

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

MAYARA FERNANDES SIMÕES SILVA

Análise do efeito antioxidante de amostras vegetais por ressonância paramagnética eletrônica e ressonância magnética nuclear.

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Bacharel em Física Médica.

Orientador : Prof. Dr. Roberto Morato Fernandez

Botucatu
Dezembro de 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Silva, Mayara Fernandes Simões.

Análise do efeito antioxidante de amostras vegetais por ressonância paramagnética eletrônica e ressonância magnética nuclear / Mayara Fernandes Simões Silva. - Botucatu, 2014

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física médica) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Roberto Morato Fernandez

Coorientador: Giuseppina Pace Pereira Lima

Capes: 20901003

1. Antioxidantes. 2. Ressonância magnética nuclear. 3. Ressonância paramagnética eletrônica. 4. Reações de radicais livres. 5. Plantas - Análise.

Palavras-chave: Antioxidantes; DPPH; EPR; RMN; Radical livre.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, pela graça da vida e zelo, pois sem isto nada seria possível.

Aos meus pais por todo o apoio, confiança, educação, cobrança e amor incondicional que foram essenciais durante a minha trajetória até aqui.

Aos meus familiares e em especial minha Avó Alice, Tio Sérgio e Tia Inês por sempre estarem presentes e prontos para me ajudar diante de qualquer situação, bem como vibrarem comigo diante das minhas pequenas vitórias.

Ao Louis Maier por ser meu porto seguro diante de dificuldades enfrentadas no trabalho durante o período de estágio e intercâmbio na Alemanha e principalmente por me mostrar um mundo novo.

Ao Professor Klaus Vitold Jenderka e a University of Applied Sciences Hochschule Merseburg, na Alemanha, pela dedicação e colaboração prestadas a mim e a este trabalho.

A todos os meus amigos, em especial César Abud, Carlos Biagi Júnior, Kátia Takeda, Aline Katsurayama, Paloma Nardi, Paola Faccin, Beatriz Garcia e Luciana Cangussu por me mostrarem o valor de uma real amizade durante o curso.

Aos docentes do curso de Física Médica pelos ensinamentos e servidores da Unesp Botucatu por todo apoio necessário.

Ao meu orientador, pela ajuda e incentivo durante este trabalho, contribuindo para a minha formação e a Professora Fina pelo fornecimento das amostras utilizadas neste trabalho.

À todas as dificuldades enfrentadas no decorrer deste trabalho, pois elas me fizeram crescer e me ajudaram a me tornar uma pessoa melhor e ética, da qual tenho orgulho.

Por fim, agradeço a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, pelo privilégio de ser aluna desta instituição.

RESUMO

Algumas espécies vegetais apresentam substâncias antioxidantes, que são moléculas capazes de retardar ou até impedir o efeito oxidativo na membrana e em outras partes de uma célula. Este efeito é causado pelos radicais livres, que apresentam elétrons desemparelhados, são altamente instáveis, com meia-vida curta e quimicamente muito reativos.

Nesse contexto, foram escolhidas amostras vegetais de espinafre, casca de manga e a vagem que foram cultivadas e preparadas de diferentes maneiras a fim de avaliar o efeito antioxidante destas amostras. O preparo das amostras vegetais foi realizado no Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências - Unesp Botucatu.

As medidas e análises das amostras foram realizadas na Universidade de Ciências Aplicadas Hochschule Merseburg, na cidade de Merseburg - Alemanha, no Departamento de Engenharia e Ciências Naturais, por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). E a outra por espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) no departamento de Física da Universidade de São Paulo (USP).

Sendo assim, o projeto tem como objetivo a análise do efeito antioxidante das amostras vegetais pela captura do radical livre DPPH com os equipamentos de ressonância citados.

Após as análises concluiu-se que os diferentes tipos de cultivo e lavagens são interferem de forma significativa no efeito antioxidante das amostras, bem como todas as amostras apresentam o este efeito, porém a casca de manga tem maior eficácia, comprovando então que uma alimentação balanceada e rica em vegetais podem prevenir doenças que são causados pelo processo oxidativo celular.

Palavras-chave: DPPH, antioxidantes, ressonância magnética nuclear, ressonância paramagnética eletrônica.

ABSTRACT

In some vegetable there are antioxidants substances, which are molecules able to delay or to prevent the oxidative effect in the membrane and in the other parts of the cell. This effect is caused by free radicals, which have unpaired and highly unstable electrons with a short half-life and are chemically reactive.

In this context vegetable samples of spinach, mango and green beans were chosen, which were cultivated and prepared to analyze the antioxidant effect of these samples. The preparation of the vegetable samples was performed in the Department of Chemistry and Biochemistry of Biosciences Institute – Unesp Botucatu.

The measurement and analysis of the samples were performed in two stages: The first was performed in the University of Applied Sciences “Hochschule Merseburg” in the city Merseburg – Germany in the Department of Engineering and Natural Sciences by researching with nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). And the other by electron paramagnetic resonance spectroscopy (RPE) in the Department of Physics, in the University of São Paulo (USP).

Thus the project aims to analyze the antioxidant effect of vegetable samples for the capture of free radical DPPH with the with the resonance equipment mentioned.

After the analysis it was concluded, that the different types of cultivation and ways of washing do not interfere significantly on the antioxidant effect of the samples. All samples show this effect, but the mango is showing most effective result, so it is proving, that a balanced diet, which is rich in vegetables can prevent diseases, that are caused by cellular oxidative process.

Keywords: DPPH, antioxidants, nuclear magnetic resonance, electron paramagnetic resonance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição eletrônica do Oxigênio e sua ilustração, respectivamente	9
Figura 2 - Distribuição eletrônica do oxigênio molecular e sua ilustração, respectivamente ..	10
Figura 3 - Distribuição eletrônica superóxido e sua distribuição estrutural, respectivamente..	10
Figura 4 - Estabilização do radical livre DPPH.....	11
Figura 5 - Desdobramento Zeeman em $L=0$ e $S= \frac{1}{2}$, mostrando a transição de ressonância magnética na frequência ν e campo H_0	15
Figura 6 - Desdobramento hiperfino para $S = I= \frac{1}{2}$, mostrando a transição de ressonância magnética com acoplamento hiperfino	17
Figura 7 - Esquema do espectrômetro de EPR	19
Figura 8 - Diagrama de um espectrômetro de RMN	22
Figura 9 - Espectro de absorção óptica do DPPH puro, e com a adição de espinafre, de vagem e de casca de manga plantadas convencionalmente	24
Figura 10 - Espectro de absorção óptica do DPPH puro, e com a adição de espinafre, de vagem e de casca de manga plantadas organicamente	25
Figura 11 - Espectro de ressonância paramagnética eletrônica do DPPH puro, e com a adição de espinafre, de vagem e de casca de manga plantadas convencionalmente	26
Figura 12 - Espectro de ressonância paramagnética eletrônica do DPPH puro, e com a adição de espinafre, de vagem e de casca de manga plantadas organicamente	26
Figura - 13, 14, 15, 16, 17 e 18- Espectros de RMN das amostras branco, sample 1, sample 2 e yellow obtidas pelo ^1H (Figuras 13, 14, 15e 16 respectivamente), e das amostras branco e yellow obtidas pelo ^{13}C (Figuras 17 e 18 respectivamente)	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores das massas dos extratos utilizados na preparação das amostras	23
Tabela 2 - Valores da 2ª integral do espectro de RPE e redução percentual do DPPH presente nas amostras plantadas convencional e organicamente. Para DPPH puro, a 2ª integral foi de 712.10^6	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
EPR	Ressonância Paramagnética Nuclear
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
RPE	Electron Paramagnetic Resonance
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
USP	Universidade de São Paulo
UNESP	Universidade Estadual Paulista
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
a.C	Antes de Cristo
O	Oxigênio
O ₂	Oxigênio Molecular
Z	Número Atômico
ERMO	Espécies Reativas do Metabolismo do Oxigênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
CAF	Controle Automático da Frequência
RF	Radiofrequência
Sod	Dadismutase
Cat	Catalase
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GST	Glutathione S – Transferase
GSH	Glutathione Tripeptide glutathione
FID	Free Induction Delay
¹ H	Hidrogênio Um
¹³ C	Carbono Treze
THz	Terahertz
GHz	Gigahertz
Si(CH ₃) ₄	Tetrametilsilano
ΔE	Diferença de Energia
ppm	Parte por Milhão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	9
2.1 Os radicais livres.....	9
2.2 O radical livre DPPH	11
<i>2.2.1 O método do sequestro de DPPH.....</i>	<i>12</i>
2.3 Os antioxidantes.....	12
2.4 A ressonância paramagnética eletrônica.....	14
<i>2.4.1 Os princípios teóricos da técnica</i>	<i>14</i>
<i>2.4.2 O espectrômetro de EPR</i>	<i>17</i>
2.5 A ressonância magnética nuclear.....	19
<i>2.5.1 O espectrômetro de RMN</i>	<i>21</i>
3 OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo geral.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4 METODOLOGIA.....	22
4.1 O preparo das amostras	22
4.2 As medidas e análises das amostras	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	24
6 CONCLUSÕES.....	29
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1 INTRODUÇÃO

Em todo o processo evolutivo a interação entre o ser vivo e o meio ambiente é de extrema importância para a sobrevivência do indivíduo, bem como o seu crescimento e a sua reprodução. Vale ressaltar que as mudanças do meio ambiente guiam o processo evolutivo em conjunto com as adaptações biológicas.

O oxigênio molecular presente no meio ambiente é uma fonte de vida para os organismos aeróbicos, porém as espécies reativas do oxigênio formadas no meio intracelular destes organismos podem ameaçar a integridade celular através da oxidação de biomoléculas e podem ainda comprometer processos metabólicos importantes.

Mesmo com a consolidação da sobrevivência e o bem estar dos indivíduos na sociedade, nos dias atuais é visível o aumento de diversas doenças como o desenvolvimento de doenças crônicas, inflamatórias e degenerativas. Tais doenças podem estar relacionadas ao processo oxidativo das células do organismo gerando danos como a inativação enzimática, mutação, ruptura da membrana, aumento da aterogenicidade de lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade e morte celular.

O processo oxidativo está ligado à substâncias chamadas radicais livres. Os radicais livres são espécies químicas constituídas de um átomo ou um conjunto de átomos que possui um elétron desemparelhado na sua camada mais externa, ou seja, um orbital semi-preenchido. Isso faz com que o átomo adquira alta instabilidade energética e cinética, uma vez que para se manter estável é necessário que ocorra reações de óxido-redução, quimicamente reativas e com meia-vida curtíssima.

Com a descoberta dos processos de óxido-redução nos organismos houve uma eclosão nas áreas de investigação destas espécies em conjunto com a investigação de doenças. Sabe-se hoje que a origem de diversas doenças pode estar associada à desestabilização de biomoléculas. Os radicais livres ocorrem de maneira espontânea no organismo através do metabolismo. Estes podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, afetando as proteínas, lipídios, carboidratos e DNA, onde o alvo celular está relacionado com o seu sítio de formação (Anderson, 1996; Yu & Anderson, 1997).

Muitos são os estudos e teorias sobre a relação dos radicais livres e a indução de danos celulares gerando doenças. A Teoria do Radical livre, postulada por Harman, descreve que as doenças crônicas não transmissíveis estão envolvidas diretamente com o papel do

metabolismo oxidativo no envelhecimento e na carga de morbimortalidade a ele relacionada. Harman propunha que as maiorias das mudanças ligadas ao envelhecimento eram devido aos danos moleculares causados por radicais livres.

Sendo assim, a partir desta teoria e outros estudos, é possível destacar a importância dos radicais livres no metabolismo celular e sua correlação com a patogênese de diversas doenças.

Um mecanismo de defesa para os radicais livres são os antioxidantes, que são moléculas responsáveis pela proteção do organismo contra a ação oxidativa dos radicais livres, e podem ser encontrados de forma espontânea no organismo humano ou ainda em alimentos. Vários estudos tem demonstrado a presença de substâncias antioxidantes em alimentos que podem prevenir doenças a partir de uma dieta rica e balanceada em nutrientes. Nestes estudos, várias técnicas espectroscópicas e ensaios bioquímicos tem sido utilizados.

Neste trabalho usamos a técnica de absorção óptica, ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e ressonância magnética nuclear (RMN) para monitorar o efeito das moléculas antioxidantes na presença do radical livre estável DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila ($C_{18}H_{12}N_5O_6$).

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Os Radicais Livres

As camadas eletrônicas de um elemento químico são denominadas por K, L, M, N, O, P e Q com subníveis s, p, d e f. (Ferreira, A. L. A.; Matsubara, L. S., 1997). Pelo princípio de exclusão de Pauli, um orbital pode ser preenchido por 2 elétrons com spins contrários, conforme mostra a figura 1, em que o orbital é representado por um quadrado e os elétrons com spins contrários pelas setas. Um radical livre é um átomo ou molécula cujo orbital é preenchido com um único elétron. A esse elétron chamamos elétron desemparelhado. A figura 1 apresenta a distribuição eletrônica do oxigênio (O).

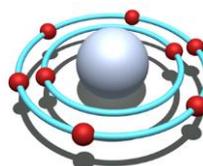
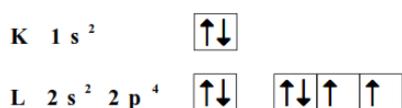


Figura 1 - Distribuição eletrônica do oxigênio por Pauli e sua ilustração, respectivamente

Para a formação do oxigênio molecular (O_2) é necessário que os dois elétrons que estão solitários no subnível p do O façam intercâmbio com os outros dois elétrons solitários do outro O. Têm-se então um composto estável com 12 elétrons na sua última camada (L):

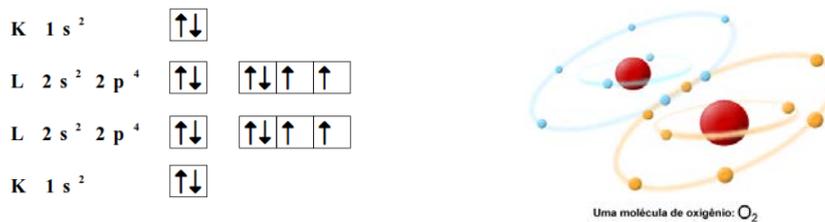


Figura 2 - Distribuição eletrônica do oxigênio molecular por Pauli e sua sua ilustração, respectivamente

A figura 3 apresenta a distribuição eletrônica do radical livre superóxido, que é resultante da reação do O_2 com a adição de um elétron. A este tipo de reação chamamos de reação de redução, que implica em ganho de elétrons. Reações em que ocorrem perda de elétrons são chamadas reações de oxidação. Portanto, quando metabolicamente o organismo sofre redução do oxigênio molecular, este ganha um elétron, formando assim o radical superóxido, que é instável por apresentar um número ímpar (13) na sua última camada eletrônica L.

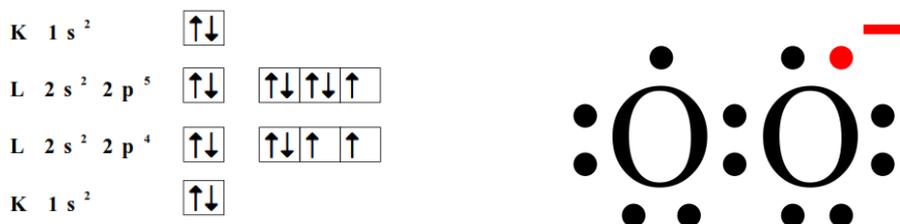


Figura 3 - Distribuição eletrônica do superóxido por Pauli e sua distribuição estrutural, respectivamente

Os radicais livres são formados de reações de óxido- redução, perdendo ou ganhando elétrons em sua última camada eletrônica. Sabe-se com base na literatura que há uma correlação entre a formação de radicais livres com danos celulares. Entretanto o termo radical livre não é totalmente apropriado para designar os agentes reativos patogênicos que causam os danos celulares, pois alguns desses agentes não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica. Como a maioria destes agentes são derivados do metabolismo do O_2 , designamos as espécies de espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERMO) ou espécies reativas de oxigênio (ERO).

A formação de radicais livres ocorre de duas formas: por fatores endógenos que, *in vivo*, ocorre via ação catalítica de enzimas durante o processo de oxido-redução no metabolismo celular, e por exposição a fatores exógenos, como o ozônio, radiações gama e ultravioleta, medicamentos, dieta, cigarro, entre outros.

2.2 O radical livre DPPH

Brand-Williams *et al.*

O DPPH é a abreviatura para o composto químico orgânico 2,2-difenil-1-picril-hidrazila, que é um radical livre estável e apresenta coloração roxa escura em pó. A característica de radical livre é proveniente do elétron desemparelhado presente no átomo de nitrogênio (N) que liga o difenil com o picril-hidrazila, como mostra a figura 4. Por apresentar compostos fenólicos em sua estrutura química possui propriedades ópticas, ou seja, absorve luz ultravioleta (UV) e visível.

A figura 4 apresenta o espectro de absorção óptica do DPPH puro (linha roxa) que, em solução, possui coloração roxa. Este radical apresenta duas bandas de absorção com intensidade máxima em torno dos comprimentos de onda 340 nm e 520 nm. Quando o DPPH reage com alguma outra molécula que preenche o seu orbital incompleto, sua propriedade óptica se altera drasticamente (linha amarela), como é o caso dos antioxidantes. Neste caso, a solução possui uma coloração amarela ou incolor.

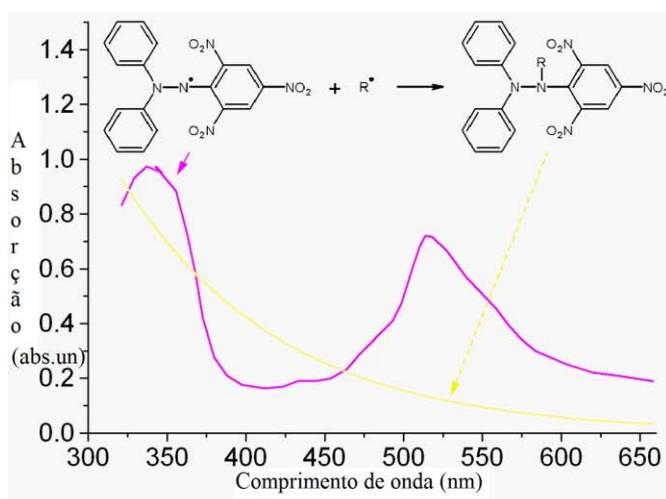


Figura 4 – Estabilização do radical livre DPPH

2.2.1 O método do seqüestro do DPPH

O método (Brand-Williams *et al.*) consiste em avaliar a capacidade antioxidante via atividade sequestradora do DPPH. Este método é muito utilizado no meio acadêmico para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas como: compostos fenólicos, fenólicos totais, flavonóis, cumarinas, quitosana com diferentes pesos moleculares, antocianinas, antocianidinas, carotenóides, entre outros. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar, o DPPH é reduzido, formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser observada pelo decréscimo da absorbância. A partir disso, é possível quantificar a redução do DPPH, bem como o a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional.

2.3 Os antioxidantes

Um mecanismo de defesa para os radicais livres são os antioxidantes que são “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” (Bianchi, Maria de Lourdes Pires; Antunes, Lusânia Maria Greggi, 1999). Os antioxidantes podem ser encontrados no organismo humano e em alimentos e estes são responsáveis pela proteção do organismo contra a ação oxidativa dos radicais livres.

Pequenas moléculas como a vitamina C, glutathiona, ácido úrico, vitamina E, selênio, carotenóides, flavonóides, entre outros podem exercer o efeito antioxidante, agindo diretamente na neutralização dos radicais livres e/ou participando de forma indireta de sistemas enzimáticos com esta finalidade.

Os antioxidantes podem ser divididos quanto à sua classe e quanto ao seu modo de ação. Quanto à classe, os antioxidantes podem apresentar atividade enzimática e não enzimática. Antioxidantes que apresentam atividade enzimática são os compostos que conseguem bloquear o início da oxidação, ou seja, as enzimas têm o papel de remoção das espécies reativas ao oxigênio. As principais defesas antioxidantes enzimáticas incluem a atividade da dismutase (Sod), catalase (Cat), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona resutase (GR) e glutathiona S-transferase (GST). Os que não apresentam atividade enzimática são

moléculas que interagem com as espécies radicalares e são consumidas durante a reação. Nesta classificação, incluem antioxidantes naturais e sintéticos. Dentre as principais defesas antioxidantes não enzimáticas estão as vitaminas C e E, carotenóides, flavonóides, pigmentos biliares, urato e o tripeptídeo glutatona (GSH), sendo todos captadores de radicais.

Quanto ao modo de ação, os antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários: os primários agem interrompendo a cadeia de reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, que convertem estes em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagem com os radicais livres formando o complexo lípido-antioxidante que podem reagir com o outro radical livre.

Já os antioxidantes secundários agem retardando as etapas do início da autoxidação, por diversos mecanismos que incluem a complexação de metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie que não tenha radical e absorção da radiação ultravioleta.

Devido à contínua produção de radicais livres durante os processos relacionados ao metabolismo, ocasionou-se o desenvolvimento de mecanismo de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos.

As estratégias de defesa antioxidantes são constituídas por diferentes níveis de proteção e podem ser resumidas em duas formas de atuação principais:

→ A inibição da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que surgem no processo de oxidação celular e são capazes de reagir no organismo e conseqüentemente interferir nos processos biológicos e fisiológicos. A capacidade destas espécies em ocasionar danos depende da caracterização do tipo de radical e das moléculas que estão sendo atingidas. As ERO podem ser formadas nos processos metabólicos normais ou patogênicos, ou de fontes exógenas físicas e químicas;

→ A neutralização das espécies reativas e reparação dos danos gerados por elas, onde o excesso de ERO é neutralizado pela adição ou remoção de elétrons dos orbitais semi-preenchidos, de acordo com a necessidade de estabilização do átomo ou molécula.

Como já mencionado, existem radicais livres e antioxidantes no organismo humano. A concentração de ambas as substâncias podem aumentar devido à maior geração intracelular ou deficiência dos mecanismos antioxidantes. O desequilíbrio entre radicais livres e moléculas antioxidantes resultam na indução de danos celulares e tem sido chamada de estresse oxidativo que está associado a fisiopatologia de várias doenças.

2.4 A ressonância paramagnética eletrônica (RPE)

RPE é uma técnica espectroscópica usada para detectar elétrons desemparelhados, ou seja, espécies paramagnéticas. A presença de um único elétron no orbital faz com que ocorra o aparecimento de um momento de dipolo magnético resultante não nulo. Portanto, estes elétrons desemparelhados comportam-se como pequeno ímãs e tendem a se alinhar paralelamente ou antiparalelamente com um campo magnético externo aplicado, resultando na separação dos níveis de energia magnéticos destes elétrons.

Assim, existe uma população de elétrons no nível mais baixo de energia e uma outra no nível mais alto. A transição de elétrons entre esses dois níveis de energia só ocorre se um campo de radiação (no caso a microonda) de energia igual à separação destes níveis incidir sobre os elétrons. Nesse caso dizemos que ocorreu absorção de energia. Para a RPE, geralmente usa-se campos magnéticos em torno de 3200 Gauss e microondas de aproximadamente 9,6 GHz (denominado banda X). No entanto podemos encontrar também equipamentos que fazem uso de radiações de 1,3 GHz (banda L), 35 GHz (banda Q) e 95 GHz (banda W).

2.4.1 Princípios físicos

Como mencionado anteriormente, cada espécie paramagnética se comporta como um dipolo magnético que é associado a um momento de dipolo magnético total μ , expresso em termos de seus momentos angulares orbital (L) e de spin (S). Para $L=0$, μ pode ser representado por:

$$\mu = -g\beta S;$$

Onde, g é a constante giromagnética de spin (fator g), β é o magneton de Bohr e S é o spin do elétron.

Na presença de um campo magnético H a energia de interação do elétron é dada pela Hamiltoniana:

$$H = -\mu \cdot H \text{ ou } H = -g\beta S \cdot H;$$

Isto descreve a interação Zeeman do elétron com o campo magnético e a sua solução irá fornecer as possíveis energias para o sistema.

Quando se têm um campo magnético H_0 aplicado na direção Z, temos:

$$H = -g\beta H_0 \cdot S_z;$$

$$E(m_s) = g\beta H_0 \cdot m_s;$$

Onde m_s , são as possíveis projeções do spin ao do eixo Z. Para um elétron as projeções são $m_s = \pm 1/2$, logo as respectivas energias são:

$$E(+1/2) = +1/2 g\beta H_0;$$

$$E(-1/2) = -1/2 g\beta H_0;$$

O fenômeno da ressonância consiste em produzir transições entre dois estados de spin pela absorção de energia de microondas incidentes na amostra. A energia da radiação incidente deve coincidir com a diferença de energia (ΔE) entre os níveis de energia, então:

$$\Delta E = g\beta H_0 \text{ ou } h\nu = g\beta H_0;$$

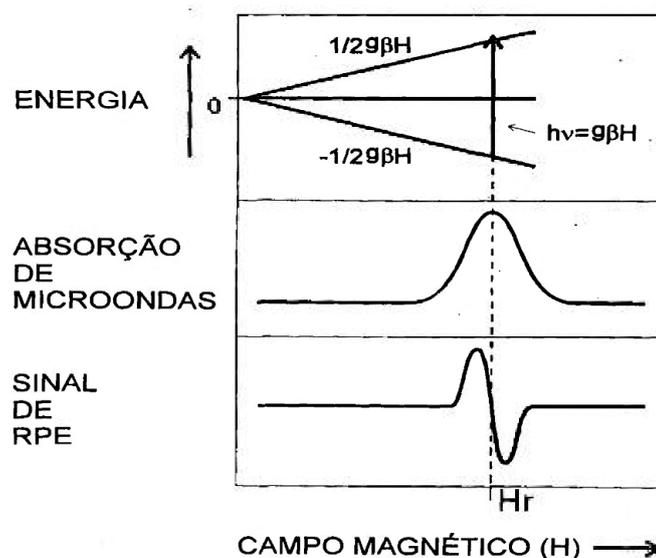


Figura 5 – Desdobramento Zeeman em $L=0$ e $S = 1/2$, mostrando a transição de ressonância magnética na frequência ν e campo H_0 .

Quando um elétron desemparelhado interage com o campo externo, deve-se levar em consideração o efeito dos núcleos vizinhos próximos ao elétron, pois estes geram um campo magnético oposto ao campo externo H , resultando num campo magnético efetivo H_{ef} aplicado ao elétron menor que o campo H . Nesta nova condição, a Hamiltoniana do sistema passa a ser:

$$H = gS\beta H + SA I;$$

onde I é o spin do núcleo e A é o tensor de interação hiperfina. Este novo termo é denominado interação hiperfina que promove o desdobramento dos níveis de energia.

Os níveis de energia para os novos estados podem ser expressos por:

$$E(m_s, m_I) = \frac{1}{2} g\beta H_0 - m_s m_I A;$$

onde, m_s e m_I são os números quânticos de spin eletrônico e nuclear. Assim,

$$E(\frac{1}{2}, \frac{1}{2}) = \frac{1}{2} g\beta H_0 + \frac{1}{4} A_0;$$

$$E(\frac{1}{2}, -\frac{1}{2}) = \frac{1}{2} g\beta H_0 - \frac{1}{4} A_0;$$

$$E(-\frac{1}{2}, \frac{1}{2}) = -\frac{1}{2} g\beta H_0 - \frac{1}{4} A_0;$$

$$E(-\frac{1}{2}, -\frac{1}{2}) = \frac{1}{2} g\beta H_0 + \frac{1}{4} A_0;$$

Como podemos observar, existem 4 possíveis valores de energia. No entanto, para que ocorra uma transição eletrônica é necessário obedecer as regras de seleção, onde $\Delta m_s = \pm 1$ e $\Delta m_I = 0$, Assim, somente existirão duas transições permitidas:

$$\Delta E 1 = E(\frac{1}{2}, \frac{1}{2}) - E(-\frac{1}{2}, \frac{1}{2}) = g\beta H_0 + \frac{1}{2} A_0;$$

$$\Delta E 2 = E(\frac{1}{2}, -\frac{1}{2}) - E(-\frac{1}{2}, \frac{1}{2}) = g\beta H_0 - \frac{1}{2} A_0;$$

Ambas as transições ocorrem para a mesma frequência da microonda de excitação $h\nu$, e para diferentes valores de H_0 , as expressões então são válidas:

$$\Delta E 1 = \Delta E 2 = h\nu;$$

$$\Delta E_1 = g\beta H_0 + \frac{1}{2} A_0 = \Delta E_2 = g\beta H_0 - \frac{1}{2} A_0;$$

Uma propriedade importante em RPE é a separação entre os dois sinais de ressonância que podem ser observados no espectro. A diferença $H_2 - H_1$, correspondentes aos valores de campo ressonante dos dois sinais de absorção denominamos desdobramento hiperfino A .

$$A = H_0 / g\beta;$$

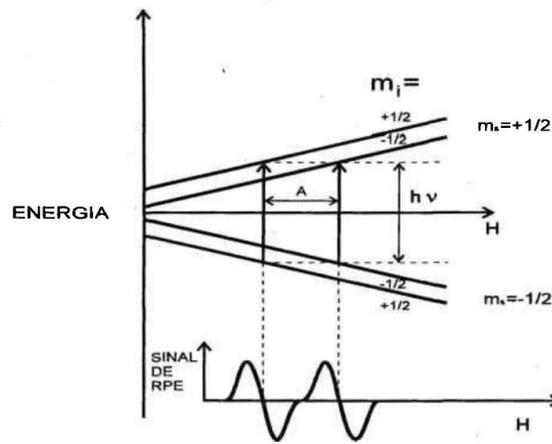


Figura 6 – Desdobramento hiperfino para $S = I = 1/2$, mostrando a transição de ressonância magnética com acoplamento hiperfino.

Existem ainda outras interações, como a spin-órbita, que modificam a Hamiltoniana de spin, resultando em valores de g e A não constantes. Neste caso, devemos tratar estes parâmetros como tensores com componentes principais em x , y e z . Assim, o espectro de EPR se torna muito mais complexo.

2.4.2 O equipamento de RPE

A RPE requer um campo magnético estático para a detecção da absorção ressonante dos elétrons desemparelhados, uma fonte de radiação e um meio de detecção da absorção da amostra a ser analisada.

A maioria dos equipamentos de RPE utiliza uma frequência fixa. A fonte de radiação é produzida por um gerador Klystron, que é uma radiação monocromática. A geração do campo magnético é produzida por um par de bobinas que, variando a corrente elétrica que passa por elas, varia o campo magnético externo de forma contínua a fim de se alcançar a condição de ressonância $h\nu = g\beta H_0$. Tal condição, a princípio ocorre em qualquer frequência. Porém algumas considerações limitam a escolha da frequência, como por exemplo, a sensibilidade do aparelho que é tanto maior quanto maior a frequência. Além disso, a amostra fica dentro de uma cavidade ressonante que possui um determinado tamanho que depende da frequência utilizada. Ainda, para frequências muito altas é necessário também campos muito altos limitando assim o instrumental, já que os eletroímãs convencionais produzem campos da ordem de 25kG. Para campos maiores faz-se necessário o uso de bobinas supercondutoras, que podem produzir campos da ordem de centenas de kG.

O Klystron do tipo refletor é alimentado por uma fonte de alta tensão variável, permitindo a operação em vários modos e dessa forma resultando em uma potência de saída variável. O ajuste geométrico da cavidade Klystron gera microondas na faixa de 8,8GHz a 10GHz. O controle da potência incidente na cavidade ressonante é feita através de um atenuador. (Dias, Guilherme Oswaldo).

O sistema cavidade-amostra é acoplado de forma que não haja reflexão de qualquer sinal. Assim, quando a frequência de ressonância é atingida, ocorre a absorção da microonda. A detecção do sinal é feito por dois diodos de microondas em conjunto com a modulação de um detector sensível a fase (Lock in) para aumentar a sensibilidade. Isto também é utilizado para filtrar sinais fora da fase, eliminando assim ruídos do sinal.

O sinal de absorção é dado por uma Gaussiana ou Lorentziana. Durante a modulação o sinal é transformado em sua derivada primeira, que é mais sensível ao desbobramento das linhas. A unidade de frequência de controle automático da frequência (CAF) mantém a igualdade entre as frequências de microondas do Klystron e a da cavidade. A modulação da microonda é feita com um sinal de modulação da ordem de kHz. O amplificador Lock-in compara a fase do sinal detectado com o sinal da modulação. Quando estes estão fora de fase o sistema gera uma tensão, proporcional à diferença de frequências, que será aplicada ao refletor do Klystron corrigindo a frequência da microonda.

O eletroímã é alimentado por uma fonte de tensão que gera campos magnéticos de 0 a 12 kG. O controle do campo magnético é realizado por uma sonda Hall. Além das bobinas do campo estático são colocadas sobre as peças polares duas outras bobinas alimentadas com

uma tensão de 60 Hz. Esta terceira modulação permite observar o sinal no osciloscópio e ajustar a fase.

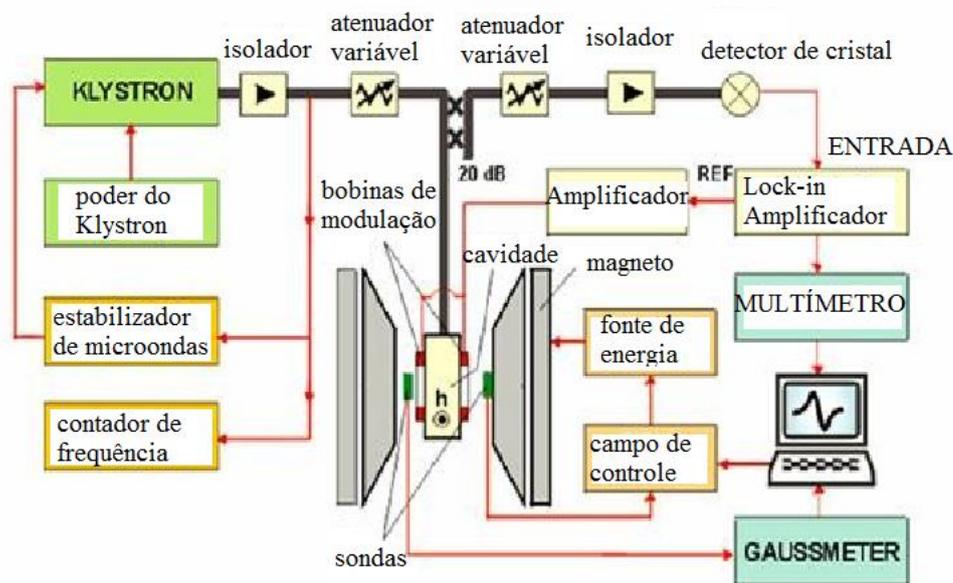


Figura 7 – Esquema do equipamento de RPE.

2.5 A ressonância magnética nuclear (RMN)

A técnica de RMN monitora a absorção de energia associada com transições de núcleos entre níveis de energia magnéticos nucleares adjacentes, e é capaz de diferenciar núcleos individuais de um mesmo tipo dentro de uma dada molécula.

O princípio físico baseia-se no movimento de rotação dos prótons (spin) presentes no núcleo, que produzem um momento de dipolo magnético. Na presença de um campo magnético externo aplicado B_0 da ordem de dezenas de kG (10^3 Gauss), esses dipolos tendem a se alinhar paralela ou antiparalelamente ao campo separando-os em duas populações com diferentes níveis de energia. A transição de partículas entre esses dois níveis de energia é feita pela aplicação de uma radiofrequência (MHz), ou seja, o sistema só absorve energia quando o valor da radiofrequência for igual à separação dos níveis de energia.

Devido à presença de elétrons moleculares, o campo magnético B efetivo em cada núcleo é diferente do campo aplicado B_0 , podendo ser $B < B_0$ (o mais comum) ou $B > B_0$. Dessa maneira, podemos expressar o campo efetivo como:

$$B = (1-\sigma) B_0;$$

onde σ é a constante de blindagem que é função da densidade eletrônica do núcleo de interesse. (Berberan, M. N.; Santos, 2014)

Os espectros de RMN unidimensionais consistem na representação da intensidade das ressonâncias em função da frequência. Assim, é preferencial o uso da frequência em vez do campo magnético. Para a escala de frequências, o parâmetro a ser analisado é o deslocamento químico δ , que é dado em partes por milhão (ppm) e definida por:

$$\delta = 10^6 \nu - \nu_{\text{ref}} / \nu_{\text{ref}};$$

onde ν é a frequência de ressonância e ν_{ref} é a frequência da referência.

Quando $\nu > \nu_{\text{ref}}$, ou seja, quando o campo é superior ao campo referência, o valor de δ é positivo, diz-se então que o núcleo está desblindado em relação a referência. A diferença entre as frequências é muito pequena, então a multiplicação por 10^6 é utilizada para a aproximação da unidade.

O composto de referência mais usado em RMN de ^1H e ^{13}C é o tetrametilsilano, ou TMS, $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$. A espectroscopia de RMN é uma técnica poderosa de análise estrutural, pois permite obter informações detalhadas sobre cada núcleo e não somente sobre grupos funcionais como os outros tipos de espectroscopias. Além do efeito dos elétrons sobre os núcleos, outras interações como a interação spin-spin é útil para obter mais detalhes sobre a amostra em questão.

Os espectrômetros de RMN hoje se baseiam em pulsos policromáticos, isto é, contendo um intervalo finito de frequências, e não em varrimentos monocromáticos onde acontecia uma frequência de cada vez, como nos equipamentos antigos. Para o espectro obtido, irradia-se a amostra com um pulso policromático de radiofrequências com uma duração pré determinada que é dependente da intensidade do campo aplicado, denominado pulso de 90° .

Além deste pulso, existe o campo magnético estático necessário para aumentar a degenerescência. A resposta do sistema ao pulso é uma magnetização transiente e oscilante, que induz no detector uma corrente elétrica, igualmente transiente, denominado FID (*Free Induction Decay*). A transformada de Fourier deste decaimento gera o espectro. A forma do

FID é determinada por três fatores: o número de ressonâncias e as respectivas intensidades relativas, o tempo de relaxação spin-spin (T_2), que é o tempo característico de desfasamento entre spins e o tempo de relaxação spin-rede (T_1), que é o tempo necessário para a magnetização regressar ao valor inicial, antes do pulso.

Os tempos de relaxação definem, em conjunto, a largura dos picos de absorção, que varia de núcleo para núcleo. A determinação rigorosa dos tempos de relaxação é feita com sequências especiais de pulsos. Por exemplo, o tempo de relaxação T_1 é obtido com a chamada sequência $180^\circ - 90^\circ$.

2.5.1 O equipamento de RMN

O aparelho de RMN basicamente possui um módulo transmissor, um módulo receptor e um módulo de circuito de amostra:

O módulo transmissor é responsável por gerar os pulsos de RF na frequência de Larmor. Para excitar a amostra em estudo, o transmissor de um espectrômetro de RMN deve ser capaz de gerar pulsos de RF (geralmente são necessários de dois a três pulsos) na frequência de ressonância da amostra em estudo, e com uma potência relativamente alta. Basicamente este módulo é constituído por: sintetizador, gerador de pulsos, circuito misturador, circuito chaveador (switch) e amplificador de potência.

O módulo receptor é responsável pela detecção e amplificação do sinal adquirido sem introduzir distorção e ruído adicionais. Este módulo é constituído pela etapa de amplificação do sinal de RF, pela etapa de detecção da envoltória (“eco de spin”, na espectroscopia) e por último a etapa de amplificação do sinal.

A sequência de pulsos de RF de alta potência é enviada para a amostra, gerando um campo B oscilante, que excita os spins nucleares da amostra.

O circuito da amostra é responsável por direcionar os pulsos de radiofrequência emitidos pelo módulo transmissor à amostra e em seguida direcionar o sinal da amostra ao módulo receptor, isolando os circuitos de transmissão e recepção. A ordem de grandeza de um sinal de RMN, muitas vezes, é inferior a 10^{-6} Volts. Logo, o receptor de um espectrômetro precisa ser bastante sensível, pois de outra forma não poderá captar o sinal de interesse, o eco de spin. É necessário e interessante um bom isolamento entre o transmissor e o receptor de um espectrômetro sem que isso acarrete em uma perda acentuada de potência durante a excitação da amostra.

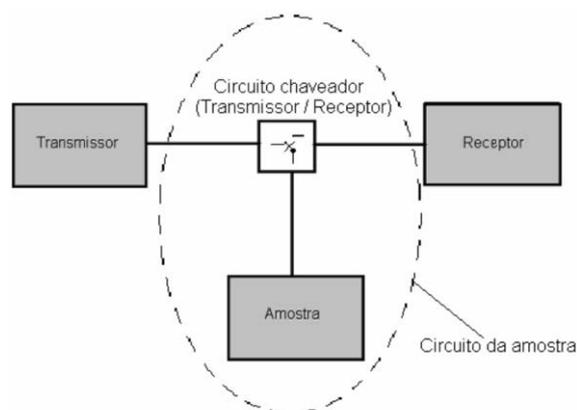


Figura 8 – Diagrama básico de um espectrômetro de RMN

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito antioxidante de amostras vegetais de espinafre, casca de manga e vagem quando estas estão na presença de radicais livres.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar se as amostras vegetais cultivadas de maneira orgânica e convencional interferem no seu efeito antioxidante; bem como os diferentes tipos de lavagem dos vegetais;
- Quantificar o efeito antioxidante das amostras vegetais;
- Verificar a interação estrutural das moléculas antioxidantes na presença do radical livre;

4 METODOLOGIA

4.1 O preparo das amostras

Uma solução estoque de 50 ml de DPPH ($2 \cdot 10^{-4}$ g.ml⁻¹ ou 0,5 mM) em Etanol P.A foi preparada. As amostras foram preparadas a partir dos extratos congelados e também diluídas em etanol. Três extratos foram analisados: espinafre (Esp), vagem (Vg) e casca de manga

(Mg), plantadas convencionalmente (Cv) e organicamente (Or). Estes, com suas massas indicadas na Tabela 1, foram diluídos em 5 ml de etanol P.A., e misturados por um agitador de tubos tipo vortex por 30 s. Os valores das massas expressas na tabela para cada amostra está de acordo com testes realizados em laboratório afim de se conhecer a quantidade adequada de amostra para realização da reação a seguir.

Tabela 1 – Valores das massas dos extratos utilizados na preparação das amostras.

	Esp Cv	Esp Or	Vg Cv	Vg Or	Mg Cv	Mg Or
m (mg)	251,4	250,5	501,3	501,0	50,5	50,6

Após isso, as amostras foram agitadas por um banho de ultrassom de 35 KHz por 15 min, e em seguida, centrifugadas por 10 min a 2000 rpm.

As amostras foram preparadas usando 250 μ l do sobrenadante, obtido no processo de centrifugação, e diluindo em 1,5 ml de etanol P.A. mais a adição de 150 μ l da solução estoque de DPPH. As mesmas foram homogeneizadas por 30 s em um agitador de tubos e guardadas em lugar escuro por 30 min.

A amostra de DPPH foi preparada usando 150 μ l da solução estoque diluída em 1,75 ml de etanol e agitada por 30 s.

Tais amostras foram realizadas em triplicata.

4.2 As medidas e análises das amostras

Os espectros de absorção óptica foram obtidos em um espectrofotômetro Varian modelo Cary 50 Bio. As amostras foram acondicionadas em cubetas de quartzo de 1,5 ml com caminho óptico de 1 cm.

Os espectros de RPE foram obtidos em um aparelho Bruker, banda X (9 GHz), modelo EMX, com cavidade ressonante de alta sensibilidade HSE 4112. As amostras foram acondicionadas em capilar de quartzo de 40 μ l.

Os espectros de RMN foram obtidos em um aparelho Bruker Avance III 400, operando de 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C . Amostras de vagem e espinafre não foram detectadas por RMN, por apresentar baixa quantidade de antioxidantes. Entretanto amostras de manga, por possuir um maior poder antioxidante, foram detectadas e assim as

medidas foram realizadas para determinar uma concentração viável de amostra em função da sensibilidade do aparelho. As amostras foram identificadas como:

- 1) Sample 1: com 500 µl de casca de manga orgânica, 3 ml de etanol e 300 µl de DPPH;
- 2) Sample 2 : com 1000 µl de casca de manga orgânica, 3 ml de etanol e 600 µl de DPPH;
- 3) Yellow: com 1500 µl de casca de manga orgânica, 3 ml de etanol e 900 µl de DPPH;
- 4) Branco: com 3,5 ml de etanol e 1,5 ml de DPPH.

O espectro do ^1H do Branco foi adquirido com 256 scans e com atraso de 15 segundos. Os espectros do ^1H do Sample 1 e Sample 2 foram adquiridos com 16 scans e com atraso de 30 segundos. O espectro do ^{13}C foram adquiridos com prótons de dissociação de banda larga.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A figura 9 apresenta os espectros de absorção do DPPH puro (0,04 mM) e com a adição do extrato de espinafre, vagem e casca de manga plantados convencionalmente (as massas são especificadas na figura). O espectro de absorção do DPPH apresenta 2 máximos: um em 327 nm e outro em 515 nm. É sabido que quando o DPPH se liga com uma molécula antioxidante, ocorre a perda do sinal em 515 nm como é possível observar nas 3 amostras analisadas. A figura 10 também apresenta as mesmas curvas, porém de extratos plantados organicamente. Comparando os valores das absorbâncias em 515 nm entre as 2 figuras, vemos uma redução dos valores das amostras plantadas organicamente. Isso é uma indicação clara de uma maior quantidade de moléculas antioxidantes presentes nestas amostras. Além disso, as diferentes formas dos espectros de absorção do espinafre, da vagem e da casca de manga, mostram que existem diferentes moléculas antioxidantes em cada uma dessas amostras.

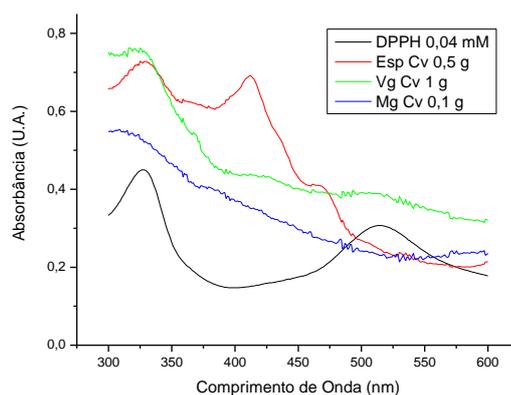


Figura 9 – Espectro de absorção óptica do DPPH puro (linha preta), e com a adição de espinafre (linha vermelha), de vagem (linha verde) e de casca de manga (linha azul) plantadas convencionalmente.

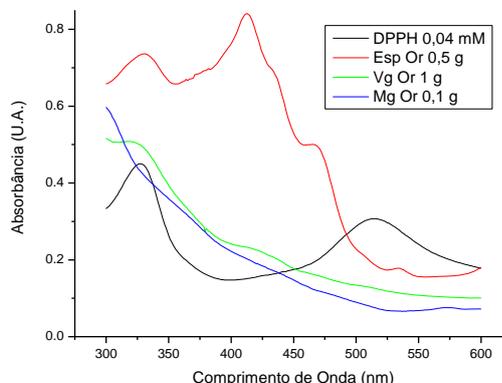


Figura 10 – Espectro de absorção óptica do DPPH puro (linha preta), e com a adição de espinafre (linha vermelha), de vagem (linha verde) e de casca de manga (linha azul) plantadas organicamente.

A análise bioquímica é importante para determinarmos as moléculas existentes nesses extratos. Adicionalmente, nesses extratos podem existir moléculas que absorvem luz na faixa de comprimento de onda analisada, resultando assim numa superposição dos espectros de absorção. Como resultado, o valor da absorbância seria a soma de todas as moléculas absorvedoras, ou seja, a interação do radical livre com a molécula antioxidante mais outras moléculas absorvedoras presentes nos extratos avaliados.

A fim de avaliar somente a interação do radical livre e o antioxidante, realizamos experimentos de RPE. A figura 11 apresenta os espectros de RPE do DPPH puro e com a adição dos extratos plantados convencionalmente. As reduções das intensidades dos espectros das amostras com extrato indicam uma redução da quantidade de radicais livres presentes nestas. Analisando visualmente os espectros, vemos que a casca de manga reduz a zero o sinal do radical livre, enquanto que espinafre e vagem diminuem o sinal em relação ao DPPH puro. A figura 12 apresenta os espectros do DPPH puro e com a adição de extratos plantados organicamente. Um comportamento similar é observado nestas, quando comparado com as amostras plantadas convencionalmente. Entretanto, nas amostras de espinafre e vagem, a redução do sinal do radical livre é maior.

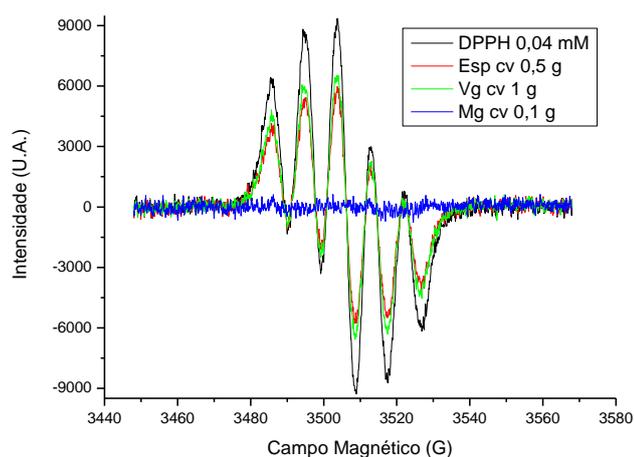


Figura 11 – Espectro de RPE do DPPH puro (linha preta), e com a adição de espinafre (linha vermelha), de vagem (linha verde) e de casca de manga (linha azul) plantadas convencionalmente.

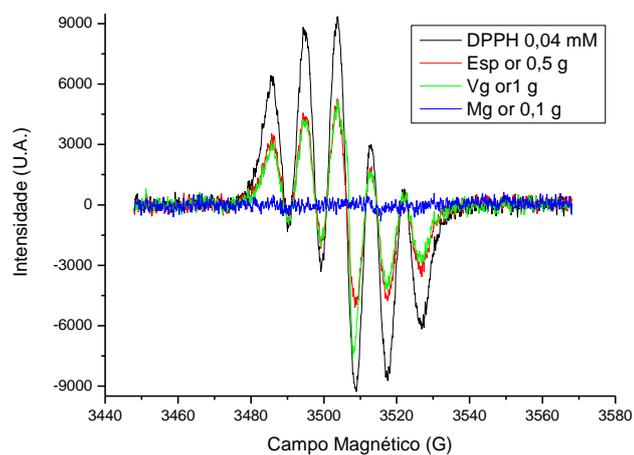


Figura 12 – Espectro de RPE do DPPH puro (linha preta), e com a adição de espinafre (linha vermelha), de vagem (linha verde) e de casca de manga (linha azul) plantadas organicamente.

Essa redução pode ser atribuída à presença de um maior número de moléculas antioxidante presentes nas amostras plantadas organicamente. Quando comparadas entre estas amostras, observa-se que a casca de manga contém um maior número de antioxidantes, reduzindo a zero o sinal do radical livre.

Uma forma de quantificar a concentração de radicais livres presentes nas amostras se baseia no valor resultante da 2ª integral do espectro de RPE. A tabela 2 apresenta os valores obtidos da 2ª integral bem como a redução percentual de radicais livres presentes em cada amostra analisada.

Tabela 2 – Valores da 2ª integral do espectro de RPE e redução percentual do DPPH presente nas amostras plantadas convencional e orgânicamente. Para DPPH puro, a 2ª integral foi de 712.10^6 .

	Espinafre Convencional	Espinafre Orgânico	Vagem Convencional	Vagem Orgânica	Manga Convencional	Manga Orgânica
Valor da 2ª Integr	392.10^6	310.10^6	450.10^6	295.10^6	0	0
Redução (%)	44,9	56,5	36,8	58,5	100,0	100,0

Os valores constantes na tabela mostram que a concentração de antioxidantes presentes na casca de manga, independentemente do tipo de plantio, é grande o suficiente para eliminar os radicais livres nestas amostras. O espinafre e a vagem possuem uma concentração menor de antioxidantes e conseqüentemente o tipo de plantio, convencional ou orgânico, tem efeito na concentração destes. Com os resultados há indícios que o plantio orgânico apresenta maior concentração de moléculas antioxidantes tanto no espinafre quanto na vagem.

Afim de termos uma valor estatístico neste trabalho fizemos o seguinte:

Dividiu-se as amostras em dois grupos: o grupo A que representa todas as amostras orgânicas, o grupo B que representa todas as amostras convencionais, o grupo C que representa as amostras de mangas tanto convencionais como orgânicas, o grupo D que representa as amostras de vagem tanto convencionais como orgânicas e o grupo E que representa as amostras de espinafre tanto convencionais como orgânicas.

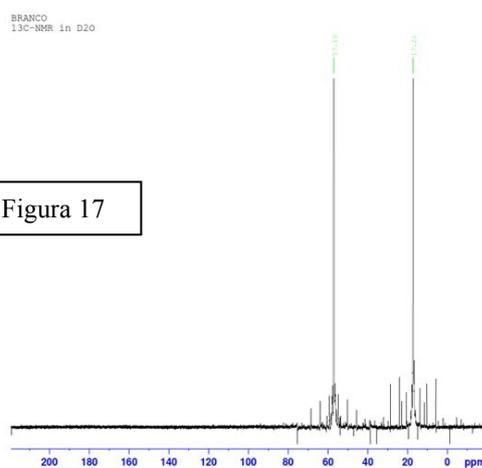
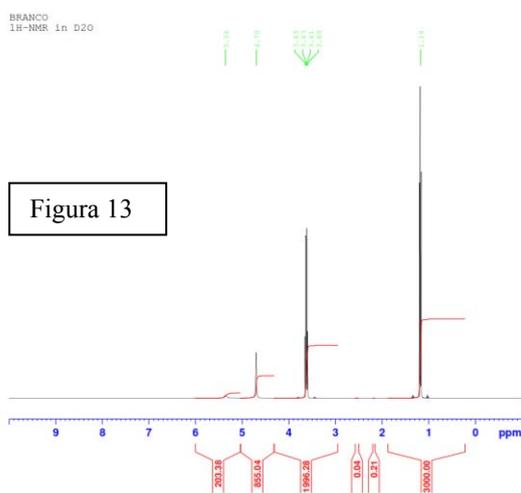
Foi obtido então as seguintes médias e desvios padrão referente ao valor da segunda integral:

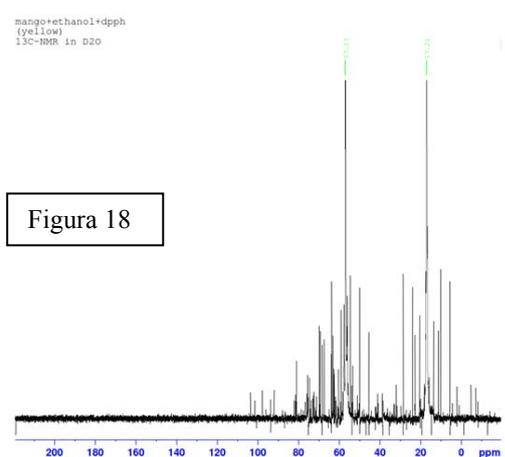
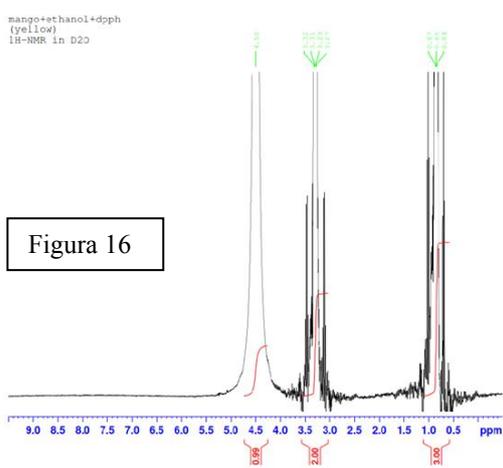
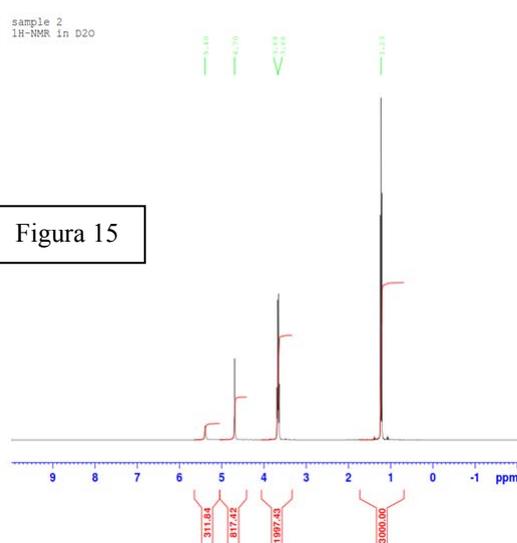
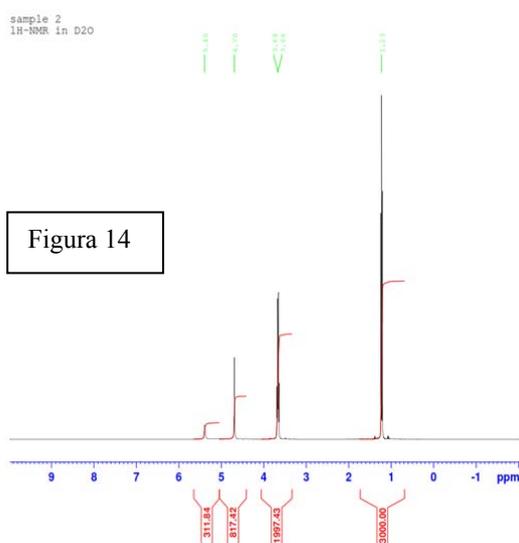
Grupo A - média: 201666666,7	desvio padrão: 174809420
Grupo B - média: 280666666,7	desvio padrão: 244788343,9
Grupo C - média: 0	desvio padrão: 0
Grupo D - média: 372500000	desvio padrão: 109601551,1
Grupo E - média: 351000000	desvio padrão: 57982756,06

Com tais dados estatísticos calculados, há indícios que entre o grupo A e o grupo B as amostras orgânicas apresentam melhor efeito antioxidante quando comparada as amostras convencionais. Entre os grupos C, D e E há indícios que a amostras de mangas apresentam

melhor efeito antioxidante quando relacionadas com a vagem e o espinafre. Estes dados estatísticos vão de encontro com os dados obtidos anteriormente por EPR.

As figuras 13 a 16 apresentam os espectros de RMN do ^1H das amostras branco, sample 1 e sample 2. Nestes espectros é possível ver o sinal do etanol (o grupo CH_3 em 1,18 ppm, o grupo CH_2 em 3,2 ppm e grupo OH em 4,7 ppm). Entretanto, as amostras propriamente ditas apresentam baixo ou nenhum sinal a ponto de não se observar interação entre a molécula antioxidante e o DPPH. Como as medidas com ^1H não foram bem sucedidas, foram realizadas medidas com ^{13}C da amostra Yellow, pois esta apresentava maior concentração de moléculas antioxidantes provenientes da casca de manga. Porém os resultados não apresentaram nenhuma diferença com os obtidos com ^1H , em que só foi observado a presença de grupos relacionados ao solvente (CH_3 em 17,2 ppm e CH_2 em 57,1 ppm).





Figuras 13, 14, 15, 16, 17 e 18 – Espectros de RMN das amostras branco, sample 1, sample 2 e yellow obtidas pelo ^1H , (Figuras 13, 14, 15 e 16 respectivamente), e das amostras branco e yellow obtidas pelo ^{13}C (Figuras 17 e 18 respectivamente).

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos é possível observar que a casca de manga apresenta maior eficácia em seu efeito antioxidante quando comparada com as outras amostras vegetais. Ainda que as amostras apresentem um efeito antioxidante, os diferentes tipos de lavagem não interferem de forma significativa em seu efeito. Entretanto, a forma de cultivo interfere no efeito antioxidante, onde o cultivo orgânico apresenta maiores percentuais de antioxidantes.

Não foi possível observar nos espectros de RMN a interação estrutural entre as moléculas antioxidantes provenientes das amostras vegetais e o radical DPPH. O uso de

etanol como solvente para as amostras vegetais interfere nas medidas. A possibilidade de uso de outro solvente é descartada, pois não foi encontrado até o presente momento procedimento que utilize outro solvente para a preparação dos extratos vegetais.

7 REFERÊNCIAS

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 1997, 43. Jg., Nr. 1, S. 61-68.

BIANCHI, Maria de Lourdes Pires; ANTUNES, Lusânia Maria Greggi. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr*, 1999, 12. Jg., Nr. 2, S. 123-30.

DIAS, Guilherme Oswaldo. Tese de mestrado - Espodumenio Brasileiro Natural e Tratado: Um estudo dos centros de cor e coloração artificial

RIEGER, Philip Henri. *Electron spin resonance: analysis and interpretation*. Royal Society of Chemistry, 2007

MORSY, M. A.; KHALED, M. M. Novel EPR characterization of the antioxidant activity of tea leaves. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2002, 58. Jg., Nr. 6, S. 1271-1277.

POLOVKA, Martin; BREZOVÁ, Vlasta; STAŠKO, Andrej. Antioxidant properties of tea investigated by EPR spectroscopy. *Biophysical chemistry*, 2003, 106. Jg., Nr. 1, S. 39-56.

BHARTI, Santosh Kumar; ROY, Raja. Quantitative¹ H NMR spectroscopy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2012, 35. Jg., S. 5-26.

JÚNIOR, Valter Lima. Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Super-Heteródino de Banda Larga.

YU, Tian-Wei; ANDERSON, Diana. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1997, 379. Jg., Nr. 2, S. 201-210.

SIMPSON, André J.; MCNALLY, David J.; SIMPSON, Myrna J. NMR spectroscopy in environmental research: from molecular interactions to global processes. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy*, 2011, 58. Jg., Nr. 3, S. 97-175.

DE MACEDO JÚNIOR, Fernando César. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C no estudo de rotas biossintéticas de produtos naturais. *Quim. Nova*, 2007, 30. Jg., Nr. 1, S. 116-124.

ROSEN, Gerald M. *Free Radicals: Biology and Detection by Spinn Trapping*. Oxford University Press, 1999.

Berberan, M. N.; Santos. Espectroscopia (Princípios de química-física), 2014

FRIEBOLIN, Horst. Basic one-and two-dimensional NMR spectroscopy. 1991.

[1] GÜNTHER, Harald. Introduction to NMR Spectroscopy. *Mir, Moscow*, 1984.