

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

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E *IN VIVO* CONTRA RADICAIS PEROXILA E
HIDROXILA EM AMOSTRAS DE PLANTAS
MEDICINAIS**

TESE DE DOUTORADO

Maurício Hilgemann

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E
IN VIVO CONTRA RADICAIS PEROXILA E HIDROXILA EM
AMOSTRAS DE PLANTAS MEDICINAIS.**

por

Maurício Hilgemann

Tese apresentada ao Curso de Doutorado 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
Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho

Santa Maria, RS, Brasil

2010

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E *IN VIVO*
CONTRA RADICAIS PEROXILA E HIDROXILA EM AMOSTRAS DE
PLANTAS MEDICINAIS.**

elaborada por
Maurício Hilgemann

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Leandro Machado de Carvalho, Dr.
(Presidente/Orientador)

Fritz Scholz, Dr. (Universidade de Greifswald)

José Maria Monserrat, Dr. (FURG)

Marcelo Barcellos da Rosa, Dr. (UFSM)

Solange Cristina Garcia, Dr^a. (UFRGS)

Santa Maria, 26 de Julho de 2010.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho, pela amizade, orientação e todas as contribuições feitas ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fritz Scholz (Universidade de Greifswald), pela oportunidade dada em trabalhar com seu grupo de pesquisa. Também gostaria de agradecer por sua constante supervisão, orientação e amizade, o que muito contribuiu para o enriquecimento desta experiência.

Aos professores Dr. Marcelo Barcellos da Rosa (UFSM) e Dr. José Maria Monserrat (FURG), e Dr^a. Heike Kahlert (Universidade de Greifswald), pelo apoio, confiança, paciência e estímulo demonstrados no decorrer deste trabalho. Agradeço também por sua amizade e pelo exemplo de pessoas e profissionais que são.

Aos professores Dr. Paulo Cícero do Nascimento e Dr^a. Denise Bohrer, agradeço imensamente pela contribuição neste e em tantos outros trabalhos desenvolvidos desde a Iniciação Científica.

Aos colegas e amigos Eduardo Pilau, Cristiane Jost, Daiane Dias, Sandra Ribeiro, Alexandre Schneider, Luiz Ferraz, Denise Bertagnolli, Marlei Veiga e Simone NoreMBERG, pela amizade, conselhos, incentivo, apoio e pelos momentos alegres vividos durante o curso.

Aos amigos e familiares que sempre me apoiaram e acreditaram em mim.

A todos os funcionários e professores que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade oferecida de realizar os cursos de Graduação e Pós-Graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Serviço de Intercâmbio Acadêmico Alemão (DAAD) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas concedidas.

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Química

Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E *IN VIVO* CONTRA RADICAIS PEROXILA E HIDROXILA EM AMOSTRAS DE PLANTAS MEDICINAIS

Autor: Maurício Hilgemann

Orientador: Leandro Machado de Carvalho

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 26 de julho de 2010.

O presente trabalho visa ao desenvolvimento de novas metodologias para a determinação da capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo* contra radicais peroxila e hidroxila em amostras de 5 plantas medicinais (*Matricaria chamomilla* L., *Psidium guajava*, *Achyrocline satureoides*, *Baccharis genistelloides* e *Cymbopogon citratus*) e sete compostos fenólicos (rutina, quercetina, resveratrol, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido gálico e ácido rosmarínico). A capacidade antioxidante das amostras foi determinada por dois métodos independentes. No primeiro, testou-se uma nova forma para a detecção de radicais hidroxila, usando-se um procedimento eletroquímico no qual os radicais destroem uma monocamada auto-organizada de hexanotiol sob um eletrodo de ouro. Esta monocamada consegue inibir o sinal eletroquímico de um par redox dissolvido, e, ao ser atacada por radicais livres, estes a destroem, e a recuperação do sinal eletroquímico do par redox se dá de forma proporcional à extensão de dissolução da monocamada. No segundo método, a determinação da capacidade antioxidante contra radicais peroxila e hidroxila ocorre através da detecção indireta destes radicais por fluorimetria (ex/em: 485/520 nm), empregando diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) como substrato. O DCFH-DA, após sofrer desacetilação, pode ser oxidado por espécies reativas de oxigênio (ERO), gerando fluorescência. Os radicais peroxila foram gerados através da termodegradação do reagente cloreto de 2,2'-azobis (2-metilamidinopropano) (ABAP) a 37°C, enquanto os radicais hidroxila foram gerados pela reação de Fenton. Ensaios *in vivo* foram avaliados utilizando-se hepatócitos do peixe zebra (*Danio rerio*), expostos aos extratos das plantas *P. guajava* e *C. citratus* (melhor e pior desempenho *in vitro*, respectivamente). Os resultados obtidos pelos métodos eletroquímico e fluorimétrico demonstram que é extremamente difícil classificar as plantas de acordo com sua capacidade antioxidante, uma vez que o resultado obtido depende fortemente da concentração e da composição química dos extratos, além do princípio do método analítico empregado. Entretanto, obteve-se uma boa correlação entre os ensaios *in vitro* e *in vivo* feitos para os extratos das plantas *P. guajava* e *C. citratus*, já que os resultados obtidos mostraram uma redução da concentração de ERO intracelular em forma dose-dependente nos hepatócitos expostos a *P. guajava*, sem se observar efeito antioxidante no ensaio com *C. citratus*, a exemplo dos ensaios *in vitro* realizados. O presente trabalho pretende chamar a atenção para esses diferentes resultados obtidos, e compara os diferentes métodos levando em consideração as diferenças existentes entre as metodologias, assim como as diferenças existentes entre os radicais testados. Além disso, discute-se a estabilidade, a reatividade e tempo de meia-vida destas espécies.

Palavras-chave: capacidade antioxidante; extratos de plantas medicinais; compostos fenólicos, métodos eletroquímicos e fluorimétricos; testes *in vitro* × testes *in vivo*

ABSTRACT

PhD Thesis in Chemistry
Post-Graduate in Chemistry
Federal University of Santa Maria

EVALUATION OF THE *IN VITRO* AND *IN VIVO* ANTIOXIDANT CAPACITY AGAINST PEROXYL AND HYDROXYL RADICALS IN MEDICINAL PLANT SAMPLES

Author: Maurício Hilgemann

Advisor: Leandro Machado de Carvalho

Santa Maria, July 26th, 2010.

The present work reports the development of new methodologies to evaluate the *in vitro* and *in vivo* antioxidant capacity against peroxy and hydroxyl radicals in five medicinal plant samples (*Matricaria chamomilla* L., *Psidium guajava*, *Achyrocline satureoides*, *Baccharis genistelloides* and *Cymbopogon citratus*) and seven phenolic compounds (rutin, quercetin, resveratrol, gallic acid, ferulic acid, caffeic acid and rosmarinic acid). The antioxidant capacity of the samples was analyzed by two independent methods. In the first one, a new approach was used to detect hydroxyl radicals indirectly using an electrochemical procedure, in which the radicals destroy a thiol self-assembled monolayer (SAM) on a gold electrode. This monolayer can block the electrochemical signal of a dissolved redox probe. When such an electrode with a SAM is exposed to free radicals, these radicals destroy the SAM and the electrochemical signal of a redox probe recovers to a degree proportional to the extent of dissolution of the SAM. In the second method, the evaluation of antioxidant capacity against peroxy and hydroxyl radicals is based on the indirect detection of these reactive oxygen species (ROS) by fluorimetry (ex/em: 485/520 nm) employing 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) as a fluorescent probe. After the deacetylation reaction of DCFH-DA, it can be oxidized by ROS to the fluorescent compound DCF. The peroxy radicals were produced at 37°C by thermal decomposition of 2,2'-azobis (2-methylpropanimidine) dihydrochloride (ABAP), while hydroxyl radicals were generated by the Fenton reaction. *In vivo* assays were evaluated using zebrafish (*Danio rerio*) hepatocytes exposed to *P. guajava* and *C. citratus* extracts (better and worst *in vitro* results, respectively). The results obtained by the electrochemical and fluorimetric methods show that it is difficult to classify the tested plants according to their antioxidant capacity, since the results depended strongly on the extract concentration and composition as well as on the principle of the analytical method. However, there was a good correlation between the *in vitro* and *in vivo* assays for *P. guajava* and *C. citratus* extracts, since these results showed a reduction in the intracellular ROS concentration in the hepatocytes exposed to *P. guajava* extract. Furthermore, no antioxidant effect was observed in the assay with *C. citratus* extract, what is in agreement with the *in vitro* assays for this plant species. At last, the thesis intended to prove and to highlight the discrepant results obtained by independent methods for the same antioxidant species. Additionally, it aimed to compare the different methods according to the differences among the experimental procedures by using different ROS. Furthermore, the stability, reactivity and the half-life time of the free radicals are discussed.

Keywords: antioxidant capacity, plant extracts, phenolic compounds, electrochemical and fluorimetric methods, *in vitro* × *in vivo* assays

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Diagrama da peroxidação lipídica: a oxidação dos lipídios ocorre em três etapas: iniciação, propagação e terminação. Na etapa de iniciação, as ERO reagem com um substrato lipídico (LH) formando radicais lipídicos (L [•]). Estes radicais são instáveis e reagem com o oxigênio formando radicais peroxila lipídicos (LOO [•]). Estes também são instáveis e reagem com outra molécula lipídica, produzindo radicais idênticos, o que propaga a reação. A reação termina quando dois radicais se ligam, formando uma molécula estável não radical	14
FIGURA 2 - Estrutura básica de um flavonoide	22
FIGURA 3 - Estrutura esquematizada de uma SAM de alcanotióis (C12-SAM) em ouro.....	40
FIGURA 4 - Reação de primeira ordem. (a) representação linear da concentração; (b) representação logarítmica da concentração	47
FIGURA 5 - Reação de segunda ordem	49
FIGURA 6 - Voltamogramas cíclicos de riboflavina adsorvida ao PIGE em uma solução de tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 4,6), velocidade de varredura = 100 mV s ⁻¹ . (----) sem RF adsorvida; (----) RF adsorvida antes do ataque de radicais hidroxila; (----) RF adsorvida após o ataque de radicais hidroxila gerados pela reação de Fenton.	65
FIGURA 7 - Variação da altura do pico anódico da riboflavina adsorvida no PIGE após o ataque de HO [•] na ausência e na presença de um antioxidante (ácido ascórbico 0,1 mol L ⁻¹) à solução de Fenton	66

- FIGURA 8 - Gráfico da função logarítmica da variação da altura do pico anódico da riboflavina adsorvida no PIGE após o ataque de HO[•] na ausência e na presença de um antioxidante (ácido ascórbico 0,1 mol L⁻¹) à solução de Fenton..... 66
- FIGURA 9 - Gráfico da função logarítmica da variação da altura do pico anódico da riboflavina adsorvida no PIGE após o ataque de HO[•] na presença de 100, 200 e 1000 mg L⁻¹ de *P. guajava* adicionada à solução de Fenton. Os valores próximos às retas correspondem aos valores dos coeficientes angulares das mesmas..... 68
- FIGURA 10 - Decaimento do sinal da riboflavina (RF) adsorvida no PIGE quando em contato com o extrato da *P. guajava* (1000 mg L⁻¹). Cada linha do voltamograma corresponde a um intervalo de 1 min de inserção do PIGE recoberto por RF no extrato de *P. guajava*. Após a inserção do eletrodo recoberto com RF ao extrato, verifica-se uma diminuição do sinal eletroquímico da RF..... 69
- FIGURA 11 - Surgimento de um sinal eletroquímico na região de potenciais positivos após a inserção do PIGE recoberto riboflavina no extrato aquoso de *P. guajava* 1000 mg L⁻¹. Cada linha do voltamograma corresponde a um intervalo de 1 min de inserção do PIGE recoberto por RF no extrato de *P. guajava*. Após a inserção do eletrodo recoberto com RF ao extrato, verifica-se um aumento deste sinal eletroquímico, o que comprova que há uma competição pelo PIGE entre a RF e compostos presentes no extrato que se adsorvem espontaneamente no PIGE..... 69
- FIGURA 12 - Voltamogramas cíclicos de uma solução de [Ru(NH₃)₆]³⁺ obtidos com (a) eletrodos não modificados, (b) eletrodos modificados com SAM (hexanotiol), (c) eletrodos modificados com a SAM após o ataque radicalar via solução de Fenton por 1 minuto, (d) e 5 minutos. Voltamogramas obtidos com uma solução de [Ru(NH₃)₆]Cl₃ 1 10⁻³ mol L⁻¹ em tampão acetato 0,01 mol L⁻¹; velocidade de varredura: 500 mV s⁻¹ 71
- FIGURA 13 - Voltamogramas cíclicos de uma solução 1 10⁻³ mol L⁻¹ [Ru(NH₃)₆]³⁺ em tampão acetato 0,01 mol L⁻¹ (pH 4,6) em um eletrodo de ouro; (a) antes da modificação a superfície do eletrodo com a SAM; (b) após a

formação da SAM; (c) após 10 minutos de ataque radicalar; (d) após 20 minutos de ataque radicalar à SAM. Velocidade de varredura: 500 mV s⁻¹, 20 ciclos..... 72

FIGURA 14 - Variação da altura do pico anódico após o ataque dos radicais HO à SAM na ausência de antioxidantes; (a) decaimento exponencial do sinal eletroquímico normalizado $\left[1 - \left(\frac{I}{I_0}\right)\right]$ versus o tempo de reação da SAM com os radicais HO; (b) gráfico da função logarítmica dos mesmos dados mostrando claramente a separação entre os decaimentos rápido e lento..... 73

FIGURA 15 - Gráfico do decaimento exponencial logaritmando do sinal eletroquímico normalizado $\left[1 - \left(\frac{I}{I_0}\right)\right]$ versus o tempo de reação da SAM com os radicais HO após sucessivos ataques de Fenton por 30 min, com intervalos de 15 s. Tempo de deposição da SAM: 15 min 74

FIGURA 16 - Gráfico logaritmando do decaimento do sinal eletroquímico normalizado $\left[1 - \left(\frac{I}{I_0}\right)\right]$ versus o tempo de reação da SAM com os radicais HO após sucessivos ataques de Fenton por 30 min. Tempo de deposição da SAM: 68 horas..... 75

FIGURA 17 - (a) decaimentos bi-exponenciais do sinal eletroquímico normalizado $\left[1 - \left(\frac{I}{I_0}\right)\right]$ versus o tempo de reação da SAM com os radicais HO obtidos para 3 diferentes concentrações (○ 1000 mg L⁻¹; ▽ 200 mg L⁻¹; □ 100 mg L⁻¹) de extratos de *M. chamomilla* L. adicionados à solução de Fenton; (b) gráfico da função logarítmica linearizada dos mesmos dados mostrando claramente a separação entre os decaimentos rápido e lento..... 76

FIGURA 18 - Correlação entre os métodos eletroquímico (Fenton-SAM) e espectrofotométrico (DPPH*) para as três concentrações de extratos testadas (100, 200 e 1000 mg L⁻¹), observando-se a inexistência de correlações significativas entre ambos os métodos. (a) *C. citratus*; (b) *P. guajava*; (c) *A. saturoides*; (d) *B. genistelloides*; (e) *M. chamomilla*..... 81

FIGURA 19 - (a) Dependência entre a concentração de ácido ascórbico e a capacidade antioxidante contra DPPH* ; (b) dependência entre a concentração de ácido ascórbico e a capacidade antioxidante contra HO* .	83
FIGURA 20 - Mecanismo mostrando a variação do sinal do par redox com a formação e dissolução da SAM, frente o ataque de radicais HO.	85
FIGURA 21 - Esquema ilustrando a metodologia para a medida da capacidade antioxidante contra radicais peroxila.	87
FIGURA 22 - Resultados típicos obtidos pelo método ACAP mostrando a variação da fluorescência com o tempo, sem e com a adição de ABAP	88
FIGURA 23 - Resultados obtidos para as cinco amostras de plantas estudadas na concentração de 1000 mg L ⁻¹ , segundo a metodologia de Amado et al. [AMADO, 2009] para a determinação da capacidade antioxidante contra radicais peroxila	88
FIGURA 24 - Resultados obtidos para as 5 amostras de plantas medicinais estudadas numa concentração de 1000 mg L ⁻¹ , com uma etapa prévia de desacetilação química do composto DCFH-DA, de acordo com a metodologia desenvolvida.	90
FIGURA 25 - Resultados obtidos para as 5 amostras de plantas medicinais estudadas numa concentração de 200 mg L ⁻¹ , com uma etapa prévia de desacetilação química do composto DCFH-DA, de acordo com a metodologia desenvolvida.	91
FIGURA 26 - Resultados obtidos para as 5 amostras de plantas medicinais estudadas numa concentração de 100 mg L ⁻¹ , com uma etapa prévia de desacetilação química do composto DCFH-DA, de acordo com a metodologia desenvolvida.	91
FIGURA 27 - Correlação entre os duas diferentes formas de quantificação da capacidade antioxidante testadas. A primeira considera o valor da área da curva obtida entre a reação de ERO e compostos antioxidantes durante 30 min de reação. A segunda considera apenas os valores de fluorescência gerados após 30 min de reação, de acordo com a eq. 39.	92

FIGURA 28 - Correlação entre os métodos fluorimétrico (ACAP) e espectrofotométrico (DPPH*) para as três concentrações de extratos testadas (100, 200 e 1000 mg L⁻¹), observando-se a inexistência de correlações significativas entre ambos os métodos. (a) *C. citratus*; (b) *P. guajava*; (c) *A. saturoides*; (d) *B. genistelloides*; (e) *M. chamomilla*..... 95

FIGURA 29 - Esquema ilustrando a metodologia para a medida da capacidade antioxidante contra radicais hidroxila 99

FIGURA 30 - Correlações entre os resultados obtidos pelos métodos fluorimétricos desenvolvidos para avaliar a capacidade antioxidante contra radicais peroxila e hidroxila em amostras de extratos de plantas nas três concentrações de extratos testadas (100, 200 e 1000 mg L⁻¹). (a) *C. citratus*; (b) *P. guajava*; (c) *A. saturoides*; (d) *B. genistelloides*; (e) *M. chamomilla* 100

FIGURA 31 - resultados obtidos para a capacidade antioxidante de diferentes compostos fenólicos nas concentrações de 10, 50 e 100 µmol L⁻¹ contra radicais peroxila (CAO: capacidade antioxidante; ROS: ácido rosmarínico; GAL; ácido gálico; QUE: quercetina; RUT: rutina; FER: ácido ferúlico; CAF: ácido cafeico) 104

FIGURA 32 - resultados obtidos para a capacidade antioxidante de diferentes compostos fenólicos nas concentrações de 10, 50 e 100 µmol L⁻¹ contra radicais hidroxila (CAO: capacidade antioxidante; ROS: ácido rosmarínico; GAL: ácido gálico; QUE: quercetina; RUT: rutina; FER: ácido ferúlico; CAF: ácido cafeico)..... 105

FIGURA 33 - correlação entre os resultados obtidos pelos métodos fluorimétricos desenvolvidos para avaliar a capacidade antioxidante contra radicais peroxila e hidroxila em amostras de compostos fenólicos nas concentrações de 10, 50 e 100 µmol L⁻¹..... 105

FIGURA 34 - Resultados obtidos para o teste de viabilidade celular, sendo que o número de células viáveis foi afetado apenas para células expostas ao extrato de *P. guajava* 1000 mg L⁻¹ 109

FIGURA 35 - Resultados obtidos para a determinação da concentração de ERO intracelular, em que se observa uma redução da concentração de ERO intracelular nos hepatócitos expostos ao extrato de *P. guajava* (PG), sem se

observar alteração para os hepatócitos expostos ao extrato de *C. citratus* (CC).
..... 109

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Potenciais-padrão de agentes oxidantes fortes, valores de potencial a 25 °C, 1 atm $a_{H_3O^+} = 1$	8
TABELA 2 - Exemplos de ERO radicalares e não-radicalares	11
TABELA 3 - Tempos de meia-vida das principais ERO	12
TABELA 4 - Constantes cinéticas de segunda ordem para reações de HO [•] ..	13
TABELA 5 - Principais classes de flavonoides e descrição de suas características básicas.....	24
TABELA 6 - Potenciais-padrão biologicamente relevantes de diferentes espécies radicalares	31
TABELA 7 - Plantas medicinais estudadas: seus nomes populares, usos tradicionais, vias de administração, contra-indicações e efeitos adversos	52
TABELA 8 - Resultados obtidos pelo método voltamétrico proposto (%) e o método do DPPH [•] (%) para a capacidade antioxidante dos extratos de plantas testados	78
TABELA 9 - Resultados obtidos pelo método fluorimétrico proposto (%) e o método do DPPH [•] (%) para a capacidade antioxidante dos extratos de plantas testados	93
TABELA 10 - Resultados obtidos pelo método fluorimétrico proposto para a avaliação da capacidade antioxidante de extratos de plantas contra radicais peroxila	97
TABELA 11 - Resultados obtidos pelo método fluorimétrico proposto para a avaliação da capacidade antioxidante de extratos de plantas contra radicais hidroxila	101

TABELA 12 - Resultados obtidos para a atividade antioxidante de compostos fenólicos empregando diferentes métodos <i>in vitro</i>	107
TABELA 13 – Classificação dos diferentes compostos fenólicos testados em função do método utilizado e do radical gerado. A concentração de todos os compostos fenólicos é de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (RUT: rutina; QUE: quercetina; RES: resveratrol; CAF: ácido cafeico; FER: ácido ferúlico).....	108

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ABAP	2,2'-azobis (2-metilamidinopropano)
ACAP	Capacidade antioxidante contra radicais peroxila
CAF	Ácido cafeico
CAO	Capacidade antioxidante
CV	Coeficiente de variação
DCFH-DA	Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
E	Potencial
EPH	Eletrodo padrão de hidrogênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ESR	Ressonância de spin eletrônico
FER	Ácido ferúlico
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
HO[•]	Radical hidroxila
i	corrente
O₂^{•-}	Radical superóxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
PIGE	Eletrodo de grafite impregnado com parafina
QUE	Quercetina
r	Coeficiente de correlação linear
RES	Resveratrol
RF	Riboflavina
RFC	Reagente de Folin-Ciocalteu

ROO[•]	Radical peroxila
RUT	Rutina
SAM	Monocamadas auto-organizadas
SOD	Superóxido dismutase
TRAP	<i>Total Radical Trapping Antioxidant Parameter</i>

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1 – SHOLZ, F. et al. Indirect electrochemical sensing of radicals and radicals scavengers in biological matrices. Angewandte Chemie International Edition , v. 46, p. 8079 – 8081, 2007.....	124
APÊNDICE 2 – HILGEMANN, M. et al. Electrochemical assay to quantify the hydroxyl radical scavenging activity of medicinal plant extracts. Electroanalysis , v. 22, p. 406 – 412, 2010	128

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES	xiv
LISTA DE APÊNDICES	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Química das espécies reativas de oxigênio (ERO)	3
2.1.1 Peróxido de hidrogênio.....	6
2.1.2 Radicais livres.....	9
2.1.3 Oxigênio e seus derivados.....	10
2.1.3.1 Radical hidroxila.....	11
2.1.3.2 Radical peroxila.....	13
2.1.4 Reação de Fenton.....	14
2.2 Fitoterapia e Plantas Medicinais	16
2.2.1 Fitoterápicos.....	19
2.2.2 Flavonoides.....	22
2.2.2.1 Fontes naturais de flavonóides.....	23
2.2.2.2 Capacidade Antioxidante <i>in vitro</i> associada a flavonoides.....	25
2.2.2.3 Capacidade Antioxidante <i>in vivo</i> associada a flavonoides.....	26
2.2.2.4 Absorção, metabolismo e efeitos clínicos dos flavonóides.....	27
2.3 Capacidade antioxidante	28

2.3.1	Métodos usados para avaliação da capacidade antioxidante em alimentos e sistemas biológicos	32
2.3.1.1	Ensaio de fenóis totais por Folin-Ciocalteu	33
2.3.1.2	Ensaio TEAC (<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>)	34
2.3.1.3	Ensaio FRAP (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>).....	34
2.3.1.4	Ensaio TRAP (<i>Total Radical-trapping Antioxidant Parameter</i>)	35
2.3.1.5	Ensaio TOSC (<i>Total Oxyradical Scavenging Capacity</i>).....	35
2.3.1.6	Ensaio do DPPH* (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila).....	36
2.3.1.7	Ensaio para a determinação da capacidade antioxidante contra o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$).....	36
2.3.1.8	Ensaio para a determinação da capacidade antioxidante contra peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	37
2.3.1.9	Ensaio para a determinação da capacidade antioxidante contra o radical hidroxila (HO^{\cdot})	37
2.4	Monocamadas auto-organizadas	38
2.4.1	Técnicas de preparação de SAMs de alcanotióis em ouro.....	41
2.4.2	Química e energia de formação de SAMs de alcanotióis em ouro	41
2.4.3	Mecanismos de crescimento das SAMs	42
2.5	Cinética química	43
2.5.1	Leis cinéticas	45
2.5.1.1	Reações de ordem zero	46
2.5.1.2	Reações de primeira ordem	47
2.5.1.3	Reações de segunda ordem	48
3	MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1	Instrumentação	50
3.2	Reagentes e soluções	50
3.3	Amostras	51
3.3.1	Preparação dos extratos	51
3.4	Procedimentos experimentais	54
3.4.1	Determinação da capacidade antioxidante de extratos de plantas medicinais pelo método do DPPH*	54
3.4.2	Estudo eletroquímico do poder antioxidante de extratos de plantas medicinais	55

3.4.2.1	Ataque radicalar a um composto redox ativo imobilizado sobre a superfície de um eletrodo	55
3.4.2.2	Ataque radicalar a um composto eletroquimicamente inativo imobilizado sobre a superfície de um eletrodo e posterior quantificação de um par redox em solução	56
3.4.3	Determinação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> contra radicais peroxila em amostras de extratos de plantas e compostos fenólicos	57
3.4.3.1	Desacetilação química do DCFH-DA	58
3.4.4	Determinação da concentração de ERO intracelular.....	58
3.4.4.1	Protocolo de exposição de hepatócitos aos diferentes extratos de plantas	58
3.4.4.2	Determinação do número de células por ABS em 630 nm.....	60
3.4.4.3	Determinação da viabilidade por MTT.....	60
3.4.4.4	Determinação de ERO	61
3.4.5	Determinação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> contra radicais hidroxila em amostras de extratos de plantas e compostos fenólicos	61
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1	Estudo eletroquímico do poder antioxidante de extratos de plantas medicinais.....	64
4.1.1	Ataque radicalar a um composto redox ativo imobilizado sobre a superfície de um eletrodo	64
4.1.2	Ataque radicalar a um composto eletroquimicamente inativo imobilizado sobre a superfície de um eletrodo e posterior quantificação de um par redox em solução	70
4.1.3	Conclusões parciais referentes aos ensaios eletroquímicos	84
4.2	Estudo fluorimétrico do poder antioxidante de extratos de plantas medicinais.....	86
4.2.1	Determinação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> contra radicais peroxila em amostras de extratos de plantas	86
4.2.2	Determinação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> contra radicais hidroxila em amostras de extratos de plantas	98
4.3	Determinação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> de compostos fenólicos contra radicais peroxila e hidroxila.....	103
4.4	Determinação da concentração de ERO intracelular	108
4.5	Conclusões parciais referentes aos ensaios fluorimétricos	110

5	CONCLUSÕES FINAIS	112
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
	APÊNDICES	124

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, há um grande interesse no estudo de espécies antioxidantes, principalmente devido à sua importância no combate a espécies radicalares em organismos vivos. No organismo, os radicais livres estão envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular e síntese de importantes substâncias biológicas [BARREIROS, 2006; HALLIWELL, 2007]. Consequentemente, os radicais livres são produzidos naturalmente como produtos metabólicos e, em alguns casos, devido a disfunções biológicas. Problemas ambientais, infecções, fumo, radiação e luz solar também podem causar a formação de radicais livres. Uma alta concentração de radicais livres e de espécies reativas de oxigênio (ERO) pode ocasionar efeitos deletérios, como a peroxidação lipídica, e a agressão a proteínas de tecidos, membranas, enzimas, carboidratos e DNA. Esses efeitos estão relacionados a diversas doenças, como artrite, choque hemorrágico, doenças cardíacas, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS e podem ser a causa ou o fator agravante de uma doença.

Os radicais livres são normalmente mantidos em balanço em sistemas biológicos por mecanismos de defesa antioxidantes. Durante o metabolismo oxidativo normal, as ERO são formadas em pequenas quantidades e podem ser removidas por mecanismos de defesa naturais. O estresse oxidativo ocorre quando há mais ERO do que podem ser destruídas [VILLA, 1997; SCHEIBMEIR, 2005], o que ocorre devido a agressões ambientais, doenças ou má nutrição. Antioxidantes são compostos conhecidos por reagir com radicais livres e ERO, inativando-os e prevenindo contra a sua ação danosa às células [HALLIWELL, 2007].

Muitas substâncias foram identificadas como antioxidantes. Compostos fenólicos, um grupo de metabólitos secundários presentes em plantas, possuem várias propriedades importantes, como anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, antitumor e antioxidante [ANDERSEN, 2006].

Devido à grande importância de radicais livres e antioxidantes, há uma considerável demanda por técnicas para detectar e quantificar estes dois grupos de compostos. Várias metodologias foram propostas para avaliar a capacidade antioxidante de extratos de plantas através da sua interação com radicais livres

estáveis (como o DPPH^{*}), ou medindo-se a proteção proporcionada pelo antioxidante a uma molécula alvo que seja oxidada pelos radicais [SÁNCHEZ-MORENO, 2002; HUANG, 2005]. Ensaio eletroquímico de antioxidantes desenvolvidos até agora são focados na determinação eletroquímica de compostos antioxidantes, não analisando a ação antioxidante direta através de ERO.

Já a determinação de polifenóis em extratos de plantas tem sido realizada principalmente por métodos de separação [CAI, 2003] como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a eletroforese capilar de zona (CZE) e a cromatografia capilar electrocinética micelar (MEKC). No entanto, a otimização e a aplicação destes métodos de separação para a determinação simultânea dos polifenóis em diferentes extratos de plantas com potencial antioxidante têm sido relatadas na literatura de forma ainda modesta. A capacidade antioxidante de extratos e de polifenóis puros é geralmente determinada pelos assim chamados “métodos clássicos”: Folin-Ciocalteu, TRAP (*Total Radical Trapping Antioxidant Parameter*), FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) e DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) [HUANG, 2005].

Do ponto de vista fisiológico e toxicológico, o interesse por compostos fenólicos justifica-se pelo fato de estes apresentarem uma série de vantagens em relação a outras drogas, principalmente em termos da ausência de efeitos colaterais. Nesse sentido, o interesse pela descoberta de novos antioxidantes de fontes naturais tem aumentado, principalmente para prevenir a deterioração fisiológica de organelas e, conseqüentemente, minimizar o efeito oxidativo provocado pelos radicais livres [HALLIWELL, 2007].

Nesse contexto, esta tese visa abordar: (1) o estudo cinético do poder antioxidante dos polifenóis em extratos de plantas frente a sistemas radiculares empregando métodos eletroquímicos; e (2) a comparação dos estudos *in vitro* e *in vivo* do poder antioxidante dos polifenóis em extratos de plantas contra radicais hidroxila e peroxila.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Química das espécies reativas de oxigênio (ERO)

O elemento oxigênio (símbolo químico O) existe no ar na forma de moléculas diatômicas, O₂, e também em quantidades-traço como ozônio, O₃. Exceto para algumas espécies anaeróbicas e aerotolerantes, todos os organismos necessitam de O₂ para uma produção eficiente de energia, usando cadeias transportadoras de elétrons, que doam elétrons ao O₂, como no caso das mitocôndrias em células eucarióticas e nas membranas celulares de várias bactérias. Estas cadeias transportadoras de elétrons estão presentes nas mitocôndrias e são a maior fonte de adenosina trifosfato, ATP. Esta necessidade de O₂ obscurece o fato de que ele é um gás tóxico, mutagênico e inflamável; organismos aeróbicos sobrevivem apenas por possuírem defesas antioxidantes [HALLIWELL, 2007].

Cerca de 90% do O₂ consumido pelos animais é transformado nas mitocôndrias. O princípio da produção de energia nas mitocôndrias é que nutrientes são oxidados. Através de transformações metabólicas complexas, os nutrientes perdem elétrons, que são carregados por carregadores de elétrons, como nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) e flavinas (FMN, flavina mononucleotídeo e FAD, flavina dinucleotídeo). Estas espécies reduzidas reagem com O₂ nas mitocôndrias, liberando grandes quantidades de ATP [STRYER, 1981]. Estes processos são de alta complexidade: a energia é liberada gradualmente pela passagem de elétrons de NADH para proteínas contendo ferro. Nesta etapa, Fe(III) é reduzido a Fe(II) e reoxidado a Fe(III) após a passagem de elétrons a citocromos. A citocromo oxidase remove um elétron de cada molécula de Fe(II)-citocromo, e gradualmente adiciona 4 elétrons ao O₂, o que leva à equação [LEHNINGER, 1995; HALLIWELL, 2007]:



Uma vez que é impossível adicionar os quatro elétrons de uma única vez e pelo fato de que intermediários de oxigênio parcialmente reduzidos – também chamados de espécies reativas de oxigênio (ERO) – podem ser danosas às células, a citocromo oxidase possui um sistema bastante complexo que lhe permite manter-se firmemente ligada a estas espécies até que sejam totalmente convertidas em água [HALLIWELL, 2007]. Entretanto, a maior parte dos processos biológicos e metabólicos lidam com ERO, desde que eles estejam normalmente associados ao metabolismo do oxigênio e sejam produzidos em pequenas quantidades sob condições fisiológicas [DRÖGE, 2002]. A cadeia de transporte de elétrons mitocondriais é um dos maiores produtores de ERO.

O termo “espécies reativas de oxigênio” inclui as espécies radicais livres (como, por exemplo, os radicais superóxido, peróxila e hidroxila) e outras que, embora não possuam elétrons desemparelhados em sua camada de valência, são muito reativas em decorrência de sua instabilidade (como o peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos) [RIBEIRO, 2005]. A falta de um elétron em sua camada mais externa dá a estas espécies uma configuração extremamente instável, e radicais reagem rapidamente com outras moléculas ou radicais a fim de atingir a configuração estável de 4 pares de elétrons na camada de valência. As ERO constituem uma grande ameaça à saúde em virtude de sua alta reatividade, através da qual muitas biomoléculas importantes – como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios – podem ser danificados ou desnaturados, resultando em danos ao DNA, células, órgãos e tecidos. Estima-se que o DNA de cada célula de nosso corpo é submetido a mais de 20 diferentes lesões oxidativas diferentes por dia, muitas das quais mutagênicas [FREI, 1994; GONZÁLEZ, 2008].

A fuga de elétrons da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial conduzirá à formação de HO^\bullet , dentre outras espécies. Estas ERO podem atacar ácidos graxos poli-insaturados presentes na membrana mitocondrial, desencadeando a formação de radicais lipídicos. O HO^\bullet também pode atacar proteínas que contêm ferro. Uma vez liberado, o ferro pode reagir com substâncias apropriadas para formar quelatos e então atacar os ácidos graxos poli-insaturados presentes nas biomembranas. O acoplamento da catálise de ferro com a transferência de elétrons é conhecido como o fator principal na iniciação e propagação da peroxidação lipídica [GONZÁLEZ, 2008].

Apenas uma pequena parte do fluxo de elétrons mitocondrial total forma o radical superóxido, que se decompõe espontaneamente ou é catalisado pela enzima superóxido dismutase (SOD), formando H_2O_2 e oxigênio [DRÖGE, 2002]. O peróxido de hidrogênio por si só é um forte oxidante que pode formar outras ERO. A redução de H_2O_2 a HO^\bullet é catalisada por metais de transição (M), especialmente Fe^{2+} e Cu^{2+} , como descrito no seguinte esquema [GONZÁLEZ, 2008]:



O potencial danoso do H_2O_2 é reduzido naturalmente por proteínas que se ligam ao ferro e cobre e enzimas (como as catalases e peroxidases), que transformam o H_2O_2 em espécies inofensivas, e com a ajuda dos assim chamados antioxidantes, como as vitaminas C e E.

Liochev e Fridovich [LIOCHEV, 1994] descobriram que o radical hidroxila, HO^\bullet , é formado *in vivo* pelas reações de Fenton e Haber-Weiss, e que o radical superóxido, $\text{O}_2^{\bullet-}$, aumenta a concentração de peróxido de hidrogênio e de ferro livre pela liberação de clusters de desidratases.

Estima-se que, no corpo humano, mais de 10 bilhões de ERO são produzidos diariamente via reações de auto-oxidação e metabólicas, principalmente pelo sistema de transferência de elétrons mitocondrial. O dano celular ou até mesmo a morte celular pode ocorrer quando o potencial do sistema defensivo é excedido pela concentração ERO, ou quando eles são gerados próximos a locais onde as defesas não são fortes o suficiente [GONZÁLEZ, 2008].

A consequência direta do ataque de ERO é o dano oxidativo a várias biomoléculas, o que, combinado à idade, pode contribuir para o desenvolvimento de inúmeras doenças degenerativas, como arteriosclerose, diabetes, certos tipos de câncer e lesões inflamatórias, doenças autoimunes (AIDS, artrite reumatoide, etc.), e doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer [FREI, 1994; WARIS, 2006; HALLIWELL, 2007].

2.1.1 Peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio, H_2O_2 , é um líquido incolor em solução que é completamente miscível em água. É encontrado naturalmente em baixas concentrações em águas de chuva, do mar, frutas, vegetais e leite materno. O H_2O_2 também é produzido como subproduto do metabolismo do oxigênio. Humanos, outros mamíferos e plantas sintetizam H_2O_2 intracelularmente e, sob enzimas antioxidativas endógenas, controlam um componente essencial da resposta imune contra micro-organismos infecciosos [STRYER, 1981; HALLIWELL, 2007].

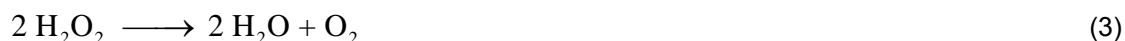
O peróxido de hidrogênio é gerado *in vivo* pela dismutação do radical superóxido, $O_2^{\cdot-}$, espontaneamente ou catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). Ele é deliberadamente sintetizado por fagócitos ativados e diversas enzimas oxidases, como monoamina oxidase, urato oxidase, acyl-CoA oxidase e L-gulonolactona oxidase, que catalisam a redução de 2 elétrons de O_2 a H_2O_2 [GONZÁLEZ, 2008]. Os papéis metabólicos do H_2O_2 têm sido extensivamente estudados. O H_2O_2 age como uma molécula sinalizadora: ele é implicado como fator chave na morte celular programada e pode regular a expressão de certos genes que estão ligados à multiplicação viral nas células [HALLIWELL, 2007].

O H_2O_2 é um agente oxidante forte. Entretanto, em termos químicos, é pouco reativo. Ele age como ambos, como um agente oxidante moderado ou um agente redutor moderado. Ele pode coexistir com várias moléculas biológicas sem, no entanto, oxidá-las mas em altas concentrações ele pode ser tóxico às células [HALLIWELL, 2000]. Embora o H_2O_2 seja moderadamente reativo, ele possui um tempo de meia-vida relativamente longo, o que permite que ele se difunda para longe de seus sítios de produção [HALLIWELL, 2007].

Devido a seus efeitos citotóxicos *in vivo*, acreditava-se que ele fosse rapidamente consumido por enzimas, como as catalases e peroxidases; entretanto, o potencial citotóxico do H_2O_2 ainda não está completamente claro. Alguns estudos demonstram que, em altas concentrações ($> 50 \mu M$), os danos causados pelo H_2O_2

dependerão do tipo de célula, do tempo de exposição, da concentração de H₂O₂, do meio de cultura empregado, etc. [HAMPTON, 1997; CLÉMENT, 1998; HALLIWELL, 2007].

O peróxido de hidrogênio decompõe-se em água e gás oxigênio, de acordo com a equação 3:



Este processo ocorre espontaneamente, porém a velocidade de decomposição depende da temperatura e da concentração de H₂O₂. O valor do pH e a presença de impurezas, catalisadores e estabilizantes possuem também um grande impacto na velocidade de decomposição do H₂O₂. A decomposição do H₂O₂ é acelerada naturalmente por catalases e peroxidases. Virtualmente, todos os organismos possuem estas enzimas, cuja função principal é a remoção de subprodutos tóxicos do metabolismo, e outra função é a redução do estresse oxidativo [HALLIWELL, 2007].

O poder oxidativo do H₂O₂ é maior que o de espécies como cloro e permanganato de potássio (Tabela 1). Entretanto, o perigo real do H₂O₂ decorre do fato de ele poder ser convertido cataliticamente em radicais hidroxilas, cuja reatividade é muito maior que a das espécies acima mencionadas, e é apenas superado pelo flúor [GONZÁLEZ, 2008].

A presença de metais de transição acelera a decomposição de H₂O₂, ocorrendo a sua conversão a HO[•]. Vários autores propuseram diferentes mecanismos para explicar este processo [HALLIWELL, 2007]. Evidências suportam que este processo se dá pela reação de Fenton, catalisando a conversão de peróxido de hidrogênio [PUPPO, 1988]. Nas reações de Fenton e do tipo-Fenton, metais de transição (especialmente ferro e cobre) são usados para a formação de HO[•]. O mecanismo ainda não está completamente claro, mas envolve a interação de Fe(II) e H₂O₂, resultando no radical hidroxila, íon hidroxila e Fe(III) (mais sobre este assunto será discutido posteriormente). Entretanto, a formação de espécies reativas adicionais, como complexos à base de ferro, não está descartada, embora não haja evidências experimentais destas espécies sendo quimicamente caracterizadas em sistemas do tipo-Fenton.

Tabela 1: Potenciais-padrão de agentes oxidantes fortes, valores de potencial a 25 °C, 1 atm aH₃O⁺ = 1 [GONZÁLEZ, 2008].

Oxidante	Reação	E vs EPH (V)
Flúor	$F_2 + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons 2HF$	3,053
Radical hidroxila	$OH^\bullet + H^+ + e^- \rightleftharpoons H_2O$	2,700
Ozônio	$O_3 + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons O_2 + H_2O$	2,078
Radical hidroxila	$OH^\bullet + e^- \rightleftharpoons OH^-$	2,020
Peróxido de hidrogênio	$H_2O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons 2H_2O$	1,776
Permanganato de potássio	$MnO_4^- + 4H^+ + 3e^- \rightleftharpoons MnO_2 + 2H_2O$	1,679
Cloro	$Cl_2(g) + 2e^- \rightleftharpoons 2Cl^-$	1,358
Oxigênio	$O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightleftharpoons 2H_2O$	1,229

No nosso organismo, a quantidade de ferro livre e outros metais de transição disponíveis para iniciar a reação de Fenton é muito baixa. Uma overdose de íons de ferro livre, contudo, pode causar sérios danos a vários tecidos do corpo. Sob condições fisiológicas normais, os metais estão ligados em segurança para o transporte e armazenamento de proteínas, e o corpo é bem equipado com vários mecanismos para neutralizá-los em caso de quebra de uma ligação metal-proteína. Não obstante, danos a sítios específicos podem ocorrer quando o íon metálico está ligado a uma molécula alvo, como, por exemplo, H₂O₂, iniciando uma reação em cadeia radicalar nas proximidades do alvo. Vários autores demonstraram estes danos específicos devido ao HO[•] [HALLIWELL, 2007]. No entanto, parece que a dimensão deste dano é determinada mais pela disponibilidade e local do catalisador metálico do que pela geração excessiva de H₂O₂.

O radical superóxido também está envolvido no sistema Fenton, pois ele serve como agente redutor (e reciclador) para Fe(III), facilitando o dano causado por H₂O₂.

2.1.2 Radicais livres

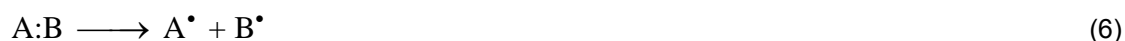
Radicaís livres podem ser basicamente definidos como quaisquer espécies capazes de existir independentemente de conter um ou mais elétrons desemparelhados. Um elétron desemparelhado é um elétron que ocupa sozinho um orbital atômico ou molecular. A presença de um ou mais elétrons desemparelhados geralmente faz com que radicaís livres sejam fracamente atraídos a um campo magnético (isto é, são paramagnéticos), o que faz com que algumas vezes sejam altamente reativos, ainda que a reatividade química dos radicaís varie bastante. Radicaís são formados pela perda de um único elétron de uma espécie não radicalar [HALLIWELL, 2007]:



ou ganhando um elétron



Radicaís também podem ser formados por fissão homolítica, quando uma ligação covalente é quebrada e cada elétron do par compartilhado permanece com uma parte da molécula quebrada, como se mostra na Equação 6:



Rigorosamente falando, a molécula de oxigênio diatômica pode ser também definida como um radical livre, já que ela possui dois elétrons desemparelhados. Uma das reações mais importantes do oxigênio é a sua redução à água, uma reação cujo potencial formal é de +0,815 V vs. EPH em pH 7. Embora esta reação seja termodinamicamente favorável, as reduções de oxigênio envolvendo a troca de 4 elétrons são muito raras. A redução de oxigênio procede normalmente via etapas de 1 ou 2 elétrons e podem apenas ocorrer desde que uma primeira reação de 1 elétron tenha ocorrido [GONZÁLEZ, 2008].

O oxigênio reage fracamente com outros radicais porque a transferência de elétron ao oxigênio é restringida pelo princípio de Pauli. Uma vez que 2 elétrons desemparelhados estejam localizados em dois diferentes orbitais π e tenham spins paralelos, o oxigênio estará limitado a aceitar um elétron de cada vez (alguns catalisadores são capazes de quebrar esta restrição de spin). Estes fatores determinam a reatividade química e bioquímica do oxigênio. Isso é algo crucial na biologia porque o consumo de oxigênio é regulado por sua reatividade cinética. Com isso, o oxigênio pode coexistir dentro da célula com vários agentes redutores, sem, no entanto, reagir rapidamente com eles, o que previne as reações de oxigênio randômicas que destruiriam um grande número de componentes celulares [HALLIWELL, 2007; GONZÁLEZ, 2008].

2.1.3 Oxigênio e seus derivados

O oxigênio também pode existir em mais formas reativas, isto é, duas formas de oxigênio singlete, o radical superóxido e o íon peróxido. O radical superóxido, $O_2^{\cdot-}$, é formado quando um único elétron é adicionado a uma molécula de O_2 (equação 7), e o íon peróxido, O_2^{2-} , é formado pela adição de 2 elétrons ao O_2 (Equação 8). O O_2^{2-} não é um radical e é facilmente reduzido a duas moléculas de óxido, $2 O^2-$. A adição de 4 elétrons leva à formação de água (Equação 9) [HALLIWELL, 2007].



O radical superóxido pertence às ERO. Este termo compreende não apenas radicais de oxigênio, mas também alguns derivados de oxigênio não-radicalares, como H_2O_2 , $HOCl$ e O_3 [HALLIWELL, 2007]. A Tabela 2 mostra as assim chamadas ERO.

Tabela 2: Exemplos de ERO radicalares e não-radicalares (adaptado de HALLIWELL, 2007).

Radicais	Não radicalares
Superóxido, $O_2^{\bullet -}$	Peróxido de hidrogênio, H_2O_2
Hidroxila, HO^{\bullet}	Ácido hipocloroso, HOCl
Peroxila, ROO^{\bullet}	Ozônio, O_3
Alcoxila, RO^{\bullet}	Peróxidos orgânicos, ROOH
Hidroperoxila, HO_2^{\bullet}	

Vários métodos têm sido usados e desenvolvidos na pesquisa de ERO. Métodos envolvendo a medida de DNA e/ou danos a proteínas expostas a radicais livres, ensaios para a determinação de peróxido de hidrogênio, radical superóxido e oxigênio singlete, ressonância de spin eletrônico (ESR), *spin trapping*, radiólise de pulso, método de degradação de desoxirribose, entre outros, têm sido empregados com o objetivo de clarificar o papel das ERO no estresse oxidativo e em outras doenças [HALLIWELL, 2007]. Na prática, a única técnica que consegue observar radicais livres diretamente é a ESR. A ESR é uma técnica espectroscópica que detecta elétrons desemparelhados e, assim, é específica para radicais livres.

A maioria dos radicais livres em sistemas biológicos é derivada do oxigênio (ERO), mas os derivados de nitrogênio (espécies reativas de nitrogênio, ERN) também existem [OLMOS, 2007] e possuem um importante papel no estresse oxidativo, que é definido como uma condição de alta atividade pró-oxidante devido aos radicais livres [FLOCCARI, 2005]. Os radicais livres mais reativos e danosos são o radical hidroxila, HO^{\bullet} , e o ânion peroxinitrato, $ONOO^-$. A química e os efeitos das espécies HO^{\bullet} e ROO^{\bullet} serão discutidos nas próximas seções.

2.1.3.1 Radical hidroxila

O radical hidroxila, HO^{\bullet} , é uma das espécies conhecidas mais reativas. Os primeiros estudos, conduzidos pela irradiação de soluções aquosas, demonstraram

que, uma vez iniciada, a reação em cadeia de ERO pode proceder facilmente atacando qualquer sítio de um alvo randômico. Em condições biológicas, todavia, ele reage próximo à velocidade controlada por difusão. Estima-se que o HO• tenha um tempo de meia-vida de 10^{-9} segundo nas células (Tabela 3). O HO• pode ser gerado por radiação, como radiólise de pulso, que é usado para a geração homogênea de espécies reativas derivadas da água [GONZÁLEZ, 2008]. Já que o componente majoritário de células vivas é água, a exposição à radiação de alta energia, como raios gama, resultará na produção de HO•. Outras fontes de HO• são as reações catalisadas por metais na presença de H₂O₂, a fissão homolítica de H₂O₂ induzida por UV, o metabolismo do etanol, a decomposição de ácido peroxinitroso, ozônio, a reação de ácido hipocloroso com O₂^{-•}, lipofilização, ultrassom, etc [HALLIWELL, 2007; JANIK, 2007].

Tabela 3: Tempos de meia-vida das principais ERO [RIBEIRO, 2005].

ERO	Tempo de meia-vida (s)
Radical hidroxila	10^{-9}
Radical alcoxila	10^{-6}
Radical peroxila	7
Oxigênio singlete	10^{-5}

As reações do HO• podem ser classificadas em três tipos principais: abstração de hidrogênio, adição e transferência de elétrons. A Tabela 4 mostra uma lista de constantes cinéticas de reações do HO•. Como pode ser observado, ele reage extremamente rápido com quase todos os tipos de moléculas encontradas em células vivas. As reações do HO• são normalmente controladas por difusão, pois são apenas limitadas pela velocidade com a qual o HO• alcança a molécula alvo [HALLIWELL, 2007].

Tabela 4: Constantes cinéticas de segunda ordem para reações de HO• (adaptado de HALLIWELL, 2007).

Composto	pH	k (M ⁻¹ s ⁻¹)
Fe ²⁺	2,1	$3,5 \times 10^8$
H ₂ O ₂	7	$4,5 \times 10^7$
EDTA	-	$2,8 \times 10^9$
Hemoglobina	-	$3,6 \times 10^{10}$
Histidina	6,7	$3,0 \times 10^9$
Glicose	7	$1,0 \times 10^9$
Ácido ascórbico	1	$7,2 \times 10^9$
Ácido cítrico	1	$3,0 \times 10^7$
Glutationa	1	$8,8 \times 10^9$
Catalase	-	$2,6 \times 10^{11}$

2.1.3.2 Radical peroxila

O radical peroxila é um bom agente oxidante. Sua formação é uma etapa importante na peroxidação lipídica (Figura 1), mas ele pode ser formado também em sistemas não lipídicos, como as proteínas. A decomposição de peróxidos pelo aquecimento ou pela catálise de metais de transição pode gerar tanto o radical peroxila quanto o radical alcóxila. Em laboratório, o radical peroxila é gerado por azo-iniciadores, que se decompõem sob aquecimento, e reagem rapidamente com O₂ gerando ROO•. Os radicais peroxila gerados a partir de azo-iniciadores podem induzir a peroxidação lipídica e danificar proteínas. De fato, eles são comumente utilizados para avaliar a capacidade antioxidante, como no ensaio TRAP (seção 2.3.1.4) [HALLIWELL, 2007].

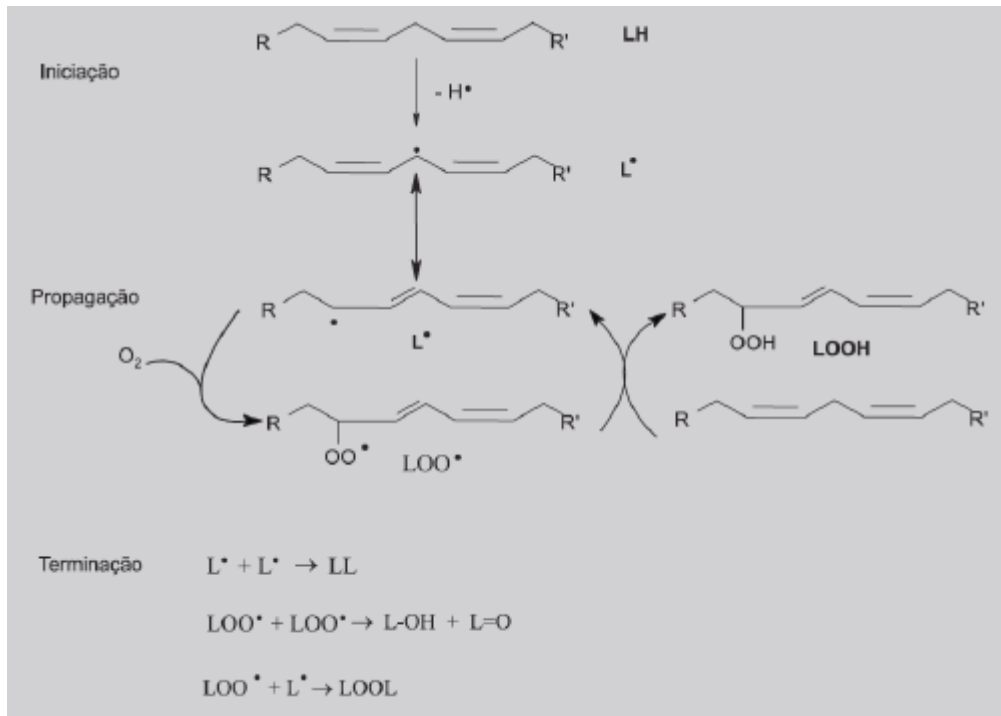
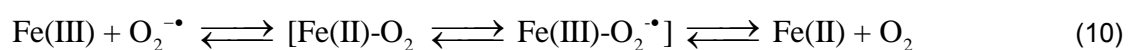


Figura 1: Diagrama da peroxidação lipídica: a oxidação dos lipídios ocorre em três etapas: iniciação, propagação e terminação. Na etapa de iniciação, as ERO reagem com um substrato lipídico (LH) formando radicais lipídicos ($L\cdot$). Estes radicais são instáveis e reagem com o oxigênio formando radicais peróxido lipídicos ($LOO\cdot$). Estes também são instáveis e reagem com outra molécula lipídica, produzindo radicais idênticos, o que propaga a reação. A reação termina quando dois radicais se ligam, formando uma molécula estável não radical [CUSTÓDIO, 2009].

2.1.4 Reação de Fenton

No organismo humano, há o potencial efeito danoso de metais “livres” ou apropriadamente complexados, devido à sua habilidade em reagir com $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , catalisando a geração de $HO\cdot$. Ferro e cobre são os metais mais conhecidos para catalisar a decomposição de H_2O_2 [NEYENS, 2003], mas outros metais podem agir de forma semelhante. Acredita-se que este processo ocorra da seguinte forma: primeiro, $O_2^{\cdot-}$ reduz Fe^{3+} a Fe^{2+} , via formação de espécies perferil, que possuem uma estrutura entre os complexos $Fe(II)-O_2$ e $Fe(III)-O_2^{\cdot-}$ mostrados na Equação 10. Esta reação libera Fe^{2+} e O_2 . Então segue-se a reação de Fenton, como descrito na Equação 11 [GONZÁLEZ, 2008].

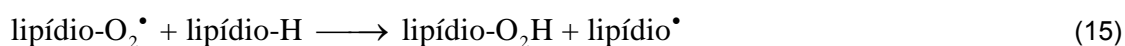




Uma vez que HO^\bullet tenha sido liberado, ele inicia o processo de peroxidação lipídica nas membranas pela retirada de átomos de hidrogênio de ácidos graxos poli-insaturados (Equação 12) ou de outras reações em cadeia radicalares. Sabe-se também que o radical hidroperoxil, HO_2^\bullet , pode iniciar a cadeia de peroxidação lipídica (Equação 13), entretanto, sob condições fisiológicas, há muito pouco desta forma protonada de O^{2-} ($\text{pK}_a \sim 4,8$) [HALLIWELL, 2007].



Sob condições aeróbicas, o radical lipídico reagirá com oxigênio, gerando o radical peroxila, que consegue retirar outros átomos de hidrogênio e propagar a reação em cadeia da peroxidação lipídica [VILLA, 1997], como se mostra nas Equações 14 e 15:



Sob condições fisiológicas, $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ pode adicionalmente reagir com peróxidos de lipídios ($\text{lipídio-O}_2\text{H}$) para gerar radicais peroxila ($\text{lipídio-O}_2^\bullet$) e alcoxila (lipídio-O^\bullet), que podem retirar outros átomos de hidrogênio e acelerar a velocidade da peroxidação [VILLA, 1997; HALLIWELL, 2007]. Entretanto, é bom ter em mente que as reações químicas que ocorrem em sistemas contendo íons ferro e peróxido de hidrogênio e as que descrevem a peroxidação lipídica são muito mais complicadas do que as equações acima sugerem. Os produtos da oxidação lipídica têm mostrado um importante papel em doenças cardiovasculares, como trombose e arteriosclerose, e em muitas doenças crônicas como artrite, câncer, diabetes e a mal de Alzheimer [HALLIWELL, 2007].

2.2 Fitoterapia e Plantas Medicinais

Fitoterapia é o uso de plantas para prevenir e tratar doenças ou promover o bem-estar. Esta prática data da Antiguidade, sendo provavelmente o método mais antigo existente que a humanidade utiliza para tratar doenças. Por esta razão, plantas medicinais (vegetais que possuem atividade farmacológica) têm sido usadas terapêuticamente ao redor do mundo, sendo um aspecto importante em várias culturas medicinais tradicionais. Embora baseada em modelos teóricos e culturais diferentes, a fitoterapia está de alguma forma integrada a essas diferentes doutrinas [AMEH, 2010]. A definição da Organização Mundial de Saúde – OMS, do inglês World Health Organization (WHO) – para plantas medicinais diz que “são aquelas que têm uma história de uso tradicional como agente terapêutico, sendo também denominada de Medicina Tradicional, Alternativa ou Complementar” [WHO – World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/topics/traditional_medicine/en/>. Acesso em jun. 2010]. Atualmente, grande parte da comercialização de plantas medicinais é feita em farmácias e lojas de produtos naturais, as quais em sua grande maioria não possuem certificado de qualidade, assim como pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, além de problemas associados à identificação errônea da planta, possibilidades de adulteração, interações entre plantas medicinais e medicamentos alopáticos, efeitos de superdosagens, reações alérgicas ou tóxicas. A diferença entre planta medicinal e fitoterápico está na elaboração da planta para uma formulação específica, o que caracteriza um fitoterápico [VEIGA JUNIOR, 2005]. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), “fitoterápicos são medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais. Eles são obtidos empregando-se exclusivamente derivados de droga vegetal (extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco e outros). Os fitoterápicos, assim como todos os medicamentos, devem oferecer garantia de qualidade, ter efeitos terapêuticos comprovados, composição padronizada e segurança de uso para a população. A eficácia e a segurança devem ser validadas através de levantamentos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas em bibliografia e/ou publicações indexadas e/ou estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos” [ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em jun. 2010]. De fato, a Resolução-RDC nº 48, de 16/03/2004 exige a apresentação de uma série de relatórios que atestem, para o preparado fitoterápico a ser registrado, a segurança e a eficácia, bem como normas de produção e controle de qualidade visando à reprodutibilidade e constância de princípios ativos e/ou marcadores característicos da espécie vegetal [Ministério da Saúde. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/-rdc_48_16_03_04_registro_fitoterapicos%20.pdf>. Acesso em jun. 2010]. O estudo de plantas medicinais envolve o isolamento de substâncias ativas e tem proporcionado inúmeras descobertas importantes para a humanidade. Seu desenvolvimento conta com um número cada vez maior de profissionais, estabelecendo um caráter multi e interdisciplinar para as pesquisas que visam referendar seu uso. Técnicas de descoberta de fármacos têm sido aplicadas para a padronização da medicina natural, principalmente para a elucidação analítica dos compostos [BALUNAS, 2005; PLAZA, 2007].

A OMS reconhece que 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam práticas tradicionais nos cuidados básicos de saúde. Deste universo, 85% utilizam plantas ou preparados. Nesse sentido, a OMS recomenda a difusão mundial dos conhecimentos necessários ao uso racional das plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos [Ministério da Saúde. Disponível em: <www.portal.saude.gov.br>. Acesso em jun. 2010]. Em sua estratégia global sobre a medicina tradicional e a medicina complementar e alternativa para os anos de 2002 a 2005, a OMS reforçou o compromisso de estimular o desenvolvimento de políticas públicas com o objetivo de inseri-las no sistema oficial de saúde dos seus 191 estados-membros. E o Brasil, com sua diversidade genética vegetal estimada em 55 mil espécies catalogadas [PLAZA, 2007], possui ampla tradição de uso das plantas medicinais vinculado ao conhecimento popular e transmitido por gerações, além de tecnologia e, principalmente, recursos humanos especializados para validar cientificamente este conhecimento. De fato, o Decreto nº 5813, de 22/06/2006, aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que tem por objetivo geral “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” [Ministério da Saúde. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Decreto_N_5813.pdf>. Acesso em jun. 2010].

Em países industrializados, o uso da fitoterapia decaiu no final da primeira parte do século 20, devido ao desenvolvimento e produção de remédios sintéticos. Durante as últimas décadas, no entanto, a fitoterapia começou a ser novamente utilizada, mesmo nesses países industrializados. Em países do terceiro mundo, a fitoterapia nunca deixou de ser importante, sendo frequentemente o único sistema terapêutico disponível à população [WHO – World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/topics/traditional_medicine/en/>. Acesso em jun. 2010]. A primazia da fitoterapia em medicina torna-se evidente a partir do grande número de drogas modernas que devem sua origem aos recursos etnobotânicos [WHO guidelines, 2007; AMEH, 2010]. Produtos naturais proporcionam um ponto de início para novas substâncias sintéticas, com diversas estruturas e com vários estereocentros que podem ser trocados sinteticamente. Fármacos derivados de plantas medicinais podem servir não somente como novas drogas por si só, mas também como modelo para novas drogas otimizadas pela química medicinal e sintética [BALUNAS, 2005]. Segundo Newman e Cragg [NEWMAN, 2007], as maiores áreas que têm sido investigadas pela indústria farmacêutica são as relacionadas com as doenças infecciosas, câncer, anti-hipertensivos e anti-inflamatórios. Na área antibacteriana, a grande maioria das novas substâncias ativas, também conhecidas como Novas Entidades Químicas (NCEs), são de origem natural (10,2%), derivadas de produtos naturais (65,3%) e sintéticas, porém modeladas a partir de produtos naturais (1%), ou seja, 76,5% do total de fármacos. As drogas anticâncer, entre as não biológicas, estão divididas entre produtos naturais (11,1%), derivadas de produtos naturais (30,9%), sintéticas (22,2%) e modeladas a partir de produtos naturais (35,8%), ou seja, apenas 22,2% do total são totalmente sintéticas. Atualmente, a pesquisa envolvendo plantas medicinais é uma das áreas com o mais rápido crescimento dentro das pesquisas biomédicas. Isso é ilustrado pela seguinte observação: o número de citações na *PubMed* de 1990 a 2007 contendo a palavra “fitoterapia” saltou de menos de 100 em 1990, para mais de 1000 em 1998; então, para quase 10000 em 2004, e para mais de 15000 em 2007 [Wikipédia – phytotherapy, 2010]. Atualmente, o número de citações já ultrapassa a barreira de 20000 citações.

Até 80% da população de países do Terceiro Mundo (Ásia e África) depende de medicina tradicional. Em muitos países industrializados, 70 a 80% da população já usou alguma forma de medicina alternativa ou complementar. O tratamento

fitoterápico é a forma mais popular da medicina tradicional, e é um mercado altamente lucrativo. Receitas anuais da Europa Ocidental alcançaram US\$ 5 bilhões em 2003-2004. Na China, a venda destes produtos totalizou US\$ 14 bilhões em 2005, enquanto no Brasil a soma foi de US\$ 160 milhões em 2007 [WHO – World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/topics/traditional_medicine/en/>. Acesso em jun. 2010].

2.3.1 Fitoterápicos

Fitoterápicos são metabólitos secundários presentes nas plantas. São também chamados fitoquímicos, para diferenciá-los dos metabólitos primários, necessários no crescimento e manutenção da planta, como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos. Já no metabolismo secundário são sintetizadas substâncias que, a princípio, não possuem função essencial. Porém, são essas substâncias as responsáveis pela proteção do vegetal de diversos fatores [AMEH, 2010]. Com algumas propriedades específicas, estes metabólitos secundários agem, por exemplo, na defesa da planta contra diversos predadores e na atração ou repulsão diante de outros organismos. Alguns são toxinas, usadas para deter predadores; alguns são feromônios, usados para atrair insetos para a polinização; outros são fitoalexinas, que protegem contra infecções microbiais, por exemplo. Assim, o metabolismo secundário acaba exercendo um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente, ou seja, representa uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante. Conseqüentemente, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais [GOBBO-NETO, 2007; PLAZA, 2007; AMEH, 2010]. Dentre os fatores ambientais que influenciam o conteúdo dos metabólitos secundários pode-se citar a sazonalidade, ritmo circadiano, desenvolvimento da planta, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes (macro e micronutrientes), altitude, poluição atmosférica e indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos. Assim sendo, a constância de concentrações de metabólitos secundários praticamente não existe, podendo ocorrer variações tanto na qualidade como na quantidade dos compostos químicos. Plantas da mesma espécie, cultivadas em diferentes localidades,

normalmente possuem os mesmos componentes, mas as porcentagens em que estão presentes podem diferir [CAPASSO, 2000]. Embora as plantas sintetizem vários fitoquímicos, a maioria é derivada de relativamente poucas rotas biossintéticas [AMEH, 2010]. Em plantas medicinais, outros fatores, como condições de coleta, estabilização e estocagem, também podem ter grande influência [GOBBO-NETO, 2007].

Comparada à terapia nutricional, a fitoterapia é mais complicada devido ao uso de muitos fitonutrientes contendo diversas estruturas químicas e atividades biológicas. A maioria das estratégias fitoterápicas está à frente da base científica e sem um controle rigoroso de qualidade, segurança e eficiência. Entretanto, a fitoterapia possui longa história e tem sido largamente utilizada. Algumas estratégias fitoterápicas têm sido bem reconhecidas desde que tenham sido extensivamente estudadas do ponto de vista químico e farmacológico e são parcialmente comprovadas por testes clínicos [ZHAO, 2007].

Estudos epidemiológicos mostraram efeitos protetores de dietas à base de plantas em doenças cardiovasculares e câncer, assim como em outros problemas de saúde, como obesidade e diabetes [BLAND, 1996; BHATHENA, 2002; PLOSC, 2006]. Em particular, uma boa correlação foi sugerida entre a dose de flavonoides consumida na dieta e o decréscimo de mortes provenientes de doenças cardíacas, em parte devido à inibição da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e à reduzida agregabilidade de plaquetas por flavonoides [BHATHENA, 2002]. A dose diária de flavonoides situa-se entre 23 mg/dia na Holanda (principalmente por chás, cebolas, maçãs e vinho tinto) e 170 mg/dia nos EUA. O consumo de 30 a 50 mg/dia de isoflavonas da soja pode ajudar a diminuir a incidência de câncer de mama [BLAND, 1996]. Compostos bioativos ocorrem normalmente em pequenas quantidades em plantas alimentícias como constituintes nutricionais. Estudos bioquímicos e fitoquímicos têm identificado os compostos bioativos exatos, como flavonoides, alcaloides, terpenoides, e outras classes de fitoquímicos [KRIS-ETHERTON, 2002]. Alguns produtos naturais com fortes atividades biológicas têm sido desenvolvidos para a medicina aplicados à quimioterapia, como a vincristina (Oncovin®) e Taxol®. Praticamente todas as plantas alimentícias possuem produtos naturais específicos com certa bioatividade [KRIS-ETHERTON, 2002]. O hidroxitirosol de azeitonas e azeite de oliva é um potente antioxidante. O resveratrol encontrado em nozes e vinho tinto tem fortes atividades antioxidantes

antitrombótica, anti-inflamatória e anticâncer. Licopeno de tomates e outras frutas é um potente antioxidante carotenoide que protege contra câncer de próstata e inibe o crescimento de células tumorais em animais. Compostos organossulfurados em alho e cebola trazem vários benefícios multifuncionais à saúde humana. Naringenina (4, 5, 7 – hidroxiflavonona), encontrada na laranja-melancia, pode atrasar a desintoxicação hepática de medicamentos como a ciclosporina e assim potencialmente ajudar a prevenir a rejeição de órgãos transplantados [BLAND, 1996]. Todos estes exemplos são apenas uma pequena porção de recomendações terapêuticas fitonutricionais e nutricionais. Muitas outras plantas, que não são alimentícias, estão sendo estudadas devido ao seu potencial uso em fitoterapia. Os vegetais crucíferos, como couve, couve-flor e brócolis, possuem fitoquímicos únicos capazes de modificar o metabolismo do estrogênio [BHATHENA, 2002]. Um equilíbrio ideal de estrogênio tem implicações para a prevenção do câncer e do envelhecimento bem sucedido tanto em homens quanto em mulheres. A *Food Federal and Drug Administration* (FDA) raramente faz recomendações para nutracêuticos ou fitonutrientes. Porém, em 2001, a FDA aprovou a alegação de que fibra solúvel de alimentos como aveia pode reduzir o colesterol e o risco de doenças cardíacas. A fibra dietética nutracêutica demonstrou reduzir níveis de colesterol e manter o peso, prometendo assim benefícios para pacientes com obesidade e diabetes [GRUNBERGER, 2007].

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides. Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico. São responsáveis pelo sabor, odor e coloração de diversos vegetais. Essa classe de substâncias é responsável pela proteção das plantas contra os raios ultravioletas, insetos, fungos, vírus e bactérias. A proteção contra a fotodestruição proporcionada por esses compostos é atribuída às suas propriedades de absorver ou dissipar a energia solar. Quimicamente dizendo, são substâncias que possuem pelo menos um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila [GOBBO-NETO, 2007]. Para a formação biossintética dos compostos fenólicos ocorre a combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivados deste [PLAZA, 2007]. Há vários relatos na literatura apontando os compostos fenólicos como substâncias potencialmente ativas frente a testes químicos e biológicos, o que indica que essa classe de substâncias é totalmente promissora na descoberta de novos fármacos.

Eles são geralmente encontrados e ingeridos pelo homem através de alimentos originários de plantas. Flavonoides, taninos, antocianinas e outros constituintes fenólicos possuem potencial antioxidante, impedindo o efeito danoso dos radicais livres. Visando à melhoria e à sustentação da saúde, é de vital importância o consumo dessas fontes naturais de substâncias para nosso organismo, pois os compostos fenólicos contribuem para a manutenção do equilíbrio pró e antioxidante de sistemas biológicos, desempenhando função essencial na prevenção de várias doenças [PLAZA, 2007].

2.3.2 Flavonoides

A estrutura básica dos flavonoides é um esqueleto de 15 átomos de carbono organizados em três anéis (C6-C3-C6), denominados A, B e C (Figura 2). As várias classes de flavonoides diferem quanto ao nível de substituição do anel C, enquanto compostos individuais dentro da mesma classe diferem no padrão de substituição dos anéis B e C. Os flavonoides geralmente ocorrem em plantas como derivados glicosilados, e contribuem para os tons azul, vermelho e laranja, em folhas, flores e frutas. Além de vários vegetais e frutas, os flavonoides são encontrados em sementes, nozes, grãos, condimentos, e diferentes plantas medicinais, assim como em bebidas, como vinho, chá e cerveja [PIETTA, 2000].

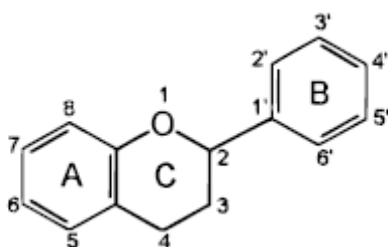


Figura 2: Estrutura básica de um flavonoide [PIETTA, 2000].

Estudos espectrofotométricos revelam que a maioria das flavonas e flavonóis exibem 2 bandas principais de absorção; a primeira entre 320 e 385 nm, que representa a absorção do anel B, enquanto a segunda (250 – 285 nm) corresponde

à absorção do anel A. Os grupos funcionais ligados ao esqueleto principal podem causar uma mudança na absorção, como a de 367 nm para o canferol (grupos 3,5,7,4'-hidroxi), 371 nm para quercetina (grupos 3,5,7,3',4'-hidroxi) e 374 nm para miricetina (grupos 3,5,7,3',4',5'-hidroxi). A ausência do grupo 3-hidroxil nas flavonas diferem-nas dos flavonóis [YAO, 2004].

Os flavonoides desempenham diferentes papéis na ecologia de plantas. Devido a suas cores atrativas, flavonas, flavonóis e antocianidinas podem agir como sinais visuais para a polinização de insetos. Em virtude de sua adstringência, catequinas e outros flavonóis podem representar um sistema de defesa contra insetos prejudiciais à planta. Podem agir também como antioxidantes para as ERO produzidas pelo sistema de transporte de elétrons da fotossíntese. Além disso, protegem a planta da radiação UV solar devido à sua propriedade de absorver este tipo de radiação [PIETTA, 2000].

Além de seus papéis fisiológicos nas plantas, os flavonoides são importantes componentes da dieta humana, embora sejam considerados como nanonutrientes. De fato, o nível para a ingestão de flavonoides é consideravelmente maior quando comparado com a vitamina C (70 mg/dia), vitamina E (7 a 10 mg/dia), e β -caroteno (2 a 3 mg/dia) [YAMASAKI, 1997]. A ingestão de flavonoides pode variar entre 50 e 800 mg/dia, dependendo do consumo de vegetais e frutas, e de bebidas específicas, como vinho tinto e cerveja não filtrada. Em particular, vinho tinto e chás contêm altos níveis (aproximadamente 200 mg por copo) de fenóis totais. Conseqüentemente, as variações no consumo destas bebidas são a principal causa para a variação da ingestão de flavonoides em diferentes países. Outra fonte significativa de flavonoides são as plantas medicinais [PIETTA, 2000].

2.3.2.1 Fontes naturais de flavonóides

Flavonoides são o grupo mais comum e amplamente distribuído de compostos fenólicos em plantas. São parte integral tanto da dieta de animais como de humanos. Como são fitoquímicos presentes em plantas, os flavonoides não podem ser sintetizados pelo corpo humano. São classificados em pelo menos 10 grupos químicos, sendo os mais importantes as flavanonas, flavonas, isoflavonoides,

flavanas, antocianinas e flavonóis (Tabela 5). Os flavonóis são os flavonoides mais abundantes nos alimentos, sendo a quercetina, o canferol e a miricetina os mais comuns. Flavanonas são encontradas principalmente em frutas cítricas, e as flavonas, no aipo. Catequinas estão presentes em grandes quantidades nos chás verde e preto, e em vinho tinto, enquanto as antocianidinas são encontradas em morangos e outras frutas vermelhas. Isoflavonas são encontradas quase exclusivamente em alimentos de soja [YAO, 2004].

Tabela 5: Principais classes de flavonoides e descrição de suas características básicas (adaptado de Yao, 2004).

Classes	Coloração	Exemplos	Comentários
Antocianinas	Azul, vermelha e violeta	Cianidina, delphinidina, peonidina	Encontradas predominantemente em frutas e flores. São usadas como corantes.
Flavanas	Incolor	Catequina, epicatequina, luteoforol, procianidina	Encontradas em frutas, chás (verdes ou pretos), lúpulo, nozes e água de coco. O sabor peculiar de algumas bebidas, frutas, chás e vinhos é devido, principalmente, à presença de flavanas.
Flavanonas	Incolor para um amarelo pálido	Hesperinidina, naringenina	Encontradas quase exclusivamente em frutas cítricas.
Flavonas	Amarelo pálido	Apigenina, luteolina, diosmetina, tangeretina, nobiletina, crisina	Encontradas quase exclusivamente em frutas cítricas, mas também em cereais, frutas, ervas e vegetais. Conferem o pigmento amarelo em flores.
Flavonóis	Amarelo pálido	Quercetina, rutina, miricetina, canferol	Presentes em diversas fontes, sendo predominantes em vegetais e frutas.
Isoflavonoides	Incolor	Daidzeína, genisteína	Encontrados quase exclusivamente em legumes, particularmente na soja.

2.3.2.2 Capacidade Antioxidante *in vitro* associada a flavonoides

De acordo com Halliwell e Gutteridge [HALLIWELL, 2007], os mecanismos de ação antioxidantes podem incluir: (1) a supressão da formação de ERO ou pela inibição de enzimas ou quelando elementos traço envolvidos na produção de radicais livres; (2) sequestrando ERO; e (3) protegendo as defesas antioxidantes. Os flavonoides já foram descritos como preenchendo a maioria destes critérios. Assim, seus efeitos são duplos. Os flavonoides inibem enzimas responsáveis pela produção de ERO, como a xantina oxidase e a NADH oxidase. Além disso, vários flavonoides quelam metais de forma eficiente. Ferro e cobre livres são potenciais precursores de ERO, como o radical hidroxila. Devido a seus baixos potenciais redox ($0,23 < E < 0,75$ V), os flavonoides são termodinamicamente capazes de reduzir radicais livres fortemente oxidantes, com potenciais redox na faixa de 2,13 a 1,0 V, como os radicais superóxido, peroxila, alcoxila e hidroxila [PIETTA, 2000].

Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de estabelecer a relação entre a estrutura dos flavonoides e sua capacidade antioxidante. A capacidade antioxidante dos flavonoides geralmente aumenta com o aumento do número de grupos hidroxila e diminui em compostos glicosilados [YAO, 2004]. De fato, o arranjo espacial dos substituintes é talvez o maior determinante da capacidade antioxidante. Tanto a configuração quanto o número total de grupos hidroxila influenciam substancialmente vários mecanismos antioxidantes. A capacidade de sequestrar radicais livres é primeiramente atribuída à alta reatividade dos substituintes hidroxila, sendo que a configuração destes grupamentos no anel B é o mais determinante na capacidade em sequestrar ERO. Estes grupamentos hidroxilas do anel B doam átomos de hidrogênio e elétrons aos radicais hidroxila e peroxila, por exemplo, estabilizando-os e dando origem a radicais flavonoídicos relativamente estáveis [HEIM, 2002].

As propriedades quelantes dos flavonoides contribuem para a sua atividade antioxidante. Através da remoção ou neutralização de íons ferro de hepatócitos, os flavonoides inibem os danos oxidativos. A quelação de cátions divalentes não torna os flavonoides inativos necessariamente, uma vez que o complexo ainda pode apresentar capacidade antioxidante contra ERO [HEIM, 2002].

2.3.2.3 Capacidade Antioxidante *in vivo* associada a flavonoides

Apesar das enormes evidências sobre o potencial antioxidante *in vitro* dos flavonoides, pouco se sabe sobre a sua eficiência *in vivo*, e isso pode ser atribuído ao pouco conhecimento sobre a sua biodisponibilidade em humanos. Foi provado que flavonoides presentes na dieta são absorvidos numa extensão que possibilita um efeito antioxidante [PIETTA, 2000]. A porcentagem de absorção normalmente não ultrapassa poucos porcentos da dose ingerida, como determinado pela medida no nível sanguíneo dos flavonoides intactos e seus conjugados. A composição dos alimentos pode representar um importante fator que afeta a biodisponibilidade. Proteínas podem ligar-se aos polifenóis, reduzindo sua disponibilidade; por outro lado, o álcool pode aumentá-la [SERAFINI, 1997], o que é evidenciado pelo aumento da absorção de polifenóis presentes no vinho tinto quando comparado com os níveis obtidos após o consumo de vinho tinto sem álcool. Além disso, observa-se um aumento na absorção destes compostos quando administrados na forma de complexos fosfolipídicos ao invés de sua forma livre [PIETTA, 1998].

Acredita-se que os flavonoides podem desempenhar sua primeira defesa antioxidante no trato digestivo, limitando a formação de EROs e sequestrando-os. Uma vez absorvidos, eles continuam a exercer efeito antioxidante. O efeito antioxidante *in vivo* pode ser evidenciado pela medida do aumento do potencial antioxidante total do plasma após uma única ingestão dos flavonoides, seja como alimento ou bebida, e correlacionando este valor ao curso do tempo dos flavonoides no plasma [PIETTA, 2000].

Os flavonoides são estáveis ao calor, mas facilmente perdidos pelo cozimento ou fritura. A biodisponibilidade dos flavonoides é apenas parcial, sendo que a proporção da quantidade ingerida absorvida varia de 0,2 a 0,9% para as catequinas dos chás a 20% para quercetina e isoflavonas. Assim, uma grande quantidade permanece não absorvida, e a mucosa gastrointestinal fica exposta a concentrações parcialmente altas destes compostos. Após a absorção, os flavonoides são conjugados no fígado, ou metabolizados a compostos fenólicos menores [YAO, 2004]. A biodisponibilidade de certos flavonoides difere acentuadamente

dependendo da fonte alimentícia. Por exemplo, a absorção de quercetina em cebolas é quatro vezes maior que a de maçãs ou chás [HOLLMAN, 1997].

2.3.2.4 Absorção, metabolismo e efeitos clínicos dos flavonóides

Além dos atributos estruturais e físico-químicos dos flavonoides, a absorção, a farmacocinética, a biotransformação e as atividades relativas dos metabólitos têm papel fundamental sobre os efeitos biológicos em organismos. Análises *in vitro* demonstram de forma efetiva e consistente a capacidade antioxidante de diversos flavonoides sob condições de estresse oxidativo. Para adicionar novos conhecimentos sobre as relações estrutura-atividade em áreas de nutrição e medicina, as futuras pesquisas precisam elucidar (i) a relação entre a absorção e a estrutura, (ii) a farmacocinética em humanos, (iii) a caracterização dos metabólitos dos flavonoides, e (iv) as relações estrutura-atividade e os efeitos à saúde desses metabólitos [HEIM, 2002].

Os flavonoides são absorvidos no trato gastrointestinal e são excretados inalterados ou como produtos metabólitos na urina e nas fezes [COOK, 1996]. Determinações do poder antioxidante em plasma e urina após a ingestão de chá verde demonstrou que a absorção dos antioxidantes é rápida [BENZIE, 1999]. Os antioxidantes entram na circulação sistêmica logo após a ingestão e causam um aumento significativo no status antioxidante do plasma, o que poderia diminuir o dano oxidativo ao DNA e, com isso, reduzir o risco de câncer. Foi mostrado que o flavonoide baicalina possui atividade anti-inflamatória e anti-HIV [LI, 2000], sendo que os flavonoides podem prover um meio para as indústrias no desenvolvimento de agentes anti-HIV.

Como os múltiplos benefícios para a saúde humana da dieta contendo plantas ricas em flavonoides estão bem documentados, o aumento de espécies de flavonoides bioativos em plantas alimentícias tornou-se de grande interesse. Tomates modificados geneticamente contêm altos níveis de flavonóis como quercetina e canferol, flavonóis glicosilados (quercitrina e rutina) e flavonas como luteolina e licopeno no tecido da casca [MEHTA, 2002, SCHIJLEN, 2006]. O nível de resveratrol em sementes de *Brassica napus* (colza ou couve-nabiça) tem também

aumentado significativamente [HÜSKEN, 2005]. O consumo destes tomates transgênicos mostrou render certos benefícios à saúde de ratos [REIN, 2006].

Uma vez que o propósito da ingestão de fitonutrientes é incorporá-los ao nosso organismo e permitir que melhorem a nossa saúde e tratem algumas doenças, assumimos que nossos corpos podem absorver estes compostos tanto quanto possível. Entretanto, muitos fitonutrientes não são totalmente absorvidos pelo corpo humano, e a porcentagem exata de absorção ainda precisa ser determinada. Informações sobre o seu metabolismo no corpo humano também estão faltando. Para alguns nutrientes, o aumento de sua taxa de absorção pode ser mais importante que o aumento de sua produção, uma vez que o gargalo atual em aliviar as deficiências nutricionais está na má absorção. A absorção, o metabolismo e as formas ativas de muitos metabólitos secundários de plantas em humanos ainda precisam ser determinados.

2.3 Capacidade antioxidante

É de grande interesse do público geral, médicos e especialistas, e de pesquisadores das ciências de saúde e alimentos, conhecer a capacidade antioxidante e os constituintes dos alimentos que consumimos. Devido à complexidade da composição dos alimentos, separar os diversos compostos antioxidantes e estudá-los individualmente torna-se caro e ineficiente, apesar das possíveis interações sinérgicas entre estes compostos na matriz. Com isso, é bastante atrativo aos pesquisadores possuir um método conveniente para a rápida quantificação da efetividade antioxidante na prevenção de doenças. No entanto, tais métodos ainda estão por ser desenvolvidos. Um ensaio para a avaliação da capacidade antioxidante total usando-se apenas uma reação química parece ser bastante irreal e de difícil desenvolvimento, ainda que haja vários métodos publicados reivindicando a medida da capacidade antioxidante total *in vitro*. Ironicamente, o maior problema é a falta de ensaios validados que possam medir de forma fidedigna a capacidade antioxidante de alimentos e amostras biológicas. Vários trabalhos têm sido publicados, e as opiniões variam consideravelmente.

Parece não haver um consenso, provavelmente porque a área de antioxidantes é um tópico bastante complexo.

Por exemplo, Rice-Evans et al [RE, 1999] desenvolveram o ensaio TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*), que foi largamente utilizado em amostras de alimentos. Em seu artigo de revisão, Sánchez-Moreno [SÁNCHEZ-MORENO, 2002] sugere que o ensaio do DPPH é um método fácil e exato para medir a capacidade antioxidante de frutas e vegetais. O ensaio ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*) possui larga aplicação na medida da capacidade antioxidante de amostras botânicas [PRIOR, 2000] e biológicas [CAO, 1998]. O ensaio TRAP (*total radical-trapping antioxidant parameter*) é também usado largamente [GHISELLI, 2000], assim como o ensaio TOSC (*Total Oxyradical Scavenging Capacity*) [WINSTON, 1998; REGOLI, 1999]. Todos estes ensaios diferem entre si em termos de substratos, sondas, condições reacionais e métodos de quantificação. Nota-se que é extremamente difícil comparar os resultados de ensaios tão diferentes. Enquanto isso, novos ensaios reivindicando a medida da capacidade antioxidante continuam a ser publicados.

A complexidade do tópico “antioxidantes” aliado à confusão introduzida por métodos muitas vezes questionáveis levam à confusão tanto a comunidade científica quanto a indústria. Em virtude da falta de ensaios-padrão, é difícil comparar os resultados publicados por diferentes grupos, e as indústrias de alimentos e nutracêuticas não conseguem realizar controles de qualidade rigorosos para produtos antioxidantes [HUANG, 2005].

A palavra “antioxidante” tornou-se incrivelmente popular na sociedade moderna, uma vez que ganhou publicidade pelos meios de comunicação de massas devido aos seus benefícios à saúde, já que ajuda a proteger o corpo humano contra danos causados por ERO [HALLIWELL, 1995]. Entretanto, o termo “antioxidante” é muito livremente utilizado. Frequentemente, o termo é usado para antioxidantes inibidores da peroxidação lipídica, como o α -tocoferol. Todavia, os radicais livres gerados *in vivo* danificam vários alvos além dos lipídios, incluindo proteínas, DNA e pequenas moléculas. Uma definição para antioxidante seria “qualquer substância que, quando presente em pequenas concentrações comparada à concentração de um substrato oxidável, significativamente retarda ou previne a oxidação desse substrato [HALLIWELL, 2007]. O termo “substrato oxidável” inclui praticamente tudo encontrado em alimentos, tecidos vivos incluindo proteínas, lipídios, carboidratos e

DNA. Quando ERO são formadas em sistemas vivos, vários antioxidantes entram em ação, como α -tocoferol, ácido ascórbico e proteínas, como a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase e catalase. A importância relativa destes vários antioxidantes *in vivo* depende de qual ERO é formada, como é gerada, onde é gerada e qual alvo de dano é monitorado [HALLIWELL, 1995].

Dependendo da disciplina científica, o escopo e os alvos de proteção são significativamente diferentes. Na indústria química, antioxidantes são compostos que retardam a auto-oxidação de um produto químico, como a borracha ou o plástico. Em alimentos, antioxidantes são compostos que previnem que as gorduras dos alimentos rancifiquem, assim como são “substâncias que em alimentos significativamente diminuem os efeitos adversos de espécies reativas, como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, em funções normais fisiológicas em humanos” [HUANG, 2005]. Assim como as outras definições, esta definição não limita os mecanismos de ação antioxidantes. Assim, os antioxidantes presentes em alimentos podem sequestrar espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio para interromper reações em cadeia radiculares, ou podem inibir que oxidantes reativos sejam formados. Antioxidantes biológicos incluem antioxidantes enzimáticos (como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) e antioxidantes não-enzimáticos, como inibidores de enzimas oxidativas, cofatores de enzimas antioxidantes, sequestradores de ERO e ERN, e quelantes de metais de transição [HUANG, 2005]. Muitos compostos que possuem atividade antioxidante são materiais facilmente oxidáveis. Eles podem tanto interceptar oxidantes primários (como peróxido de hidrogênio, diferentes radicais e metais de transição) quanto competir com reações de radicais livres para finalizarem o processo de auto-oxidação [HALLIWELL, 2007].

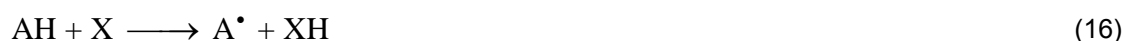
Vários critérios devem ser considerados ao avaliar-se o potencial antioxidante de um composto. Do ponto de vista químico e bioquímico, um antioxidante deve (i) reagir com espécies reativas específicas, (ii) possuir propriedades quelantes, (iii) interagir com outros antioxidantes e (iv) modular a expressão gênica. Outros critérios importantes referentes aos antioxidantes dizem respeito à absorção e biodisponibilidade, à sua concentração em tecidos, células e fluidos extracelulares e à sua localização (se em domínios aquosos, em membranas ou ambos). Um antioxidante “ideal” deve preencher todos esses requisitos [PACKER, 1995].

Os potenciais de redução para um elétron de diferentes radicais livres em pH 7 estão listados na Tabela 6. A forma reduzida de um radical livre que possui um potencial menor é capaz de neutralizar radicais livres de maior potencial. Como já mencionado, o HO[•] tem um potencial de redução muito alto e é, de longe, o mais reativo dentre os radicais livres biológicos [HALLIWELL, 2007].

Tabela 6: Potenciais-padrão biologicamente relevantes de diferentes espécies radicalares (adaptado de HALLIWELL, 2007).

Radical	<i>E</i> (V) em pH 7
Hidroxila, HO [•]	+2,31
Alcoxila, RO [•]	+1,60
Peroxila, ROO [•]	~+0,77-1,44
Urato, HU ^{•-}	+0,59
Tocoferol, T [•]	+0,50
Ascorbato, Asc ^{•-}	+0,28

Em resumo, a atividade antioxidante e sequestrante de radicais envolve a transferência de um elétron ou de um próton de um oxidante forte (como HO[•]) a uma molécula antioxidante. Esta passagem de carga destrói o caráter radical do oxidante pela formação de um radical derivado de um antioxidante mais estável e menos lábil. Este processo pode ser descrito pela reação mostrada na Equação 16:



Por exemplo, no caso do ascorbato (vitamina C), ele torna-se um radical livre (A[•] na Equação 16) doando um átomo de hidrogênio a uma espécie radicalar (X na Equação 16). O radical ascorbato é, entretanto, bastante estável devido à sua estrutura, que permite ressonância eletrônica. Além disso, o radical ascorbato é reduzido (e ascorbato é regenerado) por NADH ou redutases dependentes de NADH [GONZÁLEZ, 2008].

Mesmo que o tempo de vida de um radical derivado de um antioxidante seja usualmente maior e o potencial de redução e reatividade química sejam normalmente menores que o do oxidante sequestrado inicialmente, ele não é completamente inerte e pode ser tóxico, de acordo com as configurações celulares específicas.

2.3.1 Métodos usados para avaliação da capacidade antioxidante em alimentos e sistemas biológicos

No caso de alimentos, é necessário determinar a eficácia de antioxidantes naturais para a proteção do alimento contra danos oxidativos, a fim de evitar mudanças danosas e perda de valores comercial e nutricional. Com isso, a determinação rápida da capacidade antioxidante potencial em alimentos vegetais é necessária. Este método pode ser uma ferramenta útil na seleção entre diferentes espécies, variedades, grau de maturação e condições da cultura, para obter-se altas concentrações de antioxidantes naturais nos alimentos. Assim, a capacidade antioxidante total de um produto vegetal qualquer pode ser um parâmetro para avaliar a qualidade de um vegetal [SÁNCHEZ-MORENO, 2002].

No caso dos sistemas biológicos, o estresse oxidativo, que é um desequilíbrio entre ERO e os sistemas de defesa e reparo antioxidantes, mostrou estar envolvido no desenvolvimento de doenças degenerativas e em doenças relacionadas à idade. Com isso, a ingestão de antioxidantes da dieta e a avaliação da contribuição real dos alimentos ao status antioxidante em sistemas biológicos devem ser avaliadas [SÁNCHEZ-MORENO, 2002; HALLIWELL, 2007].

Vários substratos, sistemas e métodos analíticos são empregados em testes para a avaliação da efetividade de antioxidantes, uma evidência de que diferentes métodos são necessários para se avaliar os diferentes efeitos dos antioxidantes. A metodologia empregada precisa ser cuidadosamente interpretada de acordo com os sistemas e o método analítico utilizados na determinação do ponto final da oxidação [SÁNCHEZ-MORENO, 2002]. A efetividade antioxidante é avaliada monitorando-se a inibição da oxidação de um substrato apropriado. Após o substrato ser oxidado sob condições-padrão, a extensão da oxidação (ponto-final) é quantificada por

métodos químicos, instrumentais ou sensoriais. Assim, as características essenciais de qualquer teste são um substrato apropriado, um iniciador da oxidação e a determinação apropriada do ponto-final. As combinações de substrato, iniciador e ponto-final utilizados são numerosas, e, mesmo com a mesma técnica analítica, várias estratégias são possíveis. É possível classificar-se os testes antioxidantes em dois grupos: (i) os ensaios utilizados para avaliar a peroxidação lipídica, em que um lipídio ou uma lipoproteína sob condições padrão é usada, e o grau de inibição da oxidação é medido; e (ii) os ensaios que medem a habilidade de sequestrar radicais livres [SÁNCHEZ-MORENO, 2002]. Nesta pesquisa, será abordado apenas o segundo grupo.

2.3.1.1 Ensaio de fenóis totais por Folin-Ciocalteu

O método de Folin-Ciocalteu consiste em encubar por 10 h uma mistura de 100 g de tungstato de sódio ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 25 g de molibdato de sódio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 100 mL de HCl concentrado, 50 mL de H_3PO_4 85% e 700 mL de água. Após a incubação, adiciona-se 150 g de sulfato de lítio ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) à mistura, dando origem a uma solução de intensa cor amarela (o Reagente de Folin-Ciocalteu, RFC). A reação com fenóis presentes na amostra gera uma coloração azulada, possivelmente $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^{4-}$. Obviamente, o RFC não é específico para compostos fenólicos, uma vez que pode ser reduzido por muitos compostos não-fenólicos, como a vitamina C. Os compostos fenólicos reagem com o RFC em condições básicas (ajusta-se o pH a aproximadamente 10). A dissociação de um próton fenólico leva à formação do ânion fenolato, que é capaz de reduzir o RFC. O composto azul formado entre o fenolato e o RFC é independente da estrutura dos compostos fenólicos [HUANG, 2005]. Apesar da natureza química indefinida do RFC, o ensaio para fenóis totais é conveniente, simples e reprodutível. Como resultado, vários dados já foram obtidos, e este tornou-se um ensaio de rotina no estudo de antioxidantes fenólicos.

2.3.1.2 Ensaio TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)

No ensaio TEAC, o oxidante ($\text{ABTS}^{\bullet-}$) é gerado pela oxidação do ABTS^{2-} (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico)). Especificamente, 7 mmol de ABTS^{2-} é dissolvido em água e tratado com 2,45 mmol de persulfato de potássio, e a mistura permanece em temperatura ambiente por 12 a 16 horas, gerando uma solução azul escuro. Esta solução é diluída com etanol ou tampão (pH 7,4) até que a absorvância atinja um valor de 0,7 a 734 nm. Um mililitro desta solução é misturado com 10 μL de amostra. A mistura é aquecida a 30 °C e a absorvância é obtida após 1, 4 e 6 min. A diferença das absorvâncias é plotada versus as concentrações do antioxidante, gerando uma reta. A concentração de antioxidantes, dada pela mesma variação percentual de absorção do $\text{ABTS}^{\bullet-}$ de 1 mM de Trolox, é considerada como TEAC. Devido à fácil execução, o ensaio TEAC é amplamente utilizado no estudo da capacidade antioxidante [HUANG, 2005].

2.3.1.3 Ensaio FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Neste ensaio, um sal férrico, $\text{Fe(III)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3$ (TPTZ=2,4,6-tripiridil-s-triazina), é usado como oxidante. Não há grandes diferenças entre os ensaios TEAC e FRAP, exceto que o ensaio TEAC ocorre em pH neutro, e o FRAP em pH ácido (pH 3,6). O ensaio FRAP envolve os seguintes procedimentos: o oxidante (reagente FRAP) é preparado misturando-se 2,5 mL de uma solução de TPTZ 10 mM em HCl, 25 mL de tampão acetato e 2,5 mL de uma solução de $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 20 mM. Esta solução possui 1,67 mM de Fe(III) e 0,83 mM de TPTZ. Para a análise, 300 μL do reagente FRAP recém-preparado é aquecido a 37 °C, e faz-se a leitura dessa solução como branco a 593 nm; então 10 μL de amostra e 30 μL de água são adicionados. As absorvâncias são lidas a cada 15 segundos, até o tempo final de 4 min. A mudança de absorvância ($\Delta A = A_{4\text{min}} - A_{0\text{min}}$) é calculada e relacionada a ΔA da solução padrão de Fe(II). A variação de absorvância é linearmente proporcional à concentração do antioxidante. Uma unidade FRAP é definida arbitrariamente como a redução de 1 mol de Fe(III) a Fe(II) [HUANG, 2005].

2.3.1.4 Ensaio TRAP (*Total Radical-trapping Antioxidant Parameter*)

Wayner et al. [WAYNER, 1985] introduziram este ensaio para a determinação do status antioxidante do plasma humano. Os radicais peroxila são gerados a uma taxa controlada pela termodegradação de um azo-iniciador, como o 2,2'-azobis (2-metilamidinopropano) (ABAP). Após a adição de ABAP ao plasma, a oxidação de materiais oxidáveis é monitorada pela medida do oxigênio consumido durante a reação. O período de indução, no qual a oxidação é inibida pelos antioxidantes no plasma, é comparado ao do Trolox, usado como antioxidante de referência, e então quantitativamente relacionado à capacidade antioxidante do plasma. Este ensaio também pode ser aplicado para a avaliação da capacidade antioxidante de alimentos e bebidas [SÁNCHEZ-MORENO, 2002].

2.3.1.5. Ensaio TOSC (*Total Oxyradical Scavenging Capacity*)

O ensaio TOSC baseia-se na inibição proporcionada por antioxidantes à formação de etileno a partir da reação entre ácido α -ceto- γ -metiolbutírico (KMBA) e ERO. O ensaio permite o estudo da capacidade antioxidante de amostras contra três diferentes ERO de relevância fisiológica – peroxinitrito e os radicais peroxila e hidroxila. No ensaio TOSC, há a formação das ERO na presença das amostras e de KMBA. Os radicais peroxila são formados pela termodegradação de ABAP, enquanto que radicais hidroxila são formados pela reação de Fenton na presença de ascorbato. Peroxinitrito é produzido na decomposição de 3-morpholinosyndnonimine-N-ethylcarbamide [RIGOLI, 1999]. Na presença de ERO, há a decomposição de KMBA e a consequente liberação de gás etileno. A presença de compostos antioxidantes das amostras diminui a formação de etileno, sendo que a sua formação é monitorada por 60 minutos por cromatografia gasosa e comparada com a formação de etileno produzida pelo branco (adição de água ao invés de amostras). A avaliação da capacidade antioxidante pelo ensaio TOSC, é feita pela

relação entre as áreas obtidas para as curvas cinéticas das amostras e do controle (branco). Um valor de 0% caracteriza uma amostra sem propriedade antioxidante, já uma solução que iniba completamente a formação de etileno recebe um valor de 100% para a capacidade antioxidante [WINSTON, 1998; RIGOLI, 1999].

2.3.1.6 Ensaio do DPPH[•] (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

O DPPH é um radical livre nitrogenado orgânico e disponível comercialmente. Possui seu máximo de absorção por volta de 515 nm. O progresso da reação do DPPH[•] com um antioxidante é monitorado por espectrofotometria, após 30 min a 515 nm. Com a sua redução, a cor da solução muda, de violeta para amarelo, e a porcentagem de DPPH[•] remanescente é proporcional à capacidade antioxidante da amostra [HUANG, 2005]. Do ponto de vista metodológico, o método do DPPH[•] é recomendado por ser fácil e exato na medida da capacidade antioxidante de frutas e vegetais. O resultado é altamente reprodutível e comparado a outros métodos, como o ABTS [SÁNCHEZ-MORENO, 2002].

2.3.1.7 Ensaio para a determinação da capacidade antioxidante contra o radical superóxido (O₂^{•-})

A capacidade antioxidante contra o radical superóxido é medida em termos de inibição de geração do O₂^{•-} com o sistema enzimático hipoxantina/xantina-oxidase. O O₂^{•-} é gerado usando-se uma reação não-enzimática de metassulfato de fenazina na presença de NADH e oxigênio molecular. Em ambas as estratégias, o O₂^{•-} reduz nitroazul de tetrazólio (NBT) a formazan em pH 7,4 e temperatura ambiente, e a geração de formazan é acompanhada por espectrofotometria em 560 nm. Qualquer molécula capaz de reagir com o O₂^{•-} inibe a produção de formazan [SÁNCHEZ-MORENO, 2002].

2.3.1.8 Ensaio para a determinação da capacidade antioxidante contra peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Peróxido de hidrogênio é inerte em baixas concentrações. Em condições fisiológicas, o poder de oxidação do H_2O_2 está ligado à sua combinação com Fe(II) (reação de Fenton). Biologicamente, o H_2O_2 é convertido a oxigênio e água pela ação da catalase [HUANG, 2005]. A capacidade antioxidante contra H_2O_2 é facilmente determinada. O ensaio mais comum emprega peroxidase (HRP, peróxido de hidrogênio oxidoreductase), proveniente de raiz de rábano silvestre (*horseradish root*), que usa H_2O_2 para oxidar a escopoletina em um produto não-fluorescente. Na presença de um antioxidante putativo, a oxidação da escopoletina é inibida, e a capacidade antioxidante contra H_2O_2 pode ser monitorada [HALLIWELL, 2007].

2.3.1.9 Ensaio para a determinação da capacidade antioxidante contra o radical hidroxila ($HO\cdot$)

Biologicamente, o radical hidroxila é gerado quando H_2O_2 reage com Fe(II) (reação de Fenton). Contudo, a mistura Fe(II)/ H_2O_2 possui desvantagens em ensaios de capacidade antioxidante porque muitos antioxidantes possuem a habilidade em quelar metais, alterando a atividade do Fe(II). Como resultado, é impossível distinguir se os antioxidantes são bons quelantes de metais ou bons sequestradores de radicais OH. Antioxidantes em alimentos (como a vitamina C) podem agir como pró-oxidantes, reduzindo Fe(III) a Fe(II), aumentando a produção de radicais OH. O radical OH é extremamente reativo e com tempo de meia-vida extremamente curto (10^{-9} s, Tabela 3) e pode atacar o DNA, proteínas e lipídios. Consequentemente, a determinação direta da capacidade antioxidante contra o radical OH de antioxidantes presentes em alimentos em sistemas biológicos é irreal, já que a concentração celular dos antioxidantes é insignificante se comparada à de outras moléculas biológicas.

A capacidade antioxidante contra radicais hidroxila pode ser calculada de acordo com o ensaio de Halliwell et al. [HALLIWELL, 1995]. Uma mistura de cloreto de ferro(III) e EDTA na presença de ascorbato reage para formar ferro(II)-EDTA e ascorbato oxidado. Com a adição de H_2O_2 , há a formação de ferro(III)-EDTA mais HO^\bullet , de acordo com a reação de Fenton. Os radicais não sequestrados pelos componentes da mistura de reação podem atacar a desoxirribose, e degradá-la numa série de fragmentos; alguns destes fragmentos reagem sob aquecimento com o ácido tiobarbitúrico em baixo pH, dando origem a um composto violeta. Assim, a capacidade antioxidante contra radicais hidroxila de uma substância adicionada à mistura de reação é medida com base na inibição da degradação da desoxirribose [HALLIWELL, 1995].

2.4 Monocamadas auto-organizadas

O crescimento das pesquisas envolvendo monocamadas auto-organizadas (SAM) é uma demonstração das alterações pelas quais a química vem passando. A Química foi se afastando das disciplinas tradicionais e passou a interagir cada vez mais com áreas como a física, a biologia e a engenharia. A fabricação e manipulação de camadas moleculares tem se tornado um tema central na química moderna [ULMAN, 1996]. As vantagens do uso de SAM na química eletroanalítica já são bem reconhecidas. A estruturação da interface sólido-líquido baseada em interações entre a monocamada e o analito permite a adaptação de superfícies com propriedades e funções específicas [MARKOVICH, 2001], ideais para o estudo envolvendo biosensores [HYUN, 2001].

Na nanotecnologia moderna, deseja-se obter um arranjo molecular num nível sólido e nano. Previamente, o método Langmuir-Blodgett (LB) foi geralmente usado para a construção de camadas moleculares ordenadas numa superfície sólida. Devido ao fato de as moléculas serem fisissorvidas na superfície sólida em filmes LB, suas estruturas facilmente mudam e rapidamente tornam-se randômicas. Por outro lado, a técnica de auto-organização (SA) tornou-se um dos mais populares métodos para a construção de camadas moleculares ordenadas dentro das últimas duas décadas, pois as monocamadas auto-organizadas (SAMs) são quimicamente

adsorvidas à superfície sólida e, conseqüentemente, sua estrutura ordenada deve ser mais estável. As SAMs de alquiltióis em metais, especialmente ouro, foram extensivamente estudadas devido a suas potenciais aplicações em vários campos, como sensores, inibidores de corrosão e dispositivos eletrônicos moleculares e biomoleculares, sendo que eletrodos modificados com SAMs desempenham papéis muito importantes dentro destas áreas [RUBINSTEIN, 2007].

A auto-organização molecular é um processo no qual uma superestrutura organizada é espontaneamente formada de um conjunto de moléculas que não estão correlacionadas uma à outra numa fase líquida ou gasosa [ALLARA, 1995; WHITESIDES, 2002]. A estrutura da auto-organização molecular pode ser dividida em dois tipos de sistemas organizados: (a) um sistema que se organiza num meio homogêneo, e (b) um sistema que se organiza numa interface heterogênea. Monocamadas auto-organizadas (SAMs) sob substratos pertencem ao último sistema organizado porque estas monocamadas necessitam de um suporte na superfície de um sólido ou líquido [RUBINSTEIN, 2007]. Dois diferentes tipos de processos de adsorção de SAMs em substratos são bem caracterizados: todas as moléculas componentes estão quimicamente ligadas uma a uma ao substrato, ou elas próprias polimerizam-se sob o substrato [ALLARA, 1995]. Um típico exemplo do primeiro caso são as SAMs de tióis sob eletrodos de ouro, o que envolve a interação específica de coordenação enxofre-ouro como a principal força motriz para a organização de compostos organossulfurados da solução ou fase gasosa à superfície de ouro [ULMAN, 1996; LOVE, 2005]. Para o último caso, SAMs à base de silano (SiH_4) são usadas para a modificação de superfícies de silício cobertas com um filme de óxido [RUBINSTEIN, 2007]. A essência desses processos de auto-organização é que nenhuma intervenção externa é necessária para guiar o processo uma vez que o processo de organização inicia [ALLARA, 1995].

É possível sintetizar várias moléculas, nas quais estruturas pré-designadas estão codificadas especificamente com as regras necessárias para a organização molecular. Isso se assemelha às biomoléculas na natureza, como se o DNA ou as proteínas estivessem codificadas por especificidade estrutural para expressar suas funções. No caso de SAMs de alcanotióis, o código é fixado em duas partes estruturais, que são um substituinte tiol e uma cadeia de alcanos. O substituinte tiol é um ligante eficaz em superfícies específicas, como o ouro, para que as moléculas componentes possam ser quimicamente adsorvidas da solução ou fase gasosa

[RUBINSTEIN, 2007]. A cadeia de alcanos forma a monocamada e serve como unidade estrutural que permite a organização espontânea da monocamada fortemente empacotada através de interações do tipo van der Waals entre as cadeias de alcanos [ALLARA, 1995]. A estrutura esquematizada de uma SAM de alcanotióis é mostrada na Figura 3:

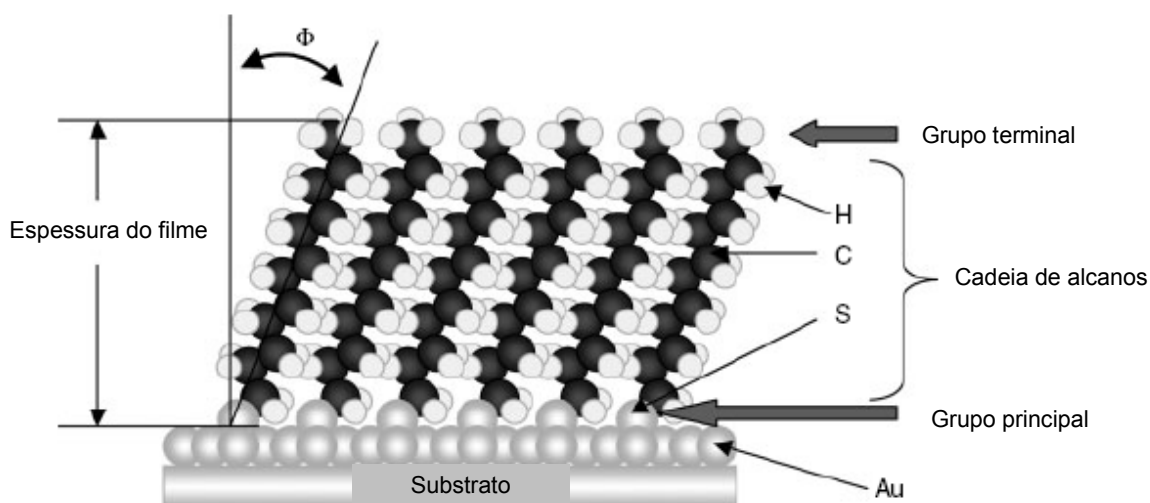


Figura 3: Estrutura esquematizada de uma SAM de alcanotióis (C12-SAM) em ouro (adaptado de RUBINSTEIN, 2007).

O ouro é o substrato mais frequentemente usado. Ao contrário de outros metais, o ouro não forma óxidos em sua superfície rapidamente e, em adição, ele não é contaminado mesmo após sua exposição à atmosfera, devido à sua inércia e interações iônicas [LOVE, 2005]. Esta característica em particular é de importância em aplicações biológicas de SAMs adsorvidas quimicamente em ouro, com sua biocompatibilidade [RUBINSTEIN, 2007] com células e proteínas. De fato, a aderência de células à superfície de ouro pode funcionar efetivamente sem evidências de toxicidade [LOVE, 2005].

2.4.1 Técnicas de preparação de SAMs de alcanotióis em ouro

A característica mais marcante das SAMs é a sua fácil preparação. As SAMs são facilmente obtidas pela exposição da superfície limpa de ouro a uma solução de um composto organossulfurado numa concentração de 0,01 a 1 mmol L⁻¹ por um período adequado, usualmente de poucos minutos a 1 dia, dependendo da estrutura do composto e do propósito da formação da SAM. Se uma monocamada mais ordenada é necessária, o tempo de imersão deve ser mais longo. O processo de formação da SAM é determinado pela energia e pela cinética de adsorção da SAM [SCHREIBER, 2000]. Consequentemente, isto pode depender da estrutura do composto organossulfurado, sua concentração na solução e da polaridade e estrutura do solvente utilizado. O solvente mais usado é etanol mas as SAMs podem ser preparadas usando-se vários solventes, como hexadecano, iso-octano, tetracloreto de carbono, ciclo-octano, tolueno, tetrahidrofurano, acetonitrila, e dimetilformamida. Não obstante, as SAMs geradas com estes solventes apresentam quase o mesmo comportamento macroscópico em suas características, como molhabilidade e espessura [RUBINSTEIN, 2007].

2.4.2 Química e energia de formação de SAMs de alcanotióis em ouro

Ao preparar-se uma SAM em ouro pelo método de deposição em solução, é difícil decidir as condições de preparação mais apropriadas em termos de solvente, concentração da solução do componente, temperatura de adsorção e tempo de imersão. Isso ocorre porque as diferentes estruturas e propriedades dos compostos organossulfurados por si só influenciam fortemente a energia e o mecanismo de formação da SAM na superfície. Entender a química de formação da SAM, mesmo no caso de modelos simples de alcanotióis, fornece pistas realmente úteis para a escolha das melhores condições de preparação. Aqui, serão descritas as questões fundamentais mais relevantes à química e energia de formação de SAMs de alcanotióis em ouro, uma vez que estes têm sido os mais investigados até agora. A reação de adsorção de alcanotióis à superfície de ouro pode ser formalmente

considerada como uma adição oxidativa de S-H ao ouro, provavelmente através do átomo de hidrogênio na superfície, seguido pela eliminação redutiva de hidrogênio [ULMAN, 1996].

As energias livre de dissociação para o processo de quimissorção de RSH ao ouro são as seguintes: RS-H (87 kcal mol^{-1}), RS-Au ($-40 \text{ kcal mol}^{-1}$), e $1/2\text{H-H}$ ($-52 \text{ kcal mol}^{-1}$) [RUBINSTEIN, 2007]. Consequentemente, a energia livre da reação global pode ser calculada como sendo de -5 kcal mol^{-1} , o que significa que a reação de quimissorção é um processo exotérmico.

A interação ouro-composto organossulfurado envolve dois regimes de adsorção, fisissorção e quimissorção. A primeira interação se dá entre a superfície de ouro e o adsorbato, e a última interação provém da ligação química entre o grupo de moléculas de enxofre do topo e a superfície de ouro. Schreiber et al. [SCHREIBER, 2000] compararam quantitativamente esses dois tipos de interações considerando várias estruturas de alcanos e os correspondentes alcanotióis. A energia de fisissorção para o decanotiol (C10) no ouro ($\sim 25 \text{ kcal mol}^{-1}$) pode ser comparada à correspondente energia de quimissorção ($\sim 30 \text{ kcal mol}^{-1}$) devido às contribuições aditivas das interações de van der Waals da cadeia carbônica.

2.4.3 Mecanismos de crescimento das SAMs

O entendimento do processo de crescimento das SAMs, assim como a energia de sua formação, é de fundamental importância para o avanço da físico-química de auto-organização molecular e também para a preparação de várias SAMs estruturadas em ouro. A energia de formação das SAMs tem impacto direto no crescimento das mesmas.

Bain et al. [BAIN, 1989] estudaram a cinética das SAMs de alcanotióis em ouro em solução etanólica. Os resultados revelaram que ao menos dois regimes cinéticos distintos podem ser caracterizados no processo de formação das SAMs. O primeiro regime, uma etapa extremamente rápida que se dá dentro de poucos minutos e é fortemente dependente da concentração da solução usada nas medidas, pode ser descrita aproximadamente pela curva de crescimento de Langmuir para adsorção. O segundo regime, constitui uma etapa lenta na qual as

propriedades macroscópicas finais da SAM são alcançadas apenas após diversas horas. Neste regime, presume-se que a cadeia alquil passa de um estado desordenado a células unitárias ordenadas [ULMAN, 1996; SCHREIBER, 2000]. O primeiro regime corresponde ao processo de adsorção ao ouro, no qual as cadeias alquil possuem um grande número de defeitos gauche em sua superfície. No segundo regime, o crescimento e o ordenamento da monocamada seguem o primeiro regime. A diferença na escala de tempo destes dois regimes é de no mínimo 2 ordens de magnitude [RUBINSTEIN, 2007]. Durante o segundo processo, as cadeias alquil estão altamente ordenadas e organizadas. Um processo subsequente ocorre a uma velocidade 35 vezes menor que o processo de arrumação das cadeias. Enquanto o processo de auto-organização em solução continua, filmes mais espessos que apenas uma monocamada são formados, indicando que um processo de fisissorção prossegue continuamente para os filmes de monocamada. Portanto, as camadas fisissorvidas produzidas pela imersão por longos períodos numa solução etanólica têm de ser removidas por uma lavagem com etanol após o procedimento de imersão. Este procedimento de rinsagem com um solvente é indispensável para o procedimento de preparação de SAMs numa superfície de ouro [RUBINSTEIN, 2007].

2.5 Cinética química

A segunda lei da termodinâmica estabelece o caráter espontâneo ou não-espontâneo de um determinado processo, incluindo reações químicas. Porém, ela não faz referência ao tempo necessário para que um processo ou reação espontânea se realize. Em vista desta limitação da termodinâmica, precisa-se de uma nova abordagem que incorpore a variável tempo à descrição dos fenômenos, abordagem esta que é fornecida pela cinética. A cinética química prediz com que velocidade os processos químicos ocorrem e, por isso, a variável tempo ocupa papel central. O estudo da cinética das reações químicas tem por objetivo a correlação matemática de dados experimentais, visando estabelecer hipóteses sobre os fatores determinantes da velocidade de uma reação e elucidar os mecanismos de reação envolvidos [NETZ, 2002].

Como exemplo da informação que pode ser obtida a partir das constantes de velocidade, considera-se o caso da formação de radicais hidroxila a partir de H_2O_2 na presença de íons Fe^{2+} ou Cu^+ [HALLIWELL, 2007]:



Se concentrações iguais de H_2O_2 são misturadas com iguais concentrações de Fe^{2+} e Cu^+ , a velocidade de formação de HO^\bullet com Cu^+ será 61,8 vezes maior ($4,7 \times 10^3 / 76$). Valores de constantes de velocidade podem ser aplicados para se ver o quão rápido uma reação *in vivo* pode ocorrer. Assim, mesmo reações com baixas constantes de velocidade podem ser biologicamente importantes se elas produzirem produtos altamente reativos, como o HO^\bullet [HALLIWELL, 2007].

A definição de velocidade de reação é de fundamental importância na cinética química. Diz-se que a velocidade da reação é a variação de concentração de uma espécie em relação ao tempo, ou seja, para uma reação genérica do tipo



a velocidade com que o reagente A desaparece é igual à velocidade com que o produto B é formado e define a velocidade de reação (v) [SCHWETLICK, 1973; NETZ, 2002]:

$$v = -\frac{\Delta[A]}{\Delta t} = \frac{\Delta[B]}{\Delta t} \quad (20)$$

A velocidade, tal como definida pela Equação 20, é na verdade uma velocidade média (v_{med}), pois contempla um intervalo definido de tempo Δt , no qual a concentração de A sofre uma diminuição equivalente a $\Delta[A]$. Na definição de velocidade para uma reação mais complexa, deve-se considerar a estequiometria da

reação. A velocidade de uma reação é igual às taxas de variação das concentrações das espécies participantes, divididas pelos respectivos coeficientes estequiométricos. Devido à estequiometria da reação, esta relação vale igualmente para qualquer espécie [NETZ, 2002]. Assim, para a reação genérica:



a velocidade da reação será:

$$v = -\frac{1}{a} \frac{\Delta[A]}{\Delta t} = -\frac{1}{b} \frac{\Delta[B]}{\Delta t} = \frac{1}{c} \frac{\Delta[C]}{\Delta t} = \frac{1}{d} \frac{\Delta[D]}{\Delta t} \quad (22)$$

Esta variação será negativa (diminuição) para os reagentes *A* e *B*, e positiva (aumento) para os produtos *C* e *D*, e essa variação pode ser determinada tanto por meio de métodos químicos, físicos como físico-químicos (como, por exemplo, variação de pH, volume, pressão, condutividade, absorvância e fluorescência). Para fins de análise de estabilidade, é bastante frequente expressar os resultados de um estudo cinético em termos de tempo de reação médio ou tempo de meia-vida ($t_{50\%}$ ou $t_{1/2}$), isto é, o tempo necessário para que a concentração de reagente seja a metade do valor inicial [NETZ, 2002].

2.5.1 Leis cinéticas

A velocidade de uma reação depende de uma série de fatores, como natureza dos reagentes, concentração, pressão, temperatura, estado de agregação, etc. Assim, a cinética busca estudar estes fatores e, com isso, aumentar o entendimento sobre como um determinado processo ocorre [NETZ, 2002]. Considerando novamente reação genérica $aA + bB \longrightarrow cC + dD$, a velocidade de reação depende, via de regra, da concentração dos reagentes:

$$v = k[A]^x[B]^y, \quad (23)$$

onde k é a chamada constante de velocidade de reação e os índices x e y estão relacionados à forma como a velocidade depende das concentrações, e são chamados de ordens (parciais) de reação [NETZ, 2002]. A soma de x e y é a ordem (global) da reação. Entretanto, x e y não são necessariamente iguais aos coeficientes estequiométricos (a e b) da reação química balanceada. Determina-se a ordem de reação a partir de dados experimentais, considerando apenas a(s) substância(s) de cuja concentração depende a velocidade de reação e que sofrem uma variação relativa significativa durante a reação. Na prática, as mais importantes são as reações de ordem zero, primeira e segunda ordens [SCHWENTLICK, 1973; NETZ, 2002].

2.5.1.1 Reações de ordem zero

Na lei cinética de ordem zero, a velocidade é uma constante, independente das concentrações dos reagentes. A concentração decresce linearmente com o tempo. Neste processo, o tempo de meia-vida é diretamente proporcional à concentração inicial (Equação 26). Já que a diminuição de $[A]$ é uma função linear do tempo, a concentração de A , para um determinado momento, é dada pela equação [NETZ, 2002]:

$$[A] = [A]_0 - kt \quad (24)$$

onde k é igual ao coeficiente angular (inclinação) e a concentração inicial, $[A]_0$, é o coeficiente linear (interseção).

O valor de k representa a velocidade de reação e $[A]_0$ a concentração inicial de reagente no tempo zero. Apesar da inclinação da reta resultante ser sempre negativa ($-k$), a constante de reação é invariavelmente positiva.

Se $v = k$, então:

$$[A] = [A]_0 - kt \quad (25)$$

$$t_{1/2} = \frac{1}{k} \frac{[A]_0}{2} \quad (26)$$

2.5.1.2 Reações de primeira ordem

Na lei cinética de primeira ordem, a velocidade depende da concentração do reagente, a qual varia de modo exponencial com o tempo (Figura 4a), de forma que a representação gráfica do logaritmo da concentração contra o tempo resulta em uma reta (Figura 4b) [NETZ, 2002].

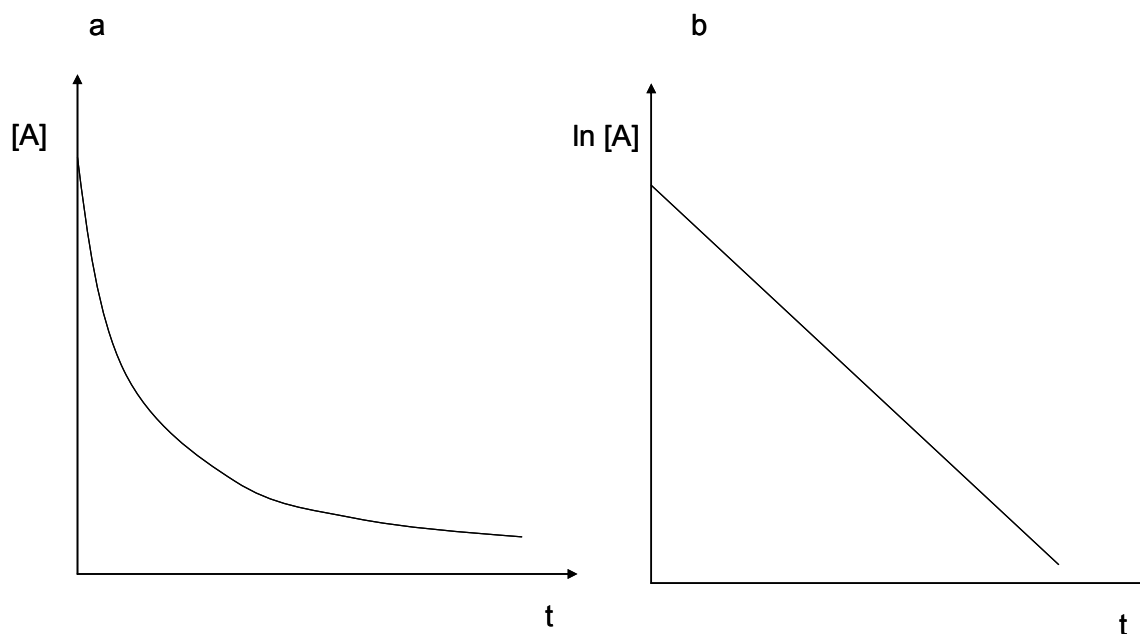


Figura 4: Reação de primeira ordem. (a) representação linear da concentração; (b) representação logarítmica da concentração.

Na representação logarítmica, a relação entre concentração de reagente e tempo é dada pela equação:

$$\ln[A] = -kt + \ln[A]_0 \quad (27)$$

Sendo que o coeficiente linear corresponde à expressão logarítmica da concentração no tempo zero ($\ln [A]_0$) e o coeficiente angular à constante de velocidade de reação k [SCHWENTLICK, 1973; NETZ, 2002].

Nesse caso, o tempo de meia-vida depende somente do valor de k , e não da concentração inicial de reagente (Equação 29). Assim, sempre haverá uma quantidade (ainda que ínfima) do reagente remanescente no meio reacional.

Como $v = k[A]$, segue-se que:

$$[A] = [A]_0 e^{-kt} \Rightarrow \ln \frac{[A]}{[A]_0} = -kt \quad (28)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (29)$$

2.5.1.3 Reações de segunda ordem

Na lei cinética de segunda ordem, há a dependência da velocidade com o quadrado da concentração do reagente, de modo que um gráfico do inverso da concentração *versus* o tempo resultará numa linha reta (Figura 5). Nesse caso, o tempo de meia-vida é inversamente proporcional à concentração inicial (Equação 31) [SCHWENTLICK, 1973; NETZ, 2002].

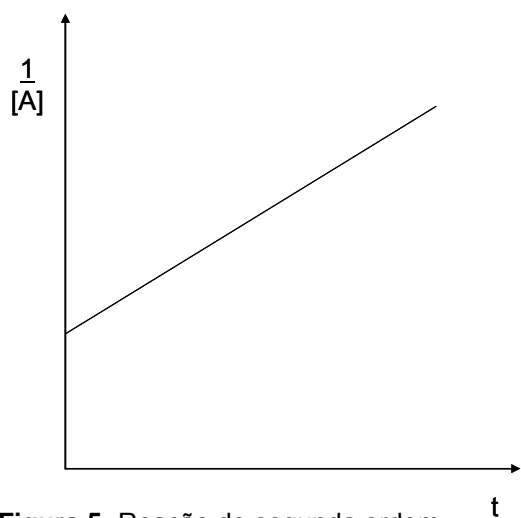


Figura 5: Reação de segunda ordem.

Para uma cinética de segunda ordem, temos que $v = k[A]^2$, o que implica:

$$\frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A]_0} + kt \quad (30)$$

$$t_{1/2} = \frac{1}{k[A]_0} \quad (31)$$

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentação

Potenciostato:

- μ -AUTOLAB III (Eco-Chemie);
- 663 VA Stand (Metrohm);
- Eletrodo de referência: Ag/AgCl/KCl 3 mol L⁻¹;
- Contra eletrodo – Carbono vítreo;
- Eletrodos de trabalho – eletrodo de grafite impregnado com parafina (PIGE) e eletrodo de disco de ouro (3 mm de diâmetro, Metrohm)

Espectrofotômetro UV-visível (Hewlett Packard 8453) com arranjo de diodos e SPECORD 50 (Analytik Jena);

Fluorímetro Victor 2 (Perkin Elmer);

Balança Analítica Sartorius com quatro casas de precisão;

Purificador de água Milli-Q (Millipore);

pHmetro Hanna;

Banho termostaticado Dubnoff TE-053.

3.2 Reagentes e soluções

No preparo das soluções, foram utilizados água purificada em sistema Milli-Q (resistividade de 18,2 m Ω .cm⁻¹) e reagentes de grau analítico.

3.3 Amostras

Neste trabalho, cinco plantas medicinais foram escolhidas como objeto de estudo: *Matricaria chamomilla* L., *Psidium guajava*, *Achyrocline satureoides*, *Baccharis genistelloides* e *Cymbopogon citratus*. Optou-se por estas plantas pelo fato de haver relatos sobre a sua capacidade antioxidante [MELO, 2001; GUGLIUCCI, 2002; MOREIRA, 2003; VERDI, 2005; VERZA, 2007; FIGUEIRINHA, 2008; GUTIÉRREZ, 2008; RATTANACHAIKUNSOPON, 2010] e também por todas elas serem facilmente encontradas no estado do Rio Grande do Sul. Seus usos tradicionais, forma de utilização e contra-indicações sugeridos pela ANVISA encontram-se na Tabela 7.

Amostras das 5 plantas medicinais foram coletadas na cidade de Santa Maria (Rio Grande do Sul, Brasil) em janeiro de 2008 e janeiro de 2010. As amostras foram secadas a 40°C por 24 h, maceradas (exceto as amostras de *A. satureoides*) e guardadas em plásticos ao abrigo da luz até o seu uso.

Quatro amostras da planta *M. chamomilla* L., 5 amostras de *A. satureoides*, 4 amostras de *B. genistelloides* e 2 amostras de *C. citratus* foram adquiridas no comércio na cidade de Rio Grande (Rio Grande do Sul, Brasil).

3.3.1 Preparação dos extratos

Os extratos aquosos das plantas em estudo foram preparados pela infusão de 1,00 g da folha seca em 50 mL de água purificada a 70°C por 30 min. Os extratos foram filtrados em papel filtro e armazenados em geladeira para posterior uso.

Tabela 7: Plantas medicinais estudadas: seus nomes populares, usos tradicionais, vias de administração, contra-indicações e efeitos adversos [ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em jun. 2010].

Nomenclatura botânica; Família	Nomenclatura popular	Parte utilizada	Via	Alegações	Contra-indicações	Efeitos adversos	Informações adicionais
<i>Achyrocline saturoides</i> ; Asteraceae	Macela; Marcela; Marcela do campo	Sumidades floridas	Oral	Má digestão e cólicas intestinais; como sedativo leve; e como anti-inflamatório	-----	-----	-----
<i>Baccharis genistelloides</i> ; Asteraceae	Carqueja; Carqueja amarga	Partes aéreas	Oral	Dispepsia (Distúrbios da digestão)	Não utilizar em grávidas, pois pode promover contrações uterinas. Evitar o uso concomitante com medicamentos para hipertensão e diabetes	O uso pode causar hipotensão (queda da pressão)	-----
<i>Cymbopogon citratus</i> ; Poaceae	Capim santo; Capim limão; Capim cidró; Cidreira; Capim cidreira	Folhas	Oral	Cólicas intestinais e uterinas. Quadros leves de ansiedade e insônia, como calmante suave	-----	-----	Pode aumentar o efeito de medicamentos sedativos (calmantes)
<i>Matricaria chamomilla</i> L.; Asteraceae	Camomila	Flores	Oral	Cólicas intestinais. Quadros leves de ansiedade, como calmante suave	-----	Podem ocorrer reações alérgicas ocasionais. Em caso de superdose, pode ocorrer o aparecimento de náuseas, excitação nervosa e insônia	-----
			Tópico	Contusões e dos processos inflamatórios da boca e gengiva	-----	-----	Não aplicar a infusão na região próxima aos olhos

<i>Psidium guajava;</i> Mystaceae	Goiabeira	Folhas jovens	Oral	Diarréias não infecciosas	-----	-----	Não utilizar continuamente
			Tópico	Pele e mucosas lesadas, como anti- séptico			

3.4 Procedimentos experimentais

3.4.1 Determinação da capacidade antioxidante de extratos de plantas medicinais pelo método do DPPH[•]

A determinação da capacidade antioxidante pelo método do DPPH[•] foi realizada de acordo com o método de Al Fatimi et al. [AL FATIMI, 2007]. Mistura-se 500 µL do extrato de planta, 375 µL de etanol e 125 µL de uma solução etanólica de DPPH[•] 1×10^{-3} mol L⁻¹. As concentrações dos extratos na reação eram 100, 200 e 1000 mg L⁻¹. A solução era mantida ao abrigo da luz e a absorvância da solução era lida após 30 min a 517 nm utilizando-se etanol como branco. Os resultados para a capacidade antioxidante (CAO) obtida são expressos de acordo com a equação 32:

$$\text{CAO (\%)} = \left[\frac{(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}})}{A_{\text{controle}}} \right] \times 100 \quad (32)$$

onde A_{amostra} é a diferença de absorvância da solução da amostra com e sem DPPH[•], e A_{controle} é a absorvância da solução de DPPH[•] na ausência de antioxidantes. Utilizou-se ácido ascórbico em concentrações variando de 10 a 1000 mg L⁻¹ como controle positivo.

3.4.2 Estudo eletroquímico do poder antioxidante de extratos de plantas medicinais

3.4.2.1 Ataque radicalar a um composto redox ativo imobilizado sobre a superfície de um eletrodo

Neste estudo, utilizou-se riboflavina (RF, Lancaster) como composto redox, e o eletrodo de grafite impregnado com parafina (PIGE) como eletrodo de trabalho. Primeiramente, é necessário fazer a limpeza do PIGE, sendo que esta etapa é de fundamental importância para a medida eletroquímica. A melhor forma de limpar o PIGE é friccionar sua superfície sobre um papel filtro. O eletrodo deve ser polido mantendo-o perpendicular à superfície do papel para evitar o arredondamento das laterais. A superfície do eletrodo deve ser mantida plana, pois isto ajuda bastante nas operações de limpeza subsequentes. Os resultados da limpeza devem ser conferidos obtendo-se um voltamograma do branco (tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,6), o qual não deve apresentar picos. Sem isto, não há como assegurar que a resposta da medida da amostra é causada apenas pela amostra em questão, e não como resultado de medidas anteriores. O melhor movimento para polir a superfície do eletrodo é escrever o número “8” sobre o papel, mantendo, entretanto, o eletrodo o mais ereto possível. Devido à limpeza e polimento da superfície do eletrodo, o PIGE diminuirá gradualmente de tamanho depois de cada experimento. Entretanto, isso não tem nenhum efeito significativo sobre a medida, sendo que cada eletrodo pode ser usado inúmeras vezes. Em contraste com outras aplicações voltamétricas, somente a superfície circular da ponta do PIGE entra em contato com a solução do eletrólito. Isso garante que a área superficial do eletrodo seja a mesma de experimento para experimento. Além disso, o baixo contato da superfície do eletrodo com a solução do eletrólito minimiza a penetração do eletrólito no corpo do eletrodo, além de diminuir a linha base e aumentar a relação sinal/ruído [CARVALHO, 2010]. O filme de RF sob o PIGE foi preparado a partir de uma solução de RF $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A adsorção da riboflavina foi feita pela variação do potencial (20 ciclos) de 0,1 a -0,6 V a uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} numa

solução de tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,6). Registra-se então um voltamograma cíclico, em que se observa um sinal redox referente à adsorção de RF. Após isso, o eletrodo é lavado com água e introduzido numa solução de Fe^{2+} contendo o extrato de planta. A reação de Fenton é iniciada com a adição de H_2O_2 , e o PIGE é exposto a essa solução pelo tempo de 1 min. A solução de Fenton foi sempre recém-preparada, a partir de sulfato de ferro(II) e amônio (Merck) e H_2O_2 30% (v/v, Degussa). A proporção de $\text{Fe}^{2+}:\text{H}_2\text{O}_2$ foi de sempre 1:1 (100 mmol L^{-1}). A reação da solução de Fenton com o eletrodo contendo RF adsorvida é finalizada removendo-se o PIGE da solução e lavando-o com água. O resultado referente ao ataque de Fenton é monitorado medindo-se o decréscimo do sinal do pico anódico da RF adsorvida ao PIGE. Todo o processo (ataque de radicais HO gerados pela solução de Fenton por 1 min e registro do voltamograma cíclico da RF adsorvida ao PIGE) foi repetido 6 vezes usando-se a mesma RF adsorvida, a fim de se obter o grau de dissolução da RF para cada amostra de extrato de planta. Finalizado todo esse processo, há a regeneração da superfície do PIGE através de polimento, como descrito anteriormente.

3.4.2.2 Ataque radicalar a um composto eletroquimicamente inativo imobilizado sobre a superfície de um eletrodo e posterior quantificação de um par redox em solução

Neste estudo, utilizou-se $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ (Acros) como composto redox e eletrodo de ouro como eletrodo de trabalho. O eletrodo de ouro foi limpo antes de cada experimento por 3 diferentes tratamentos: (i) o eletrodo recebe um tratamento químico, através de sua imersão por 3 min. numa solução piranha ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ 3:1); (ii) o eletrodo é lavado com água e é então manualmente polido com alumina e lavado com etanol para remover partículas residuais de alumina que possam ter ficado na superfície do ouro e, finalmente; (iii) o eletrodo passa por um tratamento eletroquímico, que consiste em 100 ciclos de 0,0 a 1,8 V numa solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ a 500 mV s^{-1} . A SAM é preparada pela imersão do eletrodo numa solução etanólica de hexanotiol (Aldrich) 20% (v/v) por 15 min. O eletrodo recoberto pela

SAM é lavado com etanol e água, e, finalmente inserido numa solução de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 1×10^{-3} mol L^{-1} . Registra-se, então, um voltamograma cíclico, no qual se observa a ausência do sinal do par redox. Após isso, o eletrodo é lavado com água e introduzido numa solução de Fe^{2+} contendo o extrato de planta. A reação de Fenton é iniciada com a adição de H_2O_2 , e o eletrodo é exposto a essa solução pelo tempo de 5 min. A solução de Fenton foi sempre recém-preparada, a partir de sulfato de ferro(II) e amônio e H_2O_2 30% (v/v). A proporção de $\text{Fe}^{2+}:\text{H}_2\text{O}_2$ foi de sempre 1:5 (100:500 mmol L^{-1}). A reação da solução de Fenton com o eletrodo modificado é finalizada removendo-se o eletrodo da solução e lavando-o com etanol e água. O resultado referente ao ataque de Fenton é monitorado medindo-se o aumento do sinal do pico anódico do par redox $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$. Todo o processo (ataque de radicais HO gerados pela solução de Fenton por 5 min e registro do voltamograma cíclico do par redox $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$) foi repetido 6 vezes usando-se a mesma SAM, a fim de se obter o grau de destruição da SAM para cada amostra de extrato de planta. Finalizado todo esse processo, há a regeneração da superfície do eletrodo de ouro por polimento mecânico, lavagem e condicionamento eletroquímico.

3.4.3 Determinação da capacidade antioxidante *in vitro* contra radicais peroxila em amostras de extratos de plantas e compostos fenólicos

A determinação da capacidade antioxidante contra radicais peroxila é avaliada através da detecção indireta de ERO na presença e na ausência de um gerador radicalar. Em uma placa branca contendo 96 poças, 10 μL do extrato de cada planta a uma determinada concentração (preparado conforme a seção 3.3.1) foi pipetado em 6 poças. O tampão de reação (127,5 μL) contendo 30 mmol L^{-1} de HEPES (Acros, pH 7,2), 200 mmol L^{-1} de KCl e 1 mmol L^{-1} de MgCl_2 (Isofar) foi adicionado às poças. Em três das poças para cada amostra, adicionou-se 7,5 μL de cloreto de 2,2'-azobis (2-metilamodinopropano) (ABAP, 4 mmol L^{-1} , Aldrich). Nas outras 3 poças, o mesmo volume de água ultrapura foi adicionado. Após isso, a placa foi colocada no fluorímetro, programado para manter uma temperatura de 37°C. Nesta temperatura, há a produção de radicais peroxila pela termodecomposição do ABAP [AMADO, 2009]. Imediatamente antes da leitura de

fluorescência, adiciona-se em todas as poças 20 μL de diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) previamente desacetilado (seção 3.4.3.1.1) numa concentração de 16 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O DCFH desacetilado é oxidado por ERO ao composto fluorescente DCF, que é detectado nos comprimentos de onda de 485 e 520 nm, para excitação e emissão, respectivamente. A decomposição térmica do ABAP e consequente formação de ERO é monitorada por 30 min, com leituras a cada 5 min.

3.4.3.1 Desacetilação química do DCFH-DA

Para a desacetilação química do DCFH-DA [TAKANASHI, 1997], mistura-se 0,5 mL de uma solução etanólica de DCFH-DA 5 mmol L^{-1} com 2,0 mL de uma solução de NaOH 0,01 mol L^{-1} em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após 30 min, adiciona-se 10 mL de tampão fosfato 25 mmol L^{-1} (pH 7,4) e armazena-se a solução no gelo. Desta solução, dilui-se 2,6 mL em 6,0 mL de etanol, e armazena-se em gelo até seu uso.

3.4.4 Determinação da concentração de ERO intracelular

Para os ensaios *in vivo*, utilizou-se hepatócitos do peixe zebra (*Danio rerio*), expostos por 4 horas aos extratos das plantas *P. guajava* e *C. citratus* (melhor e pior desempenho *in vitro*, respectivamente, segundo o método fluorimétrico), nas concentrações de 100, 200 e 1000 mg L^{-1} .

3.4.4.1 Protocolo de exposição de hepatócitos aos diferentes extratos de plantas

(i) Homogeneizou-se toda a suspensão celular e completou-se com volume necessário de meio de cultura RPMI para preencher as poças da placa de cultura

para o experimento (24 poças) com 300 μL de suspensão celular ($\cong 2 \times 10^6$ células/mL);

(ii) Preencheu-se as poças com 500 μL de meio RPMI e deixou-se as células aderirem por 24 h;

(iii) Após 24 h de adesão, preparou-se soluções para diferentes concentrações dos extratos de plantas nas poças;

(iv) Retirou-se delicadamente o meio RPMI de cada poça com a pipeta, e lavou-se cuidadosamente cada poça 2 vezes, com aproximadamente 500 μL de uma solução de tampão fosfato (PBS). *Todo este procedimento deve ser realizado com muito cuidado para não arrancar células aderidas das poças.*

(v) Completou-se as poças com meio de cultura e o volume de extratos correspondentes para os ensaios (volume mínimo de 400 μL por poça e uma diluição do meio com a solução de exposição no máximo de 7 vezes) e levou-se as placas para a estufa a 28°C durante o tempo estipulado de exposição (4 h).

(vi) Montagem das poças:

a) após o tempo pré-determinado (4 h) para exposição, retirou-se as placas da estufa e estas foram levadas à capela de fluxo para encerrar a exposição;

b) retirou-se o meio de cultura de todas as poças;

c) lavou-se cada poça com PBS 2 vezes;

d) adicionou-se 200 μL de tripsina por poça e deixou-se agir por 3 minutos na estufa a 28°C;

e) adicionou-se 400 μL de meio de cultura para cortar a ação da tripsina;

f) as células de cada poça foram suspensas em um tubo eppendorf (1 tubo para cada poça);

g) centrifugou-se os tubos por 5 minutos a 1100 rpm;

h) retirou-se o sobrenadante com muito cuidado para não puxar o pellet;

i) para as poças que foram utilizadas na determinação do n° de células por absorvância (ABS) e no ensaio MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium), o pellet foi ressuspendido em 400 μL de meio de cultura;

j) reservou-se 200 μL para dosagem de ABS em 630 nm (número de células) (seção 3.4.3.2.2).

k) reservou-se 200 μL para dosagem por MTT (seção 3.4.3.2.3).

l) para as poças que foram utilizadas para ERO (fluorescência), o pellet foi ressuspendido em PBS + DCFH-DA (seção 3.4.3.2.4).

3.4.4.2 Determinação do número de células por ABS em 630 nm

(i) Foram feitos 4 pools (A, B, C, D) com duas poças cada. Total de pools: 4, com 800 μ L em cada um.

(ii) Retirou-se uma alíquota de 30 μ L de cada pool (A, B, C e D) para contagem de células por microscopia.

(iii) De cada pool fez-se diluições seriadas:

(a) pools 100% (sem diluir);

(b) pools 75 % (pegou-se 150 μ L de cada pool 100 % e adicionou-se 50 μ L de meio de cultura, ou 225 μ L de cada pool 100 % e adicionou-se 75 μ L de meio de cultura);

(c) pools 50% (pegou-se 300 μ L de cada pool 100% e adicionou-se 300 μ L de meio de cultura);

(d) pools 25 % (pegou-se 300 μ L de cada pool 50 % e adicionou-se 300 μ L de meio de cultura).

(d) todas as amostras foram lidas (placa transparente de 96 poças) no espectrofotômetro a 630 nm, colocando-se em cada poça 200 μ L da suspensão celular dos tratamentos e dos pools, ou de meio de cultura (brancos).

3.4.4.3 Determinação da viabilidade por MTT

(i) Pegou-se os 200 μ L indicados na seção 3.4.3.2.1 e pipetou-se em placa transparente de 96 poças, reservando-se 3 posições para os brancos.

(ii) Adicionou-se 20 μ L da solução de MTT (4 mg dissolvidas em 800 μ L de PBS). *Importante: manipular o MTT no escuro.*

(iii) Incubou-se as placas por 30 minutos, cobrindo-as com papel alumínio a 28 °C (escuro)

(iv) Centrifugou-se a placa 7 min a 1100 rpm.

(v) Descartou-se cuidadosamente o sobrenadante, para que os cristais de formazan não fossem descartados junto.

(vi) Adicionou-se 200 μL de DMSO puro em todas as poças, inclusive nas posições dos brancos, as quais levaram apenas DMSO.

(vii) Em cada poça fez-se “up and down” com a pipeta para dissolver os cristais de formazan, e, delicadamente, para que não se formassem bolhas.

(viii) Leu-se no espectrofotômetro a 490 nm.

3.4.4.4 Determinação de ERO

(i) Nas poças que foram utilizadas para ERO (fluorescência), o pellet foi ressuspenso em PBS + DCFH-DA imediatamente antes da leitura em placa branca de fluorímetro.

(ii) Dissolveu-se 1 mg de DCFH-DA em 922 μL de etanol gelado (Solução estoque),

(iii) Diluiu-se a solução estoque 100 vezes em PBS, em um volume final suficiente de 550 μL para cada eppendorf,

(iv) Ressuspendeu-se o pellet de cada eppendorf em 550 μL de PBS + DCFH-DA, e preencheu-se a placa de fluorímetro em triplicata (160 μL /poça, em triplicata). Para os brancos usou-se apenas PBS (160 μL /poça, em triplicata).

(v) A leitura foi feita no fluorímetro.

3.4.5 Determinação da capacidade antioxidante *in vitro* contra radicais hidroxila em amostras de extratos de plantas e compostos fenólicos

A determinação da capacidade antioxidante contra radicais hidroxila é avaliada através da detecção indireta de ERO na presença e na ausência de H_2O_2 . Em uma placa branca contendo 96 poças, 10 μL do extrato de cada planta a uma determinada concentração (preparado conforme a seção 3.3.1) foi pipetado em 6 poças, assim como 20 μL de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (825 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Água ultrapura (95 μL) foi

adicionada às poças. Em três das poças para cada amostra, adicionou-se mais 20 μL de água. Nas outras 3 poças o mesmo volume de H_2O_2 ($4,125 \text{ mmol L}^{-1}$) foi adicionado imediatamente antes da leitura de fluorescência. A placa foi colocada no fluorímetro, programado para manter uma temperatura de 25°C , e foi adicionado em todas as poças 20 μL de DCFH-DA previamente desacetilado (seção 3.4.3.1.1). O DCFH desacetilado é oxidado por ERO ao composto fluorescente DCF, que é detectado nos comprimentos de onda de 485 e 520 nm, para excitação e emissão, respectivamente. A formação de ERO ocorre pela reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 100:500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e, após 5 min, faz-se a leitura da fluorescência das amostras.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos próximos capítulos serão descritos os resultados envolvendo o estudo de métodos *in vitro* e *in vivo* para a determinação da capacidade antioxidante de extratos de plantas medicinais (*Matricaria chamomilla* L., *Psidium guajava*, *Achyrocline satureoides*, *Baccharis genitelloides* e *Cymbopogon citratus*). Os resultados obtidos permitirão um estudo comparativo destas plantas quanto à sua capacidade antioxidante contra radicais peroxila e hidroxila, empregando metodologias independentes e, no caso das metodologias usadas para determinação da capacidade antioxidante contra radicais hidroxila, a geração deste radical se faz de forma semelhante (a partir da reação de Fenton). Num primeiro momento, testou-se uma nova forma para a detecção de radicais hidroxila usando um procedimento eletroquímico no qual os radicais destroem uma camada imobilizada sob a superfície de um eletrodo, e acompanha-se a variação de um sinal eletroquímico que se dá de forma proporcional à extensão de dissolução da camada. Num próximo passo, testou-se a determinação da capacidade antioxidante contra radicais peroxila e hidroxila através da detecção indireta destes radicais por fluorimetria (ex/em: 485/520 nm), empregando DCFH-DA como substrato. O DCFH-DA, após sofrer desacetilação, pode ser oxidado por ERO, gerando fluorescência. Os radicais peroxila foram gerados através da termodegradação do reagente ABAP a 37°C, enquanto os radicais hidroxila foram gerados pela reação de Fenton. Ensaio *in vivo* foram avaliados utilizando-se hepatócitos do peixe zebra (*Danio rerio*), expostos aos extratos das plantas *P. guajava* e *C. citratus* (melhor e pior desempenho *in vitro*, respectivamente).

4.1 Estudo eletroquímico do poder antioxidante de extratos de plantas medicinais

O princípio por trás dos ensaios eletroquímicos propostos baseia-se na ideia sobre o que aconteceria quando radicais reativos atacassem moléculas que estão imobilizadas sobre a superfície de um eletrodo. Para investigar tal propósito, duas diferentes estratégias foram testadas:

a) na primeira hipótese, utilizou-se um composto redox ativo como camada, e acompanhou-se o que ocorria com seu sinal redox ao ser atacado por ERO;

b) num segundo momento, uma camada imobilizada eletroquimicamente inerte é atacada por ERO, e acompanha-se a resposta de um par redox dissolvido em solução.

Em ambos os métodos, o radical livre utilizado foi o radical hidroxila, gerado a partir da reação de Fenton, segundo a equação:



4.1.1 Ataque radicalar a um composto redox ativo imobilizado sobre a superfície de um eletrodo

Testou-se uma nova forma para a determinação da capacidade antioxidante usando-se um procedimento eletroquímico no qual os radicais destroem uma camada molecular (RF) adsorvida sob um eletrodo (PIGE). A camada de RF, quando apropriadamente adsorvida, gera um sinal eletroquímico reversível e estável na faixa de -0,6 a 0,1 V. Apesar desta estabilidade, a RF pode ser facilmente atacada por radicais livres gerados numa solução de Fenton. Quando a RF adsorvida no PIGE é exposta a estes radicais, estes destroem a camada de RF, e a diminuição do seu sinal eletroquímico é proporcional à sua dissolução. A figura 6 apresenta os voltamogramas obtidos com o PIGE numa solução de tampão acetato 0,1 mol L⁻¹

antes da adsorção de RF, após a adsorção da RF e após o ataque à camada de RF com radicais HO produzidos numa solução de Fenton.

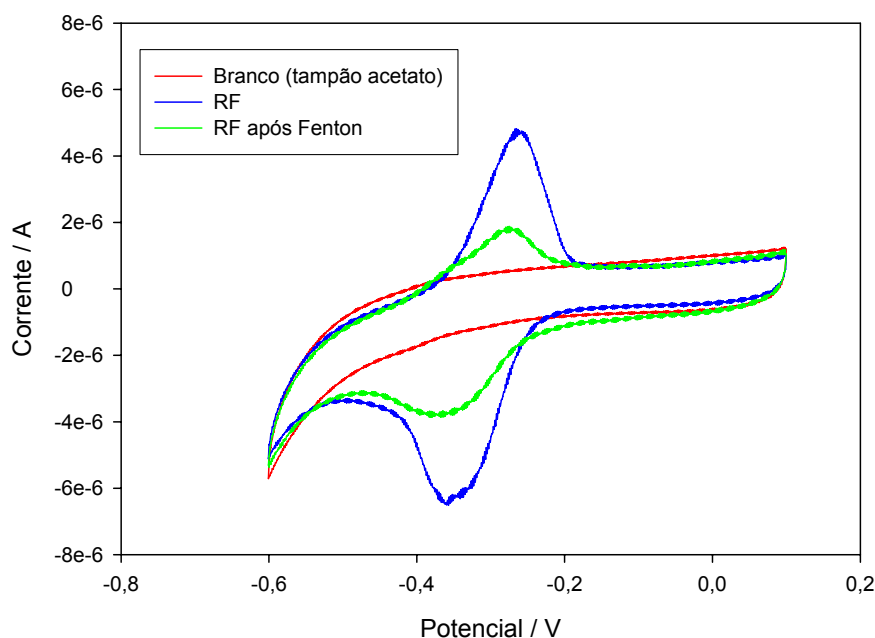


Figura 6: Voltamogramas cíclicos de riboflavina adsorvida ao PIGE em uma solução de tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,6), velocidade de varredura = 100 mV s^{-1} . (---) sem RF adsorvida; (—) RF adsorvida antes do ataque de radicais hidroxila; (---) RF adsorvida após o ataque de radicais hidroxila gerados pela reação de Fenton.

A figura 7 mostra o decaimento do sinal voltamétrico $\left(\frac{I}{I_0}\right)$ com o tempo de reação entre a camada de riboflavina e os radicais HO, para o controle (branco) e quando adiciona-se ácido ascórbico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ à solução de Fenton, enquanto a figura 8 mostra o gráfico da função logarítmica dos mesmos dados.

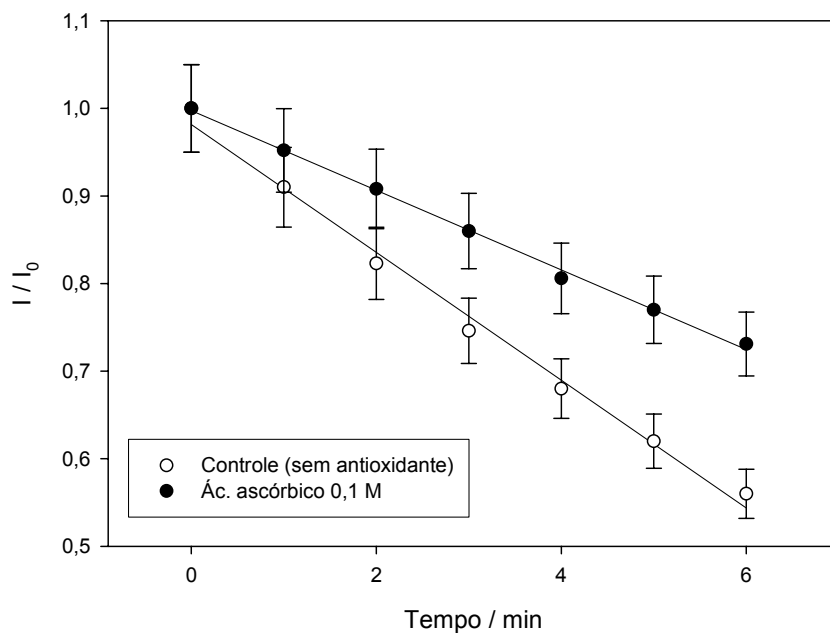


Figura 7: Variação da altura do pico anódico da riboflavina adsorvida no PIGE após o ataque de HO^\bullet na ausência e na presença de um antioxidante (ácido ascórbico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) à solução de Fenton.

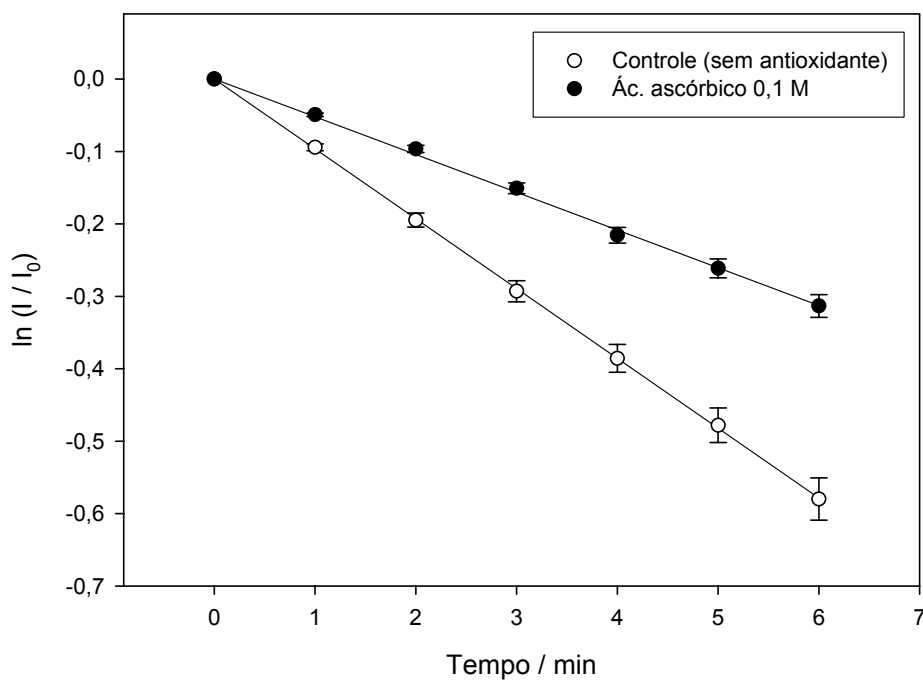


Figura 8: Gráfico da função logarítmica da variação da altura do pico anódico da riboflavina adsorvida no PIGE após o ataque de HO^\bullet na ausência e na presença de um antioxidante (ácido ascórbico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) à solução de Fenton.

Como já descrito, a diminuição do sinal eletroquímico da RF adsorvida sob o PIGE serve de base para a medida indireta da interação dos radicais HO com a RF. Este comportamento também permite o estudo da interação de espécies antioxidantes, que, ao reagirem com os radicais HO gerados na solução de Fenton, retardam a diminuição do sinal eletroquímico da RF. Isso significa que o grau de diminuição do sinal eletroquímico causado pelos antioxidantes adicionados à solução de Fenton, serve de base para a medida indireta da interação entre os radicais HO e as espécies antioxidantes. Com isso, a quantificação da capacidade antioxidante das amostras se dá pelo cálculo dos valores dos coeficientes angulares das retas obtidas na figura 8. No exemplo mostrado, são obtidos os valores de 0,0964 e 0,0521 para o branco (controle) e para uma solução de ácido ascórbico 0,1 mol L⁻¹, respectivamente. Usando-se a equação 34, chega-se a um valor de 46,0% para a capacidade antioxidante (CAO) de uma solução de ácido ascórbico 0,1 mol L⁻¹.

$$\text{CAO (\%)} = \left(\frac{b_{\text{controle}} - b_{\text{amostra}}}{b_{\text{controle}}} \right) \times 100 \quad (34)$$

O próximo passo foi tentar quantificar a capacidade antioxidante das cinco espécies de plantas medicinais estudadas. A figura 9 mostra os resultados obtidos para o extrato aquoso da *P. guajava*, nas concentrações de 100, 200 e 1000 mg L⁻¹. Curiosamente, o que se observa é um efeito pró-oxidante, uma vez que, na presença do extrato, os valores dos coeficientes angulares aumentam com o aumento da concentração do extrato (a saber, 0,1117, 0,1428 e 0,1522 para as concentrações de 100, 200 e 1000 mg L⁻¹, respectivamente), o que, pela equação 34, geraria valores negativos de capacidade antioxidante.

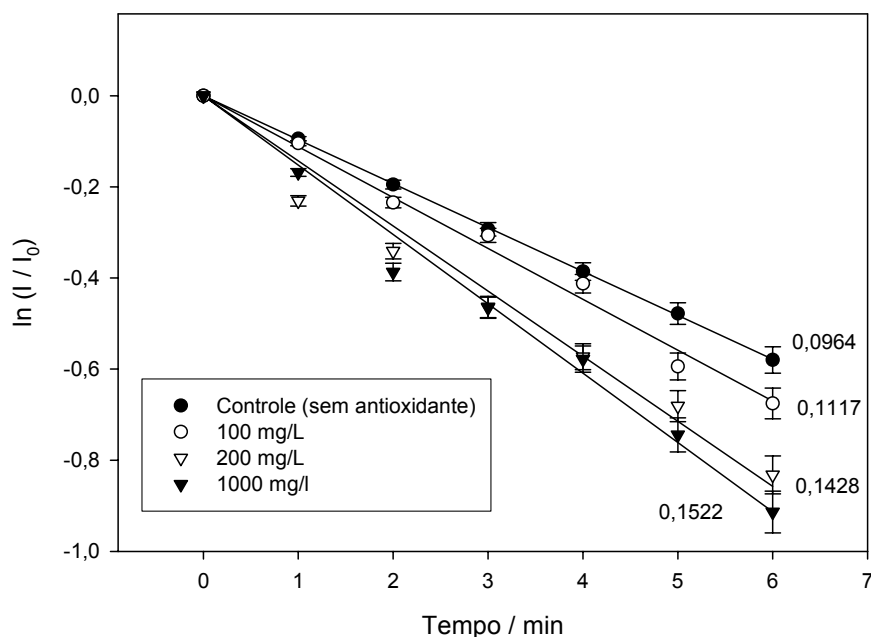


Figura 9: Gráfico da função logarítmica da variação da altura do pico anódico da riboflavina adsorvida no PIGE após o ataque de HO^\bullet na presença de 100, 200 e 1000 mg L^{-1} de *P. guajava* adicionada à solução de Fenton. Os valores próximos às retas correspondem aos valores dos coeficientes angulares das mesmas.

Testes subsequentes, entretanto, mostraram que não ocorre um efeito pró-oxidante, e sim, ocorre uma competição pelo eletrodo entre a riboflavina e compostos presentes nos extratos que se adsorvem espontaneamente no PIGE, como mostrado nas figuras 10 e 11. Na figura 10 observa-se o decaimento do sinal da RF quando em contato com o extrato de *P. guajava* (1000 mg L^{-1}). A diminuição dos valores de corrente ocorre após o contato entre a RF adsorvida no PIGE e a imersão do eletrodo no extrato aquoso da *P. guajava* por intervalos de 1 min. Já a figura 11 mostra o surgimento de um sinal eletroquímico na região de potenciais positivos, o que corrobora a hipótese de estar ocorrendo uma competição pelo eletrodo, fato esse que descarta o uso de tal metodologia para a determinação da capacidade antioxidante dos extratos de plantas testados. De fato, Zoulis e Efstathiou [ZOULIS, 1996] mostram que flavonoides como rutina, quercetina, fisetina e galangina apresentam potenciais de pico na faixa de 0,28 a 0,49 V (vs. ECS) no eletrodo de pasta de carbono.

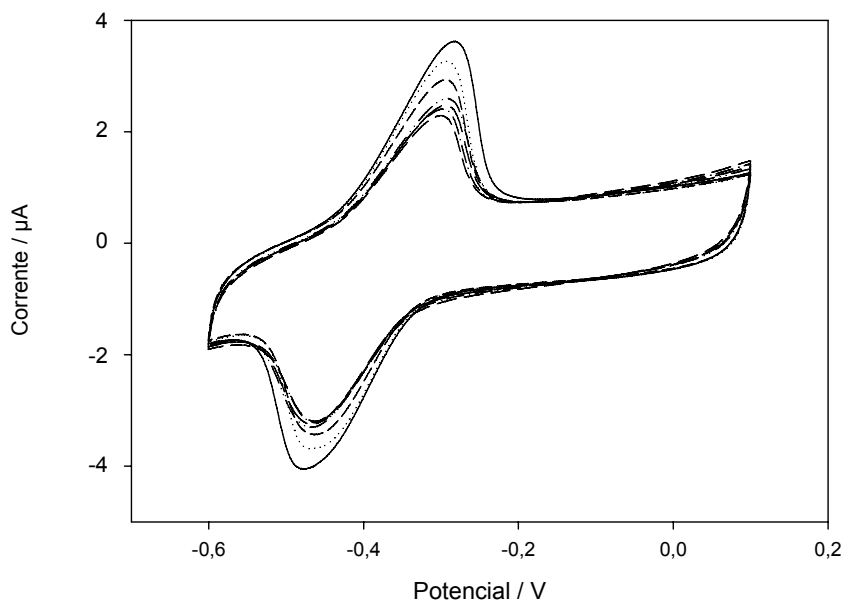


Figura 10: Decaimento do sinal da riboflavina (RF) adsorvida no PIGE quando em contato com o extrato da *P. guajava* (1000 mg L^{-1}). Cada linha do voltamograma corresponde a um intervalo de 1 min de inserção do PIGE recoberto por RF no extrato de *P. guajava*. Após a inserção do eletrodo recoberto com RF ao extrato, verifica-se uma diminuição do sinal eletroquímico da RF.

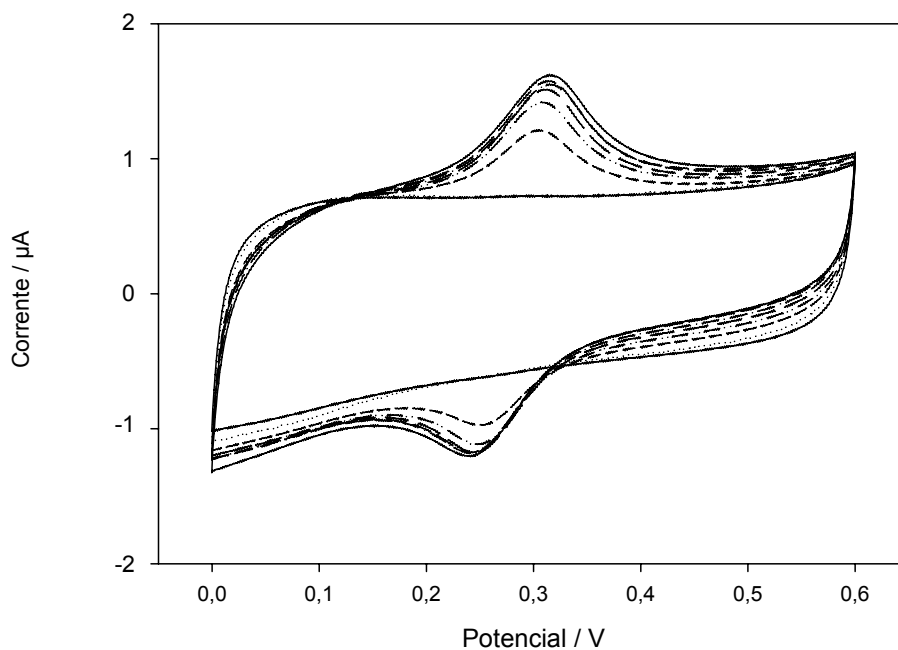


Figura 11: Surgimento de um sinal eletroquímico na região de potenciais positivos após a inserção do PIGE recoberto riboflavina no extrato aquoso de *P. guajava* 1000 mg L^{-1} . Cada linha do voltamograma corresponde a um intervalo de 1 min de inserção do PIGE recoberto por RF no extrato de *P. guajava*. Após a inserção do eletrodo recoberto com RF ao extrato, verifica-se um aumento deste sinal eletroquímico, o que comprova que há uma competição pelo PIGE entre a RF e compostos presentes no extrato que se adsorvem espontaneamente no PIGE.

4.1.2 Ataque radicalar a um composto eletroquimicamente inativo imobilizado sobre a superfície de um eletrodo e posterior quantificação de um par redox em solução

Em um primeiro estudo (**Apêndice 1**), testou-se uma nova forma para a detecção de radicais livres usando-se um procedimento eletroquímico no qual os radicais destroem uma camada molecular bem definida em um eletrodo. As monocamadas auto-organizadas (SAMs) de tióis podem ser facilmente preparadas sob a superfície de eletrodos de ouro e mercúrio e, se compostos apropriados estiverem adsorvidos, o sinal eletroquímico de um par redox dissolvido pode ser completamente inibido. Embora estas SAMs sejam conhecidas por serem estáveis, descobriu-se que elas podem ser facilmente atacadas por radicais livres. Quando um eletrodo com a SAM é exposto a uma solução em que radicais livres são gerados, estes radicais livres destroem a SAM, sendo que a recuperação do sinal eletroquímico do par redox se dá de forma proporcional à extensão da dissolução da monocamada. A figura 12 mostra os voltamogramas obtidos com eletrodos de mercúrio e ouro numa solução de 1×10^{-3} mol L⁻¹ de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ antes da modificação da superfície do eletrodo com a SAM de hexanotiol, após a formação da SAM, e após o ataque à SAM com radicais HO produzidos numa solução de Fenton por 1 e 5 minutos.

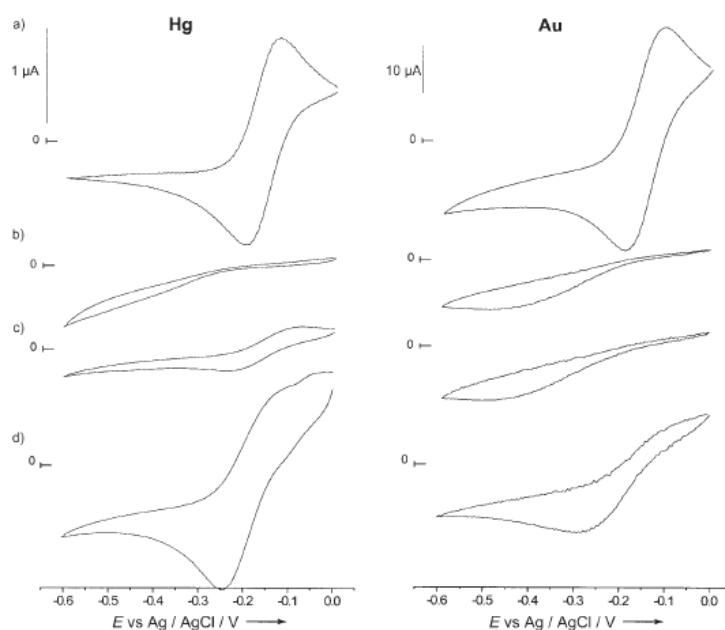


Figura 12: Voltamogramas cíclicos de uma solução de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ obtidos com (a) eletrodos não modificados, (b) eletrodos modificados com SAM (hexanotiol), (c) eletrodos modificados com a SAM após o ataque radicalar via solução de Fenton por 1 minuto, (d) e 5 minutos. Voltamogramas obtidos com uma solução de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ 1×10^{-3} mol L^{-1} em tampão acetato $0,01$ mol L^{-1} ; velocidade de varredura: 500 mV s^{-1} [SCHOLZ, 2007].

Em um estudo posterior (**Apêndice 2**), testou-se a aplicação deste estudo eletroquímico na quantificação da capacidade antioxidante de extratos de plantas medicinais, comparando-se estes resultados aos obtidos pelo método do DPPH $^{\bullet}$, largamente utilizado na quantificação do poder antioxidante de extratos de plantas [SÁNCHEZ-MORENO, 2002; KATSUBE, 2004; DUDONNE, 2009].

A Figura 13 apresenta os voltamogramas de uma solução de 1×10^{-3} mol L^{-1} $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ obtidos em um eletrodo de ouro antes da modificação da superfície do eletrodo com a SAM de hexanotiol, após a formação da SAM, e após 2 ataques consecutivos à SAM com radicais HO gerados em uma solução de Fenton. Como se pode perceber, o sinal eletroquímico de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ aumenta à medida que segue o ataque de radicais HO (10 e 20 minutos de reação de Fenton).

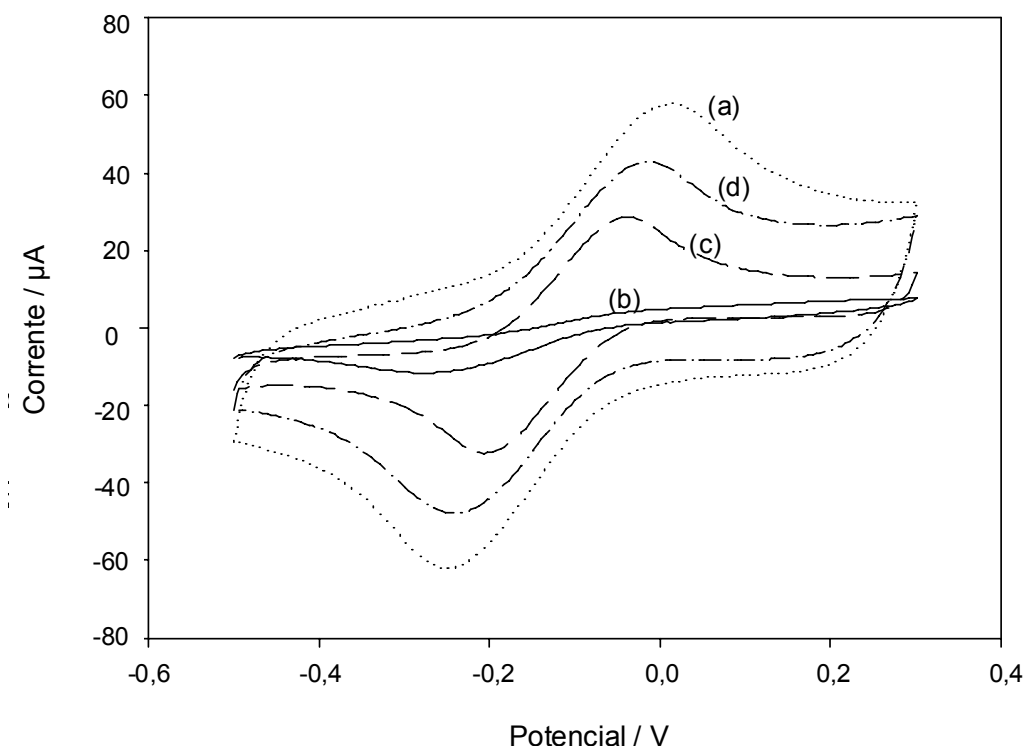


Figura 13: Voltamogramas cíclicos de uma solução $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ em tampão acetato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,6) em um eletrodo de ouro; (a) antes da modificação a superfície do eletrodo com a SAM; (b) após a formação da SAM; (c) após 10 minutos de ataque radicalar; (d) após 20 minutos de ataque radicalar à SAM. Velocidade de varredura: 500 mV s^{-1} , 20 ciclos.

A figura 14a mostra o decaimento exponencial do sinal voltamétrico $\left[1 - \left(\frac{I}{I_0} \right) \right]$

com o tempo de reação entre a SAM e os radicais HO. Este decaimento exponencial é também visto na figura 14b como 2 retas distintas: a primeira de 0 a 5 minutos (decaimento rápido, k_1), e a segunda de 5 a 30 minutos (decaimento lento, k_2). Para confirmar esta hipótese, realizaram-se medidas voltamétricas expondo-se a monocamada de tiol a sucessivos ataques de Fenton de 15 segundos de duração, por 5 min. Como mostrado na figura 15, observa-se um plateau entre 225 e 285 segundos. Considerou-se que, no período anterior a este plateau, os radicais HO atacam de maneira mais efetiva sítios de moléculas de tiol desordenadas formados sob a superfície do eletrodo de ouro, o que leva ao rápido decaimento observado na figura 14b. Após este tempo, os radicais HO atacam as moléculas de tiol remanescentes, resultando no decaimento lento observado posteriormente. De fato,

comprovou-se que, quando monocamadas eram preparadas por períodos de tempo extremamente longos (± 70 h), conseguia-se inibir a formação de domínios de moléculas de tiol desordenadas, conseguindo-se obter uma monocamada altamente ordenada, em que apenas o segundo decaimento (isto é, o decaimento lento da corrente) era observado (Figura 16).

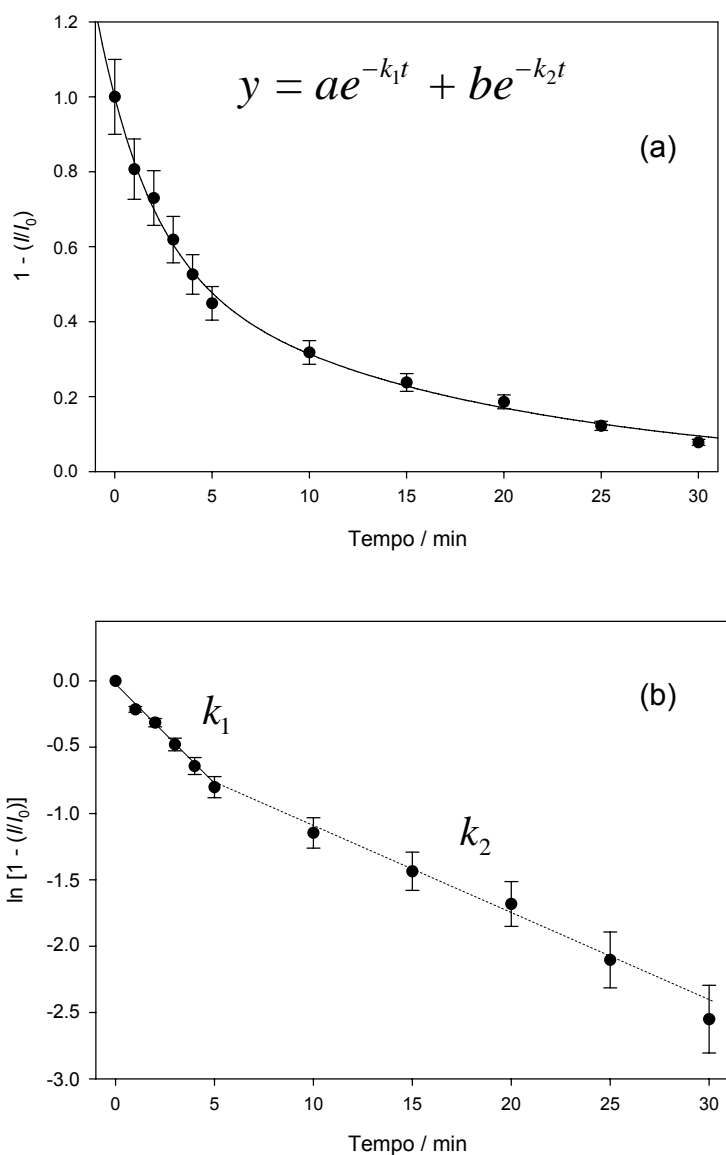


Figura 14: Variação da altura do pico anódico após o ataque dos radicais HO à SAM na ausência de antioxidantes; (a) decaimento exponencial do sinal eletroquímico normalizado $\left[1 - \left(\frac{I}{I_0}\right)\right]$ versus o tempo de reação da SAM com os radicais HO; (b) gráfico da função logarítmica dos mesmos dados mostrando claramente a separação entre os decaimentos rápido e lento.

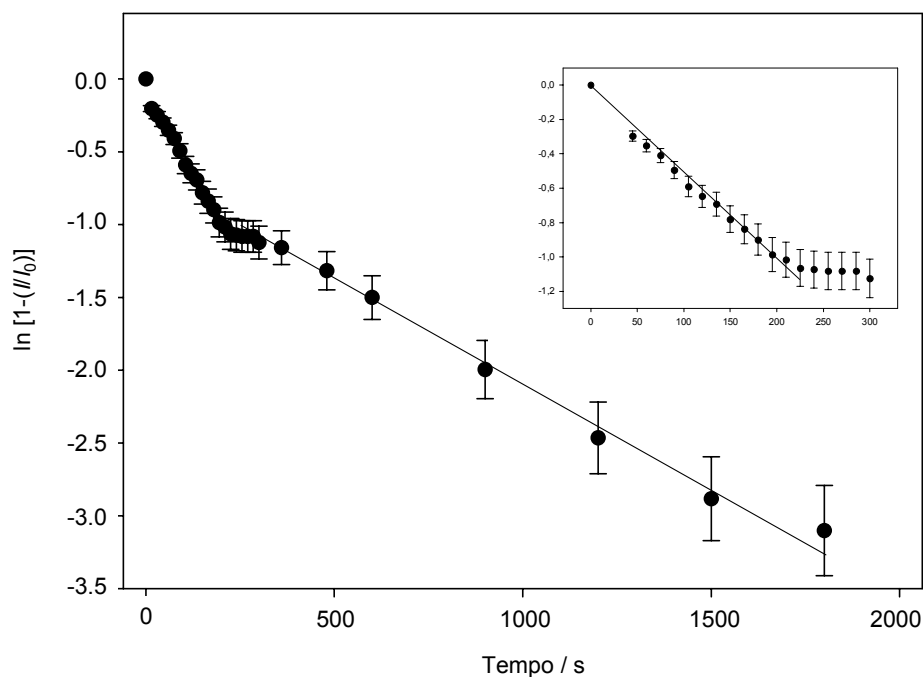


Figura 15: Gráfico do decaimento exponencial logaritmadado do sinal eletroquímico normalizado

$\left[1 - \left(\frac{I}{I_0} \right) \right]$ versus o tempo de reação da SAM com os radicais HO após sucessivos ataques de

Fenton por 30 min, com intervalos de 15 s. Tempo de deposição da SAM: 15 min.

Como já descrito nos experimentos envolvendo o ataque de HO^\bullet à SAM, a recuperação do sinal eletroquímico do par redox serve de base para a medida indireta da interação dos radicais HO com a SAM. No entanto, este comportamento também permite o estudo da interação de espécies antioxidantes, que, ao reagirem com os radicais HO, inibem a recuperação do sinal voltamétrico. Isso significa que o grau de inibição da recuperação do sinal do par redox ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$) causada pelos antioxidantes adicionados à solução de Fenton, serve de base para a medida indireta da interação entre os radicais HO e espécies antioxidantes.

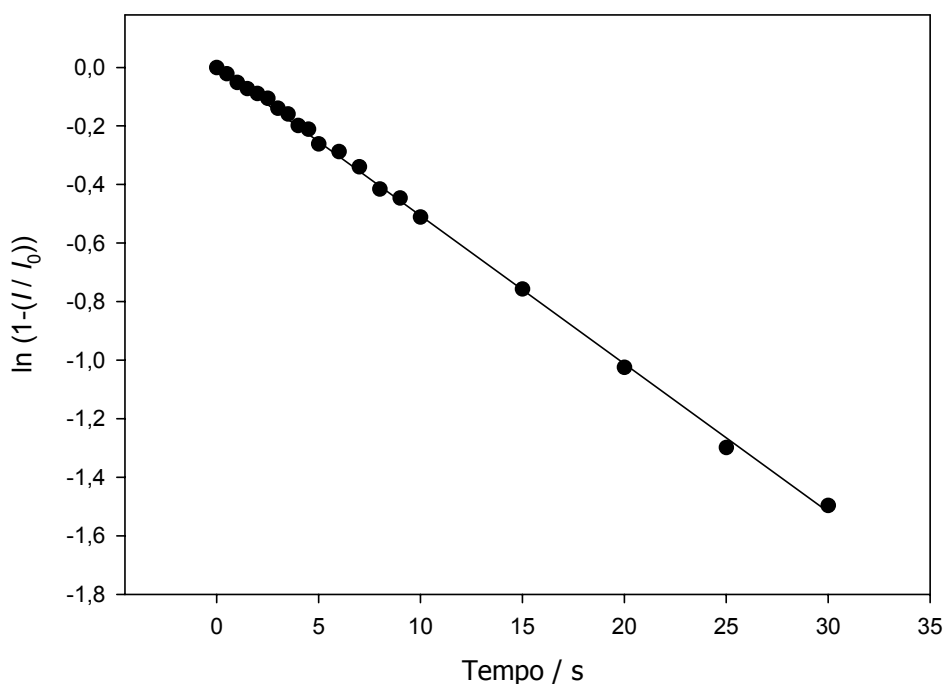


Figura 16: Gráfico logaritmado do decaimento do sinal eletroquímico normalizado $\left[1 - \left(\frac{I}{I_0}\right)\right]$ versus o tempo de reação da SAM com os radicais HO após sucessivos ataques de Fenton por 30 min. Tempo de deposição da SAM: 68 horas.

A solução de Fenton não possui uma concentração constante de radicais HO, sendo que a sua concentração decai com o tempo. Porém, todo o procedimento é reprodutível, devido à pureza dos reagentes e porque todos os passos do experimento são repetidos de forma reprodutível, isto é, o parâmetro “tempo” para todos os passos é mantido sempre constante.

Já é bastante conhecido que muitos extratos de plantas medicinais possuem altas concentrações de compostos polifenólicos que agem como antioxidantes naturais [ANDERSEN, 2006]. Desta forma, analisou-se a atividade antioxidante de alguns extratos de plantas medicinais em três diferentes concentrações. O método baseia-se no decaimento do sinal de recuperação do composto $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ medido no eletrodo modificado com a SAM, como consequência da reação dos radicais HO da solução de Fenton com as espécies antioxidantes. A figura 17a mostra os decaimentos bi-exponenciais obtidos para 3 diferentes concentrações de extratos aquosos de *M. chamomilla* L., enquanto a Figura 17b mostra a função logarítmica

linearizada dos dados, evidenciando os decaimentos rápido e lento envolvidos na reação do radical HO com as espécies antioxidantes presentes no extrato aquoso da

M. chamomilla L., onde y é $\left[\ln \left(1 - \left(\frac{I}{I_0} \right) \right) \right]$, a e b são os coeficientes lineares para os

decaimentos rápido e lento, respectivamente, t é o tempo de reação, e k_1 e k_2 são os coeficientes angulares (constantes de decaimento cinético) para os decaimentos rápido e lento, respectivamente, envolvidos na reação do radical HO com as espécies antioxidantes (Figura 17b).

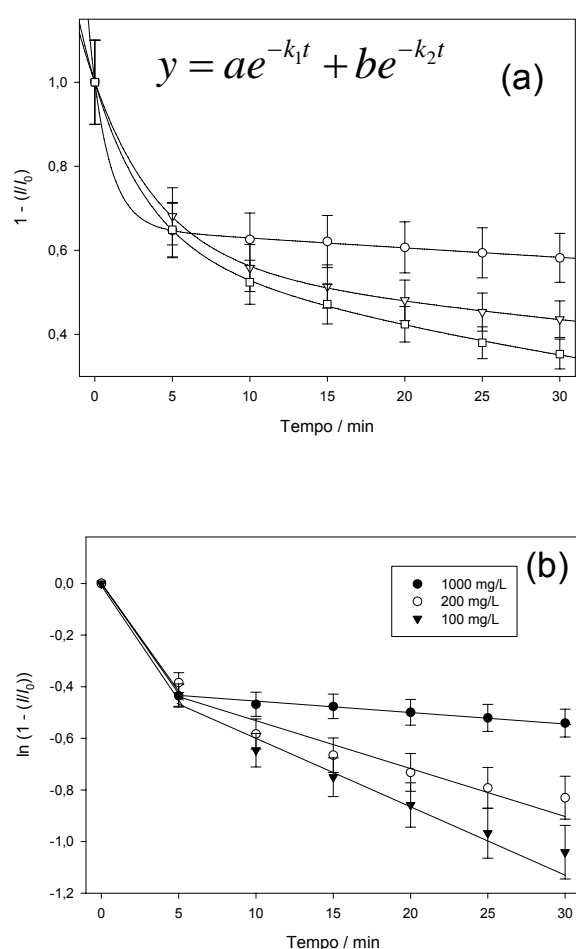


Figura 17: (a) decaimentos bi-exponenciais do sinal eletroquímico normalizado $\left[1 - \left(\frac{I}{I_0} \right) \right]$ versus o

tempo de reação da SAM com os radicais HO obtidos para 3 diferentes concentrações (○ 1000 mg L⁻¹; ▽ 200 mg L⁻¹; □ 100 mg L⁻¹) de extratos de *M. chamomilla* L. adicionados à solução de Fenton;

(b) gráfico da função logarítmica linearizada dos mesmos dados mostrando claramente a separação entre os decaimentos rápido e lento.

A Figura 17 está de acordo com a hipótese de que os radicais HO, nos primeiros 5 minutos de reação, atacam predominantemente domínios de moléculas de tiol menos ordenadas da SAM. Em adição, é possível constatar, apenas nos primeiros minutos da reação entre o extrato e os radicais HO, um decaimento substancial do sinal voltamétrico para o extrato de planta mais concentrado (1000 mg L^{-1}). Após 5 minutos de reação, o sinal voltamétrico permanece praticamente constante. Esse resultado indica que, em altas concentrações de extrato de planta, os radicais HO remanescentes conseguem destruir os domínios de moléculas de tióis menos ordenados da SAM. Entretanto, esta concentração de radicais HO não é alta o suficiente para atacar os domínios altamente orientados da SAM, resultando em uma linha quase paralela ao eixo X para o extrato da planta numa concentração de 1000 mg L^{-1} .

Com base nestes dados, pode-se concluir que, quanto maior o valor da constante cinética, menor a atividade antioxidante do extrato de planta. Também se pode perceber que a concentração do extrato tem um papel decisivo na capacidade antioxidante da planta. A Tabela 8 mostra que cada extrato de planta possui uma capacidade antioxidante específica, a qual depende da concentração do extrato. As constantes cinéticas obtidas para cada extrato de planta permitem a comparação da capacidade antioxidante entre os diferentes extratos de plantas numa mesma concentração.

Tabela 8: Resultados obtidos pelo método voltamétrico proposto (%) e o método do DPPH• (%) para a capacidade antioxidante dos extratos de plantas testados.

Extrato de planta (mg L ⁻¹)	Capacidade antioxidante (radical OH, %)	Constante cinética calculada (k_2 , min ⁻¹) (x 10 ⁻³)	Capacidade antioxidante (radical DPPH, %)	r
<i>Cymbopogon citratus</i>				
100	66,3	21,4	34,2	0,9914
200	76,1	15,2	52,5	
1000	88,2	7,5	89,5	
<i>Psidium guajava</i>				
100	72,8	17,3	93,9	0,9940
200	79,2	13,2	94,8	
1000	88,2	7,5	96,7	
<i>Achyrocline satureoides</i>				
100	50,2	31,6	32,1	0,8854
200	75,3	15,7	49,9	
1000	84,9	9,6	92,3	

Baccharis genistelloides

100	72,1	17,7	28,0	0,9953
200	83,5	10,5	49,7	
1000	98,7	0,8	91,6	

Matricaria chamomilla L.

100	71,0	18,4	31,3	0,9223
200	86,0	8,9	51,1	
1000	94,0	3,8	96,8	

A fim de validar os resultados obtidos para as constantes cinéticas, que são diretamente relacionadas à capacidade antioxidante, compararam-se os resultados obtidos pelo método voltamétrico proposto com os valores da capacidade antioxidante obtidos através do método espectrofotométrico do DPPH[•], sendo que houve uma boa correlação entre ambos os métodos (ver Tabela 8), tendo-se por base a variação da concentração dos extratos.

Ambos os métodos exibem boa correlação quando se altera a concentração dos extratos de 100 a 1000 mg L⁻¹ de todas as plantas estudadas. Os resultados mostrados na Tabela 8 permitem também a comparação dos diferentes extratos de plantas medicinais em relação a suas diferentes capacidades antioxidantes. Os extratos das plantas têm, a uma mesma concentração, diferentes capacidades antioxidantes, como determinado pelos métodos do DPPH[•] e eletroquímico. Isso certamente ocorre devido às diferentes espécies antioxidantes presentes nas plantas medicinais. Além disso, a concentração e a classe da espécie antioxidante possuem um papel muito importante, o que leva a uma capacidade antioxidante específica para cada planta. É interessante notar que todos os extratos de plantas exibem capacidades antioxidantes diferentes em ambos os ensaios para cada concentração testada, isto é, não há uma correlação significativa entre o ensaio eletroquímico (HO[•]) e o ensaio espectrofotométrico (DPPH[•]) (Figura 18).

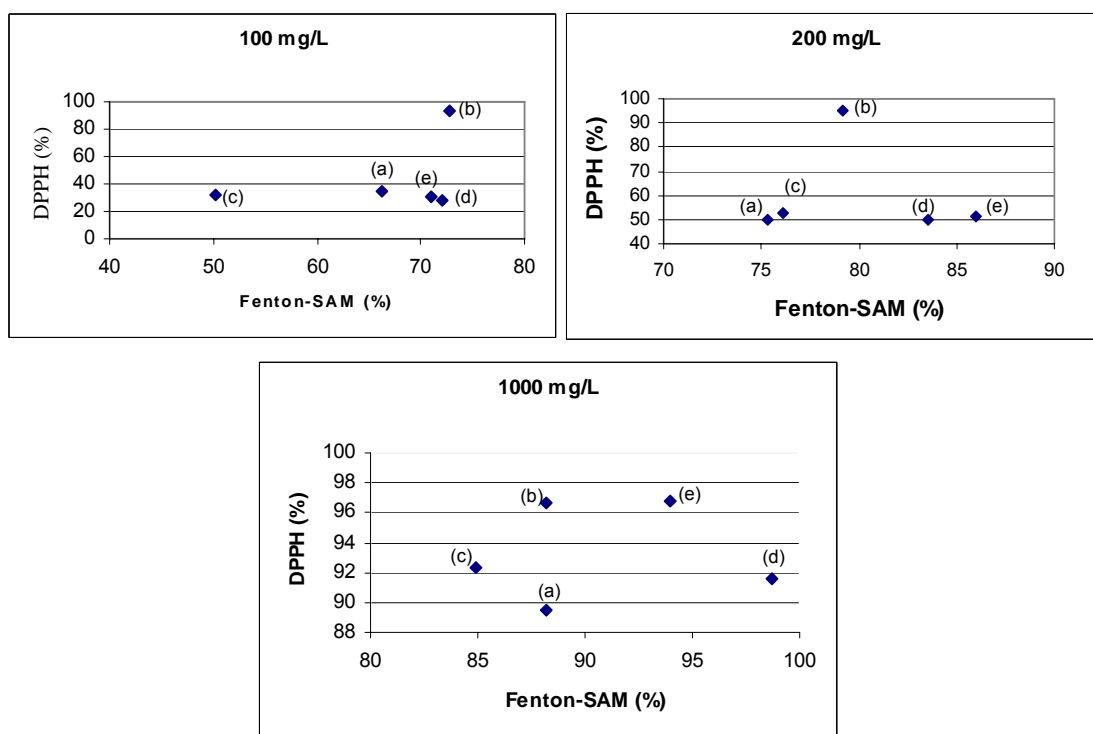


Figura 18: Correlação entre os métodos eletroquímico (Fenton-SAM) e espectrofotométrico (DPPH[•]) para as três concentrações de extratos testadas (100, 200 e 1000 mg L⁻¹), observando-se a inexistência de correlações significativas entre ambos os métodos. (a) *C. citratus*; (b) *P. guajava*; (c) *A. saturooides*; (d) *B. genistelloides*; (e) *M. chamomilla*.

As diferenças observadas podem ser explicadas em virtude das diferenças existentes entre as duas espécies radicalares: o radical estável e pouco reativo (DPPH[•]), e o radical instável e altamente reativo (HO[•]). Como os vários extratos de plantas possuem na mesma concentração (em termos de mg de planta por mL) diferentes concentrações de compostos extraídos, e estes compostos também irão diferir em sua natureza química, deve-se esperar que a reatividade destes diferentes compostos em diferentes concentrações seja diferente para cada radical testado. As seguintes equações ajudam a entender as diferenças observadas nas respostas obtidas pelos dois métodos. No ensaio do DPPH[•], a seguinte reação ocorre na presença de um antioxidante AH:



O desaparecimento de DPPH[•] indica a capacidade antioxidante da solução. A absorvância decai como resultado da mudança de cor de violeta para amarelo quando o radical reage com o antioxidante através da doação de um átomo de hidrogênio para formar o composto estável DPPH-H.

No método voltamétrico proposto, há a competição de duas reações simultâneas:



Uma vez que os radicais HO destroem a SAM, o sinal eletroquímico do par redox indica o grau de extensão de dissolução da SAM, e a destruição da SAM é retardada pela adição de um antioxidante à solução de Fenton.

Para o melhor entendimento das diferenças entre os dois ensaios, usou-se ácido ascórbico como antioxidante-padrão em concentrações de 1 a 40.000 mg L⁻¹. Os resultados são mostrados na Figura 19. Optou-se por ácido ascórbico em vez de padrões de compostos fenólicos devido à baixa solubilidade destes compostos em soluções aquosas. Estes padrões são solúveis apenas em solventes orgânicos, como metanol e etanol, ou em água quente. No entanto, o solvente orgânico poderia sequestrar os radicais HO gerados pela solução de Fenton. Além disso, a eficiência da utilização do H₂O₂ decresce em temperaturas acima de 40 °C, devido à sua decomposição em oxigênio e água. Consequentemente, usou-se ácido ascórbico como antioxidante-padrão para efeito de comparação neste trabalho.

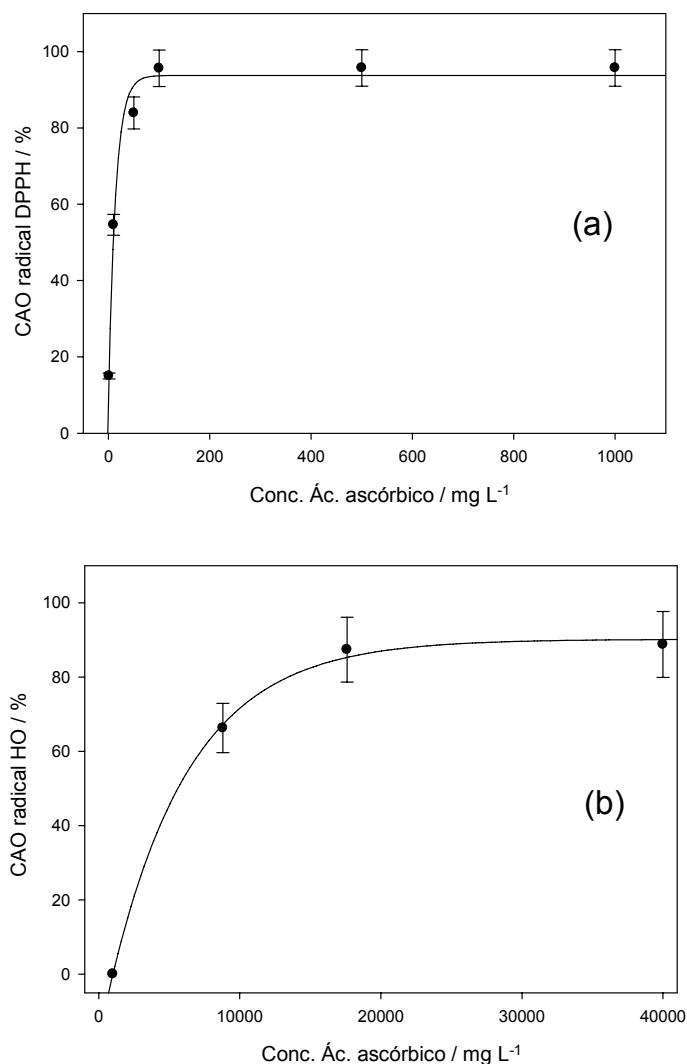


Figura 19: (a) Dependência entre a concentração de ácido ascórbico e a capacidade antioxidante contra DPPH[•]; (b) dependência entre a concentração de ácido ascórbico e a capacidade antioxidante contra HO[•].

No ensaio do DPPH[•] (Figura 19a), distinguem-se dois diferentes domínios: em concentrações de 1 a 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, a sua capacidade antioxidante varia; e, em concentrações de 100 a 1000 mg L⁻¹, a capacidade antioxidante atinge um ponto de saturação. O ensaio eletroquímico apresenta variação em toda a faixa de 1000 a 40.000 mg L⁻¹ (Figura 19b). Apesar das diferenças nas faixas de concentração acessíveis, é possível ver que ambos os métodos apresentam o mesmo comportamento, isto é, a capacidade antioxidante aumenta com a concentração de ácido ascórbico até um ponto em que ocorre o

consumo total dos radicais livres em solução pelo ácido ascórbico, resultando no crescimento exponencial observado em ambos os gráficos.

4.1.3 Conclusões parciais referentes aos ensaios eletroquímicos

1) O primeiro ensaio eletroquímico proposto (seção 4.1.1) não pôde ser usado para a determinação da capacidade antioxidante de extratos de plantas medicinais, visto que há uma competição entre a riboflavina e compostos que se adsorvem espontaneamente no eletrodo de PIGE.

2) Já o segundo ensaio eletroquímico proposto (seção 4.1.2) permite a determinação da atividade antirradicalar de extratos de plantas através do esquema mostrado na Figura 20. Uma vez que os radicais HO, gerados pela reação de Fenton, destroem a SAM, o sinal eletroquímico do par redox indica o grau de dissolução da SAM, sendo que a destruição desta é retardada com a adição de compostos antioxidantes à solução de Fenton. De acordo com os resultados obtidos, quanto menor o valor da constante cinética (k_2), maior o poder antioxidante do composto estudado.

3) De posse de tais resultados, vê-se que diferentes testes *in vitro* resultam em diferentes respostas para a capacidade antioxidante de uma mesma substância. Devido a essa disparidade de resultados frente a diferentes métodos, os testes *in vitro* não refletem a “verdadeira capacidade antioxidante” das substâncias. Para alcançar tal resposta, deve-se, primeiramente, conseguir responder a questões sobre como os antioxidantes são absorvidos pelo corpo humano, como ocorre seu transporte através das biomembranas, como estes compostos são metabolizados, etc. Apenas de posse de tais respostas e comparando-as com os testes *in vitro*, será possível eleger um ensaio como sendo “o mais confiável” em termos da quantificação da capacidade antioxidante.

Em função dessas dificuldades, o próximo tópico trata da comparação da capacidade antioxidante dos extratos de plantas através de testes *in vitro* e *in vivo*, uma vez que apenas a correlação entre ambos os testes permitirá dizer corretamente qual o melhor composto antioxidante.

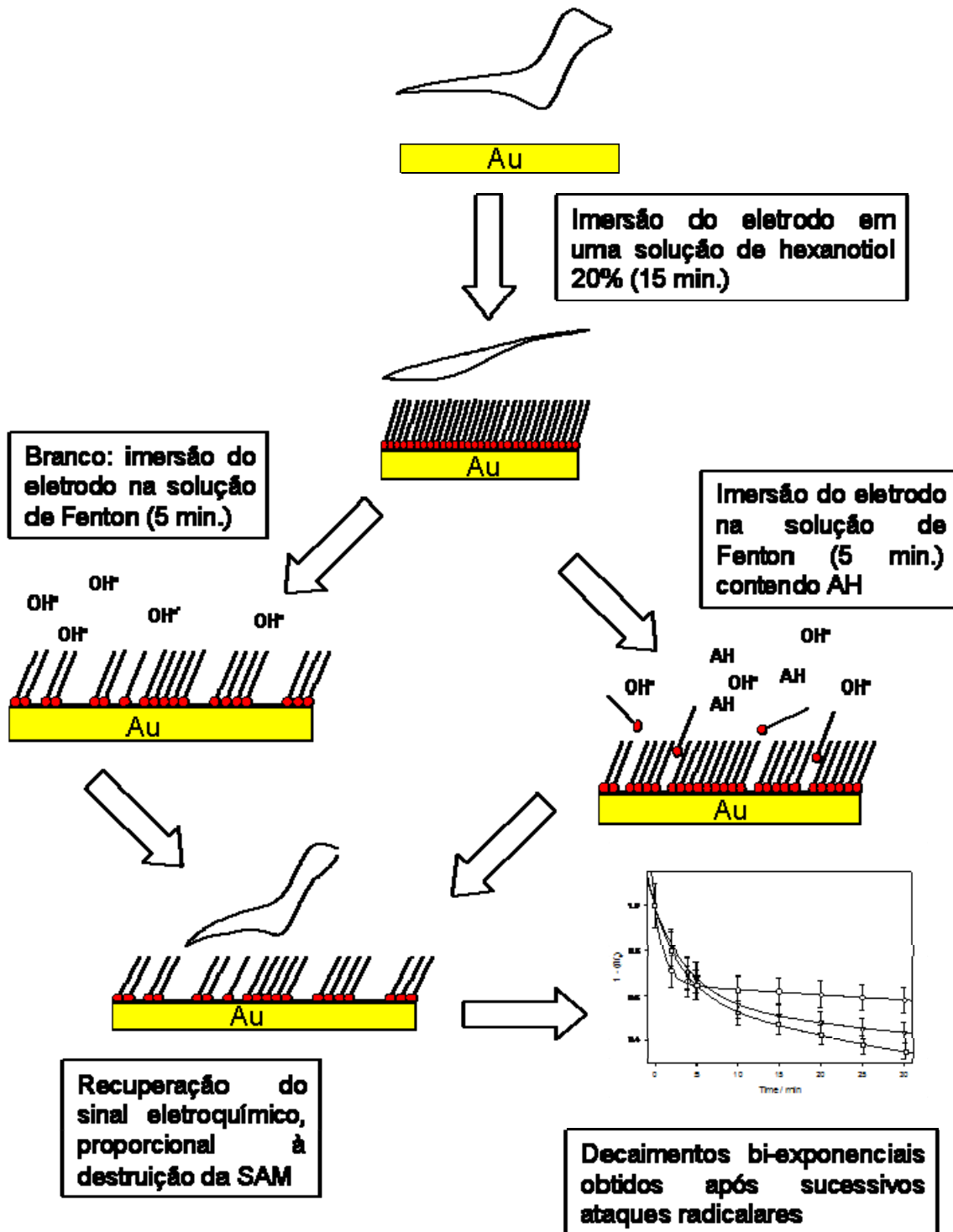


Figura 20: Mecanismo mostrando a variação do sinal do par redox com a formação e dissolução da SAM, frente o ataque de radicais HO.

4.2 Estudo fluorimétrico do poder antioxidante de extratos de plantas medicinais

O princípio por trás dos métodos fluorimétricos propostos para a determinação da capacidade antioxidante total contra radicais peroxila e hidroxila baseia-se no trabalho de Amado et al. [AMADO, 2009], que realiza a detecção indireta de ERO por fluorimetria (ex/em: 485/520 nm) empregando diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) como substrato. O DCFH-DA, após sofrer desacetilação, pode ser oxidado por ERO, gerando fluorescência. No primeiro método (seção 4.2.1), há a geração de radicais peroxila através da termodegradação do reagente cloreto de 2,2'-azobis (2-metilamidinopropano) (ABAP) a 37°C. E, num segundo método (seção 4.2.2), testou-se a capacidade antioxidante total das amostras contra os radicais hidroxila gerados pela reação de Fenton.

4.2.1 Determinação da capacidade antioxidante *in vitro* contra radicais peroxila em amostras de extratos de plantas

Neste primeiro estudo, a metodologia de Amado et al. foi otimizada para a avaliação da capacidade antioxidante total contra peroxi-radicais em amostras de extratos de plantas medicinais e compostos fenólicos. Na metodologia proposta pelos autores [AMADO, 2009], a desacetilação do DCFH-DA é feita pelas esterases presentes nas amostras de tecidos do peixe *Jenynsia multidentata* (Anablebidae), como mostrado na Figura 21.

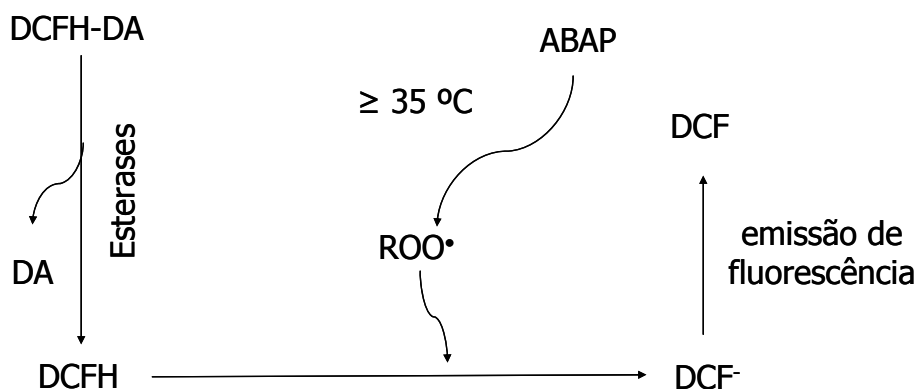


Figura 21: Esquema ilustrando a metodologia para a medida da capacidade antioxidante contra radicais peróxila (adaptado de Amado, 2009). Detalhes: ver texto.

Após a desacetilação do DCFH-DA, o composto resultante (DCFH) pode ser oxidado pelos radicais gerados a partir da termodegradação do ABAP, resultando no composto DCF, que é detectado nos comprimentos de onda de 488 e 525 nm, para excitação e emissão, respectivamente. A decomposição térmica do ABAP e consequente formação de ROO^\bullet é monitorada por 30 min, com leituras a cada 5 min. A produção de fluorescência total é calculada pela integração das unidades de fluorescência (UF) pelo tempo de reação, sendo que os dados se ajustam a uma função polinomial de segunda ordem (Figura 22). Os resultados são expressos pela diferença de área ($\text{UF} \times \text{min}$) da mesma amostra com e sem a adição de ABAP, e normalizados em função da área de ERO sem ABAP (controle). A diferença relativa entre a área de ERO com e sem ABAP é considerada a medida da capacidade antioxidante.

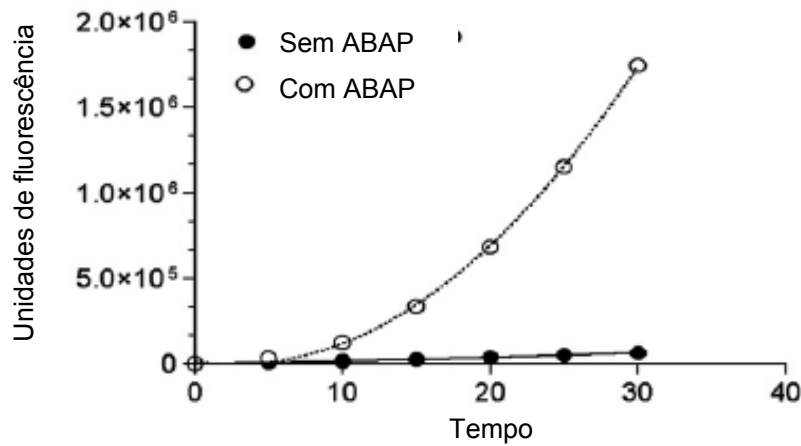


Figura 22: Resultados típicos obtidos pelo método ACAP mostrando a variação da fluorescência com o tempo, sem e com a adição de ABAP (adaptado de Amado, 2009).

Porém, ao aplicar tal metodologia às amostras de extratos de plantas, foram obtidos os resultados mostrados na Figura 23. Como pode ser constatado pela figura, os valores obtidos são negativos, possivelmente devido à baixa concentração proteica das amostras, o que faz com que não haja a desacetilação do composto DCFH-DA e, conseqüentemente, não ocorra uma produção significativa de fluorescência nas amostras.

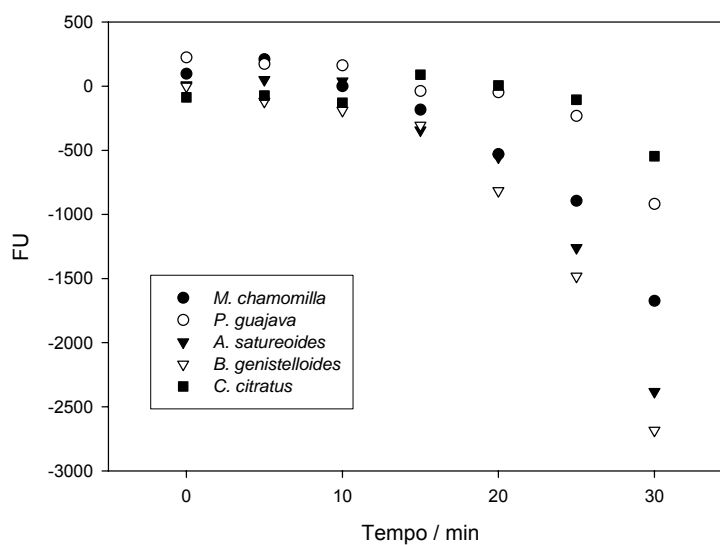


Figura 23: Resultados obtidos para as cinco amostras de plantas estudadas na concentração de 1000 mg L⁻¹, segundo a metodologia de Amado et al. [AMADO, 2009] para a determinação da capacidade antioxidante contra radicais peroxila. Detalhes: ver texto.

Diante destes resultados, optou-se por fazer a desacetilação química do composto DCFH-DA. Para isso, usou-se o procedimento de desacetilação descrito por Takanashi et al. [TAKANASHI, 1997] (ver seção 3.4.3.1). A Figura 24 mostra as curvas obtidas pela nova metodologia aplicada às 5 amostras de extratos das plantas medicinais estudadas, numa concentração de 1000 mg L⁻¹. Nesta nova metodologia, a capacidade antioxidante das amostras foi estimada pela diferença das áreas das curvas de fluorescência registradas na presença e na ausência de ABAP em função do tempo (30 min). A diferença relativa entre as curvas das amostras e a do controle é considerada como sendo a medida da capacidade antioxidante, já que uma grande diferença entre as áreas significa uma boa capacidade antioxidante, uma vez que os valores de fluorescência são obtidos após a formação de ERO, o que significa uma grande competência em neutralizar os radicais peroxila. Assim, a capacidade antioxidante da amostra é dada pela equação 38:

$$\text{CAO (\%)} = \left[1 - \left(\frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) \right] \times 100 \quad (38)$$

onde A_{amostra} e A_{controle} são as áreas referentes às curvas obtidas para a amostra e para o controle (branco), respectivamente.

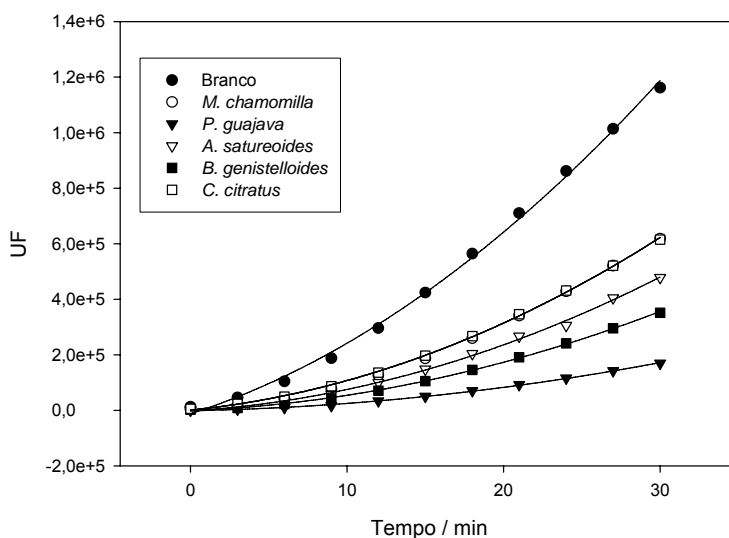


Figura 24: Resultados obtidos para as 5 amostras de plantas medicinais estudadas numa concentração de 1000 mg L^{-1} , com uma etapa prévia de desacetilação química do composto DCFH-DA, de acordo com a metodologia desenvolvida. Detalhes: ver texto.

Com a diminuição da concentração dos extratos, observa-se que há uma aproximação entre as curvas das amostras e a do controle, evidenciando uma menor capacidade antioxidante dos extratos em menores concentrações (Figuras 25 e 26). Um resumo dos resultados obtidos para a capacidade antioxidante dos extratos de plantas nas 3 concentrações testadas encontra-se na Tabela 9. Resultados semelhantes são obtidos quando se analisa apenas a diferença entre os valores de fluorescência gerados ao final do tempo de reação (Figura 27). Nesse caso, a capacidade antioxidante é determinada de forma análoga à equação do método do DPPH* :

$$\text{CAO (\%)} = \left(\frac{\text{UF}_{\text{controle}} - \text{UF}_{\text{amostra}}}{\text{UF}_{\text{controle}}} \right) \times 100 \quad (39)$$

onde $\text{UF}_{\text{controle}}$ e $\text{UF}_{\text{amostra}}$ são os valores em unidades de fluorescência gerados pelo controle (branco) e pela amostra, respectivamente. A ótima correlação entre ambas as formas permite que a quantificação da capacidade antioxidante seja feita por qualquer uma das duas formas.

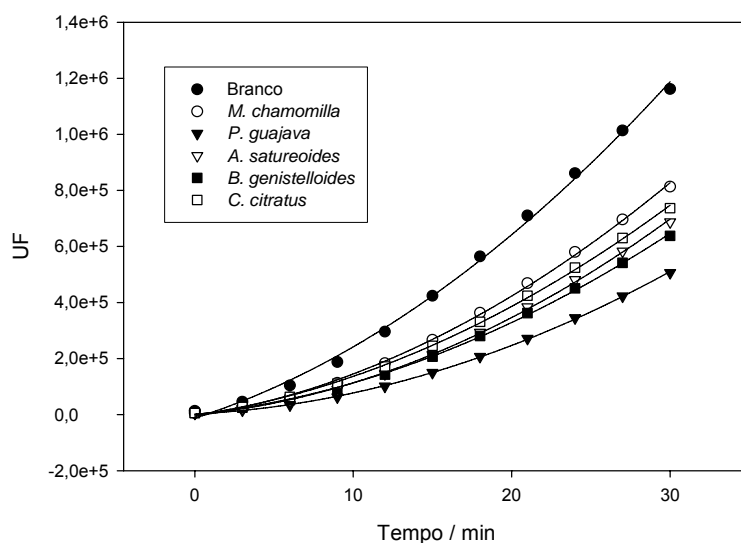


Figura 25: Resultados obtidos para as 5 amostras de plantas medicinais estudadas numa concentração de 200 mg L⁻¹, com uma etapa prévia de desacetilação química do composto DCFH-DA, de acordo com a metodologia desenvolvida.

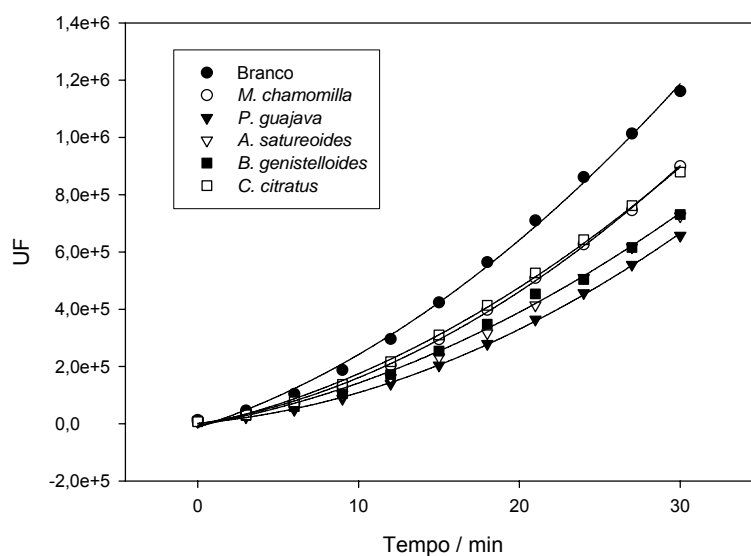


Figura 26: Resultados obtidos para as 5 amostras de plantas medicinais estudadas numa concentração de 100 mg L⁻¹, com uma etapa prévia de desacetilação química do composto DCFH-DA, de acordo com a metodologia desenvolvida.

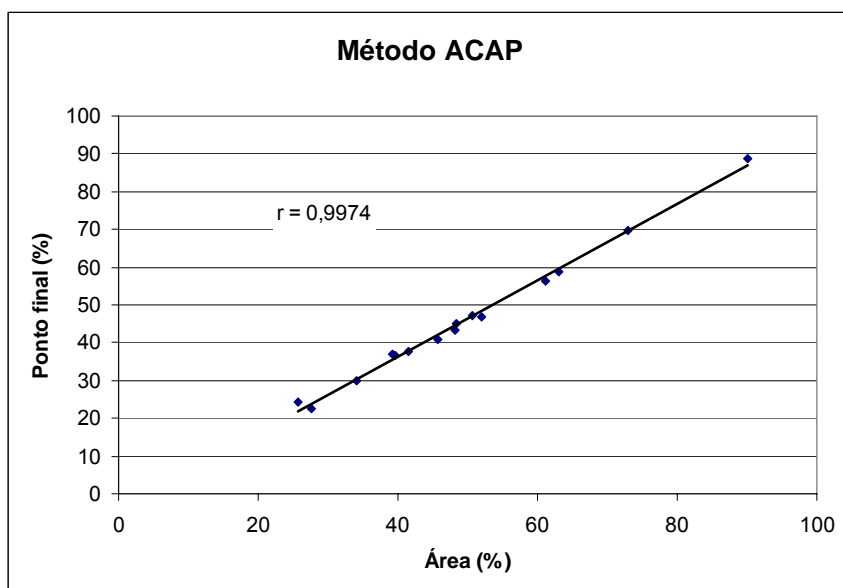


Figura 27: Correlação entre os duas diferentes formas de quantificação da capacidade antioxidante testadas. A primeira considera o valor da área da curva obtida entre a reação de ERO e compostos antioxidantes durante 30 min de reação. A segunda considera apenas os valores de fluorescência gerados após 30 min de reação, de acordo com a eq. 39.

Tabela 9: Resultados obtidos pelo método fluorimétrico proposto (%) e o método do DPPH* (%) para a capacidade antioxidante dos extratos de plantas testados.

Extrato de planta (mg L ⁻¹)	Capacidade antioxidante (radical ROO, %)	Capacidade antioxidante (radical DPPH, %)	r
<i>Cymbopogon citratus</i>			
100	25,7	3,3	0,9342
200	39,6	13,0	
1000	50,7	45,1	
<i>Psidium guajava</i>			
100	48,1	88,3	0,9974
200	61,2	90,1	
1000	90,1	93,1	
<i>Achyrocline satureoides</i>			
100	41,6	27,5	0,9998
200	45,8	39,8	
1000	63,1	95,3	

Baccharis genistelloides

100	39,2	31,5	0,9925
200	48,4	57,2	
1000	72,9	98,6	

Matricaria chamomilla L.

100	27,6	9,9	0,9979
200	34,0	20,7	
1000	52,0	63,5	

Pela Tabela 9 pode-se concluir que, assim como no método voltamétrico proposto, cada planta possui uma capacidade antioxidante específica, a qual depende da concentração do extrato. Os resultados obtidos foram comparados aos do método do DPPH^{*}, e houve uma boa correlação entre ambos os métodos, tendo-se por base a variação da concentração dos extratos. O radical peroxila possui um tempo de meia-vida muito superior ao do radical hidroxila (7 s e 10⁻⁹ s, respectivamente), o que confere ao ROO^{*} uma maior estabilidade e, conseqüentemente, menor reatividade. Apesar disso, novamente observa-se que não há uma correlação significativa entre os dois ensaios testados – os ensaios fluorimétrico ACAP (ROO^{*}) e espectrofotométrico (DPPH^{*}) (Figura 28), - a exemplo dos resultados obtidos para os ensaios voltamétrico (HO^{*}) e espectrofotométrico DPPH^{*} (Figura 18).

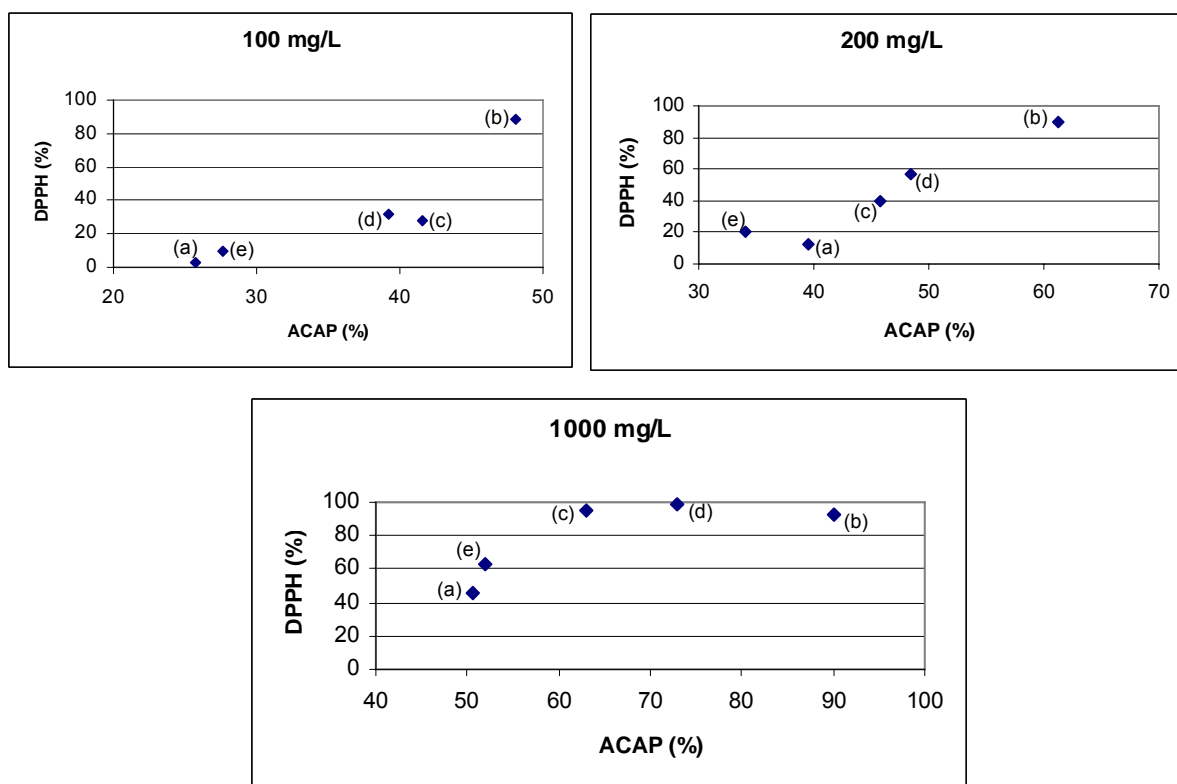


Figura 28: Correlação entre os métodos fluorimétrico (ACAP) e espectrofotométrico (DPPH^{*}) para as três concentrações de extratos testadas (100, 200 e 1000 mg L⁻¹), observando-se a inexistência de correlações significativas entre ambos os métodos. (a) *C. citratus*; (b) *P. guajava*; (c) *A. saturooides*; (d) *B. genistelloides*; (e) *M. chamomilla*.

A fim de se realizar uma análise estatística entre as capacidades antioxidantes exibidas pelas diferentes plantas, testou-se a capacidade antioxidante de diferentes amostras comerciais das plantas em estudo, com exceção da planta *P. guajava*, da qual não se conseguiu nenhuma amostra comercial. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 10, assim como a média entre as diferentes amostras e o coeficiente de variação (CV).

Analisando-se os resultados obtidos, verifica-se que há grandes variações no valor da capacidade antioxidante entre amostras da mesma espécie, o que pode ser facilmente explicado pelo fato de que a síntese de metabólitos secundários (neste caso, as espécies antioxidantes) é seriamente afetada por condições ambientais, como sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, presença de nutrientes, altitude, poluição atmosférica e ataque de patógenos. Além disso, no caso de plantas medicinais, os processos de coleta, estabilização e secagem também possuem grande influência no teor e composição de metabólitos secundários [GOBBO-NETO, 2007]. Entretanto, é possível verificar que na maior concentração testada (1000 mg L^{-1}), obtêm-se os menores valores de coeficientes de variação para todos os extratos.

A análise estatística foi feita por ANOVA, e constatou-se que, apesar das grandes diferenças entre as diferentes amostras da mesma espécie, a *P. guajava* foi a planta que apresentou a melhor capacidade antioxidante contra peroxi-radicaís e, em contraste, a *C. citratus* apresentou o pior desempenho. As plantas *M. chamomilla*, *B. genistelloides* e *A. saturoides* apresentam, estatisticamente, o mesmo desempenho quanto à capacidade antioxidante.

Tabela 10: Resultados obtidos pelo método fluorimétrico proposto para a avaliação da capacidade antioxidante de extratos de plantas contra radicais peroxila.

Planta	100 mg L ⁻¹	200 mg L ⁻¹	1000 mg L ⁻¹
<i>M. chamomilla</i>			
Amostra 01	27,6	34,0	52,0
Amostra 02	19,3	34,8	61,8
Amostra 03	35,6	39,6	70,7
Amostra 04	40,6	44,5	63,6
Amostra 05	26,9	31,6	63,7
Média	30,0	36,9	62,4
CV	24,6	12,5	9,6
<i>A. saturooides</i>			
Amostra 01	41,6	45,8	63,1
Amostra 02	1,7	18,2	52,8
Amostra 03	16,8	23,7	35,1
Amostra 04	12,2	29,6	61,6
Amostra 05	7,3	17,7	57,5
Amostra 06	33,6	40,6	63,2
Média	18,9	29,3	55,6
CV	75,3	36,6	17,7
<i>B. genistelloides</i>			
Amostra 01	39,2	48,4	72,9
Amostra 02	24,7	34,5	61,3
Amostra 03	3,8	22,8	47,3
Amostra 04	13,1	20,3	42,0
Amostra 05	2,7	16,8	55,5
Média	16,7	28,6	55,8
CV	82,3	40,5	19,4

<i>C. citratus</i>			
Amostra 01	25,7	39,6	50,7
Amostra 02	0,0	1,1	12,7
Amostra 03	0,0	4,9	10,6
Média	8,6	15,2	24,7
CV	141,4	114,0	74,7
<i>P. guajava</i>			
Amostra 01	48,1	61,2	87,1
Amostra 02	44,6	61,7	89,2
Média	46,4	61,5	88,2
CV	3,8	0,4	1,2

4.2.2 Determinação da capacidade antioxidante *in vitro* contra radicais hidroxila em amostras de extratos de plantas

Nesta segunda metodologia, avalia-se a capacidade antioxidante total contra radicais hidroxila. A metodologia baseia-se na detecção indireta do radical hidroxila por fluorimetria (ex/em: 485/520 nm), empregando diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) como substrato. O DCFH-DA, após sofrer desacetilação química, pode ser oxidado por ERO, gerando fluorescência (Figura 29).

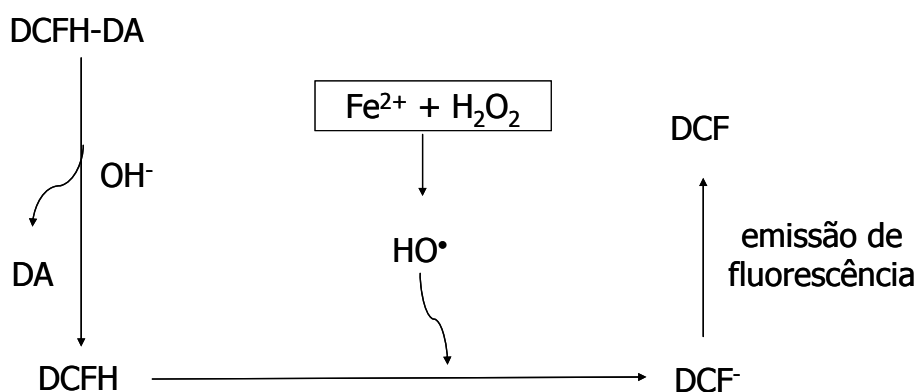


Figura 29: Esquema ilustrando a metodologia para a medida da capacidade antioxidante contra radicais hidroxila. Detalhes: ver texto.

O protocolo foi aplicado em amostras das cinco espécies de plantas estudadas. Os extratos aquosos das plantas foram expostos aos radicais hidroxila gerados pela reação de Fenton (equação 33). A capacidade antioxidante das amostras foi estimada pela diferença entre os valores de fluorescência gerados ao final de 5 minutos de reação na presença e na ausência das amostras, de acordo com a equação 39. Os resultados obtidos para as amostras de extratos de plantas são mostrados na Tabela 11.

Os resultados permitem constatar que há grandes variações no valor da capacidade antioxidante entre amostras da mesma espécie contra radicais OH, assim como no método fluorimétrico anterior para radicais ROO. E, da mesma forma, é possível verificar que, na maior concentração testada (1000 mg L⁻¹), obtêm-se os menores valores de coeficientes de variação para todos os extratos.

A análise estatística foi feita por ANOVA, e constatou-se que, apesar das grandes diferenças entre as diferentes amostras da mesma espécie, a *P. guajava* foi, novamente, a planta que apresentou a melhor capacidade antioxidante contra radicais hidroxila, seguida pela *B. genistelloides*. As plantas *M. chamomilla*, *C. citratus* e *A. saturoides* apresentam, estatisticamente, o mesmo desempenho quanto à capacidade antioxidante contra radicais hidroxila pelo método fluorimétrico proposto e adaptado de Amado et al. [AMADO, 2009].

Os resultados obtidos por esta metodologia foram comparados com os obtidos pela metodologia proposta para avaliar a capacidade antioxidante contra

radicais peroxila, obtendo-se uma boa correlação entre as amostras de extratos de plantas (Figura 30), apesar da diferença de reatividade entre ambos os radicais.

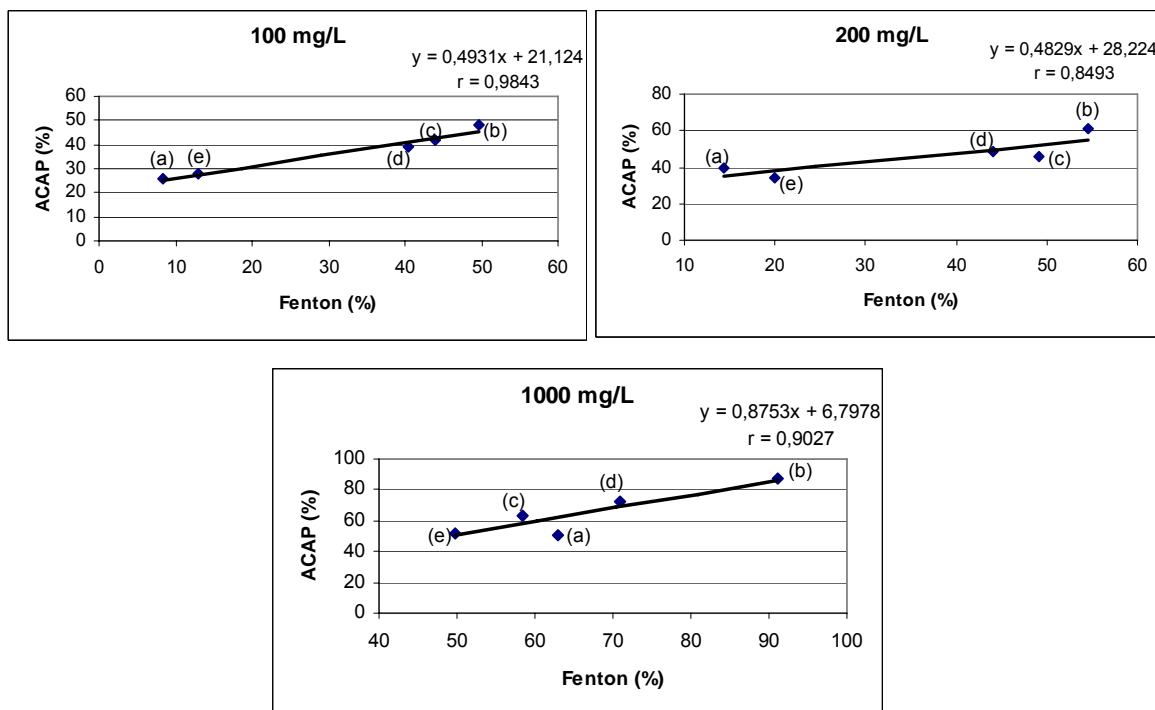


Figura 30: Correlações entre os resultados obtidos pelos métodos fluorimétricos desenvolvidos para avaliar a capacidade antioxidante contra radicais peroxila e hidroxila em amostras de extratos de plantas nas três concentrações de extratos testadas (100, 200 e 1000 mg L⁻¹). (a) *C. citratus*; (b) *P. guajava*; (c) *A. saturooides*; (d) *B. genistelloides*; (e) *M. chamomilla*.

Tabela 11: Resultados obtidos pelo método fluorimétrico proposto para a avaliação da capacidade antioxidante de extratos de plantas contra radicais hidroxila.

Planta	100 mg L ⁻¹	200 mg L ⁻¹	1000 mg L ⁻¹
<i>M. chamomilla</i>			
Amostra 01	12,9	19,9	49,8
Amostra 02	23,9	28,0	48,4
Amostra 03	30,1	38,2	63,9
Amostra 04	20,8	31,9	47,6
Amostra 05	23,4	39,0	58,0
Média	22,2	31,4	53,5
CV	25,1	22,4	11,9
<i>A. saturooides</i>			
Amostra 01	43,9	49,1	58,4
Amostra 02	3,8	14,9	56,0
Amostra 03	16,4	39,1	65,4
Amostra 04	20,3	35,4	53,0
Amostra 05	29,9	43,2	61,7
Amostra 06	9,2	21,0	60,9
Média	20,6	33,8	59,2
CV	64,6	35,7	6,8
<i>B. genistelloides</i>			
Amostra 01	40,5	44,1	71,0
Amostra 02	25,5	30,5	64,8
Amostra 03	53,0	57,7	79,0
Amostra 04	21,7	29,3	80,3
Amostra 05	41,6	64,7	88,6
Média	36,5	45,3	76,7
CV	31,4	31,3	10,6

C. citratus

Amostra 01	8,3	14,4	63,0
Amostra 02	0,0	25,7	53,8
Amostra 03	35,2	43,6	65,2
Média	14,5	27,9	60,7
CV	103,6	43,1	8,1

P. guajava

Amostra 01	49,7	54,5	91,2
Amostra 02	51,9	67,8	90,3
Média	50,8	61,2	90,8
CV	2,2	10,9	0,5

4.3 Determinação da capacidade antioxidante *in vitro* de compostos fenólicos contra radicais peroxila e hidroxila

Os métodos desenvolvidos e otimizados neste trabalho foram aplicados para a determinação da capacidade antioxidante de alguns compostos fenólicos (antioxidantes naturais) normalmente encontrados em plantas medicinais e outros produtos como bebidas e alimentos. O objetivo deste estudo é avaliar a contribuição individual desta classe de compostos para a capacidade antioxidante total em espécies vegetais que permita uma avaliação quantitativa destas espécies como antioxidantes frente a radicais livres. Os resultados apresentados a seguir empregando métodos *in vitro* independentes foram empregados no estudo dos compostos rutina, quercetina, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido rosmarínico e resveratrol, os quais estão presentes em plantas medicinais.

Dentre os métodos estudados, o método voltamétrico descrito no capítulo 4.1 não foi empregado para a avaliação da capacidade antioxidante devido à baixa solubilidade dos compostos fenólicos em água em temperatura ambiente. Com isso, o uso de calor (para a solubilização dos compostos) iria acelerar a decomposição de H_2O_2 (necessário para a reação de Fenton), e o uso de solventes orgânicos iria interferir no resultado final, uma vez que solventes como metanol e etanol podem sequestrar espécies radicalares.

O método fluorimétrico desenvolvido para radicais peroxila foi empregado inicialmente para os sete compostos fenólicos (rutina, quercetina, resveratrol, ácido cafeico, ácido gálico, ácido rosmarínico e ácido ferúlico) nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 31, exceto para o resveratrol, que não apresentou capacidade antioxidante nas condições empregadas. Pelos resultados, verifica-se que cada composto possui uma capacidade antioxidante específica, a qual depende da concentração do composto. Com isso, ao ordenar esses compostos quanto às suas capacidades antioxidantes, deve-se levar em conta a concentração dos mesmos. Na maior concentração (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$), estabelece-se a seguinte ordem decrescente de capacidade antioxidante: ácido rosmarínico = quercetina > ácido gálico = ácido cafeico > rutina > ácido ferúlico > resveratrol. Já para a concentração de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, obtém-se a seguinte ordem: quercetina > ácido rosmarínico > ácido gálico > ácido cafeico > rutina > ácido ferúlico

> resveratrol. E para a menor concentração ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$), tem-se: quercetina > ácido rosmarínico > ácido cafeico > ácido gálico = rutina > ácido ferúlico > resveratrol.

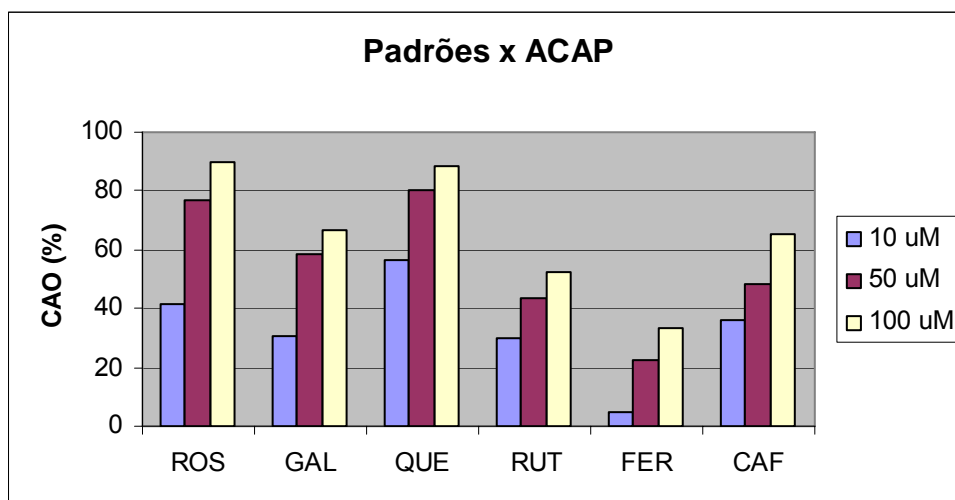


Figura 31: Resultados obtidos para a capacidade antioxidante de diferentes compostos fenólicos nas concentrações de 10, 50 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ contra radicais peroxila (CAO: capacidade antioxidante; ROS: ácido rosmarínico; GAL: ácido gálico; QUE: quercetina; RUT: rutina; FER: ácido ferúlico; CAF: ácido cafeico).

O método fluorimétrico desenvolvido para radicais hidroxila foi empregado também para os sete compostos fenólicos nas concentrações de 10, 50 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 32, exceto para o resveratrol, que não apresentou capacidade antioxidante nas condições empregadas. Pelos resultados verifica-se que cada composto possui uma capacidade antioxidante específica, a qual depende da concentração do composto. Com isso, ao ordenar esses compostos quanto às suas capacidades antioxidantes, deve-se levar em conta a concentração dos mesmos. Na maior concentração ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), estabelece-se a seguinte ordem decrescente de capacidade antioxidante: ácido rosmarínico > quercetina > ácido cafeico = rutina = ácido gálico > ácido ferúlico > resveratrol. Já para a concentração de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ obtém-se a seguinte ordem: ácido rosmarínico > ácido cafeico = quercetina > ácido gálico > rutina > ácido ferúlico > resveratrol. E, para a menor concentração ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$), tem-se: quercetina > ácido cafeico > rutina > ácido rosmarínico > ácido ferúlico = ácido gálico > resveratrol.

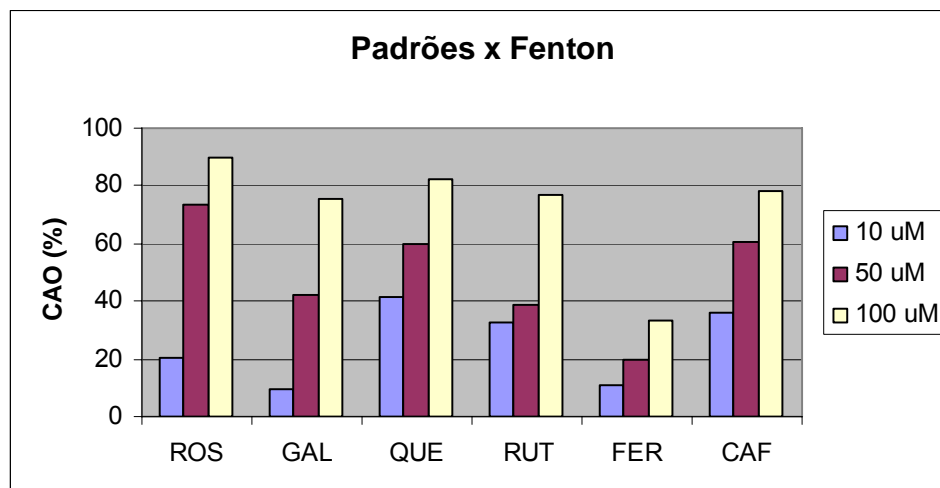


Figura 32: Resultados obtidos para a capacidade antioxidante de diferentes compostos fenólicos nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ contra radicais hidroxila (CAO: capacidade antioxidante; ROS: ácido rosmarínico; GAL: ácido gálico; QUE: quercetina; RUT: rutina; FER: ácido ferúlico; CAF: ácido cafeico).

A Figura 33 mostra a correlação obtida com os métodos fluorimétricos para radicais ROO e OH adaptados para os estudos com compostos fenólicos antioxidantes. Como se pode ver, há uma correlação de 86,55% entre os compostos estudados pelo mesmo método fluorimétrico empregando 2 espécies radicalares diferentes.

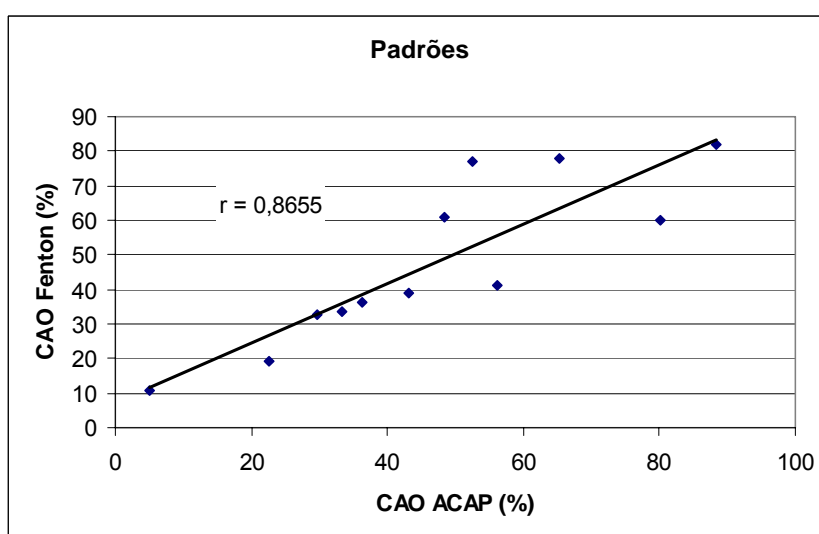


Figura 33: Correlação entre os resultados obtidos pelos métodos fluorimétricos desenvolvidos para avaliar a capacidade antioxidante contra radicais peroxila e hidroxila em amostras de compostos fenólicos nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

A Tabela 12 permite um estudo comparativo dos resultados obtidos pelos métodos estudados neste trabalho com outros resultados prévios obtidos no nosso grupo de pesquisa por outros métodos *in vitro* que empregam a geração fotoquímica de radicais OH e a detecção fotométrica dos compostos fenólicos aqui estudados [LIMA, 2010]. Para efeito de comparação, adota-se a concentração fixa de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para cada composto estudado. Pelos resultados, verifica-se que cada composto possui uma capacidade antioxidante específica, a qual varia de acordo com o método empregado. Com isso, ao ordenar esses compostos quanto às suas capacidades antioxidantes, deve-se levar em conta o método que está sendo utilizado.

Esse fato fica evidenciado na Tabela 13. A tabela apresenta a classificação decrescente da capacidade antioxidante para os cinco diferentes compostos fenólicos mostrados na tabela 12 de acordo com o ensaio e o radical testados. Como se pode verificar, a ordenação destes compostos quanto à capacidade antioxidante varia para os diferentes ensaios testados. Entretanto, observa-se que, excetuando-se o ensaio fotométrico com fotólise de H_2O_2 , os compostos rutina, quercetina e ácido cafeico são os compostos que apresentam a maior capacidade antioxidante, apesar da classificação ser diferente de acordo com o ensaio. Do mesmo modo, verifica-se que os compostos ácido ferúlico e resveratrol são os que apresentam os piores resultados para a capacidade antioxidante. Assim, é possível classificar estes compostos em dois grupos distintos: o primeiro contendo os compostos rutina, quercetina e ácido cafeico (melhor capacidade antioxidante) e outro contendo os compostos ácido ferúlico e resveratrol (pior capacidade antioxidante). A interação do radical HO gerado fotoquimicamente na presença de H_2O_2 e do radical HO gerado pela reação de Fenton não se dá da mesma forma do ponto de vista cinético, sendo a influência do meio reacional uma provável explicação para as diferenças encontradas. Já o bom desempenho apresentado por ácido ferúlico e resveratrol no ensaio fotométrico com fotólise de H_2O_2 pode ser explicado pelo fato de não haver seletividade na medida espectrofotométrica. Com isso, é muito provável que tenha-se um aumento do valor de absorvância lido devido à presença de subprodutos gerados na reação entre o composto fenólico e o radical HO.

Tabela 12: Resultados obtidos para a capacidade antioxidante de compostos fenólicos empregando diferentes métodos *in vitro*.

Composto (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$)	Capacidade antioxidante				
	Método fluorimétrico*	Método fluorimétrico*	Método fotométrico*	Método fotométrico**	HPLC-UV**
	(radical ROO - ACAP)	(radical OH - Fenton)	(radical DPPH)	(radical OH – Fotólise do H_2O_2)	(radical OH – Fotólise do H_2O_2)
Rutina	43,2	38,8	96,8	85,4	87,6
Quercetina	80,1	59,9	80,1	47,8	47,4
Ácido Cafeico	48,4	60,8	95,0	10,8	52,6
Ácido Ferúlico	22,6	19,4	60,1	79,1	47,3
Resveratrol	0	0	47,5	28,8	2,0

*Resultado expresso em percentual da atividade antioxidante de acordo com as equações descritas para cada método *in vitro*.

** Resultado expresso em função do decaimento do sinal analítico do antioxidante após reação com o radical OH [LIMA, 2010].

Tabela 13: Classificação dos diferentes compostos fenólicos testados em função do método utilizado e do radical gerado. A concentração de todos os compostos fenólicos é de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (RUT: rutina; QUE: quercetina; RES: resveratrol; CAF: ácido cafeico; FER: ácido ferúlico).

Ensaio	Radical testado	Capacidade antioxidante
DPPH	DPPH [•]	RUT=CAF>QUE>FER>RES
Fluorimetria (ACAP)	ROO [•]	QUE>CAF>RUT>FER>RES
Fluorimetria (Fenton)	HO [•]	CAF=QUE>RUT>FER>RES
HPLC-UV (fotólise H ₂ O ₂)	HO [•]	RUT>CAF=QUE=FER>RES
Fotometria (fotólise H ₂ O ₂)	HO [•]	RUT>FER>QUE>RES>CAF

4.4 Determinação da concentração de ERO intracelular

O estudo comparativo da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de extratos de plantas visa buscar uma correlação entre ambos os ensaios, e, com isso, classificar estas espécies quanto ao seu “real” poder antioxidante. A correlação almejada é verificar se os extratos de plantas que apresentam a melhor e a pior capacidade antioxidante *in vitro*, também exibem este comportamento num ensaio *in vivo*, sem causar danos aos organismos aos quais foram expostos.

Os resultados obtidos com a metodologia proposta foram avaliados em ensaios *in vivo*, utilizando hepatócitos do peixe zebra (*Danio rerio*), expostos por 4 horas aos extratos das plantas *P. guajava* e *C. citratus* (melhor e pior desempenho *in vitro*, respectivamente, segundo o método fluorimétrico). Os resultados obtidos mostraram que a exposição dos hepatócitos aos extratos das plantas alterou o número de células viáveis (Figura 34) no caso do extrato de *P. guajava* 1000 mg L⁻¹, ou seja, houve morte celular com a exposição deste extrato na maior concentração. Já para os outros extratos testados, não verificou-se alteração no número de células viáveis.

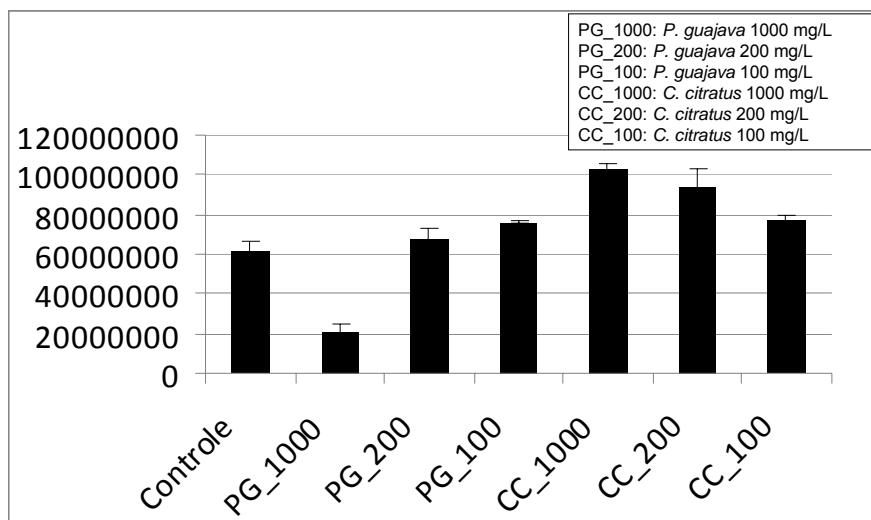


Figura 34: Resultados obtidos para o teste de viabilidade celular, sendo que o número de células viáveis foi afetado apenas para células expostas ao extrato de *P. guajava* 1000 mg L⁻¹.

Além disso, observou-se uma redução da concentração de ERO intracelular em forma dose-dependente nos hepatócitos expostos a *P. guajava* ($p < 0,05$), sem se observar efeito antioxidante no ensaio com *C. citratus* ($p > 0,05$), como mostrado na Figura 35.

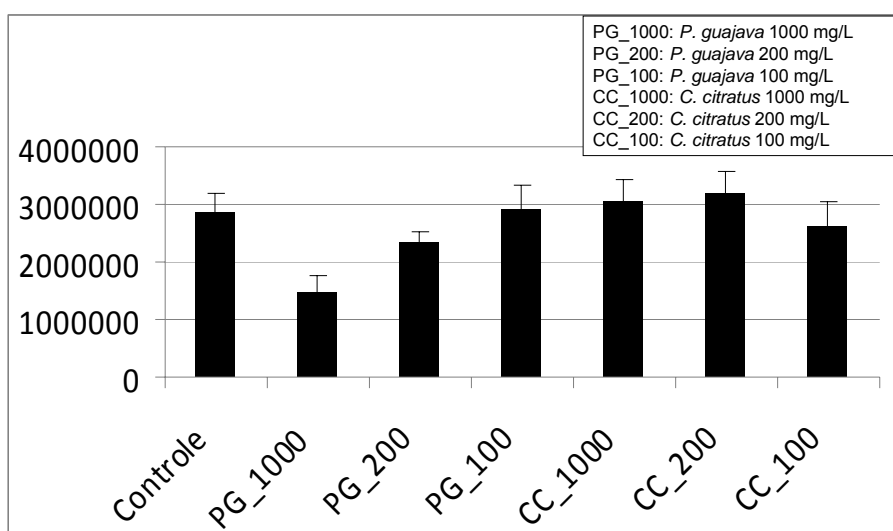


Figura 35: Resultados obtidos para a determinação da concentração de ERO intracelular, em que se observa uma redução da concentração de ERO intracelular nos hepatócitos expostos ao extrato de *P. guajava* (PG), sem se observar alteração para os hepatócitos expostos ao extrato de *C. citratus* (CC).

Os resultados dos ensaios *in vivo* corroboram os resultados dos ensaios *in vitro*, uma vez que a amostra de *P. guajava* (amostra 01, Tabela 10) apresentou capacidade antioxidante, enquanto a amostra de *C. citratus* (amostra 02, Tabela 10) – a amostra que apresentou a pior capacidade antioxidante *in vitro* dentre todas as testadas – não apresentou capacidade antioxidante intracelular, mesmo numa concentração de 1000 mg L⁻¹.

Baseado neste protocolo desenvolvido, ensaios futuros podem possibilitar uma correlação muito mais abrangente entre métodos *in vitro* para radicais ROO e OH com dados *in vivo* para os mesmos radicais livres estudados. Somente desta forma, a avaliação quantitativa de espécies antioxidantes (plantas medicinais e compostos fenólicos) pode ser realizada e concluída, uma vez que ensaios baseados em metodologias independentes e com princípios físicos de medida do sinal analítico também diferentes, apresentam, muitas vezes, resultados contraditórios ou desordenados de um ponto de vista classificatório para espécies antioxidantes.

4.5 Conclusões parciais referentes aos ensaios fluorimétricos

1) As metodologias propostas permitem a determinação da capacidade antioxidante *in vitro* de extratos de plantas contra radicais peroxila (seção 4.2.1) e hidroxila (seção 4.2.2), através da detecção indireta destas ERO por fluorimetria empregando DCFH como substrato. A diferença relativa entre os valores de fluorescência gerados ao final do tempo de reação na presença e na ausência das ERO é considerada como sendo a medida da capacidade antioxidante.

2) Pelos resultados dos ensaios *in vitro*, é possível constatar que as diferentes metodologias resultam em diferentes respostas para a capacidade antioxidante de uma mesma substância. Contra radicais peroxila, a *P. guajava* foi a planta que apresentou a melhor resposta antioxidante e, em contraste, a *C. citratus* apresentou o pior desempenho. As plantas *M. chamomilla*, *B. genistelloides* e *A. saturoides* apresentam, estatisticamente, o mesmo desempenho quanto à capacidade antioxidante contra radicais peroxila. Já contra radicais hidroxila, a *P. guajava*

também foi a planta que apresentou a melhor capacidade antioxidante, seguida pela *B. genistelloides*. As plantas *M. chamomilla*, *A. saturoides* e *C. citratus* apresentam, estatisticamente, o mesmo desempenho quanto à capacidade antioxidante contra radicais hidroxila.

3) Os resultados obtidos com os ensaios *in vivo* tiveram boa correlação com os ensaios *in vitro*, na medida em que os hepatócitos do peixe zebra expostos ao extrato da *P. guajava* (melhor desempenho *in vitro*) mostraram uma redução na concentração de ERO intracelular, sem se observar efeito antioxidante no ensaio com a *C. citratus* (pior desempenho antioxidante *in vitro*).

5 CONCLUSÕES FINAIS

1) Apesar dos diferentes resultados obtidos entre todos os métodos adotados, chega-se a importantes conclusões. Todos os ensaios realizados fornecem, de alguma forma, informações muito relevantes, mesmo o ensaio do DPPH (que não é um radical encontrado no corpo humano), uma vez que ensaios *in vitro* servem como uma pré-avaliação sobre a capacidade antioxidante das amostras. De fato, neste caso houve uma boa correlação: a *P. guajava* apresentou efeito antioxidante *in vivo* (e possuía o melhor desempenho *in vitro*), e o *C. citratus* não apresentou efeito antioxidante *in vivo* (pior desempenho *in vitro*).

2) A capacidade antioxidante das plantas é específica para cada método e depende da concentração da amostra. Na concentração de 1000 mg L⁻¹, que é a concentração que apresenta o menor valor de coeficiente de variação para todos os extratos de plantas, chega-se à seguinte ordem decrescente de capacidade antioxidante:

Voltametria (Fenton): *B. genistelloides* = *M. chamomilla* L. > *C. citratus* = *P. guajava* = *A. saturoides*

Fluorimetria (Fenton): *P. guajava* > *B. genistelloides* > *C. citratus* = *A. saturoides* = *M. chamomilla* L.

Fluorimetria (ACAP): *P. guajava* > *M. chamomilla* L. = *B. genistelloides* = *A. saturoides* > *C. citratus*

Verifica-se que diferentes classificações são obtidas pelos 2 métodos fluorimétricos (ACAP x Fenton). Essas diferenças podem ser explicadas pelos diferentes radicais utilizados (que possuem diferentes estabilidades, reatividades e concentrações). Pelo fato de a *B. genistelloides* apresentar um melhor resultado frente ao radical OH, pode-se supor que ela apresente uma característica quelante, o que geraria menos radicais OH e, conseqüentemente, geraria uma capacidade antioxidante maior frente a estes radicais.

Já as diferentes classificações obtidas entre a voltametria e fluorimetria (que empregam a reação de Fenton) são mais difíceis de explicar. Ambos os métodos utilizam a mesma geração radicalar, porém em concentrações diferentes

(voltametria: 100 mM Fe/500 mM H₂O₂; fluorimetria: 100 µM Fe/500 µM H₂O₂). Entretanto, pode-se atribuir esta diferença às características das próprias plantas, uma vez que foram colhidas num intervalo de 2 anos, ou seja, a composição química e a concentração de metabólitos secundários são diferentes entre as amostras da mesma espécie. O único resultado semelhante foi o fato de a *A. saturooides* e *C. citratus* estarem na última posição nos 2 métodos (pior capacidade antioxidante).

3) A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos é específica para cada método e também depende da concentração desses compostos, e os diferentes métodos *in vitro* nem sempre fornecem a mesma informação quantitativa frente às diferentes ERO. Na concentração de 50 µM (concentração média utilizada neste estudo), verifica-se que o meio reacional desempenha um papel-chave no valor da capacidade antioxidante e que, dependendo da forma como é gerado o radical e do princípio da medida instrumental, os resultados obtidos muitas vezes são conflitantes. Todavia, assim como no caso dos extratos de plantas, é possível separar alguns compostos em grupos de diferentes reatividades.

4) Analisando-se os prós e contras dos métodos desenvolvidos, pode-se constatar que (i) para os métodos fluorimétricos, as grandes vantagens são o tempo de análise (que permite a análise de um grande número de amostras em replicatas) e o baixo consumo de reagentes (o volume total adicionado em cada poça é de 165 µL), além de ser um método que não apresenta uma grande desvantagem; (ii) já no método eletroquímico, a grande desvantagem é, sem dúvida, o tempo de análise (limpeza do eletrodo, preparação da SAM, etc.), que permite a análise de poucas amostras em um único dia. Porém, as possibilidades para futuros trabalhos são enormes. Escolhendo-se apropriadamente a camada que recobre o eletrodo, abre-se um enorme leque de opções, pois, além das informações a respeito da interação entre composto antioxidante e radical gerado, é possível obter tais informações em um sistema biomimético, ou seja, além da determinação da capacidade antioxidante, é possível determinar como se dá a interação entre radical livre e camada utilizada. Assim, trabalhos que selecionem camadas apropriadas para o recobrimento do eletrodo (como lipossomas, lipídios e proteínas) serão de extrema importância, já que fornecerão resultados com um substrato mais apropriado, ou seja, substâncias encontradas no corpo humano. Além disso, existe a facilidade de este método ser

adaptado para testes com diferentes ERO e há a possibilidade de miniaturização dos eletrodos, o que permite uma grande interatividade com outras disciplinas.

5) Em vista de todos os resultados aqui apresentados e discutidos, fica a pergunta: *afinal, qual é o melhor método para a avaliação da capacidade antioxidante de amostras biológicas?*

Certamente é um método que utilize o radical hidroxila, que é uma das espécies mais danosas ao corpo humano. Todavia, como o presente trabalho mostrou de forma clara, resultados conflitantes são encontrados mesmo quando se trabalha com o mesmo radical, mas em condições diferentes (concentração de reagentes, pH, meio reacional, sinal analítico investigado, etc.). Com isso, é de se esperar que resultados em ensaios *in vivo* também apresentem certa disparidade, já que as condições fisiológicas variam de pessoa para pessoa. Além disso, os ensaios aqui apresentados possuem um tempo curto de geração radicalar (5 e 30 min para os radicais HO e ROO, respectivamente). Novamente, ao transferir-se esse fato para o que acontece no corpo humano, deve-se ter em mente que os estudos *in vivo* deverão levar em consideração questões como a absorvidade e o transporte dos compostos analisados, para que estes estejam presentes em locais próximos aos sítios onde e no momento em que houver a geração de ERO *in vivo*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLARA, D.L. Critical issues in applications of Self-Assembled Monolayers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 10, p. 771 – 783, 1995.

AL-FATIMI, M. et al. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 657 – 666, 2007.

AMADO, L.L. et al. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 2115 – 2123, 2009.

AMEH, S.J. et al. Current phytotherapy – a perspective on the science and regulation of herbal medicine. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, p. 72 – 81, 2010.

ANDERSEN, Ø.M.; MARKHAM, K.R. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. Boca Raton: CRC Press, 2006.

BAIN, C.D. et al. Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, p. 321 – 335, 1989.

BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431 – 441, 2005.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relações entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113 – 123, 2006.

BENZIE, I.F.F. et al. Consumption of green tea causes rapid increase in plasma antioxidant power in humans. **Nutrition and Cancer**, v. 34, p. 83 – 87, 1999.

BHATENA, S.J.; VELASQUEZ, M.T. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, p. 1191 – 1201, 2002.

BLAND, J.S. Phytonutrition, phytotherapy, and phytopharmacology. **Alternative Therapies in Health and Medicine**, v. 2, p. 73 – 76, 1996.

CAI, H. et al. Determination of the flavone tricetin in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 17, p. 435 – 439, 2003.

CAO, G.; PRIOR, R.L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. **Clinical Chemistry**, v. 44, p. 1309 – 1315, 1998.

CAPASSO, R. et al. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71, p. S58 – S65, 2000.

CARVALHO, L.M et al. Voltametria de Micropartículas Imobilizadas: fundamentos e aplicações analíticas. **Química Nova**, aceito para publicação, 2010.

CLÉMENT, M.V.; POTON, A.; PERVAIZ, S. Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion concentration and reduction of intracellular milieu. **FEBS Letters**, v. 440, p. 13 – 18, 1998.

COOK, N.C.; SAMMAN, S.; Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, p. 66 – 76, 1996.

CUSTÓDIO, T.A.S. **Azeites extra-virgem comerciais: composição em compostos voláteis e relação com parâmetros químicos de qualidade**. 2009. Dissertação de Mestrado – Universidade do Porto, Porto, 2009.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47 – 95, 2002.

DUDONNE, S.E. et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1768 – 1774, 2009

FIGUEIRINHA, A. et al. *Cymbopogon citratus* leaves: characterization of flavonoids by HPLC-PDA-ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. **Food Chemistry**, v. 110, p. 718 – 728, 2008.

FLOCCARI, F. et al. Oxidative stress and uremia. **Medicinal Research Reviews**, v. 25, p. 473 – 486, 2005.

FREI, B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. **The American Journal of Medicine**, v. 97, suplemento 3, p. 5S – 13S, 1994.

GHISELLI, A. et al. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical review and experimental data. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, p. 1106 – 1114, 2000.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374 – 381, 2007.

GONZÁLEZ, G.L.L. **Development of new electroanalytical methods for the determination of hydrogen peroxide and oxygen radicals**. 2008. Tese – Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Greifswald, Alemanha, 2008.

GRUNBERGER, G.; JEN, K.L.; ARTISS, J.D. The benefits of early intervention in obese diabetic patients with FBCx(TM) – a new dietary fibre. **Diabetes – Metabolism Research and Reviews**, v. 23, p. 56 – 62, 2007.

GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. Three different pathways for human LDL oxidation are inhibited in vitro by water extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureoides*. **Life Sciences**, v. 71, p. 693 – 705, 2002.

GUTIÉRREZ, R.M.P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R.V. *Psidium guajava*: A review of its uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 1 – 27, 2008.

HALLIWELL, B. et al. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, p. 601 – 617, 1995.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.C.M. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. New York: Oxford University Press, 2007.

HAMPTON, M.B.; ORRENIUS, S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. **FEBS Letters**, v. 414, p. 552 – 556, 1997.

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.

HOLLMAN, P.C.H. et al. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in Man. **FEBS Letters**, v. 418, p. 152 – 156, 1997.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841 – 1856, 2005.

HÜSKEN, A. et al. Resveratrol glucoside (Piceid) synthesis in seeds of transgenic oilseed rape (*Brassica napus* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 111, p. 1553 – 1562, 2005.

HYUN, J.; CHILKOTI, A. Surface-initiated free radical polymerization of polystyrene micropatterns on a Self-Assembled Monolayer on gold. **Macromolecules**, v. 34, p. 5644 – 5652, 2001.

JANIK, I.; BARTELS, D.M.; JONAH, C.D. Hydroxyl radical self-recombination reaction and absorption spectrum in water up to 350°C. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 111, p. 1835 – 1843, 2007.

KATSUBE, T. et al. Screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein assay, DPPH radical scavenger assay, and Folin-Ciocalteu assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2391 – 2396, 2004.

KRIS-ETHERTON, P.M. et al. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **American Journal of Medicine**, v. 113, suplemento 9B, p. 71 – 88, 2002.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**. 2ª ed, São Paulo: Sarvier, 1995.

LI, B.Q. et al. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 276, p. 534 – 538, 2000.

LIMA, F. **Estudo fotoquímico da ação anti-radicalar de compostos polifenólicos empregando espectrofotometria e HPLC-UV**. 2010. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

LIOCHEV, S.I.; FRIDOVICH, I. The role of $O_2^{\bullet-}$ in the production of HO^{\bullet} : *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 16, p. 29 – 33, 1994.

LOVE, J.C. et al. Self-Assembled Monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 105, p. 1103 – 1169, 2005.

MARKOVICH, I.; MANDLER, D. Disorganized self-assembled monolayers (SAMs): the incorporation of amphiphilic molecules. **The Analyst**, v. 126, p. 1850 – 1856, 2001.

MEHTA, R.A. et al. Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life. **Natural Biotechnology**, v. 206, p. 613 – 618, 2002.

MELO, S.F. et al. Effect of the *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. **Mutation Research**, v. 496, p. 33 – 38, 2001.

MOREIRA, F.P.M. et al. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – bioatividade sobre *Artemia salina*. **Química Nova**, v. 26, p. 309 – 311, 2003.

NETZ, P.A.; ORTEGA, G.G. **Fundamentos de Físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas**. 2ª reimpressão revisada, Porto Alegre: Artmed, 2002.

NEWMAN, D.J.; GRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461 – 477, 2007.

NEYENS, E.; BAEYENS, J. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. **Journal of Hazardous Materials**, v. B98, p. 33 – 50, 2003.

OLMOS, A.; GINER, R.M.; MÁNEZ, S. Drugs modulating the biological effects of peroxynitrite and related nitrogen species. **Medicinal Research Reviews**, v. 27, p. 1 – 64, 2007.

PACKER, L.; WITT, E.H.; TRITSCHLER, H.J. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, p. 227 – 250, 1995.

PIETTA, P.G. et al. Relationship between rate and extent of catechin absorption and plasma antioxidant status. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 46, p. 895 – 903, 1998.

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

PLAZA, C.V. **Investigação fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante das folhas e frutos de *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae)**. 2007. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

PLOSCH, T. Et al. Reduction of cholesterol absorption by dietary plant sterols and stanols in mice is independent of the Abcg5/8 transporter. **Journal of Nutrition**, v. 136, p. 2135 – 2140, 2006.

PRIOR, R.L.; CAO, G.H. Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: a review. **Journal of AOAC International**, v. 83, p. 950 – 956, 2000.

PUPPO, A.; HALLIWELL, B. Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron: is haemoglobin a biological Fenton reagent? **Biochemical Journal**, v. 249, p. 185 – 190, 1988.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Contents and antibacterial activity of flavonoids extracted from leaves of *Psidium guajava*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, p. 393 – 396, 2010.

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

REGOLI, F.; WINSTON, G.W. Quantification of total scavenging capacity of antioxidants for peroxynitrite, peroxy radicals, and hydroxyl radicals. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 156, p. 96 – 105, 1999.

REIN, D. Et al. Transgenic flavonoid tomato intake reduces C-reactive protein in human C-reactive protein transgenic mice more than wild-type tomato. **Journal of Nutrition**, v. 136, p. 2331 – 2337, 2006.

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

RUBINSTEIN, I.; FUJIHIRA, M.; RUSLING, J.F. **Modified Electrodes**. Wiley-VCH, 2007. (Encyclopedia of Electrochemistry, 10).

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radicals scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, p. 121 – 137, 2002.

SCHEIBMEIR, H.D. et al. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. **Intensive and Critical Care Nursing**, v. 21, p. 24 – 28, 2005.

SCHIJLEN, E.G. et al Pathway engineering for healthy phytochemicals leading to the production of novel flavonoids in tomato fruit. **Plant Biotechnology Journal**, v. 4, p. 433 – 444, 2006.

SCHOLZ, F. et al. Indirect electrochemical sensing of radicals and radicals scavengers in biological matrices. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, p. 8079 – 8081, 2007.

SCHREIBER, F. Structure and growth of self-assembling monolayers. **Progress in Surface Science**, v. 65, p. 151 – 256, 2000.

SCHWENTLICK, K. Et al. **Chemische Kinetic**. Leipzig: Verlag Chemie, 1973.

SERAFINI, M.; MAIANI, G.; FERRO-LUZZI, A. Effect of ethanol on red wine tannin-protein (BSA) interactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3148 – 3151, 1997.

STRYER, L. **Biochemistry**. 2^a ed, USA: Freeman and Company Limited Publishers, 1981.

TAKANASHI, T. et al. Fluorophotometric quantitation of oxidative stress in the retina *in vivo*. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 38, p. 2721 – 2728, 1997.

ULMAN, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. **Chemical Reviews**, v. 96, p. 1533 – 1554, 1996.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519 – 528, 2005.

VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, p. 85 – 94, 2005.

VERZA, S.G. et al. Avaliação das variáveis analíticas do método de Folin-Ciocalteu para determinação do teor de taninos totais utilizando como modelo o extrato aquoso de folhas de *Psidium guajava* L. **Química Nova**, v. 30, p. 815 – 820, 2007.

VILLA, R.F.; GORINI, A. Pharmacology of lazaroids and brain energy metabolism: a review. **Pharmacological Reviews**, v. 49, p. 99 – 136, 1997.

WARIS, G.; AHSAN, H. Reactive oxygen species: role in the development of câncer and various chronic conditions. **Journal of Carcinogenesis**, v. 5, p. 14 – 21, 2006.

WAYNER, D.D.M. et al. Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capacity of human blood plasma by controlled peroxidation. **FEBS Letters**, v. 187, p. 33 – 37, 1985.

WHITESIDES, G.M.; GRZYBOWSKI, B. Self-assembly at all scales. **Science**, v. 295, p. 2418 – 2421, 2002.

WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues, 2007.

WIKIPEDIA – phytotherapy. Disponível em: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Phytotherapy>> Acesso em maio 2010.

WINSTON, G.W. et al. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, p. 480 – 493, 1998.

YAMASAKI, H.; SAKIHAMA, Y.; IKEHARA, N. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cell against H₂O₂. **Plant Physiology**, v. 115, p. 1405 – 1412, 1997.

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

ZHAO, J. Nutraceuticals, nutritional therapy, phytonutrients, and phytotherapy for improvement of human health: a perspective on plant biotechnology application. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 1, p. 75 – 97, 2007.

ZOULIS, N.E.; EFSTATHIOU, C.E. Preconcentration at a carbon-paste electrode and determination by adsorptive-stripping voltammetry of rutin and other flavonoids. **Analytica Chimica Acta**, v. 320, p. 255 – 261, 1996.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – SHOLZ, F. et al. Indirect electrochemical sensing of radicals and radicals scavengers in biological matrices. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, p. 8079 – 8081, 2007.

APÊNDICE 2 – HILGEMANN, M. et al. Electrochemical assay to quantify the hydroxyl radical scavenging activity of medicinal plant extracts. **Electroanalysis**, v. 22, p. 406 – 412, 2010