presença de antioxidantes apolares no teste preliminar de descoloração do β-caroteno. Ainda com base neste fato podemos sugerir que realmente o TEMPOL é mais indicado para antioxidante hidrossolúveis.

4.3.3. DMPO.

A análise do DMPO é um pouco mais complexa se comparado com o DPPH e TEMPOL, pois além da neutralização do aduto de spin DMPO-OH, é necessário também analisar a sua formação, ou seja, o modo como o DMPO armadilha o radical $OH^{\bullet}$. Desta forma foi necessário também fazer a simulação da molécula de $OH^{\bullet}$. Na análise comparativa das estruturas atômicas, pode ver claramente a mudança de dupla para simples a ligação entre N-1C, com a mudança do DMPO para o respectivo aduto de spin DMPO-OH: o comprimento da ligação que era de 1,309 Å aumenta para 1,478 Å (tabela 7). Em conjunto pode-se notar a mudança dos ângulos das ligações do nitrogênio: enquanto na molécula de DMPO se aproxima de uma configuração planar, na molécula de DMPO-OH-H muda para uma configuração mais próxima da molécula de NH_3.

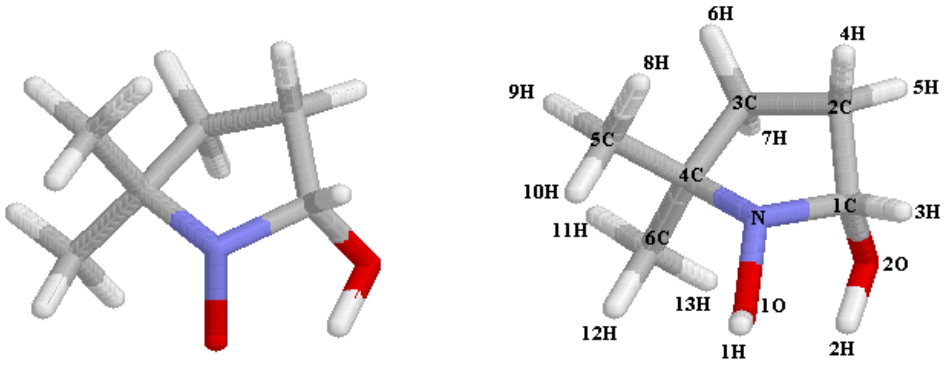

Figura 40. Figura em bastões do arranjo espacial das moléculas de DMPO-OH e DMPO-OH-H, obtida após a dinâmica molecular e a nomenclatura utilizada.

Outra observação é a pequena distância existente entre 1O-2H no aduto de spin, molécula que é detectada por Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE). Este resultado ajuda a interação hiperfina existente no espectro desta molécula, sendo que os valores das constantes para o nitrogênio e o hidrogênio são iguais: a_N=1,49 mT e a_H=1,48 mT (Finkelstein et al., 1980).

Tabela 7. Distâncias interatômicas (Å) e ângulos entre as ligações (graus) das moléculas DMPO, DMPO-OH e DMPO-OH-H.

Distâncias interatômicas (Å)				Ângulos entre as ligações (graus)			
	DMPO	DMPO-OH	DMPO-OH-H		DMPO	DMPO-OH	DMPO-OH-H
1O - 1H	-	-	0,975	1H - 1O - N	-	-	103,7
1O - N	1,258	1,279	1,424	1O - N - 1C	129,6	115,7	107,0
2O - 2H	-	1,002	0,985	1O - N - 4C	118,7	120,8	110,6
2O - 1C	-	1,381	1,399	1C - N - 4C	111,5	112,7	108,2
N - 1C	1,309	1,478	1,447	2H - 2O - 1C	-	101,9	104,2
1C - 2C	1,486	1,518	1,509	2O - 1C - N	-	107,1	112,2
2C - 3C	1,526	1,520	1,524	2O - 1C - 2C	-	112,7	109,6
3C - 4C	1,524	1,532	1,541	N - 1C - 2C	112,1	103,7	101,5
4C - N	1,514	1,484	1,491	1C - 2C - 3C	102,5	103,9	102,4
4C - 5C	1,518	1,522	1,521	2C - 3C - 4C	105,3	104,5	106,0
4C - 6C	1,502	1,507	1,515	3C - 4C - N	101,6	100,4	102,6
1O - 2H	-	1,825	2,050	3C - 4C - 5C	113,6	111,9	112,8
				3C - 4C - 6C	116,3	114,5	110,9

Quanto os estudo da estabilização devido ao balanço energético, a energia necessária para a reação do DMPO com o fenol é próxima ao valor encontrado para o TEMPOL. Isto leva a concluir que a hipótese de neutralização direta do aduto de spin DMPO-OH por um composto antioxidante, em um teste do seqüestro do radical $OH^{\bullet}$ é muito menos intensa que a que ocorre na neutralização do DPPH. O problema que surge é explicar o pequeno tempo de meia vida deste composto: 2,6h em uma solução de 0,6% de peróxido de hidrogênio e PH 7,4 (Finkelstein et al., 1980).

Para tentar explicar este processo foi simulada a molécula de H_2O, em condições similares a utilizada para os outros compostos, e foi pesquisado a restauração do spin-trap inicial DMPO, a partir da reação: $H^{\bullet}$ + DMPO-$OH^{\bullet}$ → DMPO + H_2O. O resultado foi uma variação de energia equivalente a -251,3590 $kJ.mol^{-1}$, valor absoluto menor que o obtido para a reação $H^{\bullet}$ + DMPO-$OH^{\bullet}$ → DMPO-OH-H cujo resultado é de -337,8567 $kJ.mol^{-1}$. Este resultado indica que a

reação de neutralização do aduto de spin com formação de água é menos favorável energeticamente e não deve ser a via preferencial.

5. Conclusão.

O presente trabalho apresentou um teste comparativo de atividade antioxidante de extratos vegetais, em três ensaios diferentes, de 10 espécies da flora brasileira, sendo que a técnica utilizada foi a espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE); e a simulação computacional dos compostos DPPH, TEMPOL, DMPO e suas respectivas formas reduzidas.

Os extratos de *Iryanthera juruensis* (folha e semente) apresentaram as melhores atividades antioxidantes nos testes contra o DPPH e contra o radical hidroxila, enquanto que no teste contra o TEMPOL, a atividade foi um pouco menor. Este resultado associado ao fato que o extrato da semente de *Iryanthera juruensis* foi o único que apresentou antioxidantes apolares (teste de descoloração do β-caroteno) sugere que o teste contra o TEMPOL é melhor aplicado para antioxidantes hidrossolúveis. Estes extratos foram considerados os de melhor desempenho geral.

O extrato de *Chrysophyllum inornatum* foi o que apresentou melhor resultado no teste contra o TEMPOL, inclusive sendo utilizado em um teste com maior intervalo de tempo. Neste caso ajudou a evidenciar as diferenças que ocorrem com mudanças do solvente, água e etanol, destacando o fato que o extrato em solução de etanol age mais rapidamente sobre o radical livre, no entanto, após longos períodos de tempo a diferença passa a ser pequena. Outra conclusão importante foi que a ação antioxidante dos extratos gera um declínio na concentração dos radicais livres que obedecem a um decaimento exponencial de segunda ordem, compatível com extratos vegetais em estado bruto.

Este trabalho, apesar da falta de conhecimento da correta especificidade dos testes empregando DPPH e o TEMPOL, mostra a necessidade da aplicação de mais

de um tipo de teste, inclusive em solventes diferentes, para uma análise mais completa. Casos como o do extrato de *Aegiphyla sellowiana*, que nos testes de DPPH e TEMPOL (extrato solubilizado em etanol) não apresentou grande atividade antioxidante, mas no testes de TEMPOL (extrato solubilizado em água) apresentou como o segundo mais eficiente, ilustram este fato e comprovam a tese inicial.

O flavonóide quercetina se mostrou um bom padrão para o teste contra o DPPH, havendo várias referências do mesmo em outros trabalhos, no entanto este flavonóide não apresentou adequada solubilidade em água e nem bons resultados no teste contra o TEMPOL e contra o radical hidroxila empregando a técnica de *spin trap*.

A técnica para detectar a atividade antioxidante contra o radical hidroxila, empregando a reação de Fenton e o *spin trap* DMPO, foi eficiente para a tarefa, apesar das dificuldades existentes em determinar corretamente a ação do extrato sobre a inibição da formação do radical hidroxila e a diferença obtida nos tempos de meia vida do aduto de spin. Devido ao alto valor da energia necessária para a reação do DMPO-OH com o fenol, obtido na simulação computacional, acredita-se que a neutralização do aduto de spin pela ação direta do antioxidante seja pequena.

A técnica de espectroscopia RPE, até então não utilizada para estudar atividades antioxidante de espécies da flora brasileira, se mostrou eficiente, eficaz e rápida, possuindo uma boa resolução mesmo com quantidades de amostras reduzidas, podendo detectar concentrações de décimos de micromolar de radicais livre em poucos microlitros de solução.

Os resultados obtidos na simulação computacional ajudaram a elucidar o fato do DPPH ser mais reativo, comparado ao TEMPOL, uma vez que a energia liberada em sua reação de redução, com incorporação de um átomo de hidrogênio é menor. Esta alta reatividade faz com que o DPPH seja o composto de primeira escolha em testes de antioxidantes, e devido isto, ser usado até como padrão.

A complementação que os resultados da simulação computacional ofereceram mostra a importância que estudos desta natureza possuem, indicando inclusive várias características moleculares e eletrônicas. Estudos complementares, para aumentar o conhecimento sobre a estrutura eletrônica dos compostos estudados, e aumentar o

conhecimento sobre a especificidade de cada teste, deveram ser realizados posteriormente.

Estudos com os extratos que obtiveram melhor desempenho para a determinação das principais substâncias antioxidantes e suas respectivas proporções na composição total também deverão ser realizados, indicando, se possível, aplicações comerciais e farmacêuticas.

Como conclusão final, podemos ressaltar a importância de testes comparativos como o obtido por RPE, principalmente por ajudar a seleção de espécies que apresentam atividades antioxidantes mais acentuadas, e desta forma mais promissoras e melhores candidatas para estudos mais detalhados, que normalmente são mais demorados e de custos mais elevados. A técnica ajuda a reduzir o tempo para encontrar novos compostos naturais que possam ser utilizados, tanto na alimentação como em medicamentos.

6. Referências.

1. Amarowicz, R.; Pegg, R. B.; Rahimi-Moghaddam, P.; Barl, B.; Weil, J. A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry,*84, 551-562.
2. Bolzani, V. D. S.; Gunatilaka, A. A. L.; Kingston, D. G. I. (1995). Bioactive guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens. Journal of Natural Products*, 58, 1683-1688.
3. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 28: 25-30.
4. Brezová, V.; Polovka, M.; Staško, A. (2002). The influence of additives on beer stability investigated by EPR spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A*, 58, 1279–1291.
5. Brinck, T., Haeberlein, M., Jonsson, M. (1997). A computational analysis of substituent effects on the O-H bond dissociation Energy in phenols: polar versus radical effects. *Journal American Chemical Society*, 119, 4239-4244.
6. Burkitt, M. J. (1993). ESR Spin Trapping Studies Into the Nature of the Oxidizing Species Formed in the Fenton Reaction: Pitfalls Associated with the Use of 5,5-Dimethyl-1-Pyrroline-N-Oxide in the Detection of the Hydroxyl Radical. *Free Rad. Res. Comms.*, 18, 43-57.
7. Butkovic, V.; Klasinc, L.; Bors, W. (2004). Kinetic Study Flavonoid Reactions with Stable Radicals. *J. Agric. Food Chem.,* 52, 2816-2820.

8. Burton, G. W. & Ingold, K. U. (1984). B-Carotene: An unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224: 569-573.
9. Calliste, C.; Trouillas, P.; Allais, D.; Simon, A.; Duroux, J. (2001). Free radical Scavenging Activities Measured by Electron Spin Resonance Spectroscopy and B16 Cell Antiproliferative Behaviors of Seven Plants. *J. Agric. Food Chem.,* 49, 3321-3327.
10. Cheeseman, K. H. & Slater, T. F. (1996). **Radicais livres em medicina**. Tradução Sérgio Vaisman. Rio de Janeiro, ed. Interlivros.
11. Chen, F.; Covas, D. T.; Baffa, O. (2001). Dosimetry of blood irradiation using an alanine/ESR dosimeter. *Applied Radiation and Isotopes*, v. 55, p. 13-16.
12. Chen, F.; Graeff, C.; Baffa, O. (2002). Preliminary evaluation of second harmonic direct detection scheme for low-dose range in alanine/EPR dosimetry. *Physics in Medicine and Biology*, v. 47, p. 1357-1367.
13. Chow, C. K. (2002). Antioxidante nutrients and environmental health: introduction. *Toxicology*. 180: 1-3.
14. Corsino, J.; Silva, D. H. S.; Zanoni, M. V. B.; Bolzani, V. S.; França, S. C.; Pereira, A. M. S.; Furlan, M. (2003). Antioxidant Flavan-3-ols and Flavonol Glycosides from *Maytenus aquifolium. Phytotherapy Research,* 17, 913-916.
15. Ferreira, A. L. A. & Matsubara, L. S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Ass. Med. Brasil*, 43(1): 61-68.
16. Figueiredo, M. S.; Baffa, O.; Neto, J. B.; Zago, M.A. (1993). Liver injury and generation of hydroxyl free radicals in experimental secondary hemochromatosis. *Research in Experimental Medicine*, 193, 27-37.
17. Finkelstein, E.; Rosen, G. M.; Rauckman, E. J. (1980). Spin trapping of Superoxide and Hydroxyl Radical: Pratical Aspects. *Archives of Biochemistry an Biophysics*, 200 (1), 1-16.
18. Flogliano, V.; Verde, V; Randazzo, G.; Ritiene, A. (1999). Method for Measuring Antioxidant Activity and Its Application to Monitoring the Antioxidant Capacity of Wines. *J. Agric. Food Chem.,* 47, 1035-1040.

19. Foti, M.; Ruberto, G. (2001). Kinetic Solvent Effects on Phenolic Antioxidants Determined by Spectrophotometric Measurements. *J. Agric. Food Chem.,* 49, 342-348.
20. Gardner, P. T.; McPhail, D. B.; Duthie, G. G. (1998). Electron Spin Resonance Spectroscopic assessment of the antioxidant potential of teas in aqueous and organic media. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 76 : 257-262.
21. Herring, C. (1940). A New Method for Calculating Wave Functions in Crystals. *Physical Review*, 57, 1169-1177.
22. Hohenberg, P.; Kohn, W. (1964). Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review*, 136, B864-B871.
23. Hsu, P.-C. & Guo, Y. L. (2002). Antioxidante nutrients and lead toxicity. *Toxicology*. 180 : 33-44.
24. Ikeya, M.; **New Applications of Electron Spin Resonance – Dating, Dosimetry and Microscopy.** 1ed. Singapore: World Scientific, 1993.
25. Jorge, R. M.; Leite, J. P. V.; Oliveira, A. B.; Tagliati, C. A. (2004). Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*. 94, 93–100.
26. Jovanovic, S. V.; Steenken, S.; Tosic, M.; Marjanovic, B.; Simic, M. G. (1994). Flavonoids as Antioxidants. *Journal American Chemical society.* 116, 4846-4851.
27. Kinoshita, A.; Brunetti, A.; Avelar, W. P.; Mantelatto, F. L. M.; Simões, M. G.; Fransozo, A. ; Baffa, O. (2002). ESR dating of a subfossil shell from Couve Island. *Applied Radiation and Isotopes*, v. 57, p. 497-500.
28. Kinoshita, A.; Calcina, C. S. G.; Hojo, E. T. S.; Camparato, M. L.; Picon, C.; Baffa, O. (2003). Evaluation of a high dose to a finger from a ^{60}Co accident. *Health Physics*, v. 84, n. 4, p. 477-482.
29. Kinoshita, A.; Franca, A. M.; Almeida, J. A. C.; Figueiredo, A. M.; Nicolucci, P.; GRAEFF, C. F. O.; Baffa, O. (2005). ESR dating at K and X band of northeastern Brazilian megafauna. *Applied Radiation and Isotopes*, v. 62, p. 225-229.
30. Kohn, W.; Sham, L. J. (1965). Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Physical Review*, 140, A1133-A1138.

31. Leite, J. P. V.; Rastrelli, L.; Romussi, G.; Oliveira, A. B.; Vilegas, J. H. Y.; Vilegas, W.; Pizza, C. (2001). Isolation and HPLC Quantitative Analysis of Flavonoid Glycosides from Brazilian Beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*). *J. Agric. Food Chem.,* 49, 3796-3801.
32. Li, L.; Abe, Y.; Mashino, T.; Mochizuki, M.; Miyata, N. (2003). Signal Enhacement in ESR Spin-trapping for Hydroxyl Radicals. *Analytical Sciences*, 19, 1083-1084.
33. Li, L.; Abe, Y.; Kanagawa, K.; Usui, N.; Imai, K.; Mashino, T.; Mochizuki, M.; Miyata, N. (2004). Distinguishing the 5,5-dimethyl-1-pirroline-N-oxide (DMPO)-OH radical quenching effect from the hydroxyl radical scavenging effect in the ESR spin-traping method. *Analytica Chimica Acta*, 512, 121-124.
34. Lind, J.; Shen, X.; Eriksen, T. E.; Merényi, G (1990). The One-Electron Reduction Potential of 4-Substituted Phenoxyl Radicals in Water. *Journal Am. Chem. Soc.,* 112, 479-482.
35. Lithoxoidou, A. T.; Bakalbassis E. G. (2005). PCM Study of the Solvent and Substuent Effects on the Conformers, Intramolecular Hydrogen Bonds e Bond Dissociation Enthalpies of 2-Substituted Phenols. *Journal Phys. Chem. A*, 109, 366-377.
36. Lucarini, M.; Pedrielli, P.; Pedulli, G. F. ; Cabiddu, S.; Fattuoni, C. (1996). Bond Dissociation Energies of O-H Bonds in Substituted Phenols from equilibration Studies. *Journal Org. Chem.*. 61, 9259-9263.
37. Lucarini, M.; Mugnaini, V.; Pedulli, G. F.; Guerra, M. (2003). Hydrogen-Bonding Effects on the Properties of Phenoxil Radical. An EPR, Kinetic, and Computational Study. *Journal American Chemical society.* 125, 8318-8329.
38. Magalhães, A. F.; Tozzi, A. M. G. D.; Santos, C. C.; Serrano, D. R.; Zanotti-Magalhães, E. M.; Magalhães, E. G.; Magalhães, L. A. (2003). Saponins from *Swartzia langsdorffii*: Biological activities. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz,* 98, 713-718.
39. Matthäus, B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *J. Agric. Food Chem.,* 50, 3444-3452.

40. McPhail, D. B.; Hartley, R. C.; Gardner, P. T.; Duthie, G.G. (2003). Kinetic and Stoichiometric Assessment of the Antioxidant Activity of Flavonoids by Electron Spin Resonance Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.,* 51, 1684-1690.
41. Min, D. B. & Boff, J. M. (2002). Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1, 58-72.
42. Ordejón, P.; Drabold, D. A.; Martin, R. M.; Grumbach, M. P. (1995). Linear system-size scaling methods for electronic-structure calculations. *Physical Review B*, 51, 1456-1476.
43. Ordejón P.; Artacho, E.; Soler, J. M. (1996). Self-consistent order-N density functional calculations for very large systems. *Physical Review B 1996,* vol. 53, nº 16, 441-444.
44. Paiva, L. A. F.; Gurgel, L. A.; Campos, A. R.; Silveira, E. R.; Rao, V. S. N. (2004). Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Life Science*, 75 (16): 1979-1987.
45. Pietta, P.; Simonetti, P.; Mauri, P. (1998). Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plants. *J. Agric. Food Chem.,* 46, 4487-4490.
46. Poole, C. P.; **Electron Spin Resonance - A comprehensive Treatise on Experimental Techniques**. 2 ed. New York: Wiley-Interscience, 1983.
47. Polovka, M.; Brezová, V.; Staško, A. (2003). Antioxidant properties of tea investigated by EPR spectroscopy. *Biophysical Chemistry,* 106, 39-56.
48. Polyakov, N. E.; Leshina, T. V.; Konovalova, T. A.; Kispert, L. D. (2001). Carotenoids as Scavengers of Free Radicals in a Fenton Reaction: Antioxidants or Pro-oxidants? *Free Radical Biology & Medicine*, 31 (3): 398-404.
49. Pratt D. E.; Miller E. E. (1984). A Flavonoid Antioxidant in Spanish Peanuts (*Arachia hypogea*). *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61, 1064-1067.
50. Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. (1996). Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radical Biology & Medicine,* 20, 933-956.
51. Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, 2(4), 152-159.
52. Rossi, B. T.; Chen, F.; Baffa, O. (2005). A new 2 methylalanine-PVC ESR dosimeter. *Applied Radiation and Isotopes*, v. 62, p. 287-291.

53. Russel, J. B.; **Química Geral – Vol.2** – Tradução Marcia Guekeziam et al.. 2ed. São Paulo: Makron Books, 1994.
54. Salvador, M. & Henriques, J. A. P. (2004). **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. Canoas, ed. ULBRA.
55. Sanchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Sci. Tech. Int.,* 8(3), 121-137.
56. Santos, A. B.; Rossi, A. M.; BAFFA, O. (2005). Study of dental enamel and synthetic hydroxyapatite irradiated by EPR at K-band. Applied Radiation and Isotopes, v. 62, p. 213-217.
57. Silva, D. H. S.; Pereira, F. C.; Zanoni, M. V. B.; Yoshida, M. (2001). Lipophyllic antioxidants from *Iryanthera juruensis* fruits. *Phytochemistry*, 57 (3): 437-442.
58. de Souza, R. F. V.; de Giovani, W. F. (2004). Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal íons. *Redox Report*, 9:1, 97-104.
59. Swartz, H. M.; **Biological applications of electron spin resonance**. 1 ed. New York: Wiley-Interscience, 1972.
60. Trouillas, P; Marsal, P.; Siri, D.; Lazzaroni, R.; Duroux, J. (2004). A DFT study of the reactivity of OH groups in quercetin and taxifolin antioxidants: The specificity of the 3-OH site. *Food Chemistry*, 97, 679-688.
61. Trouillas, P.; Calliste, C.; Allais, D.; Simon, A.; Marfak, A.; Delage, C.; Duroux, J. (2003). Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food Chemistry,* 80, 399-407.
62. Troullier, N.; Martins, J. L. (1991). Efficient pseudopotentials for plane-wave calculations. *Physical Review B,* 43, 1993-2006.
63. Valentão, P.; Fernandes, E.; Carvalho, F.; Andrade, P. B.; Seabra, R. M.; Bastos, M. L. (2002). Antioxidative Properties of Cardoon (*Cynara cardunculus L.*) Infusion Against Superoxide Radical, Hydroxyl Radical, and Hypochlorous Acid. *J. Agric. Food Chem.,* 50, 4989-4993.
64. Velioglu, Y. S.; Mazza, G.; Gao, L.; Oomah, B. D. (1998). Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *J. Agric. Food Chem.,* 46, 4113-4117.

65. Vianna, J. D. M.; Fazzio, A.; Canuto, S.; **Teoria Quântica de Moléculas e Sólidos – Simulação Computacional.** São Paulo: Editora Livraria da Física, 2004.
66. Wayner, D. D. M.; Lusztyk, E.; Pagé, D.; Ingold, K. U.; Mulder, P.; Laarhoven, L. J. J.; Aldrich, H. S. (1995). Effects of Solvation on the Enthalpies of Reaction of tert-Butoxyl Radicals with Phenol and on the Calculated O-H Bond Strength in Phenol. *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 8737-8744.
67. Wertz, J. E.; Bolton, J. R.; **Electron Spin Resonance – Elementary Theory and Practical Applications**. 1 ed. New York: McGraw-Hill Book Company, 1972.
68. Wright, J. S.; Johnson, E. R.; DiLabio, G. A. (2001). Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants. *Journal American Chemical Society*, 123, 1173-1183.
69. Yen, G.; Chen, H. (1995). Antioxidant Activity of Variuos Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.,* 43, 27-32.
70. Yordanov, N. D.; Christova, A. G. (1997). Quantitative spectrophotometric and EPR-determination of 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH). *Fresenius J. Anal Chem.,* 358, 610-613.
71. Yordanov, N. D.; Ranguelova, K. (2000). Quantitative electron paramagnetic resonance and spectrophotometric determination of the free radical 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy. *Spectrochimica Acta Part A*, 56, 373–378.
72. Zhang, H.; Sun, Y.; Wang, X. (2002). Electronic Effects on O-H Proton Dissociation Energies of Phenolic Cation Radicals: A DFT Study. *Journal Org. Chem.*, 67, 2709-2712.

Anexo 1. Fotos de algumas plantas.

Machaerium villosum

Swartzia langsdorffii

Maytenus ilicifolia

Copaifera langsdorffii