

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO FOTOQUÍMICO DA AÇÃO
ANTI-RADICALAR DE COMPOSTOS
POLIFENÓLICOS EMPREGANDO
ESPECTROFOTOMETRIA E HPLC-UV**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fernanda Oliveira Lima

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

**ESTUDO FOTOQUÍMICO DA AÇÃO ANTI-RADICALAR DE
COMPOSTOS POLIFENÓLICOS EMPREGANDO
ESPECTROFOTOMETRIA E HPLC-UV**

por

Fernanda Oliveira Lima

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química Analítica**

Orientador: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho

Santa Maria, RS, Brasil

2010

© 2010

Todos os direitos autorais reservados a Fernanda Oliveira Lima. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor.

Endereço: Rua Dezenove de Outubro, n. 439, apto 206, Bairro Centro, Ijuí, RS, 98700-000

Fone (0xx)55 33338813; End. Eletr: quimica.fernandalima@gmail.com

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química Analítica**

A comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ESTUDO FOTOQUÍMICO DA AÇÃO ANTI-RADICALAR DE
COMPOSTOS POLIFENÓLICOS EMPREGANDO
ESPECTROFOTOMETRIA E HPLC-UV**

Elaborada por
Fernanda Oliveira Lima

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química Analítica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Leandro Machado de Carvalho, Dr.
(presidente/orientador)

Maurício Reis Bogo, Dr. (PUC-RS)

Ricardo Andrade Rebelo, Dr. (FURB)

Santa Maria, 22 de fevereiro de 2010

Dedico este trabalho

*à minha mãe **Carmen Marília**,
pela dedicação incansável,
pelo suporte, amor, carinho,
pela força, amizade, compreensão,
pelo companheirismo, apoio e paciência,
enfim, por acreditar em mim,
à minha avó **Geny**,
pelo amor, carinho e apoio.
aos meus **Tios e Primos**,
pelo suporte, apoio,
e por acreditar em mim,
e às tão queridas **Amigas**,
pela força e compreensão.*

Muito Obrigada por tudo!

Eu amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo qual recebi o dom da vida e que me deu força e coragem diante às dificuldades;

A minha mãe, Carmen Marília, sempre maravilhosa!!! Pela compreensão, ensinamentos, apoio, paciência e amor incondicional, por dedicar a sua vida pela minha formação, e por sempre me dar o apoio de que precisei, acreditando fielmente em meus sonhos. Sem você eu não teria chegado até aqui... Obrigada! AMO VOCÊ, por certo, a melhor pessoa do mundo;

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade de realização do curso.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

Ao professor Dr. Paulo Cícero do Nascimento, pela oportunidade, auxílio, disponibilidade de tempo, atenção e paciência.

Ao meu professor orientador, Dr. Leandro Machado de Carvalho, pelo auxílio, pela disponibilidade de tempo, pela atenção dispensada, pela paciência e pelo conhecimento compartilhado durante a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Marcelo Barcellos da Rosa pela co-orientação, apoio, transmissão de conhecimentos e pela colaboração neste trabalho e na banca de qualificação.

Ao professor Dr. Marcos Antonio Villette, membro da banca de qualificação, pelas contribuições para o aprimoramento deste trabalho.

Aos professores Dr. Maurício Reis Bogo e Dr. Ricardo Andrade Rebelo, membro da comissão examinadora, pelas contribuições para o aprimoramento deste trabalho.

A todos colegas do LACHEM, pelo apoio, incentivo e conselhos. Um agradecimento especial as colegas e amigas Simoni Da Rós e Ana Paula Moreira, pelo apoio experimental, e Alice Raabe, pelo carinho.

A Mariele Martini e Luis Ferras, pessoas importantíssimas na minha vida profissional e pessoal, companheiros e conselheiros para todos os momentos sendo eles de alegria ou tristeza no enfrentamento das dificuldades. Adoro vocês!!!

A minha amiga e irmã por afinidade Greice Franciele Fehy dos Santos Montagner, pelo amor, carinho, dedicação, apoio e conselhos. Adoro você!!!

A todos os professores e funcionários que colaboraram indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho. Em especial ao Ademir e a Valeria, pelo incentivo e disponibilidade sempre que precisei.

E, a todos que me ajudaram, direta ou indiretamente, na concretização deste trabalho.

A todos o meu muito obrigado!

"O futuro não é um lugar onde estamos indo, mas um lugar que estamos criando. O caminho para ele não é encontrado, mas construído e o ato de fazê-lo muda tanto o realizador quanto o destino". (Antoine de Saint-Exupery)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

ESTUDO FOTOQUÍMICO DA AÇÃO ANTI-RADICALAR DE COMPOSTOS POLIFENÓLICOS EMPREGANDO ESPECTROFOTOMETRIA E HPLC-UV

AUTORA: FERNANDA OLIVEIRA LIMA

ORIENTADOR: LEANDRO MACHADO DE CARVALHO

Santa Maria, 22 de fevereiro de 2010.

O interesse por substâncias antioxidantes aumentou consideravelmente nos últimos anos, pois moléculas que diminuem a peroxidação de lipídeos podem minimizar ou inibir os danos oxidativos causados ao DNA, proteínas e carboidratos.

Os flavonóides, um grupo de metabólitos secundários, amplamente distribuídos no reino vegetal, apresentam propriedades antiinflamatórias, antibacterianas, antivirais, antialérgicas e antitumorais, além de possuírem propriedades antioxidantes sobre radicais livres de forma a inativá-los e a prevenir os danos oxidativos em nível celular. Acredita-se que a atividade biológica dos flavonóides seja devido às suas propriedades antioxidantes.

Devido à grande importância dada atualmente aos radicais livres e antioxidantes, existe uma forte demanda por técnicas analíticas capazes de identificar e quantificar esses dois grupos de compostos.

Este trabalho descreve o estudo do poder anti-radicalar dos flavonóides canferol, fisetina, quercetina, quercitrina, miricetina e rutina frente à radiação UV e ao radical HO[•]. O método empregado baseou-se na geração fotoquímica artificial do radical HO[•] pela fotodecomposição do H₂O₂. Os flavonóides estudados foram fotoestáveis frente à radiação UV e eficientes no combate ao radical HO[•]. A quercitrina foi o flavonóide com maior ação anti-radicalar, seguida da rutina, canferol, fisetina, quercetina e miricetina. A metodologia proposta possibilita a comparação quantitativa da ação anti-radicalar de antioxidantes com base na cinética de reação

das espécies com o radical HO[•]. Da mesma forma, o estudo “in vitro” da interação entre radicais HO[•] e extratos de plantas com caráter antioxidante pode ser realizado pelo método proposto.

Palavras-chave: flavonóides; radical HO[•]; poder anti-radicalar.

ABSTRACT

Master Dissertation in Chemistry
Postgraduate in Chemistry
Federal University of Santa Maria

ESTUDO FOTOQUÍMICO DA AÇÃO ANTI-RADICALAR DE COMPOSTOS POLIFENÓLICOS ESPECTROFOTOMETRIA E HPLC-UV

AUTHOR: FERNANDA OLIVEIRA LIMA

ADVISOR: LEANDRO MACHADO DE CARVALHO

Santa Maria, February 22th, 2010.

The interest in antioxidants has increased considerably in recent years as molecules that reduce lipid peroxidation may minimize or inhibit the oxidative damage caused to DNA, proteins and carbohydrates.

Flavonoids, a group of secondary metabolites widely distributed in the plant kingdom, have properties of anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, anti-allergic and anti-tumor, in addition to possessing antioxidant and free radicals to inactivate them and prevent oxidative damage at cell level. It is believed that the biological activity of flavonoids is due to its antioxidant properties.

Due to the great importance given today to free radicals and antioxidants, there is a strong demand for analytical techniques able to identify and quantify these two groups of compounds.

This work describes the study of anti-radical power of the flavonoids kaempferol, fisetin, quercetin, quercitrin, myricetin and rutin against UV radiation and HO[•] radical. The method used was based on artificial photochemical generation of HO[•] radicals by photolysis of H₂O₂. The flavonoids studied were photostable towards UV radiation and efficient in the fight against HO[•] radical. The flavonoid quercitrin was the most active compound, followed by rutin, kaempferol, fisetin, quercetin and myricetin. The proposed methodology allows for quantitative comparison of the antiradical action of the antioxidants based on the reaction kinetics of the species with the HO[•] radical. Similarly, the study in vitro the interaction between HO[•] radicals

and plant extracts with antioxidant character can be accomplished by the proposed method.

Keywords: flavonoids; HO[•] radical, anti-radical power.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O). Várias espécies reativas de O_2 são formadas no processo [FERREIRA & MATSUBARA, 1997].	27
Figura 2 – Reação direta dos antioxidantes com os radicais livres hidroxil (HO^\bullet) e peroxil (ROO^\bullet) [DENISOV & AFANAS'EV, 2005].	30
Figura 3 – Estrutura química do ácido ascórbico [LEHNINGER, 2005].	31
Figura 4 – Reação entre um antioxidante e com radicais livres e com íon férrico [DENISOV & AFANAS'EV, 2005].	31
Figura 5 – Estrutura química do α -tocoferol [LEHNINGER, 2005].	32
Figura 6 – Reação do α -tocoferol com os radicais livres hiroperoxil e peroxil [DENISOV & AFANAS'EV, 2005].	32
Figura 7 – Estrutura química da Glutaciona (γ -Lglutamil-L-cisteinil-glicina (GSH)) [LEHNINGER, 2005].	33
Figura 8 – Percursos de formação de EROs, o processo de peroxidação lipídica e do papel da glutaciona (GSH) e outros antioxidantes (vitamina E, vitamina C, ácido lipóico) na gestão do estresse oxidativo (equações não estão balanceadas). [VALKO et al., 2007].	34
Figura 9 – Estrutura básica dos flavonóides [ACKER ET al., 1996; PIETTA, 2000; HEIM, TAGLIAFERRO & BOBILYA, 2002; HAVSTEEN, 2002; DENISOV & AFANAS'EV, 2005].	36
Figura 10 – Principais rotas biossintéticas dos flavanóides [ACKER ET al., 1996; PIETTA, 2000; FORKMANN & MARTENS, 2001; HEIM, TAGLIAFERRO & BOBILYA, 2002; HAVSTEEN, 2002; DENISOV & AFANAS'EV, 2005].	38
Figura 11 – Estrutura química dos flavonóides estudados neste trabalho.	39

Figura 12 – Reação dos flavonóides com os radicais livres peroxil (ROO [•]) e hidroxil (HO [•]) [DENISOV & AFANAS'EV, 2005].	40
Figura 13 – Reação de Fenton [ACKER et al., 1996; DENISOV & AFANAS'EV, 2005].	40
Figura 14 – Reação do lumino com radicais alquil-peroxilas em meio alcalino para geração de luz.	43
Figura 15 – Reação do DPPH com espécies antioxidantes [MOLYNEUX, 2004].	43
Figura 16 – Reação do trolox com espécies antioxidantes [PANNALA, 2001; HUANG et al., 2005].	44
Figura 17 – Representação esquemática dos sistemas de irradiação UV desenvolvidos: (A) reator com fonte de radiação lâmpada de Hg; (a) lâmpada de Hg (80 W); (b) caixa de madeira revestida com papel alumínio; (c) cooler; (d) suporte para os tubos de quartzo; (e) tubos de quartzo; (B) reator com fonte de irradiação lâmpada de W; (f) lâmpada de W (150 W); (g) projetor; (h) caixa de madeira revestida com papel alumínio; (i) cooler; (j) suporte para os tubos de quartzo.	47
Figura 18 – Lei de velocidade de uma reação de primeira ordem.	50
Figura 19 – Determinação da constante cinética aparente dos flavonóides frente ao radical HO [•] .	50
Figura 20 – Determinação do tempo de meia-vida de uma reação de primeira ordem.	51
Figura 21 – Reação de fotodecomposição do H ₂ O ₂ [HALLIWELL; CLEMENTB; LONG, 2000].	52
Figura 22 – Curva de calibração do peróxido de hidrogênio, utilizada para quantificação da fotodecomposição do H ₂ O ₂ .	53
Figura 23 – Quantificação da fotodecomposição do H ₂ O ₂ frente à fotólise nos reatores fotoquímicos desenvolvidos com fonte radiação de W (150 W) e de Hg (80 W); [H ₂ O ₂] _{inicial} = 0,29 mmol L ⁻¹ .	53

Figura 24 – Quantificação da geração do radical HO [•] e fotodecomposição do H ₂ O ₂ frente à fotólise no reator fotoquímico com fonte radiação de Hg (80 W); [H ₂ O ₂] _{inicial} = 0,29 mmol L ⁻¹	54
Figura 25 – Estudo do decaimento do sinal dos flavonóides fisetina, quercetina e rutina frente à fotólise direta no reator fotoquímico (A) com fonte radiação de Hg (80 W).....	56
Figura 26 – Estudo do decaimento do sinal dos flavonóides fisetina, quercetina e rutina frente à fotólise direta no reator fotoquímico (B) com fonte radiação de W (150 W).....	56
Figura 27 – Estudo do decaimento do sinal dos flavonóides fisetina, quercetina e rutina frente a fotólise na presença de H ₂ O ₂ no reator fotoquímico (A) com fonte radiação de Hg (80 W); [H ₂ O ₂] = 0,29 a 2,90 mmol L ⁻¹	58
Figura 28 – Estudo do decaimento do sinal dos flavonóides fisetina, quercetina e rutina frente a fotólise na presença de H ₂ O ₂ . Reator fotoquímico (B) com fonte radiação de W (150 W); [H ₂ O ₂] = 0,29 a 2,90 mmol L ⁻¹	58
Figura 29 – Decaimento cinético dos flavonóides quercitrina, rutina, canferol, fisetina, quercetina e miricetina frente à fotólise na presença de H ₂ O ₂ , no reator com fonte de radiação lâmpada de Hg (80 W); análise por espectrofotometria UV-Vis; [H ₂ O ₂] = 0,29 mmol.L ⁻¹ ; [flavonóides] = 50 μmol.L ⁻¹ . (A) fotólise direta e (B) fotólise na presença de H ₂ O ₂	60
Figura 30 – Decaimento cinético dos compostos polifenólicos rutina, quercitrina, canferol, fisetina, quercetina e miricetina frente à fotólise na presença de H ₂ O ₂ , no reator com fonte de radiação lâmpada de Hg (80 W); análise por HPLC; [H ₂ O ₂] = 0,29 mmol.L ⁻¹ ; [flavonóides] = 50 μmol.L ⁻¹ . (A) fotólise direta e (B) fotólise na presença de H ₂ O ₂	60
Figura 31 – Decaimento espectrofotométrico da reação anti-radicalar dos antioxidantes em estudo frente aos radicais HO [•]	61
Figura 32 – Decaimento cromatográfico dos compostos polifenólicos estudados frente a fotólise na presença de H ₂ O ₂ ; [H ₂ O ₂] = 0,29 mmol L ⁻¹ . Condições de análise:	

fase estacionária C18 Dionex (4,6 mm x 150 mm x 5 µm), fase móvel acetonitrila 30 % (v/v), pH 4,00, com fluxo de 0,5 ml min ⁻¹ , injeção de 20 µL e pressão variável.	62
Figura 33 – Constante cinética em função da concentração de flavonóide em estudo frente à fotólise na presença de H ₂ O ₂ , determinada por HPLC-UV.....	64
Figura 34 – Constante cinética em função da concentração de flavonóide, determinada por espectrofotometria UV-Vis dos flavonóides em estudo frente à fotólise em presença de H ₂ O ₂	64
Figura 35 – Constante cinética <i>versus</i> concentração de flavonóide, determinada por HPLC-UV dos flavonóides em estudo frente à fotólise em presença de H ₂ O ₂	65
Figura 36 – Regiões estrutura com maior atividade antioxidante [AMIC et al., 2003].	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – EROs e os antioxidantes.	33
Tabela 2 – Constantes cinéticas dos favonóides determinadas por espectrofotometria UV-Vis.	63

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS POLIFENÓLICOS ESTUDADOS.....	74
ANEXO B – ESPECTROS DE ABSORTIVIDADES MOLAR DOS COMPOSTOS POLIFENÓLICOS EM ESTUDO.....	75
ANEXO C – DADOS CINÉTICOS DOS COMPOSTOS POLIFENÓLICOS ESTUDADOS FRENTE AO RADICAL OH.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ALA	Ácido α -lipóico
Asc⁻	Ascorbato
CAT	Catalase
DHLA	ácido dihidrolipoico
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GPx	Glutaciona peroxidase
Gred	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HO[•]	Hidroxila
HO₂[•]	Hidroperoxila
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
k	Constante cinética
k_{OH}	Constantes cinéticas aparentes
L	Radical lipídico
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LH	Ácidos graxos poliinsaturados
LO	Lipídicos alcoxil
LOO	Radical peroxil lipídico
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
O₂	Oxigênio
O₂^{-•}	Superóxido
ROO	Peroxil
SOD	Superóxido dismutase

TO	Vitamina E
T-OH	Vitamina E reduzida
UV	Radiação ultravioleta
Vis	Radiação visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1	RADICAIS LIVRES E DEFESAS ANTIOXIDANTES	25
2.1.1	Espécies Reativas de oxigênio (EROs)	26
2.1.1.1	Radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	27
2.1.1.2	Radical hidroxil (HO^{\cdot})	28
2.1.1.3	Radical hidroperoxil (HO_2^{\cdot})	28
2.1.1.4	Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	29
2.1.2	Defesas antioxidantes	29
2.2	FLAVONÓIDES COMO CAPTADORES RADICALARES	35
2.3	MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	41
2.3.1	Cinética química	41
2.3.1.1	Redução do β -caroteno	42
2.3.1.2	Quimioluminescência do luminol	42
2.3.2	Transferência de elétrons	43
2.3.2.1	Redução do radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	43
2.3.2.2	Oxidação do ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiaziline-6-sulfonate)	44
3	MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1	REAGENTES E SOLUÇÕES	45
3.2	REATORES FOTOQUÍMICOS	45
3.3	ENSAIOS POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS	48

3.4	ENSAIOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)	48
3.5	FOTODECOMPOSIÇÃO DO H₂O₂ E GERAÇÃO DO RADICAL OH	49
3.6	ATIVIDADE ANTI-RADICALAR FRENTE AO RADICAL OH	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1	ENSAIOS DE FOTÓLISE DIRETA NOS REATORES FOTOQUÍMICOS DESENVOLVIDOS	52
4.1.1	Fotodecomposição do H₂O₂	52
4.1.2	Fotoestabilidade dos flavonóides	55
4.2	CINÉTICA ANTI-RADICALAR DOS FLAVONÓIDES	57
4.2.1	Perfil cinético reacional do radical OH frente aos flavonóides	57
4.2.2	Perfil cinético reacional dos flavonóides frente ao radical OH	59
4.2.2.1	Determinação das constantes cinéticas reacionais por Espectrofotometria UV-Vis e por Cromatográfica Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	63
	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
	ANEXOS	73

1 INTRODUÇÃO

O interesse pela ação de compostos antioxidantes tem aumentado nos últimos anos, principalmente pela preocupação na prevenção ao envelhecimento e às doenças degenerativas relacionadas aos danos causados ao organismo pelos radicais livres, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, doenças degenerativas e disfunções cerebrais, como Alzheimer e Parkinson [FERREIRA & MATSUBARA, 1997; BIANCHI & ANTUNES, 1999; HAVSTEEN, 2002; VALKO et al., 2007, VELLOSA et al., 2007].

Os compostos polifenólicos, um grupo de metabólitos secundários, amplamente distribuídos no reino vegetal, apresentam propriedades antiinflamatórias, antibacterianas, antivirais, antialérgicas e antitumorais, além de possuírem propriedades antioxidantes e inibirem a atividade de muitas enzimas como as xantinas-oxidases. Acredita-se que a atividade biológica dos compostos polifenólicos seja devido às suas propriedades antioxidantes [PIETTA, 2000; HAVSTEEN, 2002; SIMÕES et al., 2004; VALKO, 2007].

Considerando a grande variedade de compostos com propriedades antioxidantes, alguns métodos *in vitro* foram desenvolvidos para a avaliação da atividade anti-radicalar destas espécies. Estes métodos empregam espécies radicalares estáveis em que a detecção do ponto final da reação se realiza, geralmente, por medida da absorvância no UV. Entre as metodologias mais conhecidas para determinação da atividade antioxidante de alimentos, bebidas e de plasma sanguíneo, estão os ensaios de captura de radicais livres DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina) e o ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico] [MOLYNEUX, 2004; PERES-JIMENEZ & SAURA-CALIXTO, 2008].

No entanto, ainda são modestamente descritos métodos que determinem a cinética de reação de espécies antioxidantes com o radical HO[•].

O radical HO[•] é um dos mais reativos radicais conhecidos. A combinação extremamente rápida do radical HO[•] com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido, confirma sua alta reatividade. Assim, se o radical HO[•] for produzido próximo ao DNA, poderão ocorrer modificações de bases nitrogenadas, levando à inativação ou mutação do DNA. Além disso, o radical HO[•] pode inativar

várias proteínas ao oxidar seus grupos sulfidrílicos formando pontes dissulfeto e iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados (lipoperoxidação) das membranas celulares [FERREIRA & MATSUBARA, 1997; VELLOSA et al., 2007].

Esta pesquisa teve como objetivo medir a cinética reacional dos compostos polifenólicos canferol, fisetina, quercetina, quercitrina, miricetina e rutina frente ao radical HO^\bullet . Uma vez que, quanto mais lenta for a reação (antioxidante + radical), maior será a ação antioxidante do composto polifenólico.

As constantes cinéticas obtidas da reação de compostos polifenólicos + radical HO^\bullet foram comparadas entre os compostos polifenólicos, uma vez que os comportamentos são diferentes para cada composto polifenólico, em função de seus poderes antioxidantes/anti-radicalares diferenciados. Portanto, procurou-se com este estudo, reunir informações de forma comparativa, com base em constantes cinéticas e tempos de meia-vida, dos compostos polifenólicos frente ao radical HO^\bullet , por ser este uma das espécies radicalares mais importantes do ponto de vista fisiológico.

Com isso, este trabalho descreve o estudo da fotoestabilidade e da atividade anti-radicalar (antioxidante) dos compostos polifenólicos canferol, fisetina, quercetina, quercitrina, miricetina e rutina, através da reação entre as espécies, a radiação UV e o radical HO^\bullet gerado artificialmente pela fotodecomposição do peróxido de hidrogênio.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Radicais livres e defesas antioxidantes

Nas últimas décadas, pesquisas apontam os radicais livres como principais responsáveis pelo envelhecimento e por doenças degenerativas [FERREIRA & MATSUBARA, 1997; BIANCHI & ANTUNES, 1999; HAVSTEEN, 2002; REN et al., 2003; VALKO et al., 2007; VELLOSA, BARBOSA & OLIVEIRA, 2007].

Os radicais livres podem ser definidos como espécies que contêm um ou mais elétrons não pareados em orbitais atômicos ou moleculares, ou seja, que apresentam um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Este elétron não pareado, geralmente, confere um considerável grau de reatividade aos radicais livres [FERREIRA & MATSUBARA, 1997; RIBEIRO et al., 2005; VALKO et al., 2007].

As reações de oxi-redução são o meio de formação de radicais livres, uma vez que eles provocam ou resultam deste tipo de reação. O radical livre pode ceder o elétron desemparelhado, oxidando-se, ou receber um elétron, reduzindo-se. Nesta tentativa de se estabilizar quimicamente, os radicais livres propiciam reações em cadeia que terminam alterando a conformação, a estrutura ou as funções de diversos componentes celulares [FERREIRA & MATSUBARA, 1997; VALKO et al. 2007].

Para limitar os níveis de radicais livres e impedir a indução de danos, defesas antioxidantes agem frente à produção contínua deles durante os processos metabólicos com o objetivo de equilibrar a formação e a remoção de espécies radicalares no organismo. O efeito prejudicial dos radicais livres ocorre quando eles estão em quantidade excessiva no organismo, ultrapassando a capacidade do sistema de defesa antioxidante de neutralizá-los [FERREIRA & MATSUBARA, 1997; BIANCHI & ANTUNES, 1999; VALKO et al. 2007].

2.1.1 Espécies Reativas de oxigênio (EROs)

Radicais livres derivados do oxigênio, chamados de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (em inglês, reactive oxygen species (ROS)) representam a classe mais importante de espécies de radicais gerados em sistemas vivos [VALKO et al., 2007]. O oxigênio é o último aceptor de elétrons no sistema de produção de energia aeróbico, por isso representa uma parte essencial do metabolismo aeróbico [PIETTA, 2000].

A terminologia, EROs, inclui as espécies de radicais livres de oxigênio e outras que, apesar de não possuírem elétrons desemparelhados, são muito reativas em decorrência de sua instabilidade [FERREIRA & MATSUBARA, 1997; RIBEIRO et al., 2005].

As EROs são onipresentes e derivadas do metabolismo do oxigênio. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O (Figura 1). Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila (HO_2^{\cdot}) e hidroxila (HO^{\cdot}), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Essas espécies desempenham papéis importantes na biologia celular, já que em baixos níveis as EROs são indispensáveis em muitos processos bioquímicos, incluindo mensagens intracelulares, diferenciação celular, apoptose, imunidade e defesa contra microorganismos [FERREIRA & MATSUBARA, 1997; VALKO et al., 2007; ROBERTS & SINDHU, 2009].

Além das EROs serem geradas por processos fisiológicos internos, também são geradas por patologias e por fontes externas como prática de exercícios físicos extenuantes, lesões isquêmicas, oxidação de LDL – colesterol, reações inflamatórias, radiações (UV, raios-X), e xenobióticos diversos como fumaça do cigarro, ingestão de bebidas alcoólicas, medicamentos como morfina e alucinógenos (cocaína), contaminação por metais como chumbo alumínio, mercúrio e ferro. [PIETTA, 2000; VALKO et al., 2007].

O estresse oxidativo, também referido na literatura como um desequilíbrio antioxidante dos radicais livres, ocorre quando o valor líquido destas moléculas excede a capacidade antioxidante, que resulta na indução de danos celulares pelos

radicais livres. Assim, o estresse oxidativo pode ocorrer como consequência de um aumento geral na geração de EROs, uma diminuição do sistema antioxidante, ou ambos [BIANCHI & ANTUNES, 1999;].

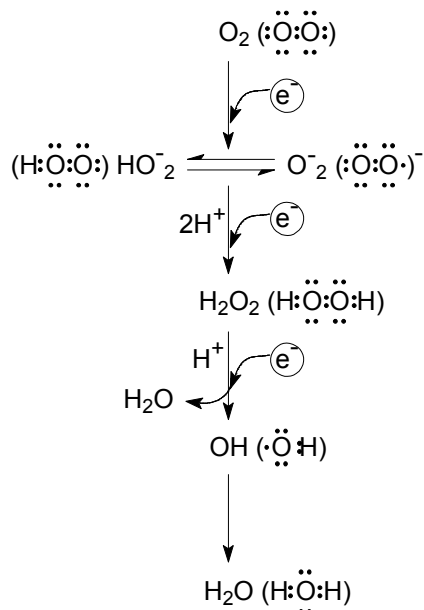


Figura 1 – Redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O). Várias espécies reativas de O_2 são formadas no processo [FERREIRA & MATSUBARA, 1997].

2.1.1.1 Radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Considerado como pouco reativo em soluções aquosas, o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) é formado após a primeira redução do O_2 pela adição de um elétron, pode reagir como oxidante ou como redutor dando origem a outras espécies reativas. Em meio aquoso, sua reação principal é a dismutação, na qual se produz uma molécula de peróxido de hidrogênio e uma molécula de oxigênio. Ele também é uma base fraca cujo ácido conjugado, o radical hidropéroxido (HOO^{\cdot}) é mais reativo [FERREIRA & MATSUBARA, 1997; RIBEIRO et al., 2005; VALKO et al., 2007].

O radical $\text{O}_2^{\cdot-}$, Apesar dos efeitos danosos, tem importância vital para as células de defesa e sem ele o organismo está desprotegido contra infecções causadas por vírus, bactérias e fungos. A formação do radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ ocorre de forma

espontânea, por exemplo, na membrana mitocondrial, através da cadeia respiratória e por fagócitos ou linfócitos e fibroblastos durante o processo inflamatório, para combater corpos estranhos. Além disso, também pode ser produzido por flavoenzimas, lipoxigenases e cicloxigenases [FERREIRA & MATSUBARA, 1997; RIBEIRO et al., 2005; VALKO et al., 2007].

2.1.1.2 Radical hidroxil (HO^\bullet)

O radical hidroxil, teoricamente, é o mais reativo das EROs, com um curto tempo de meia-vida, de aproximadamente 10^{-9} s. Ele pode oxidar qualquer molécula biológica. Assim, quando produzidos, *in vivo*, os HO^\bullet reagem no próprio sítio onde foram gerados [FERREIRA & MATSUBARA, 1997; RIBEIRO et al., 2005; VALKO et al., 2007].

As principais vias de formação do HO^\bullet são pela reação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com metais de transição e pela homólise da água por exposição à radiação ionizante [RIBEIRO et al., 2005; VALKO et al., 2007].

Para se estabilizar, o HO^\bullet promove, principalmente, a abstração de hidrogênio e/ou a adição a insaturações de moléculas próximas. Assim, este radical pode modificar bases purínicas e pirimidínicas, inativar várias proteínas e iniciar a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares [FERREIRA & MATSUBARA, 1997; VALKO et al., 2007].

2.1.1.3 Radical hidroperóxil ($\text{HO}_2^{\bullet-}$)

O $\text{HO}_2^{\bullet-}$ representa a forma protonada do radical $\text{O}_2^{\bullet-}$. Evidências indicam que o radical hidroperóxil ($\text{HO}_2^{\bullet-}$) é mais reativo que o radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas [FERREIRA & MATSUBARA, 1997; VALKO et al., 2007].

2.1.1.4 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), apesar de não ser considerado um radical livre verdadeiro, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o HO^\bullet . (Figura 1). Formado pela conversão espontânea e enzimática de dois radicais superóxido, o H_2O_2 é mais estável do que o radical HO e tem a capacidade de atravessar camadas lipídicas. Estas propriedades possibilitam que o H_2O_2 , reaja com alvos biológicos distantes do seu local de formação e provoque danos, por exemplo, na molécula do DNA por meio de reações enzimáticas [FERREIRA & MATSUBARA, 1997; BIANCHI & ANTUNES, 1999; RIBEIRO et al., 2005].

2.1.2 Defesas antioxidantes

A exposição aos radicais livres tem levado os organismos a desenvolverem uma série de mecanismos de defesa. Os mecanismos de defesa contra os radicais livres, induzidos pelo estresse oxidativo envolvem: mecanismos preventivos, mecanismos de reparo, defesas física, e as defesas antioxidantes [RIBEIRO et al., 2005; VALKO et al., 2007].

Antioxidante é um antigo termo, que no início era aplicado para a descrição de inibidores de processos oxidativos, os quais são capazes de reagir com radicais peroxil. Atualmente, este termo é freqüentemente aplicado a todos os inibidores de radicais livres [DENISOV & AFANAS'EV, 2005]. Os antioxidantes são substâncias que, mesmo presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidante, podem atrasar ou inibir as taxas de oxidação [BIANCHI & ANTUNES, 1999].

Existem três grandes tipos de defesas antioxidantes. Os antioxidantes diretos, “varredores” de radicais livres e quelantes, podem suprimir diretamente a formação de radicais livres. Além dos antioxidantes diretos, existem outros dois grupos importantes de inibidores de radicais livres: as enzimas antioxidantes e os compostos que possuem propriedades antioxidantes, que são considerados

antioxidantes indiretos. Compostos com propriedades de antioxição indireta podem afetar a formação de radicais livres, por exemplo, inibindo a atividade de enzimas pró-oxidantes [DENISOV & AFANAS'EV, 2005].

Inibidores diretos promovem a supressão da formação de radicais livres, através da reação direta com os radicais livres (Figura 2) para formar novos radicais inativos ou quelar metais de transição cataliticamente ativos para formar complexos inativos [DENISOV & AFANAS'EV, 2005]:

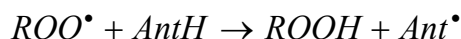
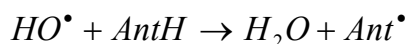


Figura 2 – Reação direta dos antioxidantes com os radicais livres hidroxil (HO^{\bullet}) e peroxil (ROO^{\bullet}) [DENISOV & AFANAS'EV, 2005].

Antioxidantes enzimáticos incluem, principalmente, as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT). A SOD catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , na presença de próton H^+ . A GPx catalisa a redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos a seus correspondentes alcoóis pela conversão da glutatona reduzida (GSH) para glutatona oxidada (GSSG). E a CAT é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do H_2O_2 à H_2O e O_2 [FERREIRA & MATSUBARA, 1997; VALKO et al., 2007].

Antioxidantes não enzimáticos são representados, principalmente, pelo ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutatona (GSH), flavonóides e outros antioxidantes.

O ácido ascórbico (Figura 3), uma molécula usada na hidroxilação de várias reações bioquímicas nas células. A sua principal função é a hidroxilação do colágeno, a proteína fibrilar que dá resistência aos ossos, dentes, tendões e paredes dos vasos sanguíneos. Além disso, é um poderoso antioxidante. Em valores de pH normalmente encontrados no meio intracelular, o ácido ascórbico encontra-se predominantemente na sua forma ionizada, o ascorbato [LEHNINGER, 2005].

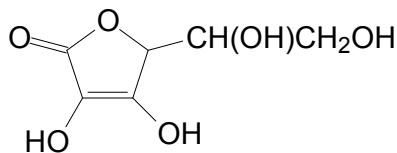


Figura 3 – Estrutura química do ácido ascórbico [LEHNINGER, 2005].

Uma das atividades mais importantes do ascorbato no organismo humano é na desidratação de resíduos de prolina no colágeno. O colágeno, uma proteína estrutural fundamental, necessita ter determinados resíduos de prolina na forma hidroxiprolina para manter uma estrutura tridimensional correta. A hidroxilação é feita pela enzima prolil-4-hidroxilase; o ascorbato não intervém diretamente nesta hidroxilação [LEHNINGER, 2005].

Por outro lado, o ácido ascórbico pode atuar como catalisador na reação de Fenton, promovendo a redução de íons férricos em íons ferrosos (Figura 4). Assim, o ácido ascórbico pode ser tanto um antioxidante, quanto um pró-oxidante dependendo das condições [DENISOV & AFANAS'EV, 2005].

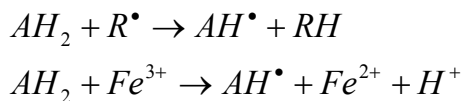


Figura 4 – Reação entre um antioxidante e com radicais livres e com íon férrico [DENISOV & AFANAS'EV, 2005].

Em plantas, o ascorbato encontra-se em concentrações relativamente elevadas (2 a 25 mM) e atua na desintoxicação do peróxido de hidrogénio. A enzima ascorbato peroxidase catalisa a redução do peróxido de hidrogénio a água, usando o ascorbato como agente redutor. Também é precursor dos íons tartarato e oxalato [LEHNINGER, 2005].

Este antioxidante reage, muito lentamente e somente por desprotonação, com o radical superóxido ($k = 0,32 \pm 0,08 \text{ l mol}^{-1}\text{s}^{-1}$), porém reage de forma relativamente rápida com o radical hidroperoxil ($K = 1,6 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1}\text{s}^{-1}$) [DENISOV & AFANAS'EV, 2005].

O α -tocoferol, também conhecido como vitamina E, (Figura 5) é um derivado fenólico lipossolúvel, que apresenta um grupo hidroxila muito ativo que é responsável pela grande capacidade antioxidante desta vitamina [PIETTA, 2000; DENISOV & AFANAS'EV, 2005].

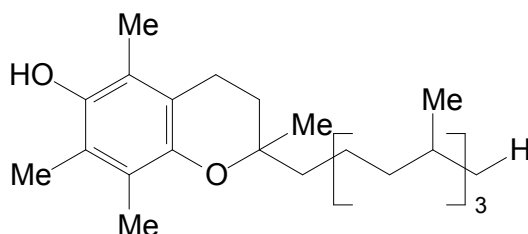


Figura 5 – Estrutura química do α -tocoferol [LEHNINGER, 2005].

Segundo DENISOV & AFANAS'EV (2005), as constantes de velocidade para as reações de α -tocoferol com os radicais HOO^\bullet e ROO^\bullet são suficientemente elevadas, sendo estimadas em $2 \times 10^5 \text{l.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ (Figura 6).

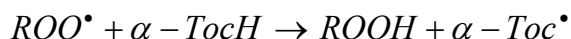
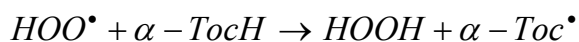


Figura 6 – Reação do α -tocoferol com os radicais livres hidroperóxil e peróxil [DENISOV & AFANAS'EV, 2005].

Outro importante antioxidante é a glutatona (Figura 7). A glutatona é um tripeptídeo (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina (GSH)), que desempenha várias funções no organismo, por exemplo, no metabolismo, transporte, catálise, manutenção de proteínas, etc. Como composto redox, a glutatona atua como um “varredor” de radicais livres e como um doador de elétrons no ciclo redox da glutatona peroxidase e da glutatona redutase que catalisa a redução de peróxidos. [FERREIRA & MATSUBARA, 1997; RIBEIRO et al., 2005; VALKO et al., 2007; DENISOV & AFANAS'EV, 2005].

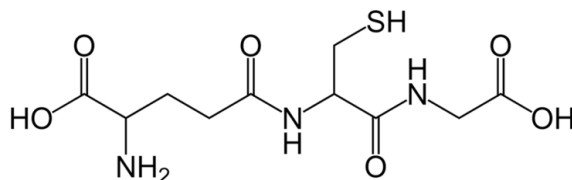


Figura 7 – Estrutura química da Glutationa (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina (GSH)) [LEHNINGER, 2005].

O ácido ascórbico e GSH são os mais importantes antioxidantes solúveis em meio aquoso encontrados nos organismos vivos. A atividade antioxidante da glutathione é especialmente importante no cérebro, que contém níveis relativamente baixos de SOD, catalase e glutathione peroxidase. Neste caso, a alteração do metabolismo de GSH pode contribuir para patogênese de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson [DENISOV & AFANAS'EV, 2005].

Em condições normais, existe um equilíbrio entre os níveis de radicais livres e os de espécies antioxidantes. Este equilíbrio é essencial para a sobrevivência e saúde dos organismos [VALKO et al., 2007].

Na Tabela 1 estão relacionadas às ERO com os respectivos antioxidantes e na Figura 8 é mostrado um esquema de inter-relação entre os radicais livres e as defesas antioxidantes.

Tabela 1 – EROs e os antioxidantes.

ERO	Antioxidantes	
	Endógenos	Exógenos
Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Superóxido dismutase (SOD): a) citoplasmática: Zinco-Cobre b) mitocondrial: Manganês	Vitaminas, zinco, cobre, manganês, picnogenol, EDTA
Radical peroxil (ROO^{\cdot})	Glutathione peroxidase, selênio, cisteína	Vitamina E, selênio
Radical hidroxila (HO^{\cdot})	Não relatado na literatura	Vitamina C, picnogenol, dimetil sulfóxido, EDTA, ácido dimercapto succínico e manitol
Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	Catalase Fe_2^+	Não relatado na literatura

Fonte: VALKO et al., 2007.

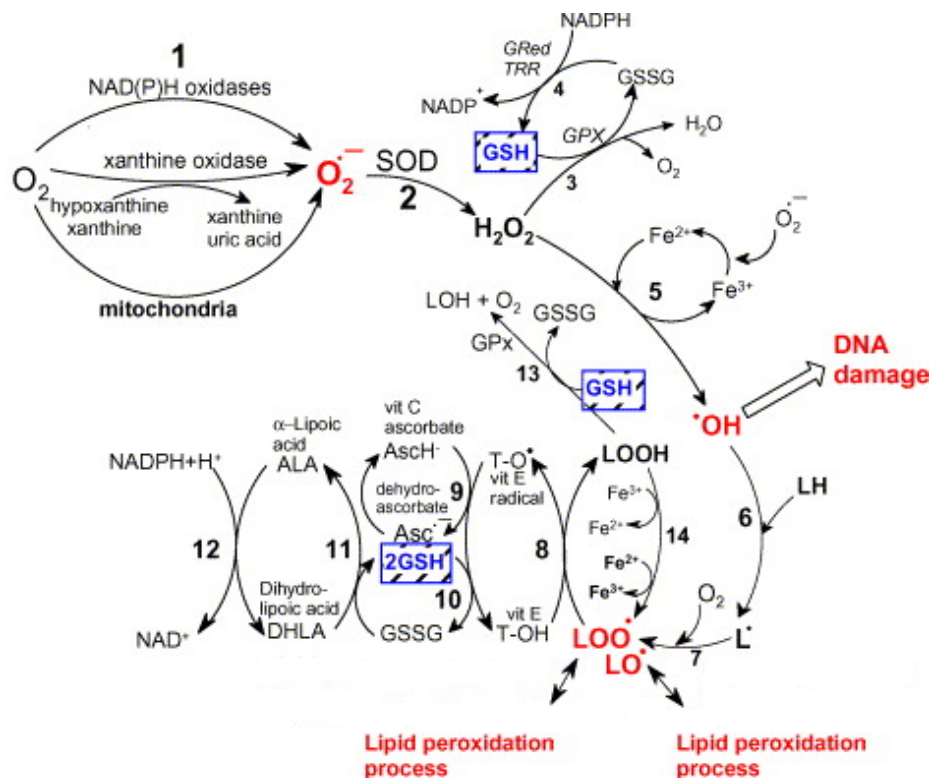


Figura 8 – Percursos de formação de EROs, o processo de peroxidação lipídica e do papel da glutatona (GSH) e outros antioxidantes (vitamina E, vitamina C, ácido lipóico) na gestão do estresse oxidativo (equações não estão balanceadas). [VALKO et al., 2007].

Na Figura 8, a reação (1) mostra que o radical ânion superóxido é formado pelo processo de redução do oxigênio molecular, mediada por NAD(P)H oxidase e xantina oxidase ou não-enzimaticamente por reações redox de compostos reativos como o composto semi-ubiquinona da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons. Na reação (2), o radical superóxido é dismutado pela superóxido dismutase (SOD) a peróxido de hidrogênio. Na reação (3), o peróxido de hidrogênio é oxidado pela enzima glutatona peroxidase (GPx), que requer GSH como doador de elétrons. Na reação (4), a glutatona oxidada (GSSG) é reduzida de volta para GSH pela enzima glutatona redutase (Gred), que utiliza NADPH como doador de elétrons. Na reação (5), alguns metais de transição (por exemplo, Fe^{2+} , Cu^+ e outros) podem reagir com o peróxido de hidrogênio, pela reação de Fenton, e formar radical hidroxil. Na reação (6), o radical hidroxila pode abstrair um elétron de ácidos graxos poliinsaturados (LH) para dar lugar a um radical lipídico (L). Na reação (7), o L pode continuar a interagir com o oxigênio molecular para formar um radical peróxido lipídico (LOO). Se o LOO não for reduzido em antioxidante, ocorre o processo de peroxidação lipídica. Na

reação (8), o LOO é reduzido dentro da membrana pela forma reduzida da vitamina E (T-OH), resultando na formação de um hidroperóxido lipídico e um radical da vitamina E (TO). Na reação (9), ocorre a regeneração da vitamina E pela vitamina C: Na reação (10), a regeneração da vitamina E por GSH. Na reação (11), a glutathione oxidada (GSSG) e do radical ascorbil (Asc-) são reduzidos de volta para GSH e ascorbato monoânion, Asch, respectivamente, pelo ácido dihidrolipóico (DHLLA), que é convertido ao ácido α -lipóico (ALA). Na reação (12), ocorre a regeneração da DHLLA da ALA usando NADPH. Na reação (13), os hidroperóxidos lipídicos são reduzidos a álcoois e dioxigênio pela GPx usando GSH como doador de elétrons. Na reação (14), radicais hidroperóxidos lipídicos podem reagir rapidamente com Fe^{2+} para formar os radicais lipídicos alcóxil (LO), ou muito mais lento com Fe^{3+} para formar os radicais lipídicos peróxil, ocorrendo, por fim, o processo de peroxidação lipídica. [VALKO et al., 2007].

2.2 Flavonóides como captadores radicalares

Atualmente, são conhecidos mais de 4200 flavonóides diferentes [HEIM, TAGLIAFERRO & BOBILYA, 2002; REN et al., 2003; SIMÕES et al., 2004]. Os flavonóides são substâncias fenólicas e/ou polifenólicas, derivadas de benzo- π -pirona e isoladas de uma vasta gama de plantas vasculares. Eles atuam em plantas como antioxidantes, antimicrobianos, fotorreceptores, atratores visuais, repelentes herbívoros, e para a seleção de luz. [PIETTA, 2000; HEIM, TAGLIAFERRO & BOBILYA, 2002; HAVSTEEN, 2002; REN et al., 2003; YAO et al., 2004; DENISOV & AFANAS'EV, 2005].

Além de vários vegetais, os flavonóides são encontrados em sementes, frutos secos, grãos e especiarias, bem como nas bebidas, como vinho (sobretudo vinho tinto), chá, e cevada (em níveis mais baixos) [PIETTA, 2000; HAVSTEEN, 2002; SIMÕES et al., 2004; DENISOV & AFANAS'EV, 2005].

Os flavonóides são membros de uma classe de compostos naturais que recentemente tem sido objeto de considerável interesse científico e terapêutico, uma vez que têm sido relatadas importantes atividades biológicas, tais como, ações antialérgicas, antivirais, antiinflamatórias e vasodilatadoras. Entretanto, o maior

interesse, realmente, tem sido na atividade antioxidante dos flavonóides, que é devido a sua capacidade de inibir e/ou reduzir a formação de radicais livres e na capacidade de quelar metais [HARBORNE & WILLIAS, 1992; PIETTA, 2000; HAVSTEEN, 2002; REN et al., 2003; DENISOV & AFANAS'EV, 2005].

O termo “fenólico” ou “polifenólico” pode ser definido como sendo uma substância que tem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais (ésteres, éteres metílicos, glicosídeos e outros) [SIMÕES et al., 2004].

A estrutura básica dos flavonóides é o núcleo que consiste de 15 átomos de carbono, composto do tipo C6-C3-C6, dispostos em dois anéis aromáticos, que são denominados A e B, conectados por uma ponte de três carbonos, que contém um átomo de oxigênio (anel C) (Figura 9) [PIETTA, 2000; HAVSTEEN, 2002; REN et al., 2003; SIMÕES et al., 2004].

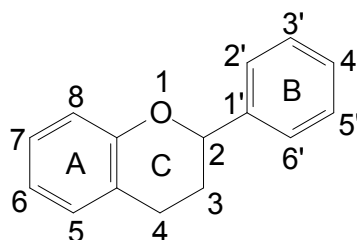


Figura 9 – Estrutura básica dos flavonóides [ACKER ET al., 1996; PIETTA, 2000; HEIM, TAGLIAFERRO & BOBILYA, 2002; HAVSTEEN, 2002; DENISOV & AFANAS'EV, 2005].

Do ponto de vista biossintético, os flavonóides são derivados do ácido cinâmico (*trans*-4-cumarato), o qual deriva do metabolismo dos aminoácidos fenilalanina e tirosina. O ácido cinâmico age como precursor na síntese de um intermediário, ao qual são adicionados três resíduos de malonato e, posteriormente, a estrutura é ciclizada. Subseqüentes hidroxilações e reduções formam diferentes flavonóides (Figura 10) [ACKER ET al., 1996; PIETTA, 2000; FORKMANN & MARTENS, 2001; HEIM, TAGLIAFERRO & BOBILYA, 2002; HAVSTEEN, 2002; DENISOV & AFANAS'EV, 2005].

A grande diversidade de flavonóides é decorrente das variações estruturais, tais como: flavonas, flavanóis, flavonóis, diidroflavonóis, antocianidinas e

isoflavonóides. A figura 11 apresenta a estrutura química dos flavonóis estudados neste trabalho, ressaltando que destes o canferol, a fisetina, a miricetina e a quercetina são não-glicosilados e a quercitrina e a rutina são glicosilados.

De modo geral, a grande variabilidade dos flavonóides apresenta: 1) diferenças na estrutura do anel C e no seu estado de oxi-redução; 2) diferenças no grau de hidroxilação e nas posições dos grupos hidroxila; 3) diferenças na derivatização dos grupos hidroxila, por exemplo, com grupos metila, hidratos de carbono, ou isoprenóides [PIETTA, 2000; HAVSTEEN, 2002; SIMÕES et al., 2004; DENISOV & AFANAS'EV, 2005]. Os flavonóides são classificados em grupos pelo nível de oxidação e no padrão de substituição do anel C. Enquanto os compostos individuais, dentro de um mesmo grupo, são diferenciados pelo padrão de substituição dos anéis A e B. [PIETTA, 2000; HAVSTEEN, 2002; HEIM, TAGLIAFERRO & BOBILYA, 2002; YAO et al., 2004; SIMÕES et al., 2004].

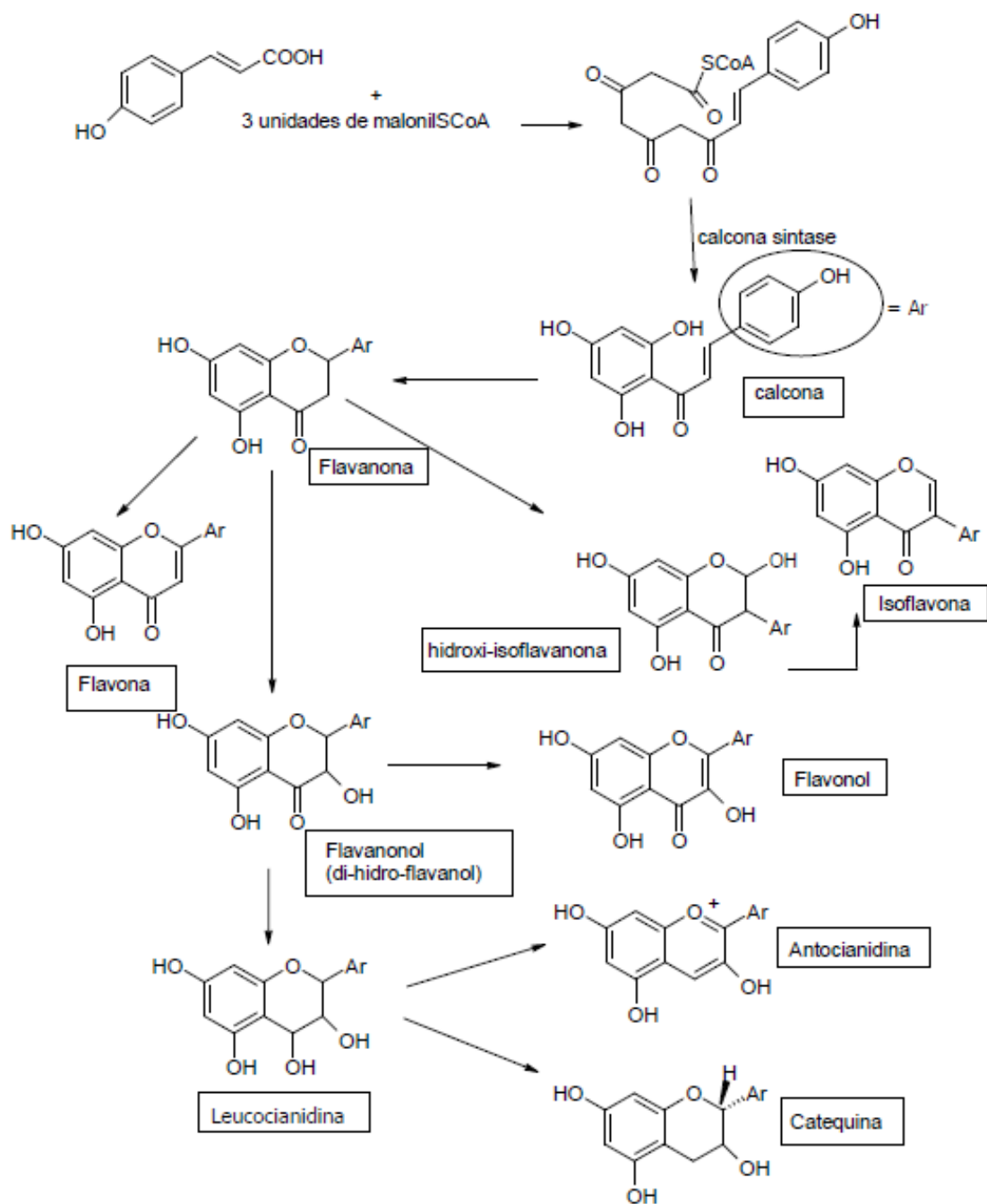


Figura 10 – Principais rotas biossintéticas dos flavanóides [ACKER ET al., 1996; PIETTA, 2000; FORKMANN & MARTENS, 2001; HEIM, TAGLIAFERRO & BOBILYA, 2002; HAVSTEEN, 2002; DENISOV & AFANAS'EV, 2005].

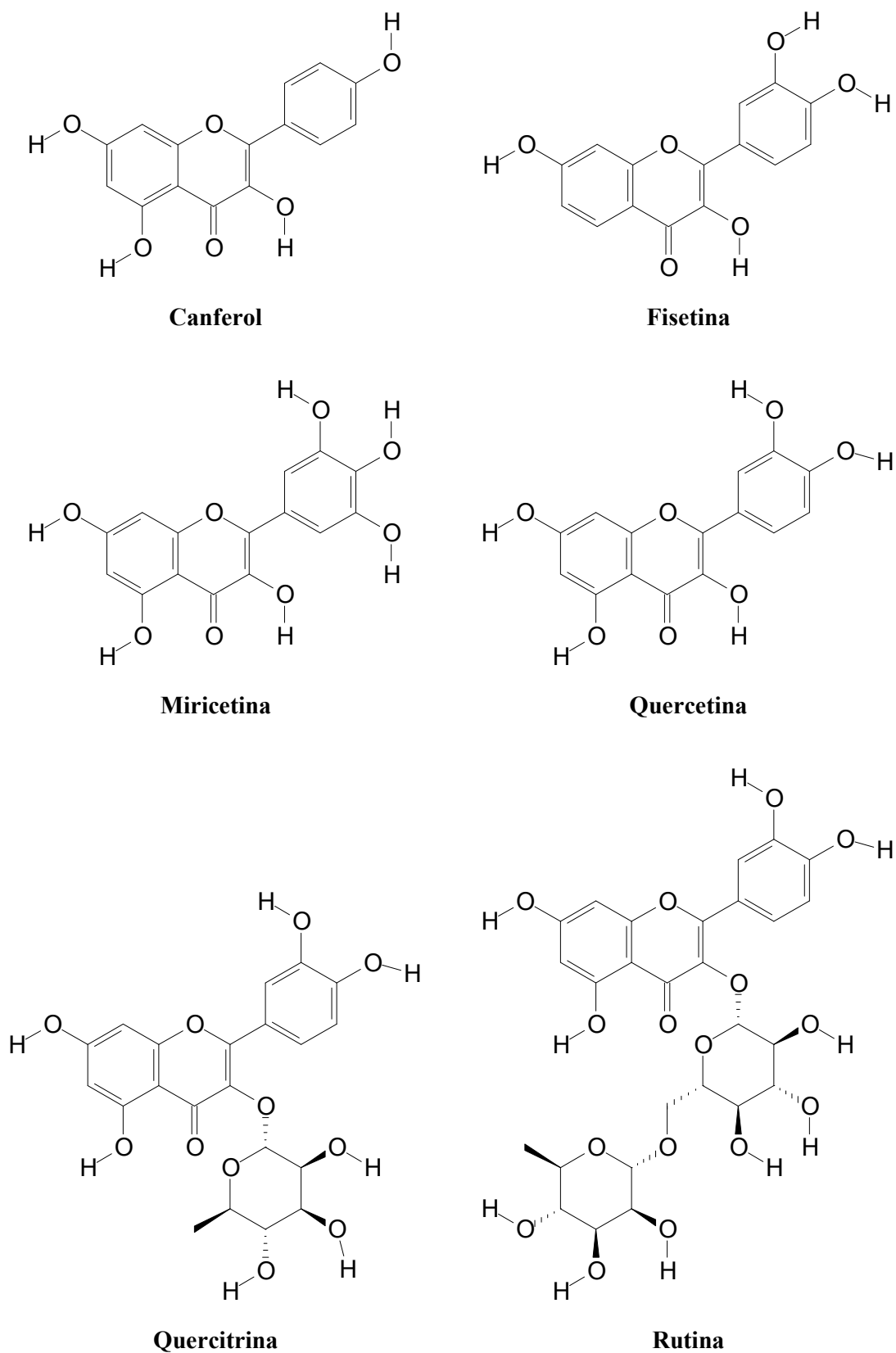


Figura 11 – Estrutura química dos flavonóides estudados neste trabalho.

Os flavonóides são, geralmente, hidroxilados nas posições 3, 5, 7, 3', 4' e 5'. Alguns desses grupos hidroxila podem ser metilados, acetilados ou sulfatados. Quando glicosídeos são formados, a ligação glicosídica é normalmente localizada na posição 3. Os glicosídeos mais comuns são L-ramnose, D-glicose, glucorhamnose, galactose, ou arabinose [HAVSTEEN, 2002].

Os efeitos antioxidantes dos flavonóides podem ser explicados por sua prevenção a peroxidação lipídica através do aprisionamento de radicais de iniciação lipídica (Figura 12), tais como, superóxido, hidroxil e hidroperóxil [HAVSTEEN, 2002; DENISOV & AFANAS'EV, 2005].

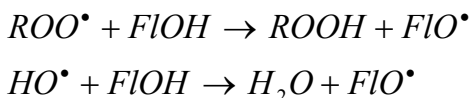


Figura 12 – Reação dos flavonóides com os radicais livres peróxil (ROO^{\bullet}) e hidroxil (HO^{\bullet}) [DENISOV & AFANAS'EV, 2005].

Outro efeito, muito importante, é a quelação de íons metálicos, por exemplo, a complexação com íons ferro, suprimindo a reação de Fenton (Figura 13) [ACKER et al., 1996; DENISOV & AFANAS'EV, 2005].

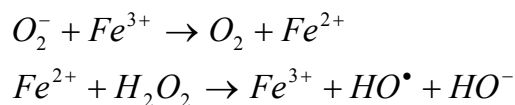


Figura 13 – Reação de Fenton [ACKER et al., 1996; DENISOV & AFANAS'EV, 2005].

Muitos autores têm tentado elucidar a relação estrutura-atividade dos flavonóides quanto ao poder antioxidante. No entanto, isso é uma tarefa difícil, já que o potencial antioxidante pode ser determinado por vários fatores, dos quais a lipofilicidade, a quelação de ferro, e a limpeza de radicais livres são os mais importantes.

As principais aplicações dos flavonóides são na indústria como corantes, aromatizantes e flavorizantes. Além disso, o interesse pela indústria farmacêutica é crescente, e justifica-se pelo fato dos flavonóides apresentarem uma série de vantagens em relação a outros fármacos, principalmente em termos de não apresentar efeitos colaterais, como ulcerogenicidade. Assim, parece claro que os antioxidantes naturais são bem indicados para atenuar os efeitos deletérios do estresse oxidativo celular. Entretanto, estudos mais aprofundados e rigorosos devem ser conduzidos para determinar a concentração destas espécies em diferentes tipos de plantas medicinais e o seu real poder antioxidante frente a sistemas radicalares.

2.3 Métodos para avaliação da atividade antioxidante

Diversas metodologias para medição da atividade antioxidante total são descritas na literatura, principalmente, para amostras de fluidos biológicos, extratos de alimentos e plantas, e compostos puros. Cada método varia quanto ao tipo de radical gerado, ao indicador de oxidação empregado e ao método de detecção e quantificação usado. [RE et al. 1999; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999; HUANG et al., 2005].

Os ensaios antioxidantes podem ser classificados em duas categorias: ensaios baseados em estudos de cinética química, também denominados de métodos diretos e ensaios mediados pela transferência de elétrons, também denominados de métodos indiretos [RE et al. 1999; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999; HUANG et al., 2005].

Os radicais livres podem ser gerados por processos físico-químicos, químicos ou enzimáticos. Os métodos físico-químicos envolvem técnicas como fotólise ou oxidação fotodinâmica. Já os métodos químicos utilizam sistemas, por exemplo, de Fenton, que contêm um agente redutor e um íon metálico. E, por fim, os métodos enzimáticos empregam as reações principalmente as reações da xantina oxidase e da NAD(P) oxidase na geração de radicais livres [RE et al. 1999; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999; HUANG et al., 2005].

Segue abaixo a descrição dos métodos mais empregados na avaliação da atividade antioxidante dos flavonóides.

2.3.1 Cinética química

2.3.1.1 Redução do β -caroteno

Este ensaio está baseado na capacidade de substâncias antioxidantes em retardar a oxidação do β -caroteno na presença de luz. A solução de β -caroteno em CH_2Cl_2 , de coloração amarelada, atua como um revelador em cromatografia em camada delgada sendo que quando aplicada em uma corrida cromatográfica e exposta à luz inicia-se o processo de oxidação do β -caroteno ocasionando a descoloração da placa. Substâncias antioxidantes serão evidenciadas através de manchas amareladas demonstrando o efeito antioxidante da amostra [DENISOV & AFANAS'EV, 2005].

2.3.1.2 Quimioluminescência do luminol

De forma geral, este método está baseado na habilidade do luminol e de compostos relacionados em gerar luminescência sob um fluxo de radicais livres. A produção de espécies reativas de oxigênio gera certa luminescência, a qual pode ser aumentada através da inserção do luminol no sistema [FERREIRA & ROSSI, 2002].

A adição de um antioxidante no sistema, como um “seqüestrador” de radicais, resulta numa extinção da quimioluminescência num pronunciado período de indução, conforme Figura 14. Outras versões do método diferem no tipo de radical livre ativo produzido e no modo como este é produzido [FERREIRA & ROSSI, 2002].

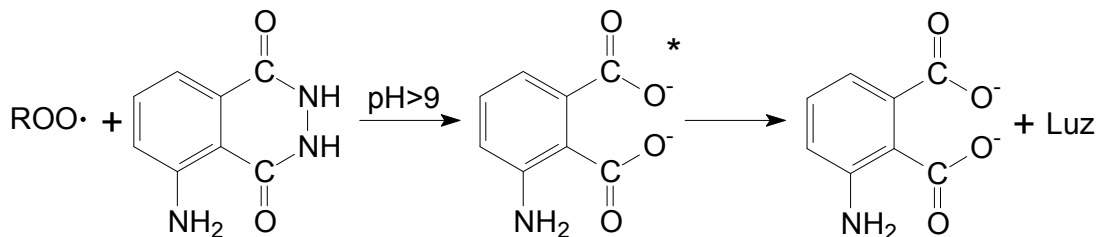


Figura 14 – Reação do lumino com radicais alquil-peroxilas em meio alcalino para geração de luz.

2.3.2 Transferência de elétrons

2.3.2.1 Redução do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)

O radical DPPH é estável, de coloração púrpura, porém quando reduzido passa a ter coloração amarela. Com isso, pode ser facilmente detectado por espectroscopia devido a sua intensa absorção na região visível [SÁNCHEZ-MORENO, 2002; MOLYNEUX, 2004].

O método está baseado na capacidade do DPPH em reagir com doadores de hidrogênio (Figura 15). Na presença de substâncias antioxidantes o mesmo recebe H^{\bullet} sendo então reduzido. O ensaio é iniciado pela adição do DPPH à amostra, então a capacidade da amostra de reduzir o DPPH, ou seja, evitar sua oxidação, é evidenciada pela porcentagem de DPPH restante no sistema. Com isso, a porcentagem de DPPH restante é proporcional à concentração de antioxidante (AH) [SÁNCHEZ-MORENO, 2002; MOLYNEUX, 2004].

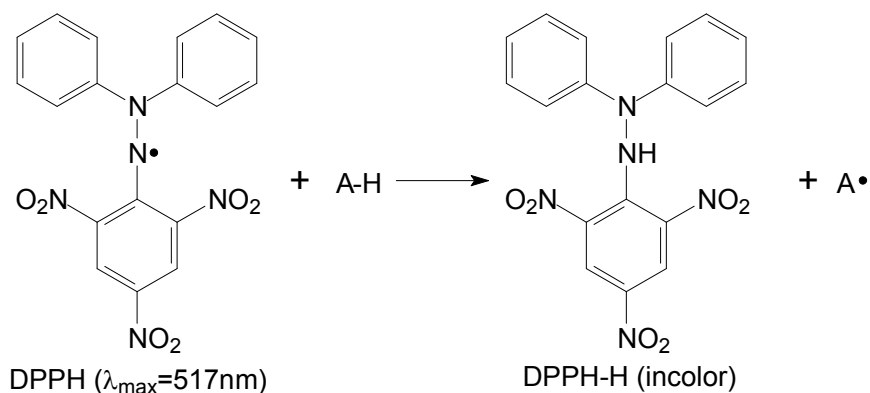


Figura 15 – Reação do DPPH com espécies antioxidantes [MOLYNEUX, 2004].

2.3.2.2 Oxidação do ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico))

O ensaio TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) tem como objetivo monitorar o decaimento do cátion-radical $ABTS^{*+}$, produzido pela oxidação do ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)), gerado pela adição de uma amostra contendo antioxidantes. Na ausência de fenóis, $ABTS^{*+}$ é estável, mas reage energeticamente com um doador de átomo de hidrogênio, como fenóis, sendo convertido em uma forma não colorimétrica do ABTS, conforme reação apresentada na Figura 16. A quantificação é determinada pela quantidade de $ABTS^{*+}$ consumida, devido à reação deste com a amostra contendo fenóis, sendo expressa em Trolox equivalente [HUANG et al., 2005].

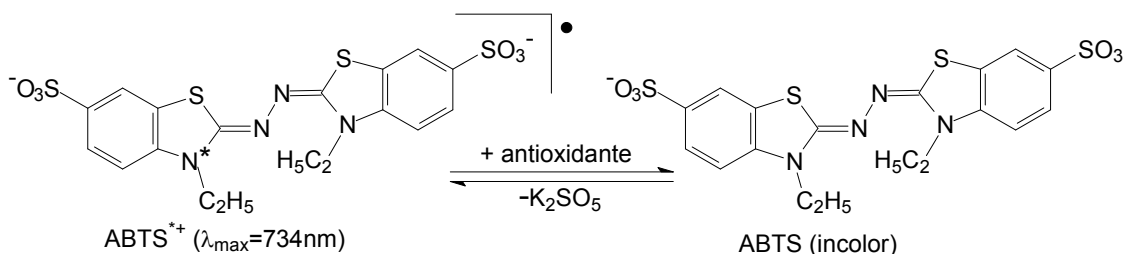


Figura 16 – Reação do trolox com espécies antioxidantes [PANNALA, 2001; HUANG et al., 2005].

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura, destilada e deionizada em sistema Milli Q (Millipore) e todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. As soluções padrão dos compostos polifenólicos canferol, fisetina, quercetina, quercitrina, miricetina e rutina (Sigma-Aldrich) foram preparadas em solvente hidroetanólico 50 % (v/v). O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi obtido da Vetec. As soluções foram armazenadas a 4 °C e ao abrigo da luz, quando necessário.

3.2 Reatores fotoquímicos

Reações radicalares podem ser geradas em reatores fotoquímicos, os quais têm sido desenvolvidos principalmente para a decomposição de amostras e o tratamento de resíduos industriais, visto que promovem a degradação da matéria orgânica [CARVALHO et. al., 2008].

Carvalho e colaboradores (2008) desenvolveram um reator fotoquímico, baseado num modelo comercial, que possibilita a irradiação simultânea de 12 amostras, as quais são mantidas à temperatura controlada por um termo-regulador durante o processo de mineralização sob circulação de ar. O sistema é provido de uma lâmpada de mercúrio de alta pressão (400 W) utilizada em iluminação pública, cujo bulbo externo foi removido para total exposição das amostras à radiação UV.

No entanto, a construção de sistemas de irradiação, com o objetivo específico de induzir a formação lenta de radicais livres para estudo da ação anti-radicalar de espécies antioxidantes, ainda não foi descrita na literatura. Os sistemas de irradiação já desenvolvidos para a destruição de matéria orgânica não podem ser utilizados para o estudo da ação anti-radicalar de espécies antioxidantes, uma vez

que empregam lâmpadas de alta potência que provocam uma alta velocidade reacional de formação do radical $\bullet\text{OH}$, além de degradar o antioxidante em pouco segundos por fotólise direta e por reações secundárias.

Portanto, neste trabalho foram construídos dois sistemas de irradiação, denominados reatores fotoquímicos, diferenciados pela fonte de radiação empregada: lâmpadas comerciais de mercúrio e de tungstênio.

Os sistemas consistem dos seguintes componentes básicos: uma fonte de radiação; um sistema de resfriamento por circulação forçada de ar; um termômetro para controle de temperatura; um suporte para tubos de quartzo e uma caixa de madeira forrada com papel alumínio. A Figura 17 ilustra a composição dos dois sistemas de irradiação construídos em laboratório, onde se emprega fonte de irradiação de mercúrio (A) e de tungstênio (B).

No reator fotoquímico (A), uma lâmpada de mercúrio de alta pressão com potência nominal de 80 W foi empregada como fonte de radiação (a) (marca GE). A lâmpada com o bulbo exposto foi afixada na parte central do sistema onde está posicionado o soquete da lâmpada. A caixa de madeira forrada com papel alumínio (b) que envolve o sistema é na forma de cubo e apresenta 21,5 cm de aresta. O sistema de resfriamento é constituído de um cooler (c) (marca Ruilian Science Technology), igual à ventiladores usados em computadores, posicionado na parte superior do sistema, o qual é acionado, durante todo o funcionamento da lâmpada. A temperatura máxima de operação do sistema foi de 25 °C com variação de ± 1 °C, sendo que, o estudo foi realizado após estabilização do sistema. O suporte para 12 tubos de quartzo (d) foi construído e moldado em madeira, com dimensões precisas, de modo que os tubos permaneçam dentro do sistema circundando o bulbo da lâmpada.

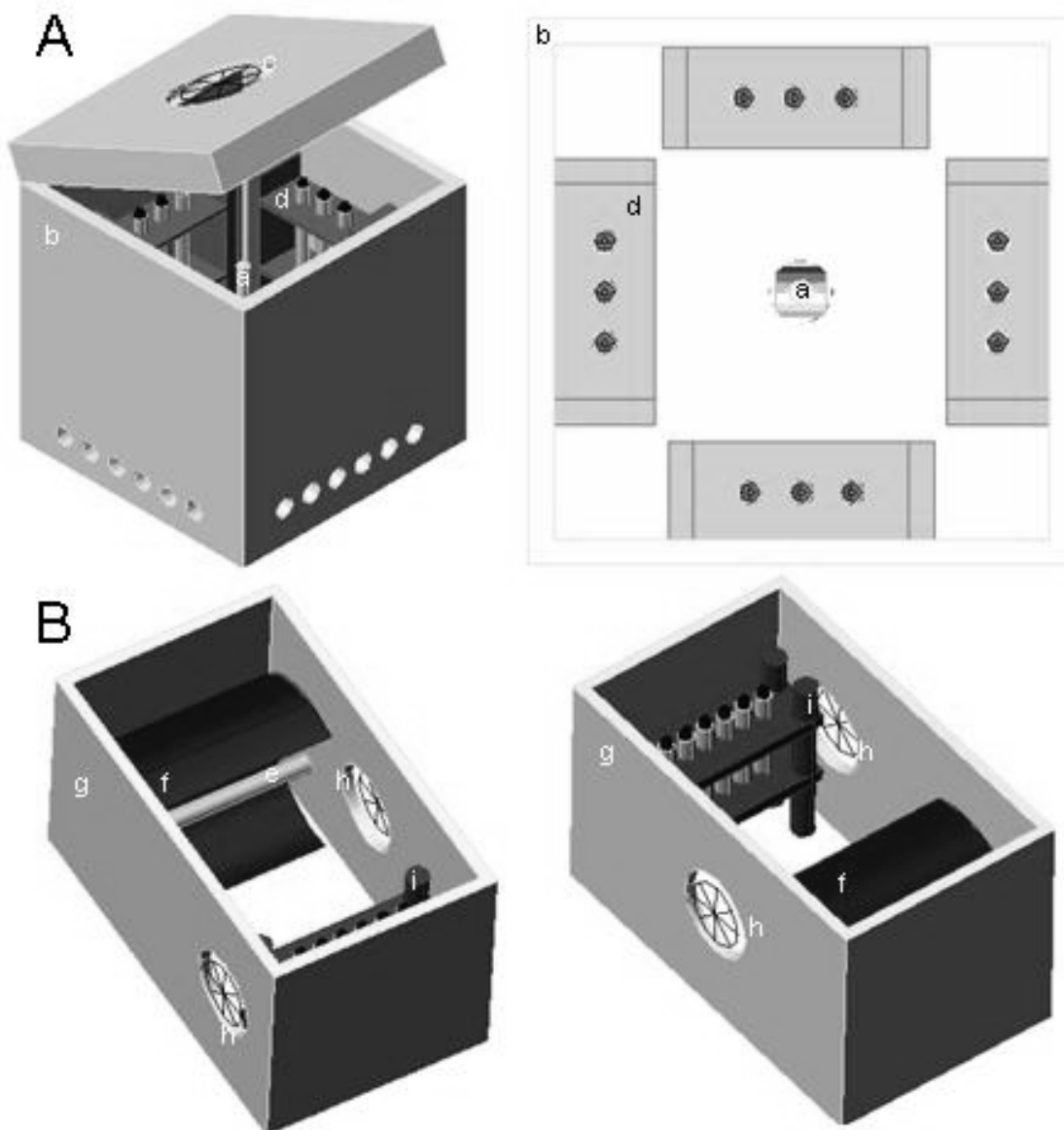


Figura 17 – Representação esquemática dos sistemas de irradiação UV desenvolvidos: (A) reator com fonte de radiação lâmpada de Hg; (a) lâmpada de Hg (80 W); (b) caixa de madeira revestida com papel alumínio; (c) *cooler*; (d) suporte para os tubos de quartzo; (e) tubos de quartzo; (B) reator com fonte de irradiação lâmpada de W; (f) lâmpada de W (150 W); (g) projetor; (h) caixa de madeira revestida com papel alumínio; (i) *cooler*; (j) suporte para os tubos de quartzo.

Já no reator fotoquímico (B), uma lâmpada de tungstênio com potência nominal de 150 W foi empregada como fonte de irradiação (f) (marca Xelux). A lâmpada foi afixada em um refletor retangular (marca Xelux) (g), onde está posicionado o soquete da lâmpada, e este posicionado na parte lateral o sistema. A caixa de madeira forrada com papel alumínio (h) que envolve o sistema é na forma retangular e apresenta 35 cm de comprimento e 18,6 cm de largura e altura. O sistema de resfriamento foi constituído de dois coolers (i) posicionados um em cada

lado do reator, e são acionados automaticamente, durante todo o funcionamento da lâmpada. A temperatura máxima de operação do sistema foi de 60 °C com variação de ± 5 °C, sendo que, o estudo foi realizado após estabilização do sistema. O suporte para 6 tubos de quartzo (j) foi construído e moldado em madeira, com dimensões precisas, de modo que os tubos permaneçam dentro do sistema a uma distância de 25 cm da lâmpada contida no refletor.

Os tubos de quartzo (e), utilizados nos dois reatores fotoquímicos, foram obtidos comercialmente (Metrohm) e possuem dimensões de 12,5 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro interno, com capacidade máxima para 10 mL de amostra. Os dois sistemas operam em 220V.

3.3 Ensaios por Espectrofotometria UV-VIS

Os espectros de absorção molecular no UV-VIS foram obtidos entre 200 e 380 nm, no comprimento de onda com máxima absorvidade molar de cada flavonóide. As medidas foram realizadas em um espectrofotômetro com arranjo de diodos HP 8453 (Hewlett Packard), utilizando uma célula de quartzo de 10 mm de espessura do caminho óptico.

3.4 Ensaios por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

As medidas por HPLC foram realizadas, nos comprimentos de onda específicos de cada composto estudado, entre 200 e 380 nm, em um cromatógrafo P680 (Dionex) acoplado à detector UV-Vis UVD-170 (Dionex), com coluna de separação C₁₈ de dimensões 4,6 mm x 150 mm x 5 μ m (Dionex). Como fase móvel foi utilizada acetonitrila 30 % (v/v) (Tedia) grau HPLC em água destilada e deionizada com pH ajustado em 4,00 com uma solução de ácido fosfórico 10% (Vetec), e fluxo de 0,5 mL.min⁻¹.

3.5 Fotodecomposição do H_2O_2 e geração do radical HO^\bullet

Para quantificação da fotodegradação do H_2O_2 e geração do radical HO^\bullet , foi construída uma curva de calibração, em que a concentração de H_2O_2 , durante o processo de fotólise direta, foi calculada pela equação da reta, obtida através do gráfico da curva de calibração.

Para construção da curva de calibração, preparou-se por diluição do reagente peróxido de hidrogênio em solvente hidroetanólico 50 % (v/v) soluções de concentrações 0,11; 0,21; 0,29; 0,37; 0,46 $mmol.L^{-1}$. A quantificação foi feita em triplicata e a análise espectrofotométrica foi realizada nos comprimentos de onda 220, 230 e 240 nm.

O procedimento de fotólise direta empregado para quantificação da fotodecomposição do H_2O_2 decorreu da mesma forma que os ensaios realizados para a determinação da atividade anti-radicalar dos flavonóides em estudo frente ao radical HO^\bullet .

3.6 Atividade anti-radicalar frente ao radical HO^\bullet

O estudo cinético da atividade anti-radicalar dos compostos polifenólicos canferol, fisetina, quercetina, quercitrina, miricetina e rutina, baseou-se na análise temporal por espectrofotometria UV-Vis e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) da reação entre alguns compostos antioxidantes e o radical HO^\bullet .

Os primeiros ensaios foram realizados por espectrofotometria UV-Vis somente com uma solução de cada antioxidante para a investigação da influência da ação da fotólise direta sobre os compostos polifenólicos. Da mesma forma, foi investigada a fotodecomposição do H_2O_2 , bem como, a ação do peróxido de hidrogênio frente à solução de cada antioxidante, sem a incidência de irradiação UV.

Para o estudo da atividade anti-radicalar frente ao radical HO^\bullet , foi empregada a geração fotoquímica do radical HO^\bullet na presença de H_2O_2 nos reatores fotoquímico

desenvolvidos. Os ensaios foram realizados por espectrofotometria UV-Vis com adição de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (0,29 a 2,90 mmol.L⁻¹) em uma solução padrão de cada antioxidante, para investigar a influência da concentração inicial de peróxido de hidrogênio sobre o decaimento do sinal dos compostos polifenólicos, totalizando 7 ensaios para cada antioxidante polifenólico.

Por fim, foram realizados dois ensaios para determinação da constante cinética dos compostos polifenólicos frente ao radical HO[•]. No primeiro, a análise foi espectrofotométrica e, no segundo, cromatográfica. Nestes experimentos, foi adicionado 0,29 mmol.L⁻¹ de peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações de cada flavonóide (25, 50 e 75 μM).

As constantes cinéticas de primeira ordem dos flavonóides frente à radiação UV e frente ao radical HO[•], gerado pela fotodecomposição do peróxido de hidrogênio, foram calculadas conforme equação da Figura 18:

$$\ln\left(\frac{[A]}{[A_0]}\right) = -kt$$

Figura 18 – Lei de velocidade de uma reação de primeira ordem.

Onde, k é a constante cinética de primeira ordem. No instante inicial a espécie antioxidante apresenta uma absorvância $[A_0]$, e num instante t qualquer, após fotólise, a absorvância é $[A]$. Ao plotar um gráfico de $\ln([A]/[A_0])$ em função do tempo (min), no caso de uma reação de primeira ordem, como a dos compostos polifenólicos em estudo com radical HO[•], o coeficiente angular da reta é o k .

Para determinação da constante cinética aparente dos compostos polifenólicos frente ao radical HO[•], a contribuição da fotólise direta das espécies antioxidantes foi descontada da constante cinética radicalar (Figura 19).

$$k_{OH+h\nu} - k_{h\nu} = k_{OH}$$

Figura 19 – Determinação da constante cinética aparente dos flavonóides frente ao radical HO[•].

Após determinação da constante cinética aparente dos compostos polifenólicos frente ao radical HO[•] é possível calcular o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), para a reação de primeira ordem para cada flavonóide na atividade anti-radicalar frente ao HO[•] (Figura 20).

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{OH}}$$

Figura 20 – Determinação do tempo de meia-vida de uma reação de primeira ordem.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaios de fotólise direta nos reatores fotoquímicos desenvolvidos

Sabe-se que o peróxido de hidrogênio, quando exposto a radiação ultravioleta, se decompõe em radical HO[•] [HALLIWELL; CLEMENTB; LONG, 2000], de acordo com a seguinte reação (Figura 21):

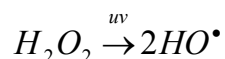


Figura 21 – Reação de fotodecomposição do H₂O₂ [HALLIWELL; CLEMENTB; LONG, 2000].

Como a concentração gerada de radical HO[•] varia no tempo, um primeiro estudo envolveu o acompanhamento desta reação na presença de H₂O₂ nos reatores construídos em laboratório. A determinação da concentração de radical HO[•] formada numa janela de tempo de 1 hora foi baseada na determinação de H₂O₂ remanescente no meio, após um determinado tempo de irradiação UV. Pelo monitoramento do decréscimo da concentração de H₂O₂ e de acordo com a reação acima, pode-se calcular a concentração de radical HO[•] formada durante os experimentos cinéticos subseqüentes.

4.1.1 Fotodecomposição do H₂O₂

A curva de calibração para quantificação da fotodecomposição do H₂O₂ (Figura 22) por determinação espectrofotométrica no UV apresentou linearidade, com coeficiente de correlação superior a 0,99.

Os ensaios de fotodecomposição do H_2O_2 demonstraram que o reator fotoquímico (A) com fonte radiação de Hg (80 W) é mais eficiente na geração de radical HO^\bullet que o reator fotoquímico (B) com fonte de radiação W (150 W), conforme Figura 23.

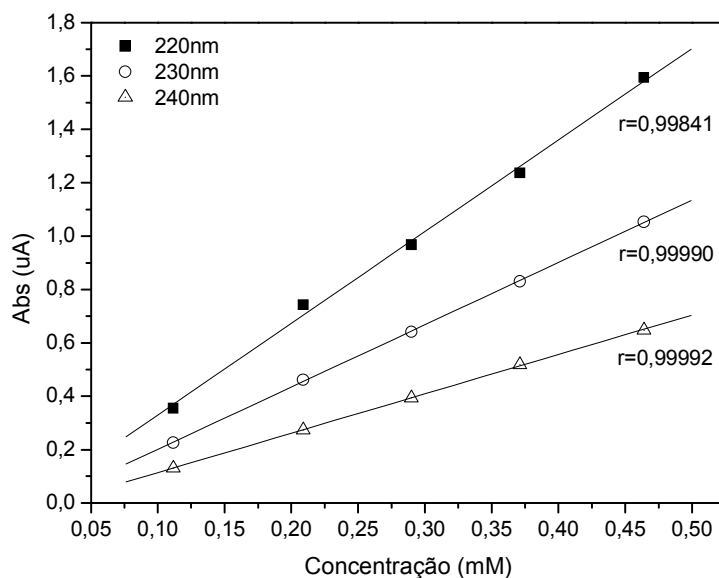


Figura 22 – Curva de calibração do peróxido de hidrogênio, utilizada para quantificação da fotodecomposição do H_2O_2 .

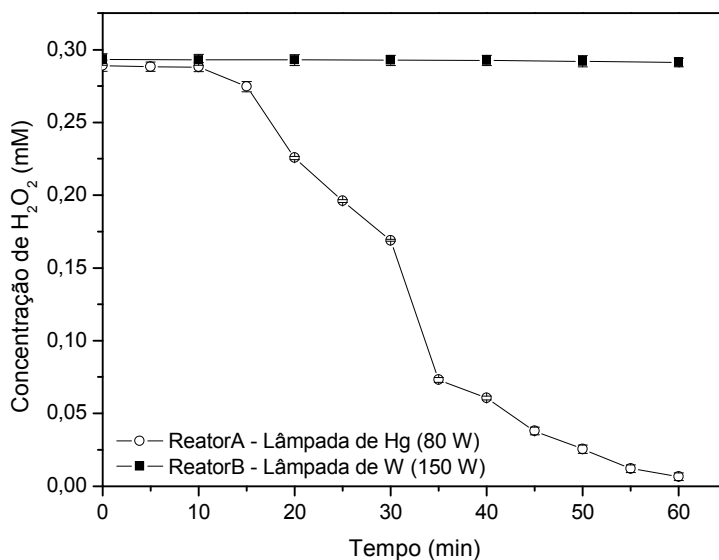


Figura 23 – Quantificação da fotodecomposição do H_2O_2 frente à fotólise nos reatores fotoquímicos desenvolvidos com fonte radiação de W (150 W) e de Hg (80 W); $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{inicial}} = 0,29 \text{ mmol L}^{-1}$.

No reator fotoquímico (A), a fotodecomposição do H_2O_2 inicia-se após 10 minutos de irradiação, sendo que em 30 minutos de irradiação a concentração de H_2O_2 reduz a, aproximadamente, 50% em relação à concentração inicial. E a fotodecomposição completa do H_2O_2 se dá com, aproximadamente, 60 minutos de irradiação. Neste reator, a geração de radical HO^\bullet é gradual, ou seja, aumenta com o tempo de irradiação. Já no reator fotoquímico (B) com fonte de radiação de W (150 W), não é observada a fotodegradação do H_2O_2 , durante os ensaios.

Essa diferença de eficiência na geração de radical HO^\bullet a partir da fotodecomposição do H_2O_2 , entre os reatores fotoquímicos desenvolvidos, pode ser explicada pelos espectros de emissão de lâmpadas de tungstênio e de mercúrio, uma vez que a lâmpada de Hg apresenta linhas espectrais de emissão de alta intensidade que coincidem com os comprimentos de onda de máxima absorção do H_2O_2 (190 a 225 nm). Já a lâmpada de W apresenta uma banda espectral de emissão que difere do comprimento de onda de máxima absorção do H_2O_2 .

A Figura 24 mostra o aumento da concentração de radical HO^\bullet , calculada a partir da concentração de H_2O_2 disponível, no reator de Hg com o aumento do tempo de irradiação da solução de H_2O_2 $0,29 \text{ mmol.L}^{-1}$.

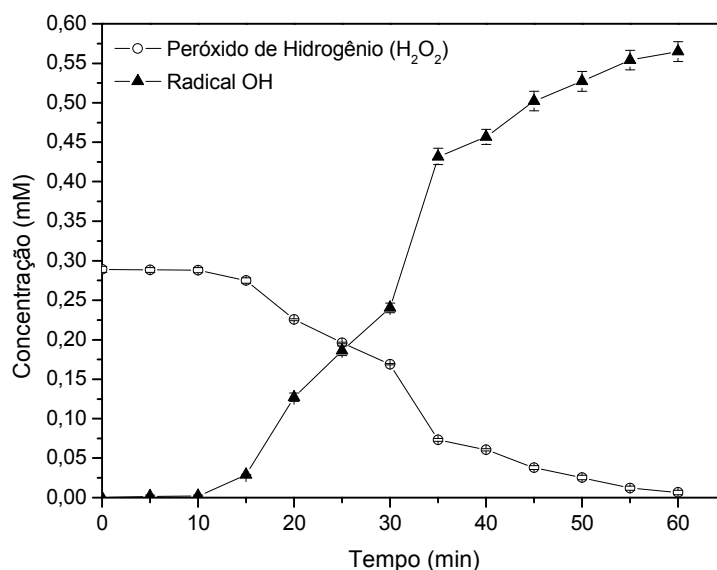


Figura 24 – Quantificação da geração do radical HO^\bullet e fotodecomposição do H_2O_2 frente à fotólise no reator fotoquímico com fonte radiação de Hg (80 W); $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{inicial}} = 0,29 \text{ mmol.L}^{-1}$.

Como a concentração de radical HO^\bullet varia no tempo, os estudos cinéticos que serão apresentados a seguir tratam do cálculo de **constantes cinéticas aparentes** (k_{OH}). Como todas as outras variáveis do sistema são mantidas constantes (temperatura, pressão, geometria do reator, etc.), os ensaios propostos permitem a comparação das espécies antioxidantes quando reagindo com o radical HO^\bullet . A variação da concentração do radical HO^\bullet passa, portanto, a ser considerada também uma constante.

4.1.2 Fotoestabilidade dos flavonóides

A radiação UV, por convenção, é dividida em três faixas de comprimento de onda, designadas de UVA (400 a 320 nm), UVB (320 a 290 nm) e UVC (290 a 100 nm), sendo que a radiação UVB é apenas parcialmente absorvida pelo ozônio, chegando, portanto, com mais incidência na Terra do que as outras.

Segundo Harborne & Williams (2000), HAVSTEEN (2002) e YAO et al. (2004), os flavonóides, geralmente, absorvem na região de 280 – 315 nm e, portanto, são capazes de agir como filtros UV, protegendo assim os tecidos subjacentes de danos fotossintéticos.

Os ensaios realizados para investigação da fotodegradação por ação da fotólise direta, ou seja, sem adição de H_2O_2 como precursor radicalar sobre os flavonóides, demonstraram que as espécies antioxidantes são relativamente fotoestáveis nas condições empregadas, nos dois reatores desenvolvidos (Figuras 25 e 26). Isto corrobora com o mencionado na literatura [HARBORNE & WILLIAMS, 2000; HAVSTEEN, 2002; e YAO et al., 2004].

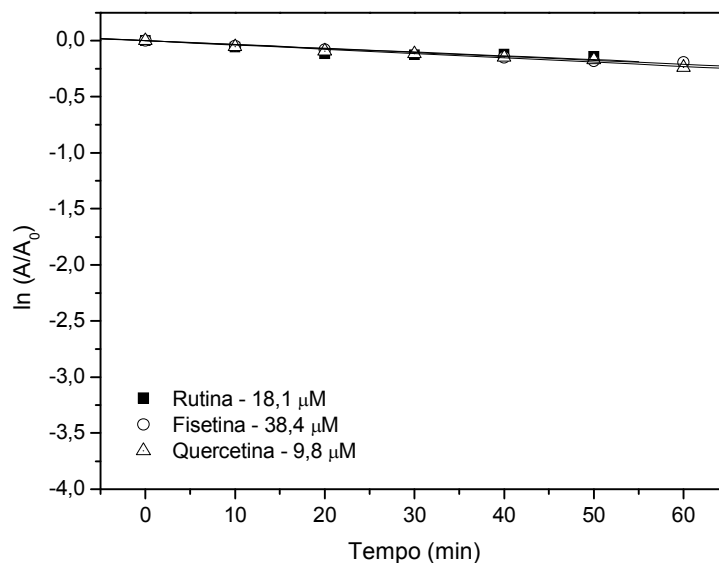


Figura 25 – Estudo do decaimento do sinal dos flavonóides fisetina, quercetina e rutina frente à fotólise direta no reator fotoquímico (A) com fonte radiação de Hg (80 W).

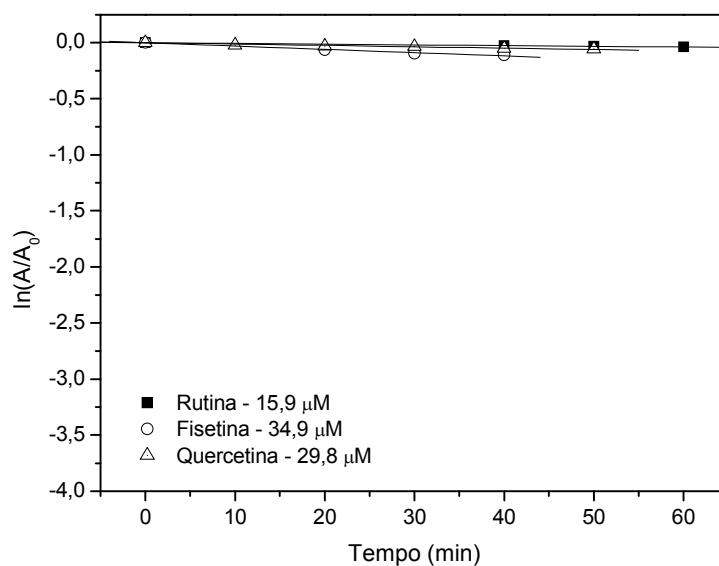


Figura 26 – Estudo do decaimento do sinal dos flavonóides fisetina, quercetina e rutina frente à fotólise direta no reator fotoquímico (B) com fonte radiação de W (150 W).

No estudo da interação direta dos flavonóides com o H_2O_2 sem incidência da radiação de Hg e W, não foi observado o decaimento de absorvância para os

flavonóides em estudo, uma vez que sem a influência da radiação não ocorre a fotodecomposição do H_2O_2 para a formação do radical HO^\bullet .

Os estudos demonstrados até aqui indicam a aplicabilidade do método cinético proposto, o qual se baseia na geração fotoquímica do radical HO^\bullet e na fotoestabilidade dos antioxidantes irradiados nos reatores com lâmpadas de W e Hg.

4.2 Cinética anti-radicalar dos flavonóides

Após os estudos sistemáticos da geração do radical HO^\bullet nos reatores fotoquímicos, o trabalho seguiu para o estudo cinético da reação dos flavonóides de interesse frente o radical HO^\bullet gerado. Aqui, investigou-se num primeiro momento a influência da variação da concentração do próprio H_2O_2 inicializador da reação no decaimento do sinal dos antioxidantes. Logo após estabelecida a concentração de H_2O_2 a ser utilizada nos tubos reacionais dispostos no reator, investigou-se o decaimento cinético dos antioxidantes frente a uma concentração de H_2O_2 e, conseqüentemente, de radical HO^\bullet ao longo do tempo de experimento no reator. Aqui, chega-se por fim ao cálculo da constante cinética de reação e, portanto, ao estudo comparativo da ação anti-radicalar dos compostos polifenólicos frente ao radical HO^\bullet .

4.2.1 Perfil cinético reacional do radical HO^\bullet frente aos flavonóides

Os ensaios com adições de diferentes concentrações de H_2O_2 na faixa de 0,29 a 2,90 mmol.L^{-1} demonstraram que a concentração de H_2O_2 não altera o decaimento observado para os flavonóides durante 1 hora de irradiação. Os pequenos desvios observados nos decaimentos das Figuras 27 e 28 comprovam este efeito. Tal resultado pode ser explicado pelo fato de que a potência da lâmpada é o limitante na geração de radical HO^\bullet . Ou seja, a baixa radiação emitida pelas

lâmpadas de Hg (80 W) e W (150 W) não fotolisa todo o H_2O_2 adicionado ao meio em excesso.

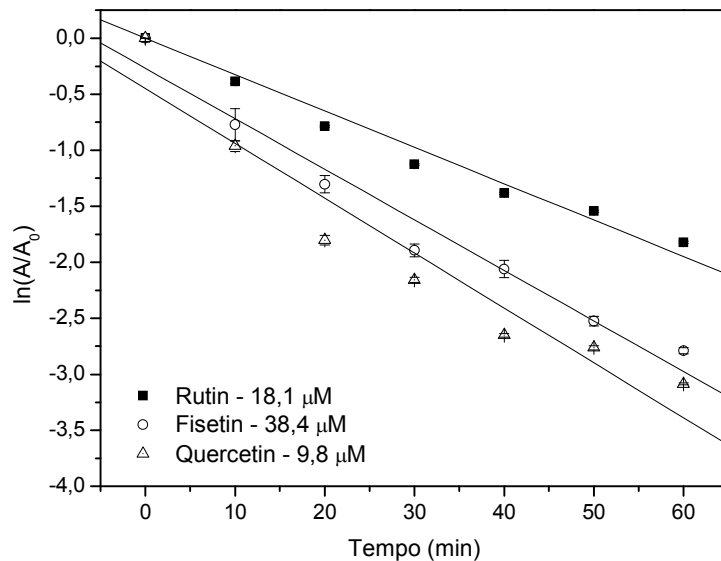


Figura 27 – Estudo do decaimento do sinal dos flavonóides fisetina, quercetina e rutina frente a fotólise na presença de H_2O_2 no reator fotoquímico (A) com fonte radiação de Hg (80 W); $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0,29$ a $2,90 \text{ mmol L}^{-1}$.

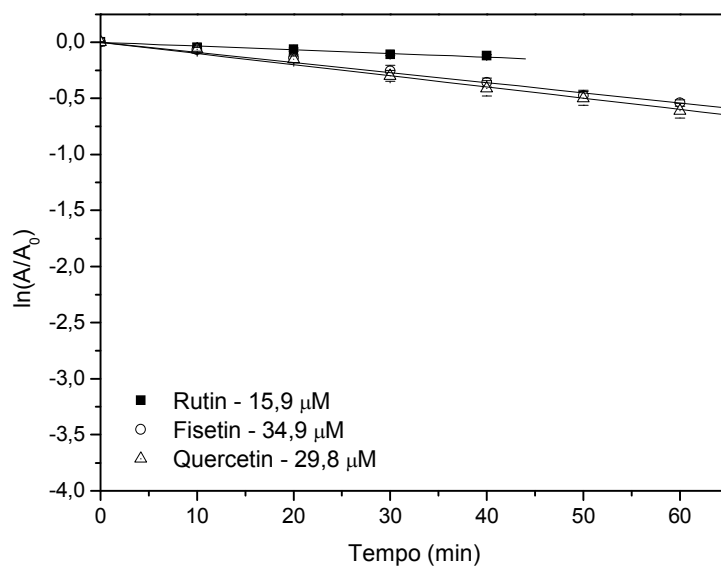


Figura 28 – Estudo do decaimento do sinal dos flavonóides fisetina, quercetina e rutina frente a fotólise na presença de H_2O_2 . Reator fotoquímico (B) com fonte radiação de W (150 W); $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0,29$ a $2,90 \text{ mmol L}^{-1}$.

Como pode ser observado na Figura 27, no reator fotoquímico (A) com a fonte de radiação lâmpada de Hg o decaimento do sinal de absorvância foi mais acentuado do que no reator com fonte de radiação lâmpada de W (Figura 28). Isto pode ser explicado pelo fato de que a lâmpada de Hg apresenta uma eficiência maior na fotodecomposição do H_2O_2 do que a lâmpada de W, como discutido anteriormente no item 4.1.1.

Com isso, a concentração de H_2O_2 adicionada foi fixada em $0,29 \text{ mmol.L}^{-1}$, já que o decaimento das espécies antioxidantes independe da concentração de H_2O_2 adicionada (Figura 27 e 28) nos reatores fotoquímicos.

4.2.2 Perfil cinético reacional dos flavonóides frente ao radical HO^\bullet

As constantes cinéticas dos compostos polifenólicos foram determinadas por espectrofotometria e HPLC. Em ambas as determinações, a ordem de decaimento dos flavonóides foi mantida, e os decaimentos cinéticos dos antioxidantes foram lineares quando plotados $\ln([A]/[A_0])$ em função do tempo (Figura 29 e 30), caracterizando, assim, a reação dos flavonóides frente ao radical HO^\bullet como uma reação de primeira ordem [ATKINS, 1999].

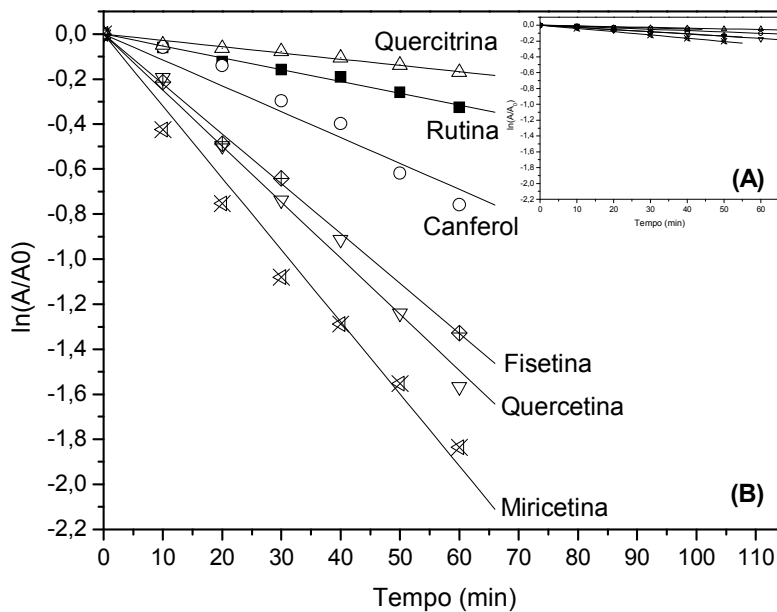


Figura 29 – Decaimento cinético dos flavonóides quercitrina, rutina, canferol, fisetina, quercetina e miricetina frente à fotólise na presença de H_2O_2 , no reator com fonte de radiação lâmpada de Hg (80 W); análise por espectrofotometria UV-Vis; $[H_2O_2] = 0,29 \text{ mmol.L}^{-1}$; $[\text{flavonóides}] = 50 \mu\text{mol.L}^{-1}$. (A) fotólise direta e (B) fotólise na presença de H_2O_2 .

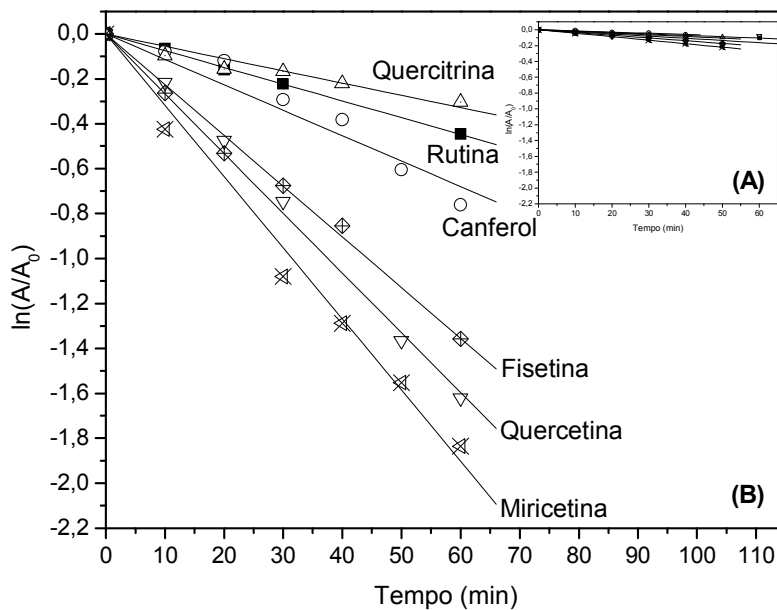


Figura 30 – Decaimento cinético dos compostos polifenólicos rutina, quercitrina, canferol, fisetina, quercetina e miricetina frente à fotólise na presença de H_2O_2 , no reator com fonte de radiação lâmpada de Hg (80 W); análise por HPLC; $[H_2O_2] = 0,29 \text{ mmol.L}^{-1}$; $[\text{flavonóides}] = 50 \mu\text{mol.L}^{-1}$. (A) fotólise direta e (B) fotólise na presença de H_2O_2 .

Na Figura 31 e 32 são apresentados, respectivamente, os espectrofotogramas e os cromatogramas dos decaimentos de absorvância da reação anti-radicalar dos flavonóides frente ao radical HO[•] com o passar do tempo.

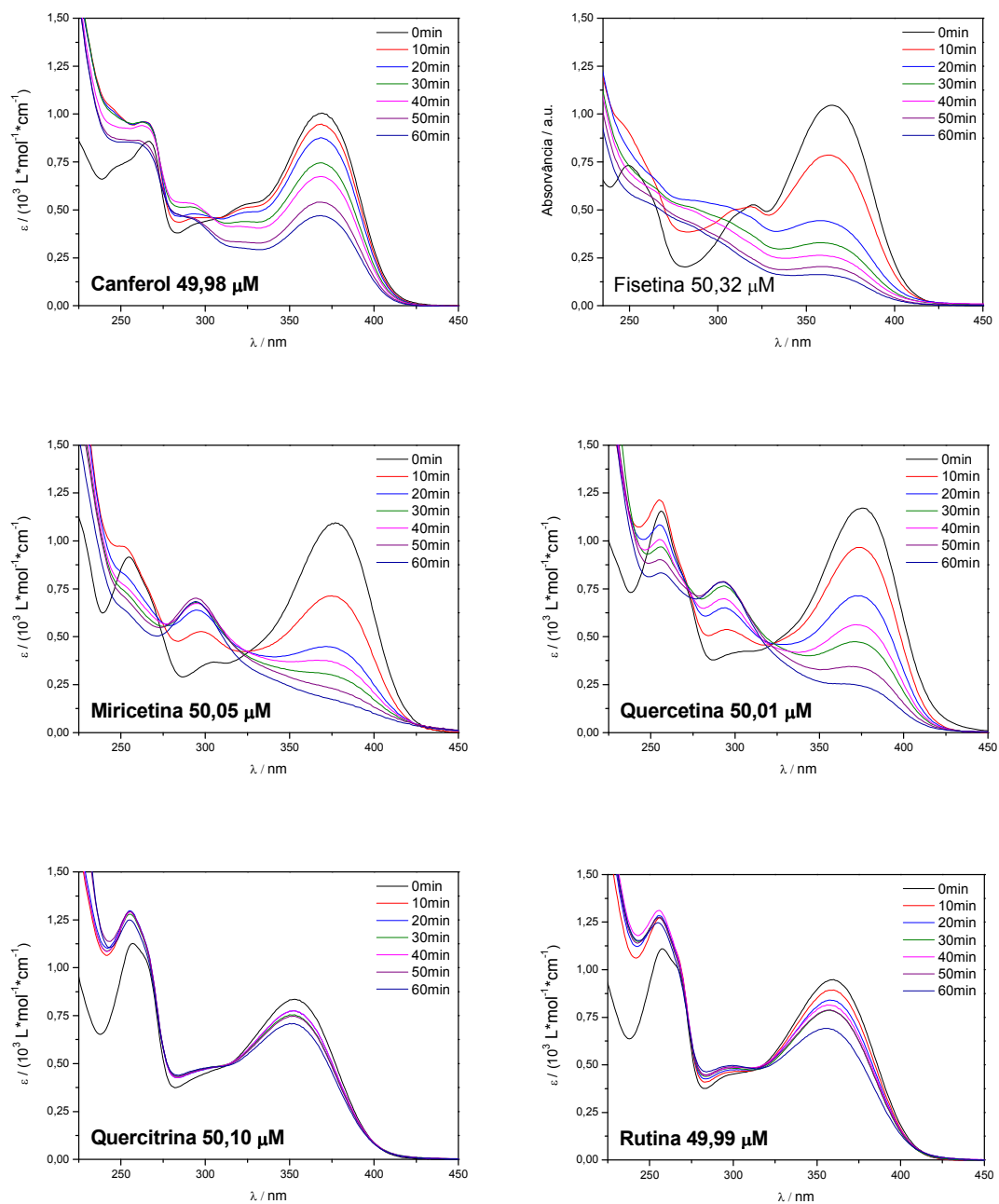


Figura 31 – Decaimento espectrofotométrico da reação anti-radicalar dos antioxidantes em estudo frente aos radicais HO[•].

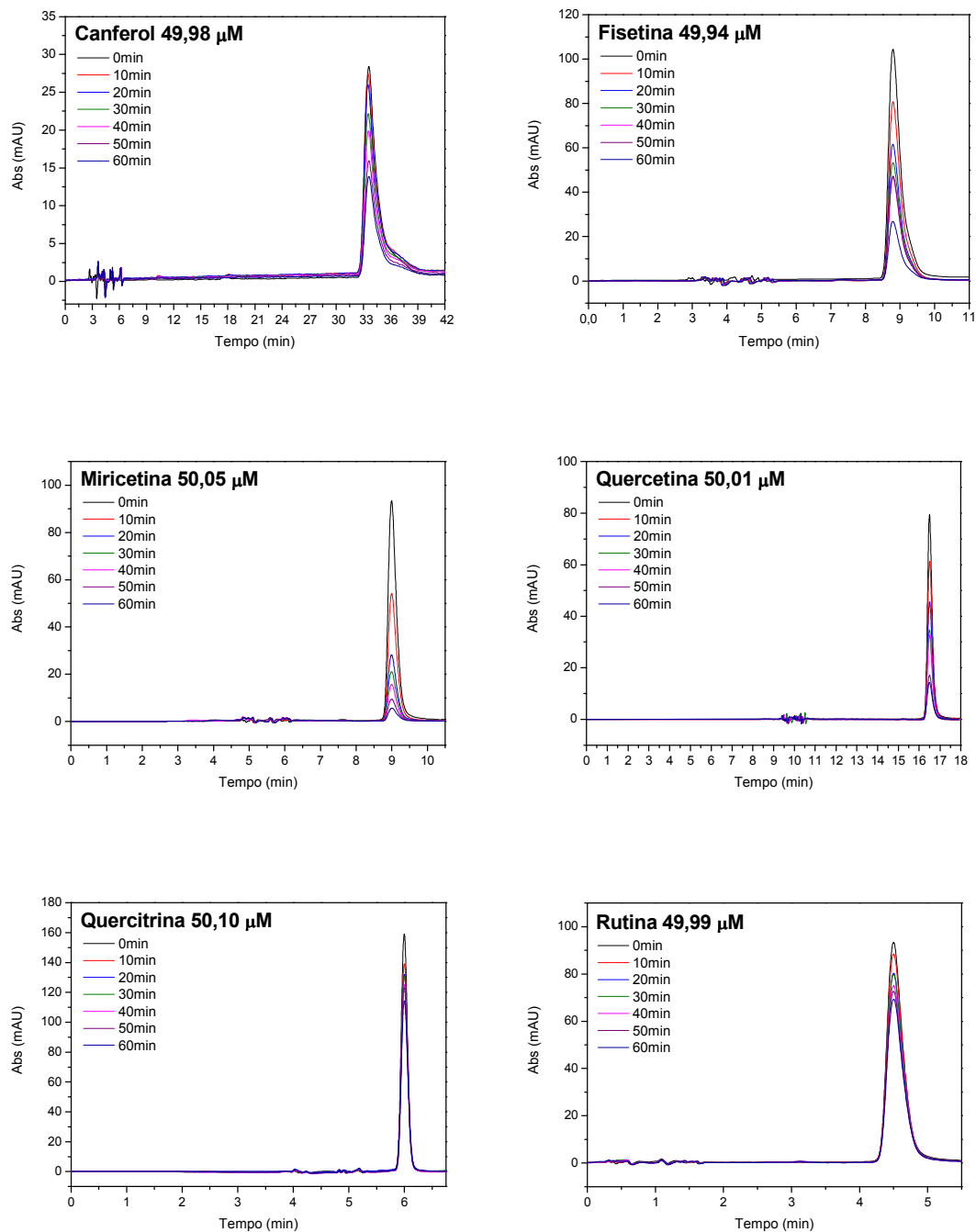


Figura 32 – Decaimento cromatográfico dos compostos polifenólicos estudados frente à fotólise na presença de H_2O_2 ; $[H_2O_2] = 0,29 \text{ mmol L}^{-1}$. Condições de análise: fase estacionária C18 Dionex (4,6 mm x 150 mm x 5 μm), fase móvel acetonitrila 30 % (v/v), pH 4,00, com fluxo de $0,5 \text{ ml min}^{-1}$, injeção de 20 μL e pressão variável.

4.2.2.1 Determinação das constantes cinéticas reacionais por Espectrofotometria UV-Vis e por Cromatográfica Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Nas determinações tanto espectrofotométricas quanto cromatográficas, a ordem de atividade anti-radicalar dos flavonóides foi a mesma, em que o mais eficiente no combate ao radical HO[•] foi a quercitrina, seguido da rutina, canferol, fisetina, quercetina e miricetina (tabela 2 e gráfico 33). No entanto, as constantes cinéticas determinadas foram um pouco diferentes. Isso se deve, principalmente, à separação cromatográfica dos possíveis produtos de decomposição (radicais ou intermediários estáveis – radicais fenoxilas) formados na reação dos compostos polifenólicos com os radicais HO[•], que na análise espectrofotométrica, não são separados e pode interferir no sinal de absorvância medida.

Tabela 2 – Constantes cinéticas dos flavonóides determinadas por espectrofotometria UV-Vis.

Flavonóides	Concentração (μM)	Espectrofotometria UV-Vis		HPLC-UV	
		k_{OH} (min^{-1})	$t_{1/2\text{OH}}$ (min)	k_{OH} (min^{-1})	$t_{1/2\text{OH}}$ (min)
Quercitrina	25,05	$3,13 \times 10^{-3}$	221,45	$4,65 \times 10^{-3}$	149,06
	50,10	$2,07 \times 10^{-3}$	334,85	$2,72 \times 10^{-3}$	254,83
	75,15	$0,98 \times 10^{-3}$	707,29	$1,43 \times 10^{-3}$	484,72
Rutina	24,97	$7,14 \times 10^{-3}$	97,08	$13,80 \times 10^{-3}$	50,23
	49,99	$4,11 \times 10^{-3}$	168,65	$5,81 \times 10^{-3}$	119,30
	70,93	$1,02 \times 10^{-3}$	679,56	$2,67 \times 10^{-3}$	259,61
Canferol	24,99	$11,58 \times 10^{-3}$	59,86	$16,77 \times 10^{-3}$	41,33
	49,98	$8,55 \times 10^{-3}$	81,07	$11,28 \times 10^{-3}$	61,45
	74,97	$8,08 \times 10^{-3}$	85,79	$5,96 \times 10^{-3}$	116,30
Fisetina	25,00	$31,04 \times 10^{-3}$	22,33	$39,78 \times 10^{-3}$	17,42
	49,94	$19,06 \times 10^{-3}$	36,37	$18,56 \times 10^{-3}$	37,35
	75,04	$10,46 \times 10^{-3}$	66,27	$12,77 \times 10^{-3}$	54,28
Quercetina	25,00	$40,88 \times 10^{-3}$	16,96	$54,94 \times 10^{-3}$	12,62
	50,01	$21,63 \times 10^{-3}$	32,05	$24,09 \times 10^{-3}$	28,77
	75,06	$9,930 \times 10^{-3}$	69,80	$10,97 \times 10^{-3}$	63,19
Miricetina	25,03	$48,86 \times 10^{-3}$	14,19	$102,04 \times 10^{-3}$	6,79
	50,05	$23,64 \times 10^{-3}$	29,32	$41,00 \times 10^{-3}$	16,91
	75,03	$9,120 \times 10^{-3}$	76,00	$16,76 \times 10^{-3}$	41,36

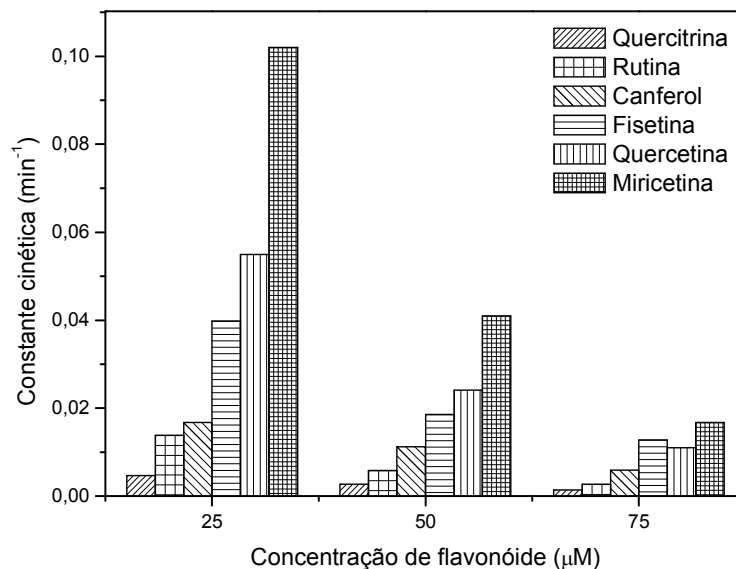


Figura 33 – Constante cinética em função da concentração de flavonóide em estudo frente à fotólise na presença de H_2O_2 , determinada por HPLC-UV.

As determinações foram desenvolvidas em 25, 50 e 75 μM para cada flavonóide com adição de $0,29 \text{ mmol.L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio. Como as constantes cinéticas anti-radicalares dos compostos polifenólicos frente ao radical HO^\bullet são de primeira ordem, estas se mostraram lineares (Figura 34 e 35) quando foi plotada a concentração de flavonóide em função da constante cinética determinada neste estudo.

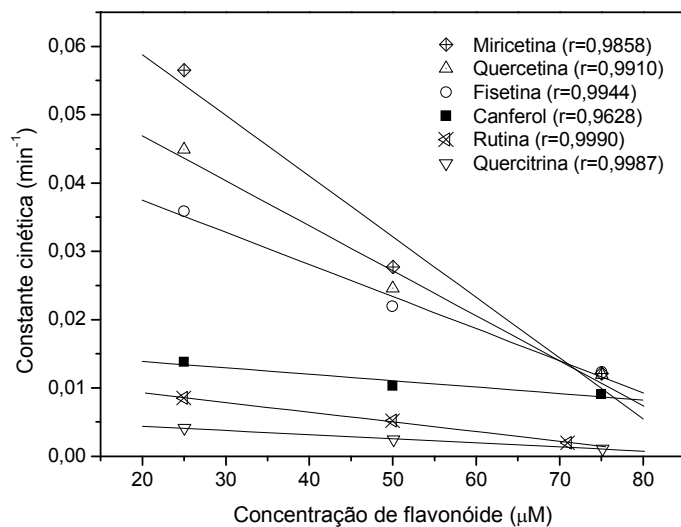


Figura 34 – Constante cinética em função da concentração de flavonóide, determinada por espectrofotometria UV-Vis dos flavonóides em estudo frente à fotólise em presença de H_2O_2 .

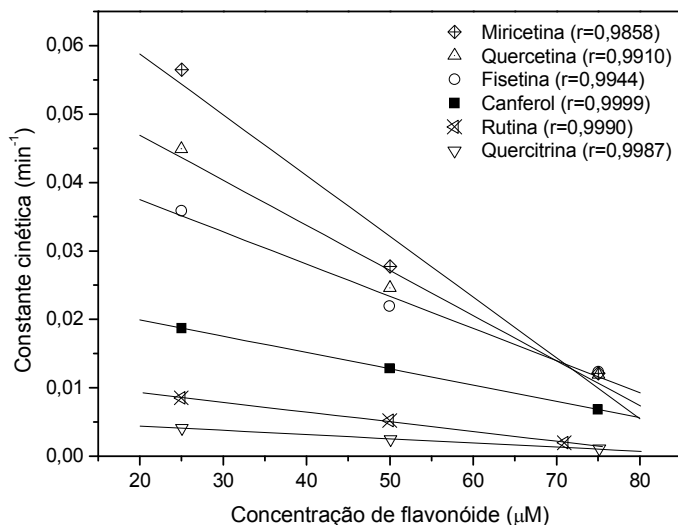


Figura 35 – Constante cinética *versus* concentração de flavonóide, determinada por HPLC-UV dos flavonóides em estudo frente à fotólise em presença de H₂O₂.

A maior ação anti-radicalar da quercitrina deve-se à reação lenta (menor constante cinética) deste flavonóide frente à mesma concentração do radical HO[•] e tempo de irradiação, em comparação aos outros.

A velocidade de uma reação quantifica a rapidez com que esta ocorre. Por isso, uma maior ação anti-radicalar está relacionada a uma reação mais lenta com o radical OH, já que o antioxidante permanece mais tempo no meio.

Estudos apontam que, além das ações já mencionadas neste trabalho, os antioxidantes têm um papel fundamental no mecanismo de reparo de danos causados por EROs. Se os mecanismos antioxidantes não conseguem impedir os danos ao DNA, ocorrem injúrias oxidativas, que incluem a modificação de bases, de açúcares e a formação de ligações cruzadas entre fitas duplas e simples [RIBEIRO et. al., 2005], com isso a maior permanência do antioxidante no meio possibilita um alcance maior de sua ação.

Estudos mostram que a ação dos flavonóides frente a radicais livres se dá pela rápida doação de um átomo de hidrogênio dos compostos polifenólicos aos radicais livres, e depende, principalmente, da possibilidade de estabilização dos radicais fenoxilas formados via ligação com hidrogênio e/ou do deslocamento expandido de elétrons, e da estabilização dos radicais fenoxilas formados, quando os compostos polifenólicos apresentam grupos hidroxilas nas posições 3' e 4' do anel B e/ou na posição 7 e 8 do anel A [JOVANOVIC et al., 1994; PANNALA et al.,

2001; BURDA & OLESZEK, 2001; TAGLIAFERRO & BOBILYA, 2002; HAVSTEEN, 2002; AMIC et al. 2003; DENISOV, 2005; SEYOUM et al., 2006].

Os flavonóides hidroxilados estudados se diferem pela localização dos grupos HO[•]. Destes, o canferol foi o mais eficiente no seqüestro dos radicais HO[•]. Isto, provavelmente, se deve à presença de apenas um grupo HO[•] nas posições 4' (anel B). De acordo com a literatura, flavonóides que têm apenas um HO[•] no anel A ou B são mais antioxidantes [JOVANOVIC et al., 1994; AMIC et al. 2003; DENISOV, 2005].

O fato de apresentar somente um grupo hidroxila, também, é observado para a fisetina que possui um grupo HO[•] na posição 7 (anel A). Este resultado corrobora com publicações que afirmam a diminuição da atividade antioxidante em flavonóides que apresentam grupos hidroxila nas posições 5 e/ou 6 do anel [PIETTA, 2000; PANNALA et al., 2001]

Além disso, quando comparamos o caso do canferol com o da fisetina, podemos deduzir que a presença única de um grupo HO[•] no anel B, é mais importante, do ponto de vista anti-radicalar, que no anel A, nas condições testadas.

Diversos estudos com espectrofotometria UV-Vis têm revelado que a maioria dos flavonóides apresenta duas Bandas de absorção: Banda I (320-385 nm) que representa a absorção do anel B e a Banda II (250-285 nm) que corresponde à absorção do anel A, conforme figura 36 [JOVANOVIC, 1994; AMIC et al. 2003, YAO et al., 2004].

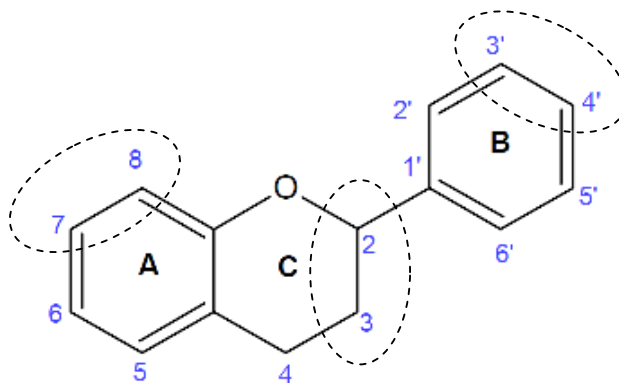


Figura 36 – Regiões estrutura com maior atividade antioxidante [AMIC et al., 2003].

Com isso, é possível afirmar que a atividade anti-radicalar dos flavonóides em estudo se deu, principalmente, no anel B, porque conforme acompanhamento espectral da reação deste com os radicais HO^\bullet , gerados pela fotodecomposição do H_2O_2 , a Banda I apresentou um decaimento de absorvância com passar do tempo, o que não foi observado na Banda II (Figura 31).

A quercetina e a miricetina, que também são flavonóides hidroxilados, possuem em sua estrutura mais de um grupo HO^\bullet nos anéis A e B. No entanto, a miricetina tem um grupo HO^\bullet na posição 5' (anel B) que a quercetina não apresenta. Quanto à eficiência anti-radicalar, a quercetina foi mais eficaz do que a miricetina. Possivelmente, o aumento de grupos HO^\bullet no anel B prejudica o seqüestro de radicais HO^\bullet .

Neste trabalho foram estudados dois flavonóides glicosilados, a quercitrina e a rutina. A única diferença entre estes flavonóides é o grupamento glicosídico, em que a quercitrina possui um ramnopiranosil e a rutina um rutinosídeo-quercetina. Com relação à capacidade anti-radicalar, a quercitrina apresentou maior eficiência do que a rutina. Este fato leva à dedução de que a rutina, em relação à quercitrina, sofre um maior impedimento estereoquímico, e por isso foi menos eficiente no combate ao radical livre. É importante destacar, no entanto, que estudos sobre a relação estrutura-atividade antioxidante de flavonóides glicosídicos são ainda bastante controversos [HOPIA & HEINONEN, 1999].

CONCLUSÕES

Os reatores desenvolvidos possibilitam o estudo da atividade anti-radicalar de espécies antioxidantes na medida em que proporcionam o acompanhamento cinético da reação entre o radical HO[•] gerado pela fotodecomposição do H₂O₂ e os compostos polifenólicos.

Este estudo mostrou que o flavonóide mais eficiente no combate ao radical HO[•], gerado pela fotodecomposição do H₂O₂, foi a quercitrina. Com base nos estudos realizados, a ordem de ação radical dos compostos polifenólicos é a seguinte:

Quercitrina > Rutina > Canferol > Fisetina > Quercetina > Miricetina

O sistema pode ser empregado para o estudo da cinética de reação dos compostos polifenólicos frente ao radical HO[•] e o cálculo das constantes de reação para cada composto. Da mesma forma, o estudo “in vitro” da interação entre radicais HO[•] e extratos de plantas com caráter antioxidante pode ser realizado pelo método proposto.

Para uma caracterização do perfil de ação de compostos polifenólicos frente a radicais livres, destaca-se a necessidade de estudos interdisciplinares comparativos realizados em sistemas químicos (não enzimáticos), sistemas bioquímicos (enzimáticos), sistemas ex-vivo (celulares) e sistemas in vivo.

Por fim, o presente trabalho sugere a correlação dos estudos realizados in vitro com estudos in vivo com as mesmas espécies antioxidantes, com o objetivo de se ter uma comparação dos dados cinéticos obtidos com resultados de outros métodos clássicos in vitro de determinação do poder antioxidante, como DPPH, ABTS, etc.

Por fim, este trabalho abre a possibilidade de obtenção de constantes de reação universais para o radical HO^\bullet frente a espécies antioxidantes, através de novos cálculos cinéticos que venham a considerar a variação da concentração de radical HO^\bullet no tempo, dados estes ainda inexistentes na literatura. Estes dados seriam de grande importância para estudos fisiológicos in vivo, bem como para estudos farmacológicos com substâncias antioxidantes (naturais e sintéticas) capazes de reagir diretamente com EROs no organismo com uma eficácia suficiente para atuarem como candidatos a fármacos com elevada ação anti-radicalar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKER, S. B. E. V. et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 20, p.331-342, 1996.

AMIC, D. et al. Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids. **Croatica Chemica Acta**, n. 76, v. 1, p. 55-61, 2003.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**. v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, n. 6, p. 2774–2779, 2001.

DENISOV, E. T. **Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology**. Boca Raton: CRC Taylor & Francis Group, 2005. 981p.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 43, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, E. C.; ROSSI, A. V. A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise. **Química Nova**. v. 25, n. 6, p.1003-1011, 2002.

FORKMANN, G.; MARTENS, S Metabolic engineering and applications of flavonoids. **Current Opinion in Biotechnology**. n. 12, p. 155-160, 2001.

HALLIWELL, B.; CLEMENTB, M. V.; LONG, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. **FEBS Letters**. n. 486, p. 10-13, 2000.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. n. 55, p. 481-504, 2000.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 96, p. 67–202, 2002.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 13, p.572-584, 2002.

HOPIA, A.; HEINONEN, M. Antioxidant Activity of Flavonol Aglycones and Their Glycosides in Methyl Linoleate. **JAOCs**, v. 76, n. 1, 1999.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 1841, n. 53, p. 1841-1856, 2005.

JOVANOVIĆ, S. V. et al. Flavonoids as antioxidants. **Journal of the American Chemical Society**. v. 116, p. 4846–4851, 1994.

LEHNINGER, L.A. **Bioquímica**. 6.ed. Edgard Blücher, 2005.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarín Journal of Science and Technology**. v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

PANNALA, A. S. et al. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 282, p.1161-1168, 2001.

PERES-JIMENEZ, J. & SAURA-CALIXTO, F. Anti-oxidant capacity of dietary polyphenols determined by ABTS assay: a kinetic expression of the results. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 43, p. 185–191, 2008.

PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**. v. 63, p. 1035–1042, 2000.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 26, n. 9/10, p. 1231–1237, 1999.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**. v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

ROBERTS, C. K.; SINDHU, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sciences**. n. 84, p. 705–712, 2009

SANCHEZ-MORENO, C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Science and Technology International**. v. 8, n.3, p. 121–137, 2002.

SEYOUM, A.; ASRES, K.; EL-FIKY, F. K. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. **Phytochemistry**. v. 67, p. 2078-2070, 2006.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação e da capacidade antioxidante. **Química Nova**. v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5ª edição, ver. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004.

VALKO et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 39, p. 44–84, 2007.

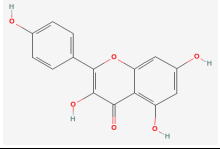
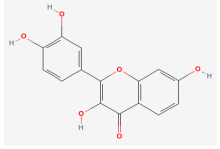
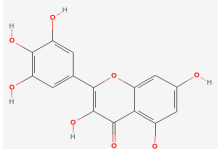
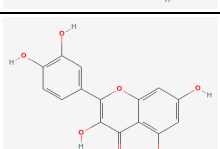
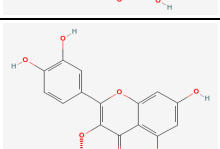
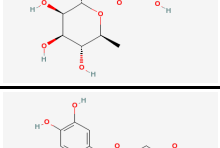
VELLOSA J. C. R.; BARBOSA, V. F.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 5, n. 2, p. 119-130, 2007.

YAO, L. H. et al. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**. v. 59, p.113-122, 2004.

ANEXOS

ANEXO A – Características químicas dos compostos polifenólicos estudados

Tabela 1 – Características químicas dos compostos polifenólicos estudados.

Compostos polifenólicos	Massa molecular (g/mol)	Fórmula química	Nomenclatura (IUPAC)	pKa	Estrutura química
Canferol	286,24	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	3,5,7-trihidroxi-2-(4-hidroxifenil)cromen-4-one	6,93 ± 0.60	
Fisetina	286,24	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	2-(3,4-dihidroxifenil)-3,7-dihidroxicromen-4-one	(*)	
Miricetina	318,24	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	3,5,7-trihidroxi-2-(3,4,5-trihidroxifenil)cromen-4-one	6,88 ± 0.60	
Quercetina	302,24	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxicromen-4-one	6,89 ± 0.60	
Quercitrina	448,38	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3-[(2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihidroxi-6-metiloxan-2-il]oxicromen-4-one	(*)	
Rutina	610,52	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-[[[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihidroxi-6-metiloxan-2-il]oximetil]oxan-2-il]oxicromen-4-one	6,83 ± 0.60	

(*) Não encontrado na literatura.

Fonte: PubChem Publi Chemical Database.

ANEXO B – Espectros de absorvidades molar dos compostos polifenólicos em estudo

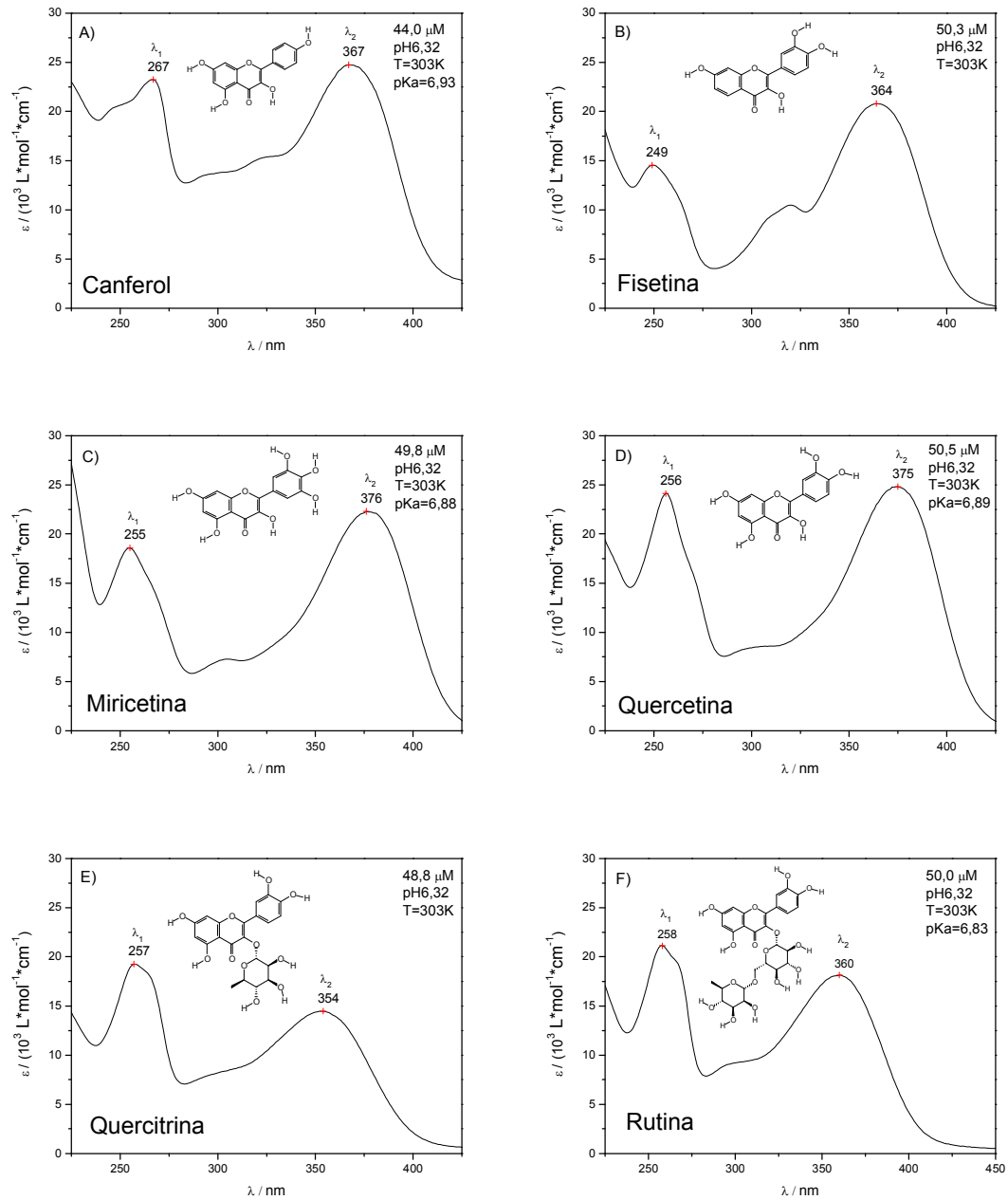


Figura 1 – Espectros de absorvidade molar dos compostos polifenólicos estudados.

**ANEXO C – Dados cinéticos dos compostos polifenólicos estudados
frente ao radical HO[•]**

Tabela 1 – Dados cinéticos do radical HO[•] frente aos compostos polifenólicos estudados determinados por espectrofotometria UV-Vis; [H₂O₂] = 0,29 a 2,90 mmol L⁻¹.

Flavonóide	Lâmpada do reator	Conc. (μM)	k _{hv} (min ⁻¹)	k _{hv+OH} (min ⁻¹)	k _{OH} (min ⁻¹)	t _{1/2hv} (min)	t _{1/2hv+OH} (min)	t _{1/2OH} (min)
Rutina	W (150 W)	15,87	0,64x10 ⁻³	3,05x10 ⁻³	2,41x10 ⁻³	1083,04	227,26	287,61
	Hg (80 W)	18,05	3,38x10 ⁻³	29,92x10 ⁻³	26,54x10 ⁻³	205,07	234,05	307,33
Fisetina	W (150 W)	34,94	2,59x10 ⁻³	9,50x10 ⁻³	6,910x10 ⁻³	267,62	72,96	100,31
	Hg (80 W)	38,43	3,51x10 ⁻³	45,12x10 ⁻³	41,61x10 ⁻³	197,48	8,66	9,55
Quercetina	W (150 W)	28,97	1,08x10 ⁻³	10,58x10 ⁻³	9,50x10 ⁻³	641,80	65,51	72,96
	Hg (80 W)	29,55	3,82x10 ⁻³	48,96x10 ⁻³	45,14x10 ⁻³	181,45	13,05	14,34

Tabela 2 – Dados cinéticos dos compostos polifenólicos estudados frente a fotólise e ao radical HO[•]; determinados por espectrofotometria UV-Vis; [H₂O₂] = 0,29 mmol L⁻¹.

Flavonóide	Conc. (μM)	k _{hv} (min ⁻¹)	t _{1/2hv} (min)	r	k _{hv+OH} (min ⁻¹)	t _{1/2hv+OH} (min)	r	k _{OH} /k _{hv}
Quercitrina	25,05	0,98 x10 ⁻³	707,29	0,9768	4,11 x10 ⁻³	168,65	0,9701	4,19
	50,10	0,39 x10 ⁻³	1777,30	0,9871	2,46 x10 ⁻³	281,77	0,9820	6,31
	75,15	0,10 x10 ⁻³	6931,47	0,9990	1,08 x10 ⁻³	641,80	0,9994	10,80
Rutina	24,97	1,38 x10 ⁻³	502,28	0,9904	8,52 x10 ⁻³	81,36	0,9842	6,17
	49,99	1,09 x10 ⁻³	635,91	0,9956	5,20 x10 ⁻³	133,30	0,9936	4,77
	70,93	0,93 x10 ⁻³	745,32	0,9903	1,95 x10 ⁻³	355,46	0,9989	2,10
Canferol	24,99	2,24 x10 ⁻³	309,44	0,9940	13,82 x10 ⁻³	50,16	0,9964	6,17
	49,98	1,79 x10 ⁻³	387,23	0,9973	10,34 x10 ⁻³	67,04	0,9951	5,78
	74,97	1,01 x10 ⁻³	686,28	0,9971	90,90 x10 ⁻³	76,25	0,9954	9,00
Fisetina	25,00	4,82 x10 ⁻³	143,81	0,9947	35,86 x10 ⁻³	19,33	0,9893	7,44
	49,94	2,91 x10 ⁻³	238,19	0,9910	21,97 x10 ⁻³	31,55	0,9949	7,55
	75,04	1,86 x10 ⁻³	372,66	0,9997	12,32 x10 ⁻³	56,26	0,9992	6,62
Quercetina	25,00	4,05 x10 ⁻³	171,15	0,9865	44,93 x10 ⁻³	15,43	0,9841	11,09
	50,01	2,95 x10 ⁻³	234,97	0,9891	24,58 x10 ⁻³	28,20	0,9972	8,33
	75,06	1,99 x10 ⁻³	348,32	0,9972	11,92 x10 ⁻³	58,15	0,9887	5,99
Miricetina	25,03	7,65 x10 ⁻³	90,61	0,9971	56,51 x10 ⁻³	12,27	0,9993	7,39
	50,05	4,10 x10 ⁻³	169,06	0,9995	27,74 x10 ⁻³	24,99	0,9974	6,77
	75,03	2,98 x10 ⁻³	232,60	0,9943	12,10 x10 ⁻³	57,28	0,9891	4,06

Tabela 3 – Dados cinéticos dos compostos polifenólicos estudados frente ao radical HO[•]; determinados por HPLC; [H₂O₂] = 0,29 mmol L⁻¹.

Flavonóide	Conc. (µM)	k _{hv} (min ⁻¹)	t _{1/2hv} (min)	r	K _{hv+OH} (min ⁻¹)	t _{1/2hv+OH} (min)	r	K _{OH/k_{hv}}
Quercitrina	25,05	(1,68±0,07) x10 ⁻³	412,59	0,9966	(6,33±0,64) x10 ⁻³	109,50	0,9864	3,77
	50,10	(1,26±0,04) x10 ⁻³	550,12	0,9863	(3,98±0,41) x10 ⁻³	174,16	0,9906	3,16
	75,15	(0,96±0,02) x10 ⁻³	722,03	0,9982	(2,39±0,37) x10 ⁻³	290,02	0,9896	2,49
Rutina	24,97	(2,02±0,05) x10 ⁻³	343,14	0,9990	(15,82±0,78) x10 ⁻³	43,81	0,9985	7,83
	49,99	(1,67±0,03) x10 ⁻³	415,06	0,9966	(7,48±0,53) x10 ⁻³	92,67	0,9991	4,48
Canferol	70,93	(0,96±0,03) x10 ⁻³	722,03	0,9972	(3,63±0,46) x10 ⁻³	190,95	0,9947	3,78
	24,99	(1,94±0,10) x10 ⁻³	357,29	0,9833	(18,71±0,52) x10 ⁻³	37,05	0,9981	9,64
	49,98	(1,55±0,06) x10 ⁻³	447,19	0,9885	(12,83±0,37) x10 ⁻³	54,03	0,9938	8,28
Fisetina	74,97	(0,86±0,05) x10 ⁻³	805,99	0,9955	(6,82±0,28) x10 ⁻³	101,63	0,9955	7,93
	25,00	(4,94±0,17) x10 ⁻³	140,31	0,9818	(44,72±0,32) x10 ⁻³	15,50	0,9858	9,05
	49,94	(3,28±0,12) x10 ⁻³	211,33	0,9929	(21,84±0,26) x10 ⁻³	31,74	0,9964	6,66
Quercetina	75,04	(1,95±0,09) x10 ⁻³	355,46	0,9921	(14,72±0,20) x10 ⁻³	47,09	0,9560	7,55
	25,00	(5,79±0,08) x10 ⁻³	119,71	0,9959	(60,73±0,80) x10 ⁻³	11,41	0,9944	10,49
Miricetina	50,01	(3,58±0,05) x10 ⁻³	193,62	0,9986	(27,67±1,07) x10 ⁻³	25,05	0,9986	7,73
	75,06	(2,24±0,03) x10 ⁻³	309,44	0,9984	(13,21±1,16) x10 ⁻³	52,47	0,9991	5,90
Miricetina	25,03	(10,14±0,17) x10 ⁻³	68,36	0,9980	(112,18±0,09) x10 ⁻³	6,18	0,9892	11,06
	50,05	(4,12±0,09) x10 ⁻³	168,24	0,9999	(45,12±0,86) x10 ⁻³	15,36	0,9996	10,95
	75,03	(2,94±0,06) x10 ⁻³	235,76	0,9846	(19,70±0,69) x10 ⁻³	35,19	0,9861	6,70