



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Câmpus de Araraquara**



**Avaliação da capacidade antioxidante de derivados dos ácidos
hidroxibenzoico e hidroxicinâmico, em sistemas-modelo *in vitro*.**

Bianca Taíse Roim Varotto

Araraquara

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Análises Clínicas
Laboratório de Bioquímica Clínica

**Avaliação da capacidade antioxidante de derivados dos ácidos
hidroxibenzoico e hidroxicinâmico, em sistemas-modelo *in vitro*.**

Bianca Taíse Roim Varotto

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de graduação em
Farmácia- Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para a obtenção do grau de
Farmacêutica-Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti
Co-Orientadora: Ma. Renata Pires de Assis

Araraquara

2014

Agradecimentos

A Deus por sempre iluminar meu caminho e me guiar.

Aos meus pais Antonia e Sebastião por estarem ao meu lado em todos os momentos, por acreditarem em mim e serem grandes incentivadores e entusiastas das minhas conquistas. Aos meus irmãos Bruna e Bernardo por todos os momentos de descontração e carinho. Amo vocês!

Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, Orientador de minha formação e deste trabalho, agradeço a oportunidade e por ter confiado e acreditado na minha capacidade; grata pelos ensinamentos, por seu exemplo de dedicação e incentivo à pesquisa, pela paciência, humor e amizade.

A co-orientadora Ma. Renata Pires de Assis por ter sido um verdadeiro “anjo da guarda” durante essa jornada. Obrigada pelos ensinamentos, companheirismo, paciência e carinho. Você faz parte dessa vitória!

Aos amigos de laboratório, Vânia, Carlos, Juliana, Vivian por todo o apoio e aprendizado de grupo. A Profa. Dra. Amanda Martins Baviera, prova de que o caminho de sucesso se faz com estudo e persistência, grata pelo exemplo.

Ao grupo PET Farmácia por todos os anos de amizade e aprendizado e ao tutor Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, que nos fez vivenciar que o diálogo, o estudo, a compreensão e a tolerância são caminhos para um mundo melhor .

As amigas Estela e Fernanda, companheiras de república, por tudo e principalmente, pelo carinho, cumplicidade, amizade e risadas durante esses cinco

anos. Aos amigos Jhohann e Flávia por estarem sempre presentes. Araraquara não seria a mesma sem vocês!

Ao Eduardo pelo carinho, paciência e atenção!

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelo suporte físico e oportunidade.

A FAPESP pelo apoio financeiro.

Sumário

Resumo

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

1. Introdução	14
1.1. Espécies Reativas	16
1.1.1. Ânion Radical Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	17
1.1.2. Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)	18
1.1.3. Radical Hidroxila ($HO^{\cdot}$)	19
1.1.4. Ácido Hipocloroso ($HOCl$)	20
1.1.5. Radicais Peroxila ($ROO^{\cdot}$) e Alcoxila ($RO^{\cdot}$)	20
1.1.6. Oxigênio Singlete ($^1O_2$)	21
1.2. Antioxidantes	21
1.2.1. Compostos Fenólicos	22
2. Objetivos	25
3. Material e Métodos	25
3.1. Equipamentos	25
3.2. Compostos Fenólicos	26
3.3. Métodos Analíticos	26
3.3.1. Captura do ABTS $^{*+}$	27
3.3.2. Captura do DPPH $^{\cdot}$	28
3.3.3. Captura do $HOCl/OCI^-$	29
3.3.4. Captura do Ânion Radical Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	30
3.3.5. Captura do H_2O_2	31
3.3.6. Ensaio de clareamento (<i>bleaching</i>) da crocina	32
4. Resultados e discussão	36
4.1. Captura do ABTS $^{*+}$	36
4.2. Captura do DPPH $^{\cdot}$	45
4.3. Captura do $HOCl / OCI^-$	53
4.4. Captura do $O_2^{\cdot-}$	62

4.5. Captura do H_2O_2	70
4.6. Ensaio de clareamento (<i>bleaching</i>) da crocina	73
5. Conclusão	85
6. Referências Bibliográficas	86
7. Dados Finais	92

Resumo

Os ácidos fenólicos são metabólitos secundários, presentes em muitas espécies vegetais. Esses ácidos são amplamente conhecidos com vasta distribuição na natureza e consequentemente nos alimentos. Há vários estudos que buscam comprovar as ações benéficas desses compostos no organismo humano, principalmente no que se refere à atividade antioxidante, ou seja, podem retardar ou inibir processos oxidativos. O estresse oxidativo é resultado do desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidantes, e pode provocar sérios danos celulares, participando na gênese e/ou desenvolvimento de doenças degenerativas, inflamatórias, entre outras. Entretanto, o organismo por sua vez se defende das espécies reativas oxidantes com os antioxidantes endógenos, produzidos pelo próprio organismo ou exógenos obtidos da dieta, fitoterapia, etc.

Os ácidos fenólicos são constituídos por um anel aromático, um grupamento carboxila e um ou mais grupamentos hidroxila (-OH) e/ou metoxila (-OCH₃); de modo geral tem-se que os ácidos derivados do hidroxicinâmico que possuem maior atividade antioxidante em relação aos ácidos derivados do hidroxibenzoico, o grupamento -CH=CH-COOH na cadeia lateral nos derivados do ácido hidroxicinâmico ter maior capacidade de interagir com as espécies reativas e doar elétrons ou hidrogênio, em comparação ao grupamento -COOH do ácido hidroxibenzoico e seus derivados.

Para substanciar o estudo das propriedades antioxidantes dos compostos derivados do ácido hidroxibenzoico (ácidos: *p*-hidroxibenzoico, protocatéquico, gálico, siríngico e vanílico) e do ácido hidroxicinâmico (ácidos: *p*-cumárico, cafeico, ferúlico e sinapínico) foram analisadas suas capacidades de capturar espécies reativas radicalares e não radicalares, bem como compará-las a *padrões*, tais como: a glutathione reduzida, uma biomolécula que tem participação importante no sistema antioxidante endógeno e o trolox, um análogo sintético solúvel em meio aquoso da vitamina E, ambos com reconhecida capacidade antioxidante. Para explorar a ação antioxidante dos ácidos fenólicos e *padrões* supracitados, foram realizados ensaios de capacidade de captura sobre: 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}), 2,2-difenil-1 picrilhidrazila (DPPH[•]), ânion radical superóxido (O₂^{•-}), ácido hipocloroso/ hipoclorito (HOCl / OCl⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e do radical peroxila ROO[•].

Os ácidos fenólicos investigados mostraram eficiência para captura das espécies reativas ABTS^{•+}, DPPH[•], HOCl/Cl⁻, O₂^{•-} e ROO[•]. O ácido gálico, derivado do ácido hidroxibenzoico com três grupos hidroxila, foi o melhor composto para a atividade antioxidante, enquanto que o ácido *p*-hidroxibenzoico, mono-hidroxilado, foi o menos eficiente. Os resultados substanciam as evidências que o número e a posição de hidroxilas são importantes para a atividade antioxidante.

Lista de Figuras

Figura 1: Representação das estruturas dos ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxibenzoico e hidroxicinâmico	24
Figura 2: Representação da formação do ABTS ^{•+}	28
Figura 3: Representação estrutural do DPPH [•]	29
Figura 4: Representação da oxidação do TMB pelo HOCl/OCl ⁻	30
Figura 5: Representação esquemática da formação do ânion superóxido e ação de um antioxidante presente no meio.	31
Figura 6: Representação estrutural do DTNB e TNB.	32
Figura 7: Representação estrutural da crocina.	33
Figura 8: Reações envolvidas no clareamento da crocina.	34
Figura 9: Representação estrutural dos metoxicatecóis apocinina e vanilina.	36
Figura 10: Inibição (captura) do ABTS ^{•+} pela glutathiona.	37
Figura 11: Inibição (captura) do ABTS ^{•+} pelo Trolox.	38
Figura 12: Inibição (captura) do ABTS ^{•+} pelo ác. <i>p</i> -cumárico.	39
Figura 13: Inibição (captura) do ABTS ^{•+} pelo ác. sinapínico.	39
Figura 14: Inibição (captura) do ABTS ^{•+} pelo ác. ferúlico.	40
Figura 15: Inibição (captura) do ABTS ^{•+} pelo ác. cafeico.	40
Figura 16: Inibição (captura) do ABTS ^{•+} pelo ác. gálico.	41
Figura 17: Inibição (captura) do ABTS ^{•+} pelo ác. vanílico.	42
Figura 18: Inibição (captura) do ABTS ^{•+} pelo ác. protocatéquico.	42
Figura 19: Inibição (captura) do ABTS ^{•+} pelo ác. siríngico.	43

Figura 20: Inibição (captura) do ABTS ^{•+} pelo ác. <i>p</i> -hidroxibenzoico.....	43
Figura 21: Inibição (Captura) do ABTS ^{•+} (IC ₅₀ µmol/L), pelos ácidos derivados do hidroxibenzoico e hidroxicinâmico e dos <i>padrões</i>	44
Figura 22: Inibição (captura) do DPPH [•] pela glutathione.....	46
Figura 23: Inibição (captura) do DPPH [•] pelo trolox.	46
Figura 24: Inibição (captura) do DPPH [•] pelo ác. cafeico	47
Figura 25: Inibição (captura) do DPPH [•] pelo ác. sinapínico.	48
Figura 26: Inibição (captura) do DPPH [•] pelo ác. ferúlico.....	48
Figura 27: Inibição (captura) do DPPH [•] pelo ác. <i>p</i> -cumárico.....	49
Figura 28: Inibição (captura) do DPPH [•] pelo ác.gálico.	50
Figura 29: Inibição (captura) do DPPH [•] pelo ác. protocatéquico.	50
Figura 30: Inibição (captura) do DPPH [•] pelo ác.siríngico, ...	51
Figura 31: Inibição (captura) do DPPH [•] pelo ác. vanílico.	51
Figura 32: Inibição (Captura) do DPPH [•] (IC ₅₀ µmol/L) pelos ácidos derivados do hidroxicinâmico e hidroxibenzoico e padrões..	52
Figura 33: Inibição (captura) do HOCl/OCl ⁻ pela glutathione.....	54
Figura 34: Inibição (captura) do HOCl/OCl ⁻ pelo trolox	55
Figura 35: Inibição (captura) do HOCl/OCl ⁻ pelo ác. <i>p</i> -cumárico.....	55
Figura 36: Inibição (captura) do HOCl/OCl ⁻ pelo ác. cafeico.....	56
Figura 37: Inibição (captura) do HOCl/OCl ⁻ pelo ác. ferúlico.	56
Figura 38: Inibição (captura) do HOCl/OCl ⁻ pelo ác. sinapínico.	57
Figura 39: Inibição (captura) do HOCl/OCl ⁻ pelo ác. gálico.	58
Figura 40: Inibição (captura) do HOCl/OCl ⁻ pelo ác. <i>p</i> -hidroxibenzoico.	58

Figura 41: Inibição (captura) do HOCl/OCl ⁻ pelo ác. protocatéquico.	59
Figura 42: Inibição (captura) do HOCl/OCl ⁻ pelo ac. vanílico	59
Figura 43: Inibição (captura) do HOCl/OCl ⁻ pelo ác.siríngico	60
Figura 44: Inibição (Captura) do HOCl/OCl ⁻ (IC ₅₀ µmol/L) pelos ácidos derivados do hidroxicinâmico e hidroxibenzoico e padrões..	61
Figura 45: Inibição (captura) do O ₂ ⁻ pela glutathiona.	63
Figura 46: Inibição (captura) do O ₂ ⁻ pelo trolox.....	63
Figura 47: Inibição (captura) do O ₂ ⁻ pelo ác. cafeico.	64
Figura 48: Inibição (captura) do O ₂ ⁻ pelo ác. sinapínico.....	65
Figura 49: Inibição (captura) do O ₂ ⁻ pelo ác. ferúlico.	65
Figura 50: Inibição (captura) do O ₂ ⁻ pelo ác. <i>p</i> -cumárico.	66
Figura 51: Inibição (captura) do O ₂ ⁻ pelo ác. gálico	67
Figura 52: Inibição (captura) do O ₂ ⁻ pelo ác. protocatéquico	67
Figura 53: Inibição (captura) do O ₂ ⁻ pelo ác. siríngico	68
Figura 54: Inibição (captura) do O ₂ ⁻ pelo ác. <i>p</i> -hidróxibenzoico.....	68
Figura 55: Inibição (Captura) do O ₂ ⁻ (IC ₅₀ µmol/L) pelos ácidos derivados do hidroxicinâmico e hidroxibenzoico e padrões..	69
Figura 56: Inibição (captura) do H ₂ O ₂ pela catalase.....	71
Figura 57: Espectro de absorção do DTNB, e da formação do TNB por ação da glutathiona.....	72
Figura 58: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com trolox.	73
Figura 59: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com glutathiona.....	74

Figura 60: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com ác. sinápico	75
Figura 61: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com ác. cafeico.....	75
Figura 62: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com ác. ferúlico.....	76
Figura 63: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com ác. <i>p</i> -cumárico.....	76
Figura 64: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com ác. gálico.....	77
Figura 65: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com ác. protocatéquico.....	77
Figura 66: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com ác. siríngico.....	78
Figura 67: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com ác. vanílico.. ..	78
Figura 68: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com ác. <i>p</i> -hidroxibenzoico.. ..	79
Figura 69: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com apocinina.....	83
Figura 70: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com vanilina.....	84

Lista de Tabelas

Tabela 1: Equação de competição cinética entre os ácidos fenólicos, glutathione e trolox.....	80
Tabela 2: Comparação entre valores de IC_{50} e coeficiente angular, para o ensaio de clareamento da crocina.....	81

Lista de abreviaturas

$^1\text{O}_2$	Oxigênio Singlete
AAPH	2,2'-azobis- (2-metilpropanoamidina)
ABTS ⁺⁺	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico)
Cl^-	Íons cloreto
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH [•]	2,2-difenil-1 picrilhidrazila
DTNB	Ácido 5-5'-ditio-2-nitrobenzoico
EGF	Fator de crescimento epidermal
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GSH	Glutathiona reduzida
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
$\text{HO}^\bullet$	Radical hidroxila
HOCl	Ácido hipocloroso
LPO	Lipoperoxidação
MPO	Mieloperoxidase
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaOCl	Hipoclorito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NBT	azul de nitrotetrazólio
$\text{NO}^\bullet$	Óxido nítrico

$O_2^{\bullet-}$	Ânion radical superóxido
$ONOO^-$	Peroxinitrito
ORAC	<i>Oxygen radical absorbance capacity</i>
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PMS	Metassulfato de fenazina
$RO^\bullet$	Radical alcóxila
$ROO^\bullet$	Radical peróxila
SOD	Superóxido dismutase
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNB	Ácido 5-tio-2-nitrobenzoico

1. Introdução

A prospecção por compostos com propriedades antioxidantes está intimamente relacionada aos efeitos de espécies reativas, em especial de oxigênio (ERO) e/ou de nitrogênio (ERN), envolvendo processos oxidativos no organismo humano (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Essas espécies reativas estão envolvidas em uma diversidade de eventos celulares, tais como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular e síntese de biomoléculas importantes. Em condições fisiológicas, o aumento na formação do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) está relacionado à elevação na produção de outras ERO, que por sua vez podem atuar como segundo mensageiros no controle de diversas funções fisiológicas, por exemplo: regulação no relaxamento da musculatura vascular lisa; monitoramento nas concentrações de oxigênio, promovendo alterações na mecânica respiratória e controlando a produção de eritropoietina; participação na cascata de transdução de sinal de vários receptores de membrana, entre outras funções (DROGE, 2002). Entre as ERO produzidas após aumento do $O_2^{\cdot-}$ e que têm participação em eventos sinalizatórios intracelulares, merece destaque o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Tem sido observado aumento nas concentrações intracelulares de H_2O_2 após estimulação de receptores dos mais diversos ligantes, tais como fatores de crescimento (fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); fator de crescimento epidermal (EGF); interleucinas (IL-1, IL-3, IL-4), ligantes de receptores acoplados à proteína G (angiotensina II), entre outros. Agindo como segundo mensageiro das sinalizações disparadas por estes receptores, o H_2O_2 está envolvido no controle da função de uma diversidade de proteínas, incluindo fatores de transcrição, proteínas quinases e fosfatases, fosfolipases e canais iônicos (RHEE et al., 2003). Entretanto, se houver uma produção excessiva de ERO, o equilíbrio redox

poderá ser alterado e haver danos oxidativos; assim o entendimento de estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidantes (VASCONSELOS et al., 2007; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; FINKEL; HOLBROOK, 2000).

Os danos ocasionados pelo estresse oxidativo podem atingir diversos alvos, tais como: lipídios de membrana, proteínas, carboidratos e DNA, entre outros. Nesse contexto, a oxidação dessas biomoléculas tem sido postulada como eventos intracelulares importantes para o desenvolvimento e complicações de várias doenças, como por exemplo, aterosclerose, diabetes mellitus, inflamações, cardiopatias, doenças neurodegenerativas (doença de Alzheimer, esclerose múltipla, mal de Parkinson), câncer, etc, bem como, estão envolvidas no processo de envelhecimento por participarem de reações que alteram a homeostase celular (PADURAIU et al. 2013; BARBOSA et al., 2010; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010; NIKI, 2010; DURACKOVÁ, 2010; RODRIGUES, 2007; VASCONCELOS et al., 2007; VALKO et al., 2006; FINKEL; HOLBROOK, 2000).

Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição ou atenuação dessas “lesões” causadas pelas espécies reativas nas células (BIANCHI; ANTUNES, 1999; SIES; STAHL, 1995;). O organismo se defende das espécies reativas com antioxidantes endógenos, produzidos pelo próprio organismo, ou exógenos, obtidos pela dieta. Esses últimos podem ser consumidos como suplementos alimentares, de modo a auxiliar na melhoria do estresse oxidativo e também evitar efeitos adversos de determinados medicamentos (PADURAIU et al. 2013; OLIVEIRA et al. 2009).

Entre os antioxidantes endógenos têm relevância: a glutathiona reduzida (GSH) e as enzimas como superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona peroxidase (GSH-Px), já para os antioxidantes exógenos, destacam-se: α -tocoferol

(vitamina E), β -caroteno (pro-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), e compostos fenólicos dos quais destacam-se os polifenóis (OWENS et al. 2013; PADURAIU et al. 2013; KAJARIA et al. 2012; BARBOSA et al., 2010; OLIVEIRA et al. 2009; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Os polifenóis são metabólitos secundários de espécies vegetais, cujas funções estão relacionadas com o crescimento, reprodução e proteção. Na indústria, são utilizados como aditivos em alimentos (corantes e preservativos naturais) e também estão presentes na composição de fitoterápicos e cosméticos. Os compostos fenólicos são produzidos através do metabolismo secundário pela via do chiquimato e acetato, são estruturas complexas que englobam desde compostos simples como os ácidos fenólicos, até compostos complexos como os taninos (PEREIRA; CARDOSO, 2012; ANGELO; JORGE, 2007; BRAVO, 1998).

1.1. Espécies Reativas

O termo radical livre refere-se a espécies químicas (átomos ou moléculas) geradas continuamente durante os processos metabólicos, altamente reativas, com número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, sendo a presença do(s) elétron(s) desemparelhado(s) responsável pela alta reatividade desses compostos e, portanto, com capacidade de reagir com biomoléculas tais como carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (ALVES et al., 2010; FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Além das espécies radicalares, também existem espécies reativas não radicalares. Entre essas espécies não radicalares, podem ser destacados dois grupos: as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN). Entre as principais ERO radicalares, destacam-se o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($HO^{\cdot}$), peroxila ($ROO^{\cdot}$), alcóxila ($RO^{\cdot}$); e

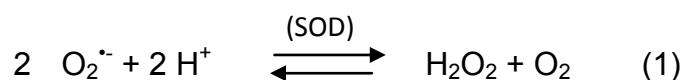
para as não radicalares destacam-se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso/hipoclorito (HOCl/OCl^-) e o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). O óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) e o peroxinitrito (ONOO^-) constituem as principais ERN. Nesse trabalho, torna-se importante salientar que as espécies supracitadas são geradas em sistemas biológicos por vários processos de oxi-redução (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010; VASCONCELOS et al., 2007).

A geração e regulação das ERO e ERN são de grande importância para a compreensão dos eventos celulares relacionados ao controle da sobrevivência, morte e proliferação celular. Considerando que tais espécies apresentam alta reatividade, todavia podem promover consequências adversas nos sistemas biológicos, podendo ser benéficas e até mesmo essenciais ou serem deletérias para o organismo (NIKI, 2010; VALKO et al., 2006).

1.1.1. Ânion Radical Superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

O $\text{O}_2^{\bullet-}$ é gerado *in vivo* pela redução monoeletrônica do O_2 , por exemplo, em fagócitos (macrófagos e neutrófilos) durante o processo inflamatório via mecanismo dependente da ativação da NADPH oxidase presente na membrana dessas células, para combater corpos estranhos; a formação de H_2O_2 no endotélio vascular ocorre a partir da formação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ pela xantina oxidase, contribuindo no desenvolvimento de doenças como arterosclerose (SILVA; CERCHIARO; HONÓRIO, 2011; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). O $\text{O}_2^{\bullet-}$ é uma das ERO de maior importância devido a sua reatividade, além de participar da formação de outras espécies reativas de grande importância, tais como o H_2O_2 e $\text{HO}^\bullet$ (NELSON; COX, 2011). A formação de H_2O_2 pelo ânion superóxido ocorre via reação de dismutação espontânea ou catalisada pela superóxido dismutase (SOD) (reação 1), um processo que ocorre em

especial nas mitocôndrias, e portanto importante para a homeostase deste radical, pois a presença de níveis elevados de $O_2^{\bullet-}$ pode ser muito prejudicial à célula. O H_2O_2 pode, participar de outras reações na célula e/ou ser eliminado pela ação da catalase, diminuindo os danos celulares (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).



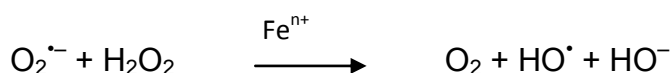
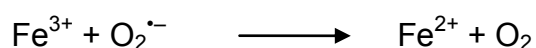
1.1.2. Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

O H_2O_2 é formado pela reação de dismutação de $O_2^{\bullet-}$ (catalisada pela SOD), ou pela redução bieletrônica do O_2 e catalisada por diversas oxidases *in vivo*, tais como: xantina, urato, glicose, coproporfirinogênio III, lisil, monoamina e D-aminoácidos, localizadas nos peroxissomas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; VASCONCELOS et al., 2007).

Apesar de não ser um radical livre, devido à ausência de elétrons desemparelhados na última camada, o H_2O_2 é considerado um metabólito, contudo seu excesso é extremamente prejudicial, pois apresenta efeitos deletérios às moléculas biológicas, participa da reação que produz $HO^{\bullet}$, podendo assim participar na lipoperoxidação de membranas e ainda reagem com metaloproteínas, em especial aquelas contendo ferro. Entretanto esse composto também possui ações benéficas ao nosso organismo, como por exemplo, a sua utilização pelos fagócitos na produção de ácidos hipohalogenosos, que são oxidantes muito efetivos no combate a vírus e bactérias (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; VALKO et al., 2006; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

1.1.3. Radical Hidroxila (HO[•])

É um dos radicais mais reativos, com alto potencial oxidante, capaz de reagir com várias biomoléculas, portanto uma vez formado pode causar modificações no DNA, danos nas proteínas, causando a inativação de enzimas e a peroxidação lipídica; soma-se a isso o fato do organismo não apresentar mecanismos de defesa contra esse radical. Para sua formação a partir de H₂O₂ é necessária a presença de um metal de transição como o ferro, sendo este processo conhecido como Reação de Fenton (reação 2); esse radical também pode ser formado a partir da reação do O₂^{•-} com H₂O₂, reação proposta por Haber-Weiss (reação 3), porém, em meio aquoso, a constante de velocidade dessa reação é próxima a zero. Entretanto, na presença de metais de transição (Fe²⁺, Cu²⁺, Cr²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Ti³⁺), essa reação ocorre de maneira significativa, podendo causar danos oxidativos *in vivo* (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006); assim se o radical HO[•] for produzido próximo ao DNA, podem ocorrer mutações ou até mesmo inativação do DNA. Outro exemplo muito importante é o ataque do HO[•] aos lipídios de membrana no processo de lipoperoxidação (VASCONCELOS et al., 2007; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).



1.1.4. Ácido Hipocloroso (HOCl)

O HOCl é formado pela ação catalítica da mieloperoxidase (MPO) sobre o H_2O_2 e Cl^- . A MPO é uma enzima armazenada prioritariamente nos grânulos azurófilos de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos, que utiliza o H_2O_2 , para oxidar o íon cloreto (Cl^-), e gerar o HOCl/ OCl^- , um potente oxidante e agente bactericida (KLEBANOFF et al., 2013; ALVES et al., 2010; WINTERBOURN; VISSERS; KETTLE, 2000).

A reação entre o HOCl e o grupamento NH_2 presente em aminoácidos gera as cloraminas, compostos altamente reativos, estendendo a capacidade microbicida do HOCl. As cloraminas são oxidantes mais estáveis e menos tóxicos que o HOCl. Dentre os aminoácidos, o β -aminoácido taurina, de maior abundância em neutrófilos, é um dos principais alvos que reagem com o HOCl formando taurinacloramina (KHALIL, 2005; ZGLICZYNSKI et al., 1971).

1.1.5. Radicais Peroxila ($\text{ROO}^\bullet$) e Alcoxila ($\text{RO}^\bullet$)

$\text{ROO}^\bullet$ e $\text{RO}^\bullet$ são formados durante a decomposição de peróxidos orgânicos e reações de radicais do carbono com oxigênio, reações que ocorrem na peroxidação lipídica. Propriedades específicas de cada radical variam de acordo com a natureza de cada grupo R, o local de geração e a quantidade de oxigênio disponível. Esse tipo de radical pode atuar em diversas reações toxicológicas e patológicas no organismo, sendo de maior relevância as que envolvem o processo de lipoperoxidação (VASCONCELOS et al., 2007; VALKO et al., 2006).

1.1.6. Oxigênio Singlete ($^1\text{O}_2$)

O oxigênio singlete é o estado eletronicamente excitado do oxigênio molecular, não possui elétrons desemparelhados, logo não é um radical livre, no entanto é altamente reativo e produzido via adição de energia. Desse modo, esse composto é muito mais reativo (oxidante) do que o oxigênio molecular e pode interagir com outras moléculas ou transferir sua energia, retornando ao estado fundamental (RONSEIN et al., 2006). O fato do $^1\text{O}_2$ conseguir transferir sua energia é denominado supressão física (*quenching*) e observado na presença de fenóis, carotenoides e bilirrubina. Ele também pode interagir com lipídios da membrana dando início ao processo de lipoperoxidação (VASCONCELOS et al., 2007; RONSEIN et al., 2006).

1.2. Antioxidantes

A produção contínua de espécies reativas durante os processos metabólicos promove o desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante, visando limitar seus níveis intracelulares dessas espécies e impedir a indução de danos ao organismo. Os antioxidantes de uma maneira geral podem ser descritos como “qualquer composto que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, diminui ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010; BIANCHI; ANTUNES, 1999; SIES; STAHL, 1995). A atividade das defesas antioxidantes varia de acordo com o tipo celular, pois quando se comparam os líquidos extracelulares com os intracelulares, observam-se diferentes mecanismos protetores (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010).

1.2.1. Compostos Fenólicos

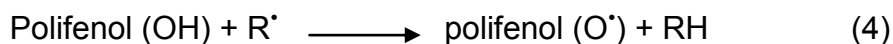
Entre os compostos largamente distribuídos na natureza, destacam-se os fenólicos, encontrados praticamente em todo o reino vegetal. Os compostos fenólicos são divididos em dois grandes grupos: os flavonoides e seus derivados e os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos hidroxibenzoico, hidroxicinâmico e *o*-cumárico) (SANTOS, 2011; SOUZA, 2007; SOARES, 2002). Os ácidos fenólicos são constituídos por um anel aromático, um grupamento carboxila e um ou mais grupamentos hidroxila (-OH) e/ou metoxila (-OCH₃) (RAMALHO; JORGE, 2006). Os compostos fenólicos simples são constituídos por um anel aromático com uma hidroxila, os ácidos fenólicos derivados do hidroxibenzoico possuem um anel fenólico e um grupamento carboxila caracterizando-os como ácidos, enquanto os ácidos hidroxicinâmicos são derivados dos fenilpropanoides com um grupamento carboxila inserido na cadeia lateral (OLIVEIRA; BASTOS, 2011; SOARES, 2002; BRAVO, 1998).

A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos está vinculada principalmente às propriedades redutoras de sua estrutura, atuando tanto na captura de espécies reativas quanto quelando metais de transição, participando assim nas etapas de iniciação e propagação do processo oxidativo (SOUSA et al, 2007). A ressonância do anel aromático desses compostos é responsável pela estabilidade dos produtos intermediários formados durante a sua interação com as espécies reativas (RAMALHO; JORGE, 2006).

O número e a posição de grupamentos -OH e -OCH₃ em relação ao grupo funcional carboxila em compostos fenólicos contribui para a captura das espécies reativas; desse modo, substituintes na posição *orto* e *para* em relação ao grupamento carboxila, conferem uma maior atividade antioxidante ao composto

(SILVA et al, 2010; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; MAMEDE; PASTORE, 2004;).

De maneira geral, a doação de hidrogênio às espécies reativas pelos grupamentos -OH e -OCH₃ dos compostos fenólicos pode ser demonstrada da seguinte maneira (reações 4 e 5) (SANTOS, 2011; MACHADO et al., 2008):



Onde R[•] representa a espécie reativa e O[•] representa o polifenol após doar elétrons para a espécie radicalar.

Na reação 4, doa-se um hidrogênio, após interação entre o composto fenólico e a espécie reativa, estabilizando-a. Na reação 5, o resultado dessa interação é a doação do metil (-CH₃) à espécie reativa, neutralizando-a (SANTOS, 2011).

Os ácidos derivados do hidroxicinâmico possuem maior atividade antioxidante em relação aos ácidos derivados do hidroxibenzoico devido ao grupamento CH=CH-COOH presente na cadeia lateral dos derivados do ácido hidroxicinâmico ter maior capacidade de estabilizar espécies reativas e doar hidrogênio em comparação ao grupamento -COOH do ácido hidroxibenzoico (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; MAMEDE; PASTORE, 2004).

Nesse estudo, os compostos avaliados fazem parte dos dois grupos supracitados: derivados do hidroxibenzoico (ácido *p*-hidroxibenzoico; ácido protocatéquico; ácido gálico; ácido siríngico e ácido vanílico) e os derivados do hidroxicinâmico (ácido *p*-cumárico; ácido cafeico; ácido ferúlico e ácido sinapínico) (Figura 1).

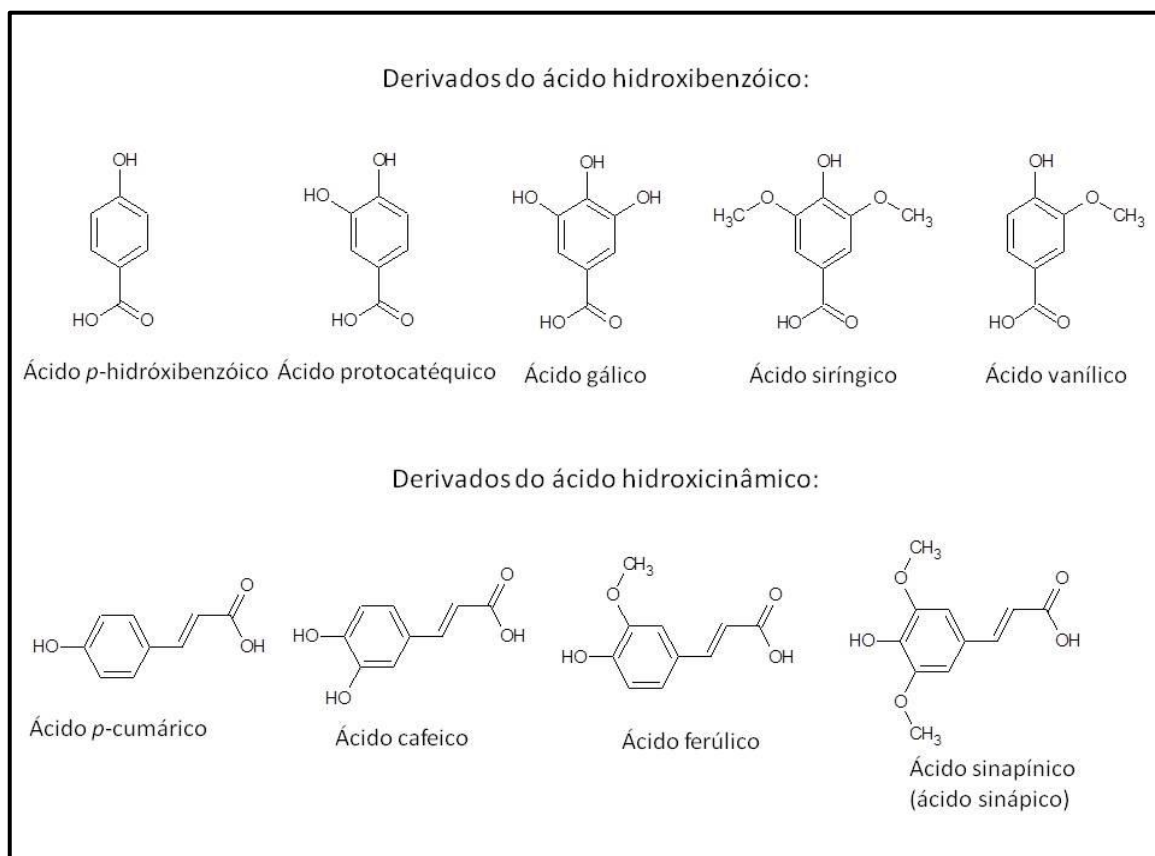


Figura 1: Representação das estruturas dos ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxibenzoico e hidroxicinâmico.

Esses ácidos são amplamente conhecidos devido à larga distribuição na natureza e consequentemente na alimentação. O ácido vanílico, por exemplo, pode ser encontrado na espécie *Origanum vulgare*, que corresponde a um tipo de orégano. O ácido cafeico, ácido *p*-hidroxibenzoico e *p*-cumárico estão presentes no azeite de oliva, contribuindo para a sua característica sensorial, e o ácido cafeico pode também ser extraído de grãos de café (LIN; YAN, 2012; CHOU et al., 2010; KIRITSAKIS, 1998).

Os ácidos *p*-cumárico e ferúlico podem ser encontrados em uma espécie de planta denominada *Oldenlandia diffusa*, comumente utilizada na medicina chinesa, sendo com o nome botânico de *Hedyotis diffusa* (LI et al.; 2012).

De um modo geral, as frutas, principalmente as que apresentam coloração vermelha/azul são as fontes de compostos fenólicos mais importantes em dietas alimentares; especialmente em relação aos derivados do ácido hidroxibenzoico e do ácido hidroxicinâmico. A dieta do mediterrâneo é um exemplo de dieta rica em compostos fenólicos, vitaminas e minerais (SANTOS, 2011; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

2. Objetivos

Para substanciar o conhecimento da ação antioxidante avaliou-se em sistemas-modelo *in vitro*, a capacidade de captura de determinadas espécies reativas (ERO e radicais modelo como ABTS^{•+} e DPPH[•]), pelos compostos fenólicos: ácidos derivados do ácido hidroxicinâmico, e derivados do hidroxibenzoico, correlacionando a capacidade de captura com os grupos substituintes e suas estruturas, tanto em número quanto em posição. Foram utilizados também padrões como o trolox (análogo solúvel da vitamina E) e a glutatona reduzida, compostos com reconhecida capacidade antioxidante.

3. Material e Métodos

3.1. Equipamentos

Foram utilizados: balança analítica (Acculab), banho-maria, potenciômetro (Marconi), Sonicador Ultra Sonic Cleaner (Unique), espectrofotômetros, de placas Biotek (Power Wave XS2) e com cubetas: OceanOptics USB 4000 ou Jasco V-630 com agitação magnética e termostatização com peltier.

3.2. Compostos Fenólicos

O estudo foi realizado com os ácidos derivados do ácido hidroxicinâmico (cafeico, ferulico, *p*-cumárico e siríngico), com os derivados do hidroxibenzoico (gálico, protocatéquico, *p*-hidroxibenzoico, sinapínico e vanílico) (Figura 1), e compostos relacionados ao ácido vanílico (apocinina e vanilina), todos obtidos da Sigma-Aldrich.

Os outros sais e reagentes utilizados nos ensaios estão listados a seguir: dicloridrato de 2,2'-azobis- (2-metilpropanoamidina) (AAPH), crocina, persulfato de potássio, 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico) (ABTS), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), Metassulfato de fenazina (PMS), azul de nitrotetrazólio (NBT), Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), glutatona reduzida, ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano (trolox) e 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) da Sigma-Aldrich; ácido acético glacial e peróxido de hidrogênio, da Merck. Os demais sais e reagentes utilizados foram todos de grau analítico.

3.3. Métodos Analíticos

Os métodos utilizados consistem em sistemas-modelo *in vitro* de espécies reativas e/ou radicalares para o ABTS^{•+}; DPPH[•]; O₂^{•-}; HOCl / OCl⁻; H₂O₂ e ROO[•]. Para avaliar a capacidade antioxidante foram utilizadas as porcentagens de captura (inibição), calculadas de acordo com a equação 6, exceto quando especificado:

$$\% \text{ Inibição} = (1 - A_a / A_t) \times 100 \quad (6)$$

Onde, *A_t* e *A_a* são as absorbâncias do cromóforo (radical, ou o produto da reação entre as ERO e reagente(s) de revelação) na ausência ou na presença das

amostras (e padrões), respectivamente. O IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$) foi determinado pela equação obtida do segmento linear do gráfico da % inibição *versus* a concentração das amostras. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM) das porcentagens de inibição (IC_{50}).

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas, exceto para o radical $ROO^{\bullet}$ que foi realizado em duplicata. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo Student-Newman-Keuls, utilizando o software Sigma Stat 2.03, considerando um nível de significância estatística, limite de 5% ($p < 0,05$).

3.3.1. Captura do $ABTS^{\bullet+}$

Para a avaliação da capacidade de captura sobre o $ABTS^{\bullet+}$ foi utilizada a metodologia descrita por Pellegrini et al. (1999), com algumas modificações. A oxidação do ABTS (7 mmol/L) pelo persulfato de potássio (140 mmol/L) gera o cátion radical $ABTS^{\bullet+}$, na ausência de luz e à temperatura ambiente com incubação de ~ 16 horas (Figura 2). Uma vez formado o radical, este foi diluído em tampão fosfato de sódio (pH 7,0) até obter-se absorvância de $\approx 0,750 \pm 0,020$ em 734 nm. Realizou-se o ensaio na presença e na ausência das amostras ou *padrões*, com incubação de 15 minutos na ausência de luz. Para a leitura das absorvâncias em 734 nm, utilizou-se espectrofotômetro de placa. O volume total da reação foi de 300 μL , sendo 100 μL fixo para o $ABTS^{\bullet+}$, e os volumes das amostras ou *padrões* e do tampão variaram entre si, totalizando de 200 μL .

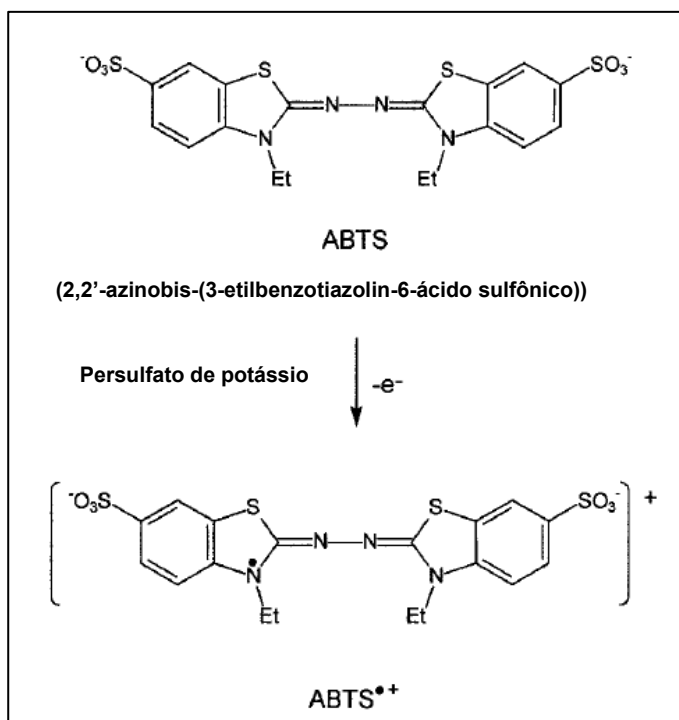


Figura 2: Representação da formação do ABTS^{•+}

3.3.2. Captura do DPPH[•]

Para a realização do ensaio de captura sobre o DPPH[•] (Figura 3) utilizou-se a metodologia proposta por Soares et al. (1997). O ensaio consiste no monitoramento da absorbância do radical DPPH[•] em 517nm na ausência e na presença de amostras ou *padrões*, após incubação por 20 minutos, a 25°C e na ausência de luz.

O DPPH[•] é estável em solução etanólica, no ensaio sua concentração foi de 62 µmol/L, desse modo as amostras e *padrões* também foram dissolvidas em etanol para que fosse utilizado o mesmo solvente. O volume total da reação foi de 900µL, sendo 90µL fixo para solução de DPPH[•] e volumes variados para amostras, *padrões* e etanol.

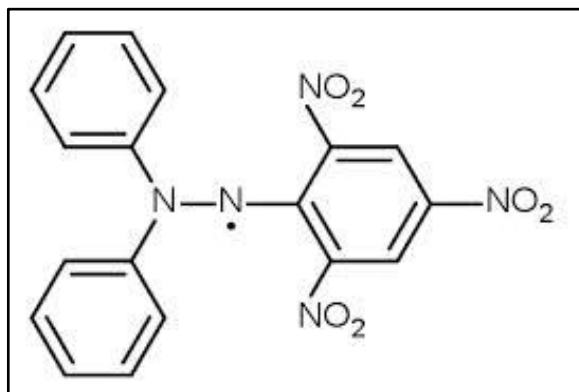


Figura 3: Representação da estrutura do DPPH[•] (adaptado de ALVES et al. 2010)

3.3.3. Captura do HOCl/OCl⁻

Este ensaio foi realizado segundo Ching et al. (1994), onde a capacidade antioxidante depende da habilidade da amostra em capturar o HOCl/ OCl⁻ impedindo que o mesmo oxide a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (Figura 4). Com a oxidação do TMB é gerado um cromóforo azul com valor máximo de absorbância em 652 nm, e com grande sensibilidade para determinar a capacidade de captura do HOCl/ OCl⁻ pela amostra.

Para obter o agente oxidante padrão foi feita diluição do NaOCl 12% em NaOH 10 mmol/L; a concentração do HOCl na solução estoque foi determinada espectrofotometricamente através de seu coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em 292 nm, ZGLICZYNSKI et al., 1971), pH 12.

O teste foi realizado em placa de 96 poços, com diferentes concentrações das amostras ou *padrões* em meio com tampão fosfato de sódio (50 mmol/L) pH 7,4, HOCl (30 $\mu\text{mol/L}$), incubação de 10 minutos e por último adição de TMB (2,8 mmol/L) dissolvido com a mistura de dimetilformamida 50%, ácido acético 0,8 mol/L e iodeto de potássio 0,01 mol/L para um volume final de reação de 300 μL . Incubou-

se novamente por 5 minutos, em temperatura ambiente e na ausência de luz; e realizou-se a leitura das absorbâncias em 655 nm.

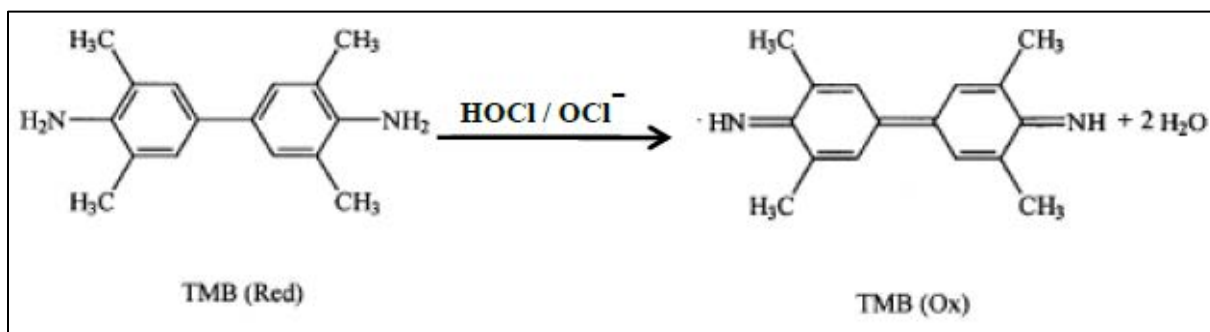


Figura 4: Representação da oxidação do TMB pelo HOCl/OCl⁻.

3.3.4. Captura do Ânion Radical Superóxido (O₂^{•-})

Segundo Kakkar et al. (1984), neste ensaio o O₂^{•-} é gerado pela reação entre metassulfato de fenazina (PMS) e a nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH). O O₂^{•-} gerado reage com o azul de nitrotetrazólio (NBT), reduzindo-o, para gerar uma formazana, cuja intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração do radical e assim, quanto menor a absorbância maior será a capacidade antioxidante dos compostos em teste (Figura 5).

Para realização do ensaio foi utilizado o tampão pirofosfato de sódio (pH 8,3, 25 mmol/L), PMS (372 µmol/L), NBT (600 µmol/L), NADH (1560 µmol/L) e diferentes concentrações dos compostos fenólicos *ou padrões*, em um volume final de reação de 300 µL. Após incubação de 7 minutos a temperatura ambiente e na ausência de luz, a absorbância foi monitorada em 560 nm, a fim de determinar a quantidade de formazana presente (HAZRA; BISWAS; MANDAL, 2008). O monitoramento da formazana é espectrofotométrico com a mudança da coloração amarelo pálido do NBT para uma coloração púrpura da formazana; assim as moléculas que atuam como antioxidantes interagem com o O₂^{•-} inibindo a produção da formazana (ALVES et al., 2010).

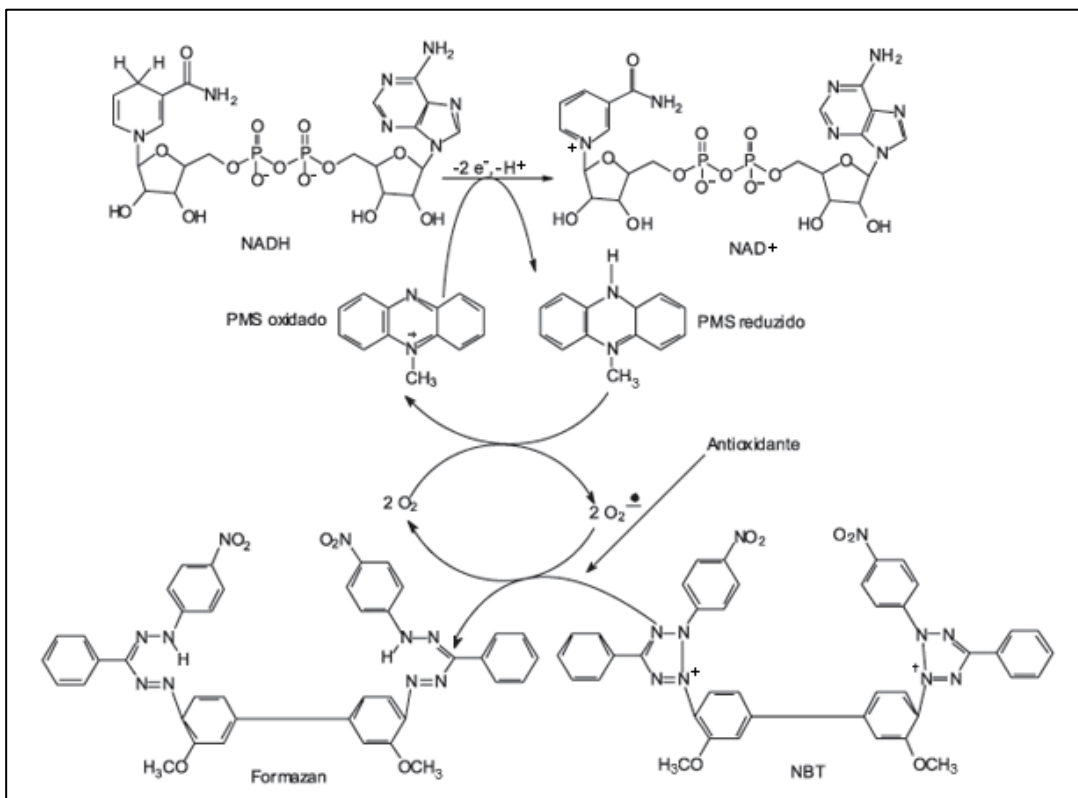


Figura 5: Representação esquemática da formação do ânion superóxido e ação de um antioxidante presente no meio (OLIVEIRA et al., 2009).

3.3.5. Captura do H_2O_2

A capacidade de captura sobre o H_2O_2 foi determinada de acordo com Ching et al. (1994) pelo ensaio em que o H_2O_2 oxida o ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) à ácido 5-5'-ditio-2-nitrobenzoico (DTNB) (Figura 6), ocorrendo uma diminuição da absorbância em 412nm. A concentração do TNB foi determinada através do coeficiente de extinção molar em 412nm ($\epsilon=13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; Ching et al., 1994) e a concentração do H_2O_2 foi determinada de acordo com Brestel (1985), ($\epsilon=80 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, em 230nm).

O ensaio foi realizado em tampão fosfato de potássio, 50mmol/L, pH 7,4, com diferentes concentrações dos compostos estudados, H_2O_2 (0,3mmol/L) e incubação por 30 minutos a 37°C, adicionou-se então TNB (53 μ mol/L) e incubou-se novamente por 1 hora a 37°C. A leitura da absorbância foi realizada em 412nm.

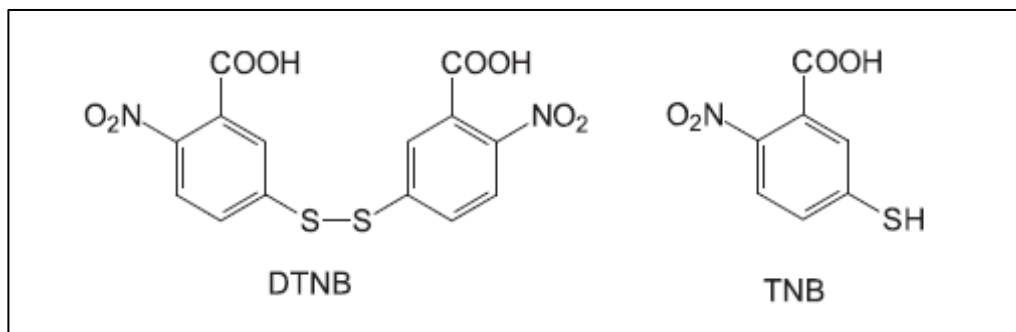


Figura 6: Representação estrutural do DTNB e TNB (VASCONCELOS et al, 2007 modificado).

A porcentagem de inibição da oxidação do TNB (% de captura do H₂O₂) é calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{1 - (\text{Abs Máx.} - \text{Abs Amostra})}{(\text{Abs Máx.} - \text{Abs Min.})} \times 100$$

Onde, Abs Máx. representa a absorbância na ausência do agente oxidante (H₂O₂) e da amostra; Abs Amostra é a absorbância na presença do agente oxidante e da amostra; e Abs Min. é a absorbância na presença do agente oxidante e na ausência da amostra. As amostras não apresentaram absorbância, no meio reacional, no comprimento de onda utilizado no ensaio.

3.3.6. Ensaio de clareamento (*bleaching*) da crocina

O processo de lipoperoxidação (LPO) pode ser definido como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação das espécies reativas sobre os lipídeos de membrana, gerando principalmente o radical peroxila (ROO[•]) que propaga esse processo, acarretando em danos celulares que podem até levar à morte celular (LIMA, ABDALLA, 2001). Além disso, esse processo é responsável pela diminuição das propriedades nutricionais e sensoriais dos produtos alimentícios que contem lipídeos (HRÁDKOVÁ et al., 2013). Devido à importância da LPO, vários sistemas-

modelo simulam essa reação e são utilizados para avaliar a capacidade antioxidante frente a este tipo de atividade oxidativa.

Esse ensaio foi inicialmente proposto por BORS et al.(1984) e mostra-se adequado para avaliar a atividade antioxidante frente ao processo de LPO. A capacidade antioxidante é medida através da proteção do clareamento (*bleaching*) da crocina, um carotenoide e pigmento natural derivado da planta *Crocus sativus* L.. (Figura 7), frente a um composto gerador de radicais livres.

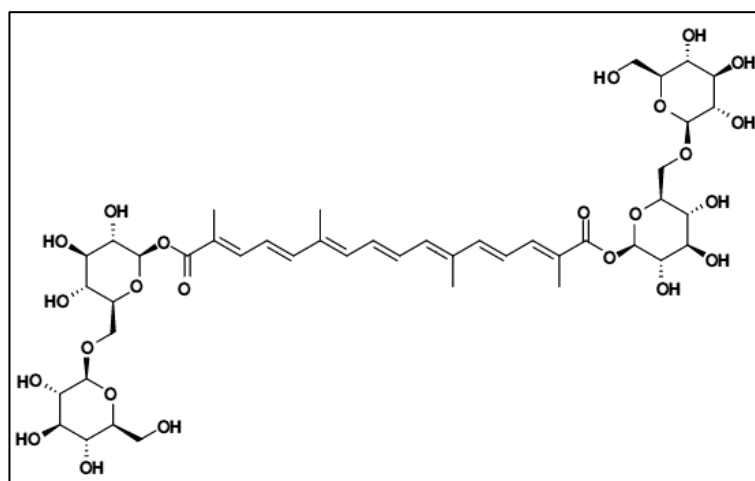


Figura 7: Representação estrutural da crocina.

O ensaio do clareamento (*bleaching*) da crocina foi realizado de acordo com Tubaro et al. (1998) por meio do monitoramento do decréscimo da absorbância da crocina a 443 nm, em ensaio de competição cinética, durante 10 minutos. O dicloridrato de 2,2'-azobis- (2-metilpropanoamidina) (AAPH) gera por termólise a 40°C e com velocidade constante, um radical livre que em meio aerado, gera ROO[•], o qual é capaz de abstrair um átomo de hidrogênio e gerar um radical na estrutura da crocina, resultando no rompimento do seu sistema de duplas ligações conjugadas, provocando seu clareamento, com redução de sua absorbância na região do visível. Na presença de uma molécula antioxidante, estabelece-se uma

competição e a redução da absorbância é menor, portanto registra-se um novo valor na variação da absorbância em função do tempo, ou seja, na velocidade de clareamento (Figura 8).

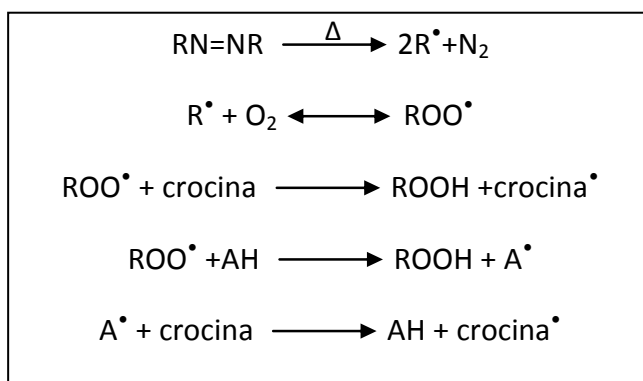


Figura 8: Reações envolvidas no clareamento da crocina com a termólise do AAPH (adaptado de ORDOUDI; TSIMIDOU, 2006); A, representa um antioxidante (amostra).

Os ensaios cinéticos foram realizados a 40°C e com agitação constante, sendo a absorbância monitorada à 443nm. O volume total da reação é de 2 mL, em tampão fosfato de sódio 0,12 mol/L, pH 7,0 com 25 µmol/L de crocina (a partir de uma solução estoque a 6 mmol/L em DMSO) cuja concentração é aferida pelo coeficiente de extinção molar da crocina em DMSO ($\epsilon=13.727 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, em 443nm) conforme descrito por Assis (2012), e diferentes concentrações dos padrões e compostos fenólicos. A reação tem início com a adição de 50 µl (12,5 mmol/L, concentração final) de AAPH (em solução estoque 0,5 mol/L em tampão fosfato de sódio 0,12 mol/L, pH 7,0), preparada no dia do experimento.

Após a adição do AAPH, em aproximadamente 1 minuto, a velocidade do *bleaching* da crocina torna-se linear. Para eliminar possíveis interferências das amostras, para cada composto foi realizado um ensaio sem crocina, sendo este considerado o branco da reação.

Na presença de um antioxidante que compete com a crocina pela interação com o ROO[•], a velocidade de clareamento diminui de acordo com a concentração e a constante de velocidade da reação entre o radical e o antioxidante (TUBARO, RAPUZZI, URSINI, 1999). Essa relação pode ser descrita matematicamente pela equação abaixo.

$$\frac{v_0}{v} = \frac{k_c[C] + k_a[A]}{k_c[C]} = 1 + \frac{k_a}{k_c} \times \frac{[A]}{[C]}$$

Na qual: v_0 =velocidade da reação da crocina com ROO[•]; v = velocidade da reação da crocina com ROO[•] na presença de antioxidante; k_c = constante de velocidade para a reação entre ROO[•] e crocina; k_a = constante de velocidade para a reação entre ROO[•] e antioxidante; $[C]$ =concentração da crocina; $[A]$ =concentração do antioxidante.

O valor de k_a/k_c corresponde ao valor obtido na regressão linear do gráfico v_0 / v versus $[A]/[C]$ e indica a capacidade de interação entre o antioxidante e o ROO[•].

Pela divisão do k_a/k_c dos ácidos fenólicos pelo k_a/k_c de um antioxidante padrão como o Trolox, obtém-se a razão entre as constantes e os valores para a capacidade antioxidante dos compostos analisados, assim podendo os resultados serem expressos em equivalentes ao Trolox.

Para a captura do ROO[•] também foram testados dois metóxicatecóis: apocinina e vanilina, compostos relacionados estruturalmente ao ácido vanílico (Figura 9).

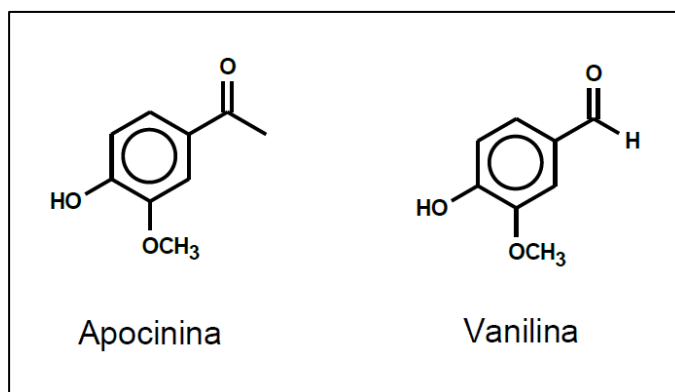


Figura 9: Representação estrutural dos metoxicatecóis apocinina e vanilina (adaptado de KANEGAE, 2009).

4. Resultados e discussão

4.1. Captura do ABTS^{•+}

O ABTS^{•+} destaca-se em ensaios da interação entre amostras biológicas e radicais livres, para avaliar o potencial desta interação (PRABHU et al., 2011). A utilização do ABTS^{•+} é importante para avaliar *in vitro* o potencial antioxidante de forma simples e rápida, uma vez que sua redução diminui sua absorbância em 734 nm (descolorindo-o); essa diminuição da absorbância é proporcional à concentração e atividade antioxidante (PELLEGRINI et al., 1999). Apresenta ainda como vantagens ser utilizado em diferentes pH, possibilitando assim o estudo da influência da acidez do meio na atividade antioxidante e solubilidade em água e solventes orgânicos permitindo assim avaliar compostos hidrossolúveis e lipossolúveis; contudo tem a limitação de ser um radical modelo, e não uma biomolécula (MAGALHÃES et al., 2008).

Os resultados neste ensaio estão expressos pelo IC₅₀ (μmol/L), que mensura a quantidade dos ácidos fenólicos capaz de capturar metade dos radicais livres

presentes na solução. Quanto menor o valor do IC_{50} , menor é a quantidade de composto necessário para reduzir em 50% a concentração do $ABTS^{\bullet+}$. As análises foram feitas em triplicata, e os resultados representam as médias e o erro padrão das inibições.

A glutathiona reduzida (GSH) é uma biomolécula que participa do sistema de defesa antioxidante do organismo (JÚNIOR et al., 2001) e a vitamina E possui efeitos benéficos contra os danos oxidativos, ambos tem reconhecida atividade antioxidante. Um análogo da vitamina E com maior solubilidade em água, o Trolox foi utilizado em ensaios *in vitro* (LUCIO et al., 2009). Em função desse contexto optou-se pelos *padrões* a glutathiona e o trolox, os quais apresentaram IC_{50} de 11,10 $\mu\text{mol/L}$ e 17,50 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente para o $ABTS^{\bullet+}$ (Figuras 10 e 11).

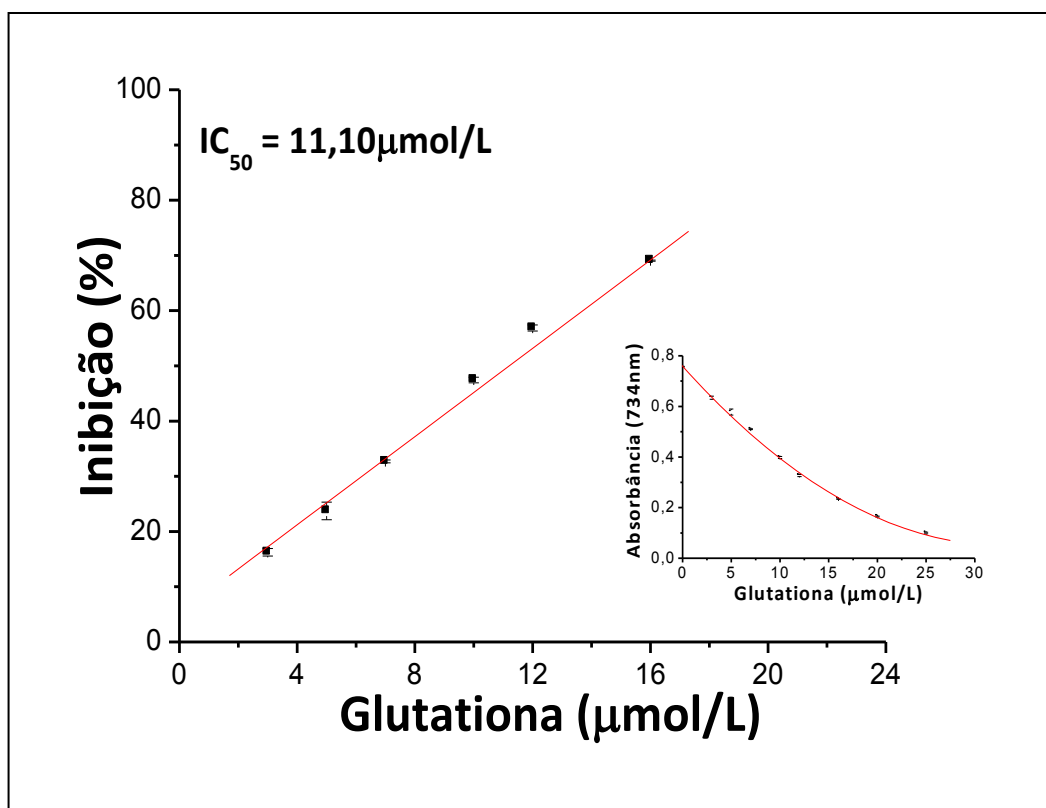


Figura 10: Inibição (captura) do $ABTS^{\bullet+}$ pela glutathiona, em tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 734 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do $ABTS^{\bullet+}$ na presença de diferentes concentrações da glutathiona.

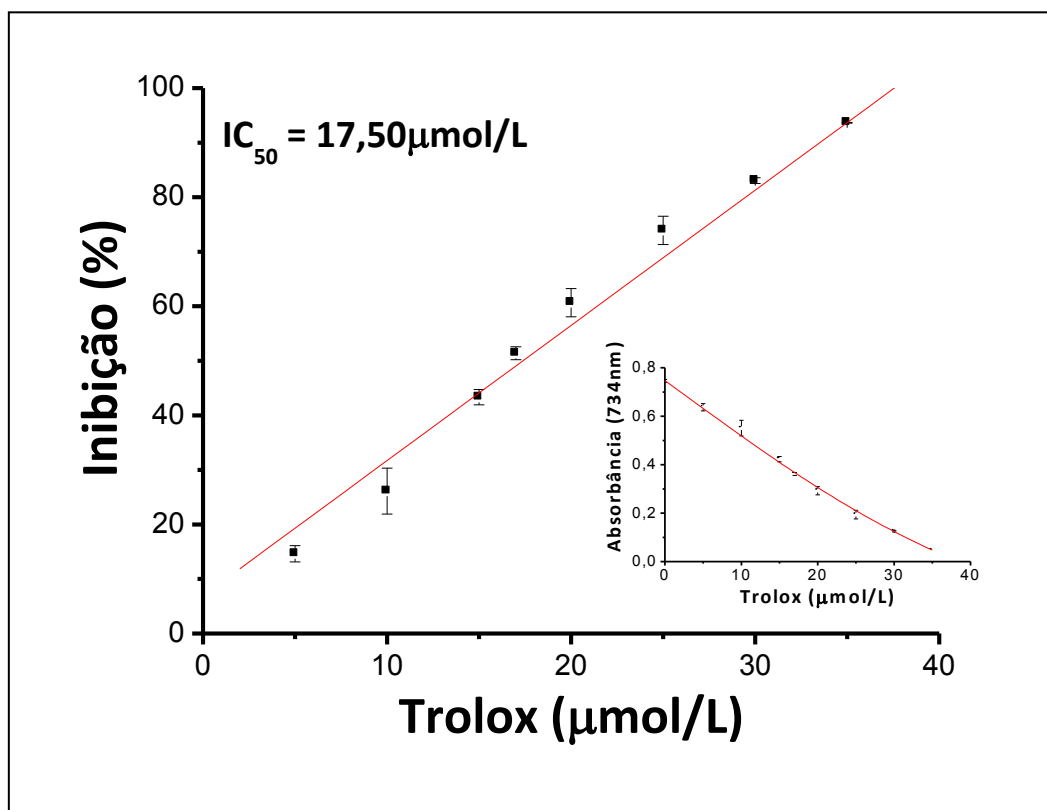


Figura 4: Inibição (captura) do ABTS^{++} pelo trolox, em tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 734 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do ABTS^{++} na presença de diferentes concentrações do trolox.

Nas figuras de 12 a 15 são apresentados os respectivos IC_{50} para a captura do ABTS^{++} para os ácidos derivados do hidroxicinâmico, cujos valores em ordem crescente do IC_{50} variam de ~ 7 até $16 \text{ } \mu\text{mol/L}$: *p*-cumárico < sinapínico < ferulico < cafeico e portanto decrescente para o potencial antioxidante frente ao ABTS^{++} .

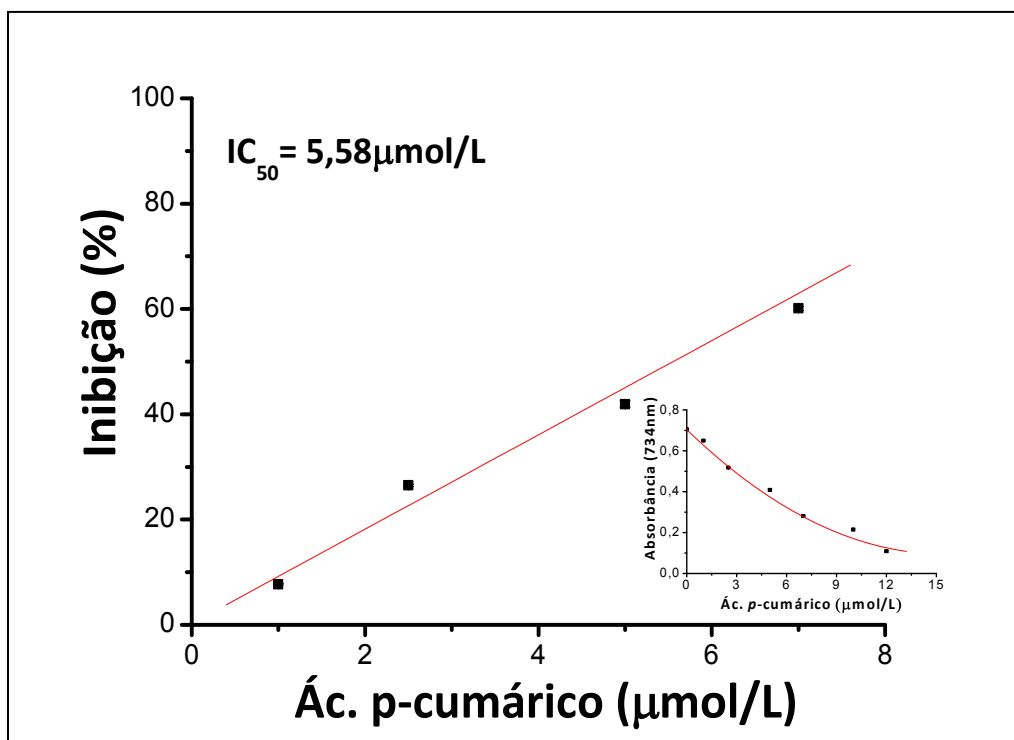


Figura 12: Inibição (captura) do ABTS⁺⁺ pelo Ác. *p*-cumárico, em tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 734 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do ABTS⁺⁺ na presença de diferentes concentrações do Ác. *p*-cumárico.

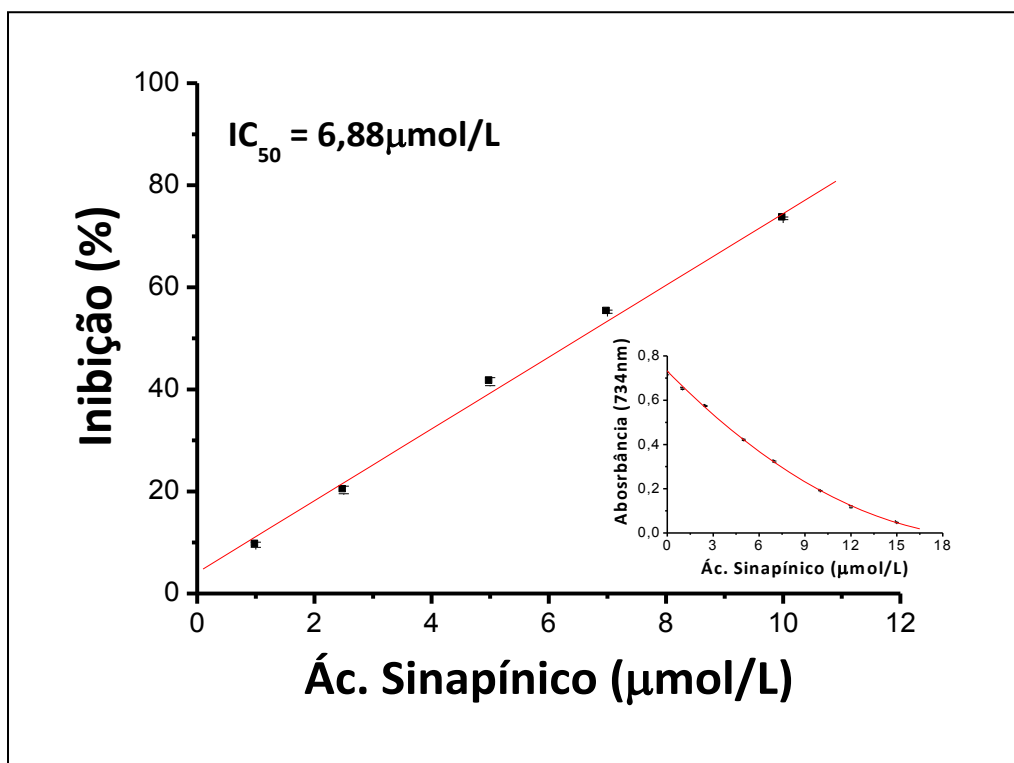


Figura 5: Inibição (captura) do ABTS⁺⁺ pelo Ác. Sinapínico, em tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 734 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do ABTS⁺⁺ na presença de diferentes concentrações do Ác. Sinapínico.

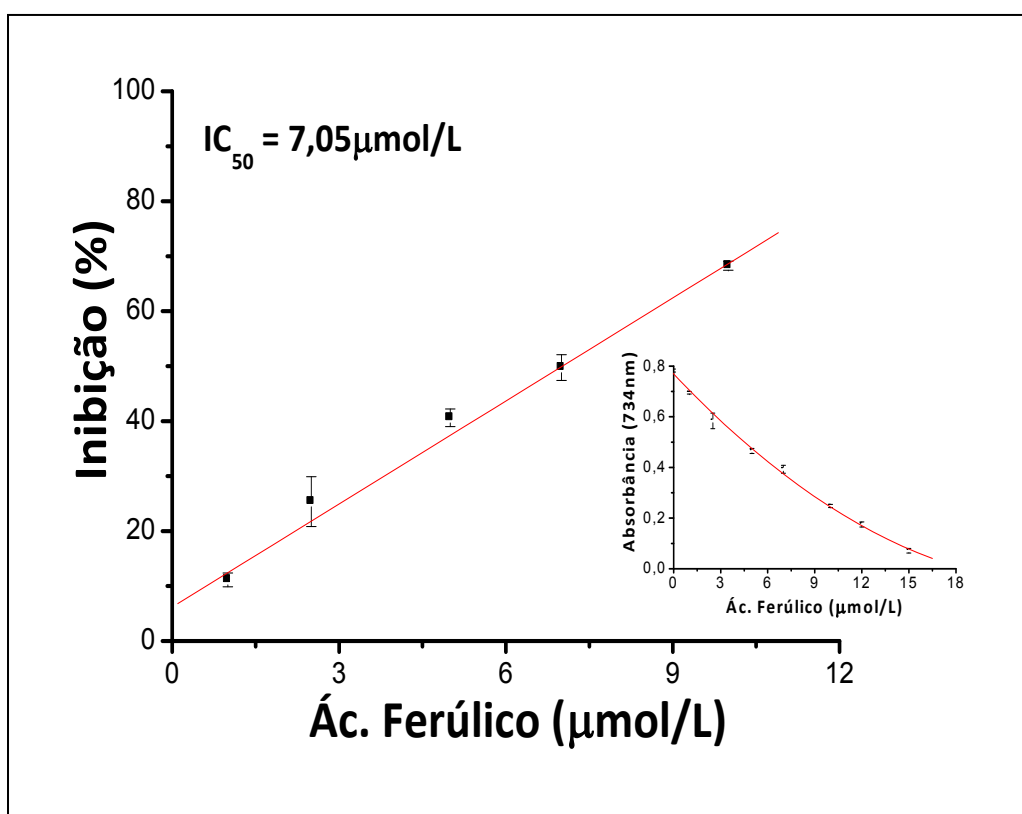


Figura 6: Inibição (captura) do ABTS⁺⁺ pelo Ác. Ferúlico, em tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 734 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do ABTS⁺⁺ na presença de diferentes concentrações do Ác. Ferúlico.

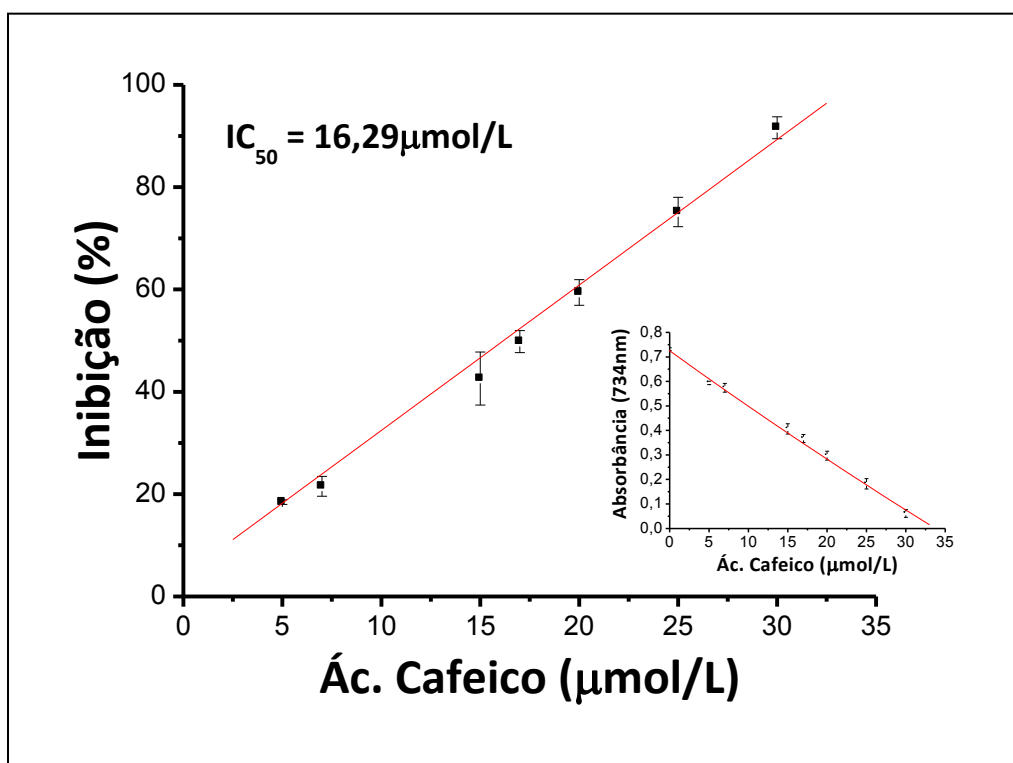


Figura 15: Inibição (captura) do ABTS⁺⁺ pelo Ác. Cafeico, em tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 734 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do ABTS⁺⁺ na presença de diferentes concentrações do Ác. Cafeico.

Nas figuras de 16 a 20 são apresentados os respectivos IC_{50} para o $ABTS^{++}$ dos ácidos derivados do hidroxibenzoico. Os compostos apresentaram ordem crescente do IC_{50} de ~ 3 até 32 $\mu\text{mol/L}$: gálico < vanílico < protocatéquico < siríngico < *p*-hidroxibenzoico e decrescente para o potencial antioxidante frente ao $ABTS^{++}$

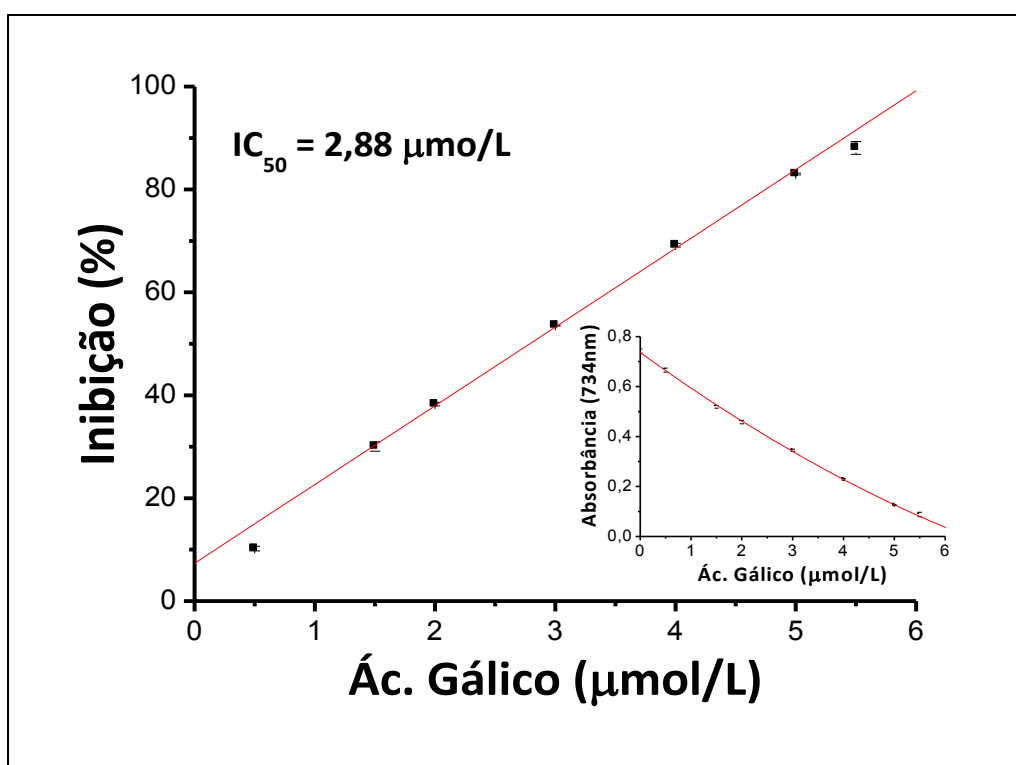


Figura 16: Inibição (captura) do $ABTS^{++}$ pelo Ác. Gálico, em tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 734 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do $ABTS^{++}$ na presença de diferentes concentrações do Ác. Gálico.

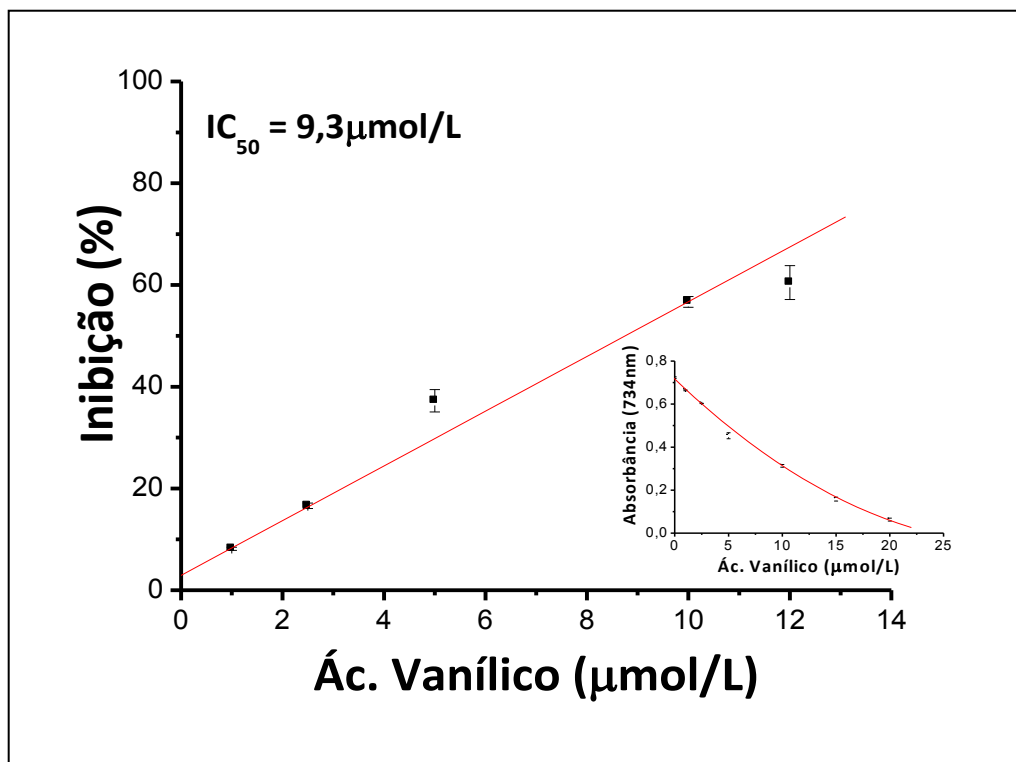


Figura 17: Inibição (captura) do ABTS^{++} pelo Ác. Vanílico, em tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 734 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do ABTS^{++} na presença de diferentes concentrações do Ác. Vanílico.

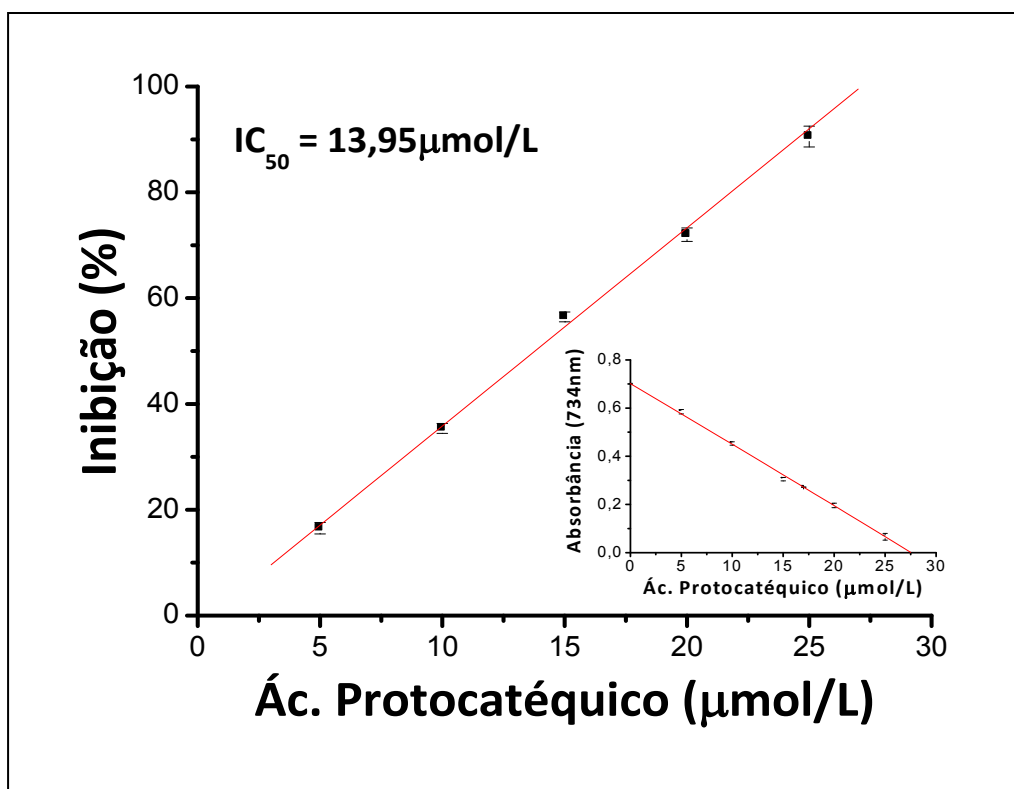


Figura 7: Inibição (captura) do ABTS^{++} pelo Ác. Protocatéquico, em tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 734 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do ABTS^{++} na presença de diferentes concentrações do Ác. Protocatéquico.

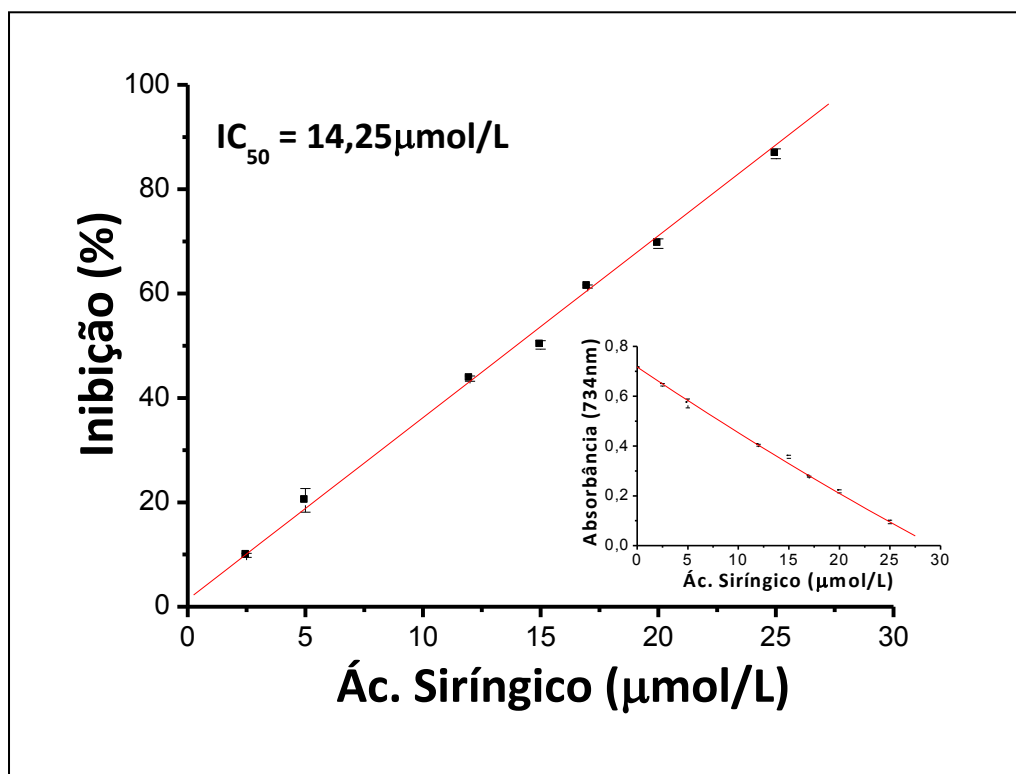


Figura 8: Inibição (captura) do ABTS^{++} pelo Ác. Siríngico, em tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 734 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do ABTS^{++} na presença de diferentes concentrações do Ác. Siríngico.

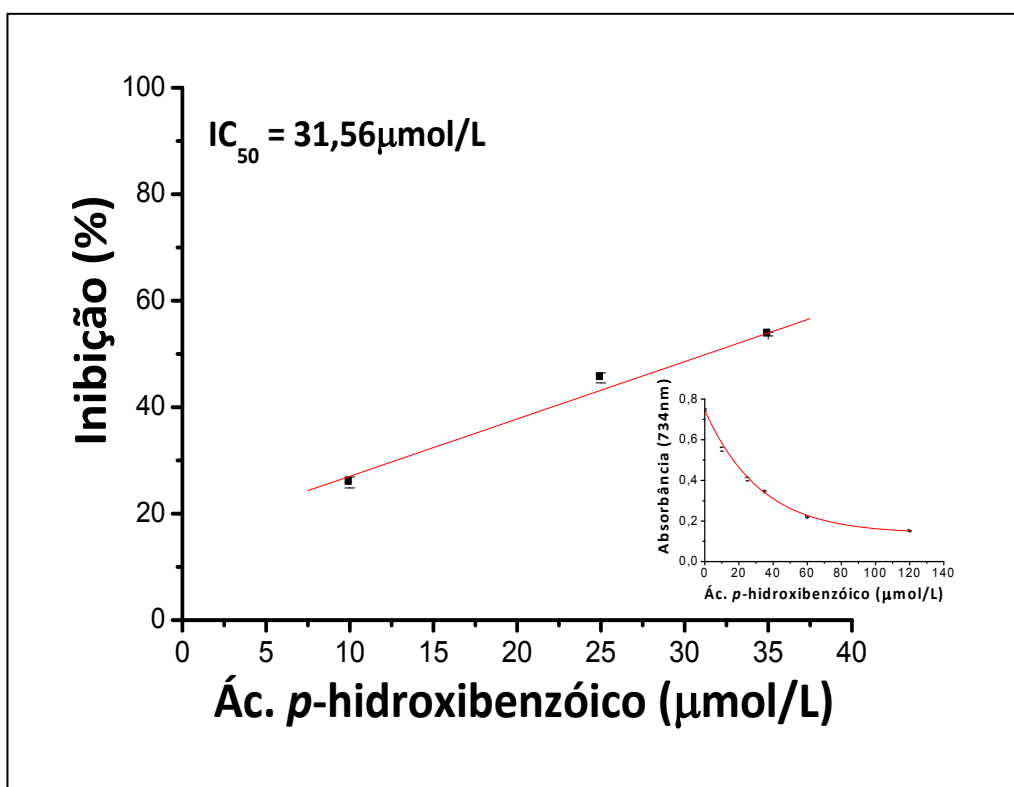


Figura 9: Inibição (captura) do ABTS^{++} pelo Ác. *p*-hidroxibenzoico, em tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 734 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do ABTS^{++} na presença de diferentes concentrações do Ác. *p*-hidroxibenzoico.

Na figura 21 são apresentados os valores de IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$) dos ácidos derivados do hidroxicinâmico e hidroxibenzoico, e dos *padrões* (glutathiona e trolox).

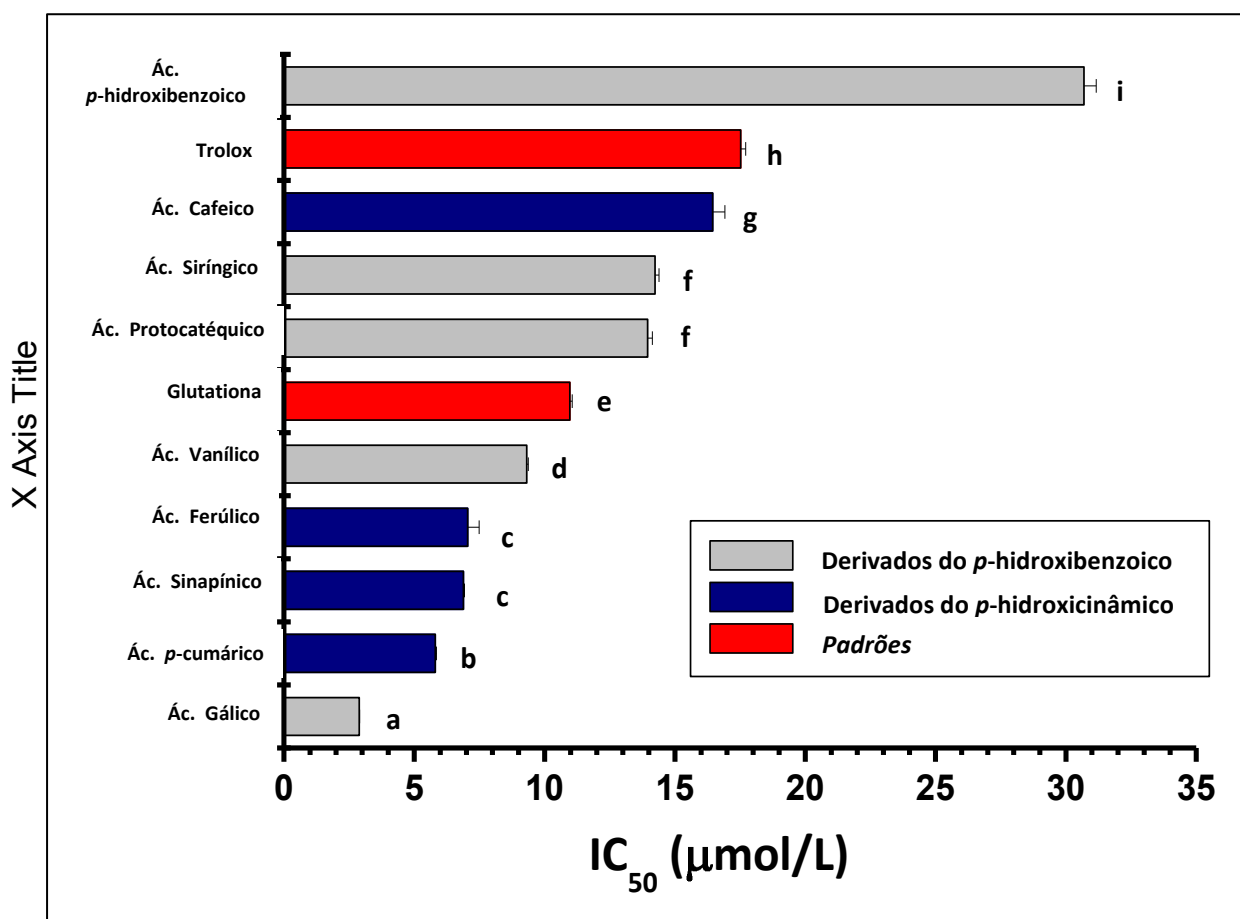


Figura 21: Inibição (Captura) do $ABTS^{•+}$ (IC_{50} $\mu\text{mol/L}$), pelos ácidos derivados do hidroxibenzoico e hidroxicinâmico e dos *padrões*. Tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4; $\lambda = 734\text{nm}$. Letras iguais, sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

Observa-se na figura 21 que os derivados do hidroxicinâmicos foram discretamente mais eficientes que os *padrões* derivados do hidroxibenzoico, contudo o composto mais eficiente para a captura do $ABTS^{•+}$ foi o ácido gálico, derivado disubstituído do ácido *p*-hidroxibenzoico.

De acordo com Pannala et al. (2001), os compostos que apresentam maior número de hidroxilas na molécula demonstram ter maior atividade antioxidante em

relação aos compostos mono-hidroxilados, o que corrobora com os resultados obtidos nesse ensaio, com exceção do ácido cafeico que é di-hidroxilado e teve seu IC_{50} maior, ou seja menor atividade antioxidante que o ácido *p*-cumárico que é mono-hidroxilado, ambos derivados do ácido hidroxicinâmico.

Os ácidos siringico e vanílico apresentaram melhores atividades antioxidantes comparados ao ácido *p*-hidroxibenzoico; segundo Balasundram; Sundram; Samman (2006) isso se deve às metoxilas adjacentes à hidroxila que nos ácidos derivados do *p*-hidroxibenzoico confere melhor atividade antioxidante em relação a uma hidroxila apenas na posição *para*. Entretanto a presença de duas metoxilas no ácido siringico (posição 3 e 5) não apresentou maior atividade em comparação ao vanílico, com apenas uma metoxila adjacente à hidroxila; o mesmo aconteceu para os ácidos sinapínico e ferúlico, derivados do ácido hidroxicinâmico.

4.2. Captura do DPPH[•]

O ensaio foi realizado de acordo com Soares et al.(1997), no qual monitorou-se o decréscimo da absorbância do DPPH[•]. O DPPH[•] também é considerado um radical modelo, sendo utilizado como um ensaio preliminar em meio orgânico para avaliar a capacidade antioxidante (PRABHU et al.,2011).

Apenas para uma amostra não foi obtido o IC_{50} , o ácido *p*-hidróxibenzoico, o qual foi testado até 35 mmol/L, devido a sua solubilidade limitada.

Os resultados nesse ensaio também estão apresentados como valores de IC_{50} para captura do DPPH[•]. Os *padrões*, Glutathione e Trolox apresentaram IC_{50} de 84,17 μ mol/L e IC_{50} 16,36 μ mol/L, respectivamente (Figuras 22 e 23).

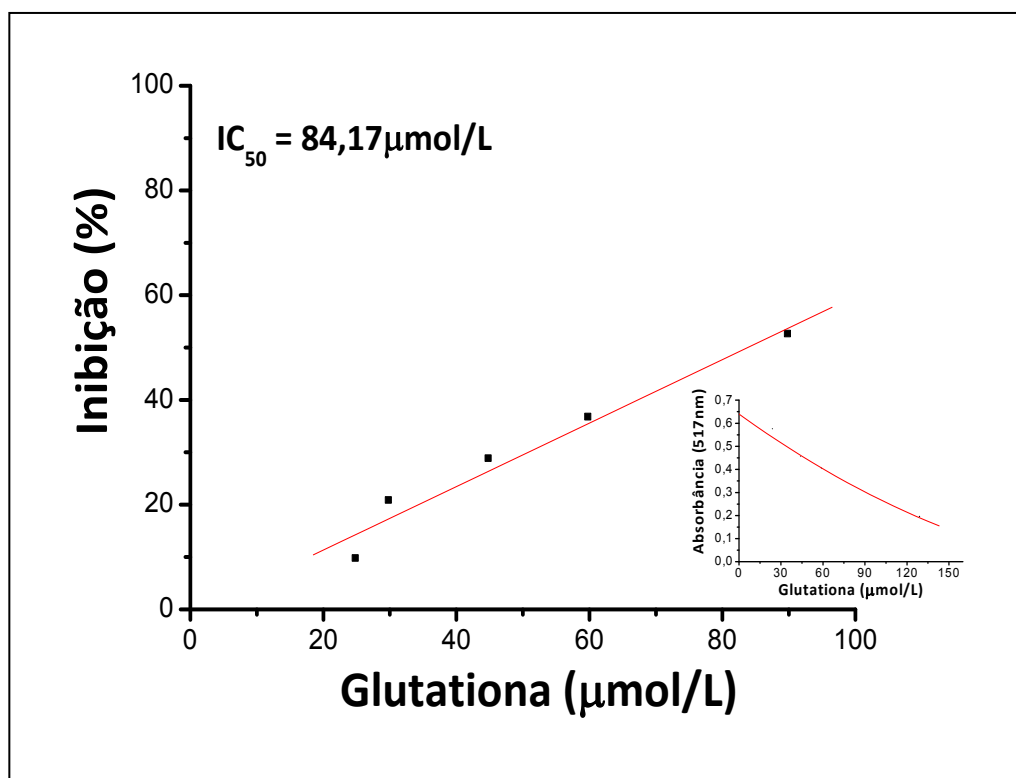


Figura 22: Inibição (captura) do DPPH• pela Glutathione, em etanol. $\lambda = 517 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do DPPH• na presença de diferentes concentrações da Glutathione.

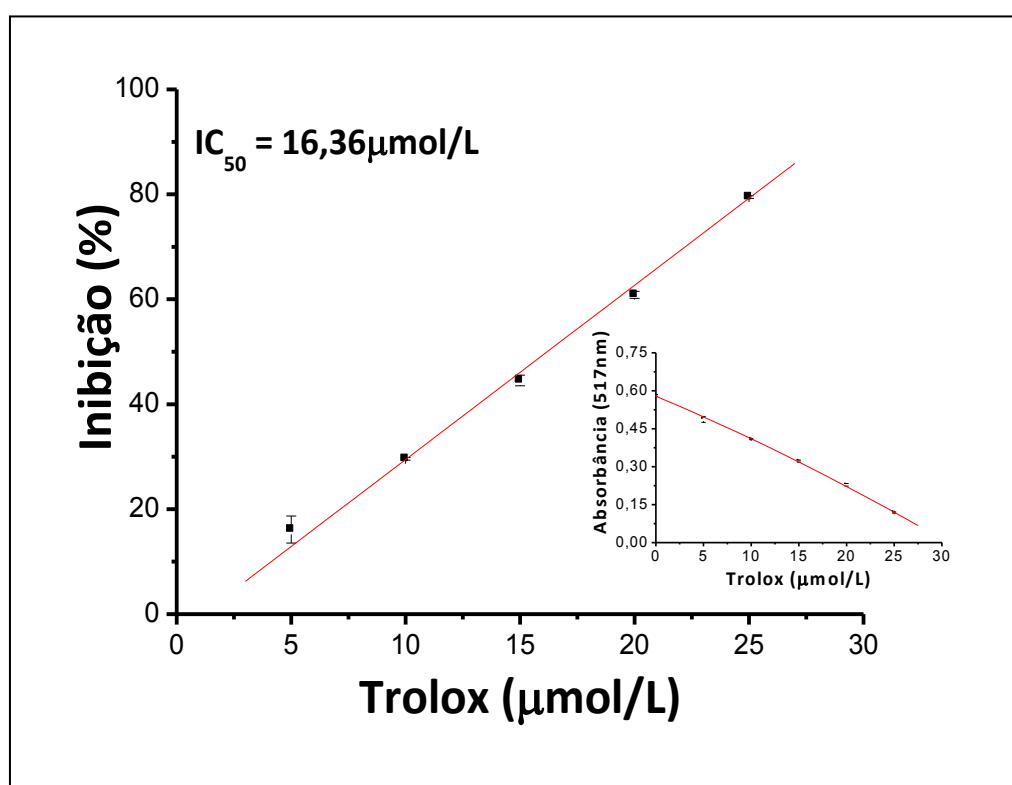


Figura 23: Inibição (captura) do DPPH• pelo Trolox, em etanol. $\lambda = 517 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do DPPH• na presença de diferentes concentrações do Trolox.

Entre os ácidos fenólicos estudados, a maioria mostrou ser eficiente como sequestrador do DPPH• exceto o ácido *p*-hidroxibenzoico, e, portanto foi possível determinar os respectivos IC₅₀ (Figuras 24 a 31).

Para os ácidos derivados do hidroxicinâmico os valores de IC₅₀ variaram de ~ 13 µmol/L até 37 mmol/L, em ordem crescente: ácido cafeico < sinapínico < ferúlico < *p*-cumárico, o que representa uma ordem decrescente para eficiência de captura sobre o DPPH• (Figuras 24 a 27).

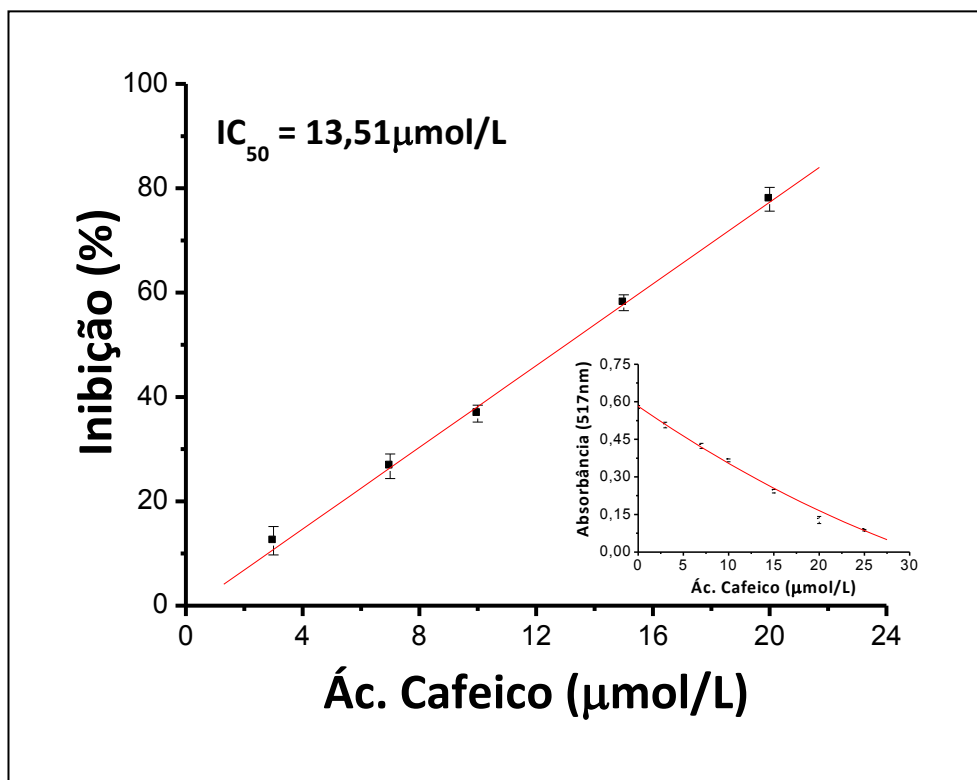


Figura 24: Inibição (captura) do DPPH• pelo Ác. Cafeico, em etanol. $\lambda = 517$ nm. A figura inserida apresenta a média das absorvâncias do DPPH• na presença de diferentes concentrações do Ác.Cafeico.

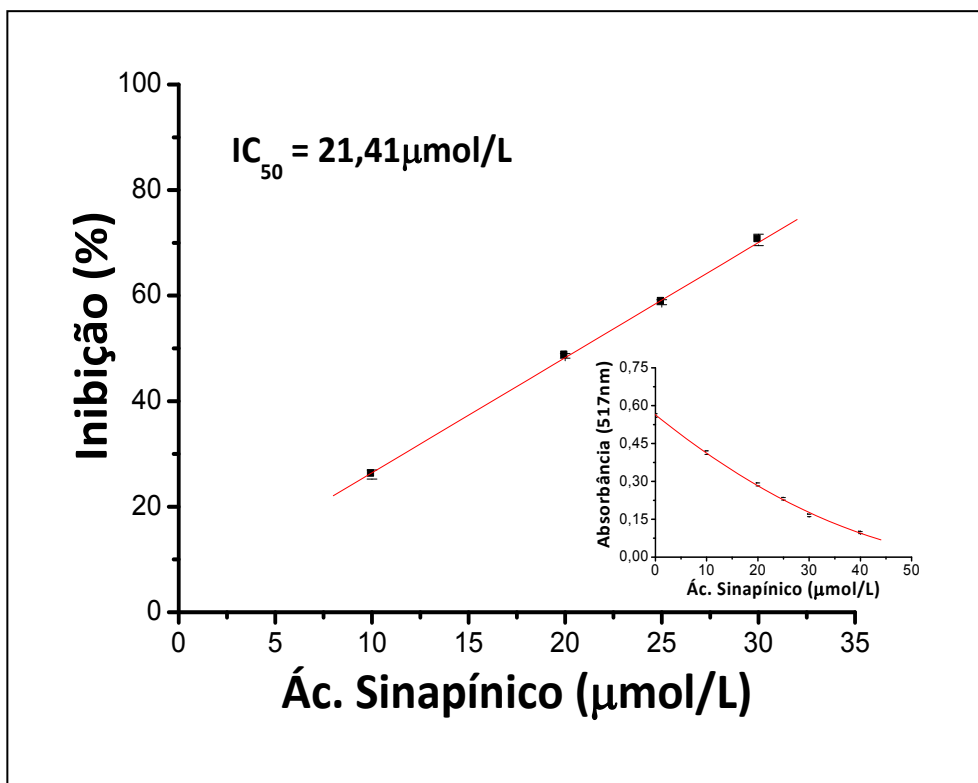


Figura 25: Inibição (captura) do DPPH[•] pelo Ác. Sinapínico, em etanol. $\lambda = 517 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do DPPH[•] na presença de diferentes concentrações do Ác. Sinapínico.

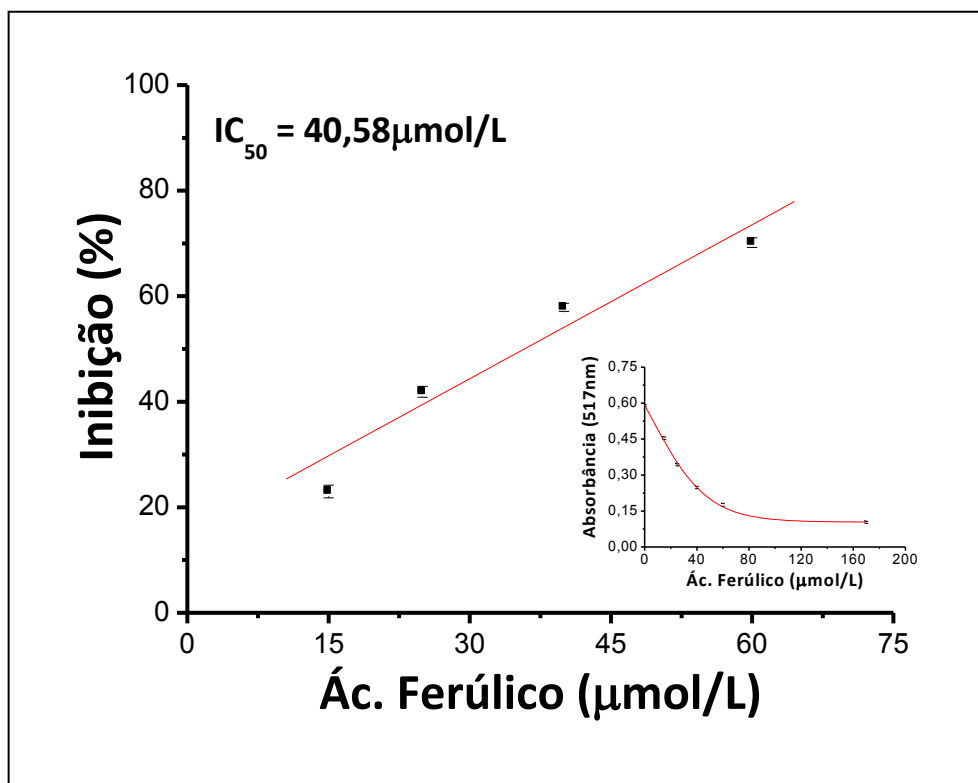


Figura 10: Inibição (captura) do DPPH[•] pelo Ác. Ferúlico, em etanol. $\lambda = 517 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do DPPH[•] na presença de diferentes concentrações do Ác. Ferúlico.

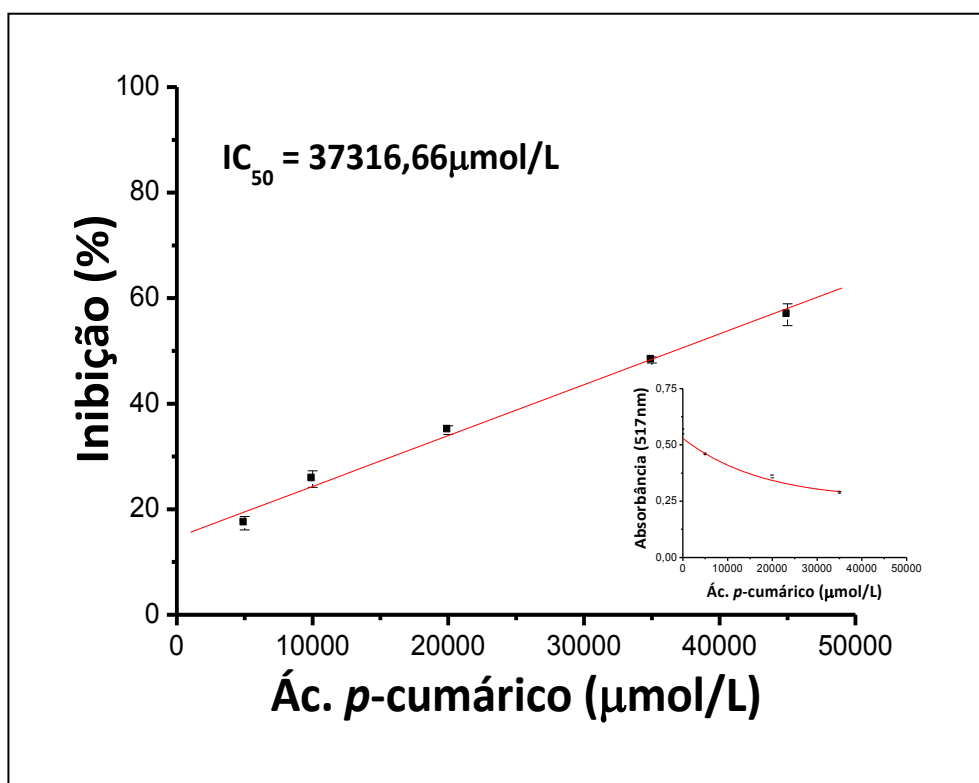


Figura 27: Inibição (captura) do DPPH• pelo Ác. *p*-cumárico, em etanol. $\lambda = 517 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do DPPH• na presença de diferentes concentrações do Ác. *p*-cumárico.

Para os ácidos derivados do hidroxibenzoico os valores de IC_{50} variaram de $\sim 5 \text{ } \mu\text{mol/L}$ até 4 mmol/L , em ordem crescente: ácido gálico < protocatéquico < siríngico < vanílico, o que representa uma ordem decrescente para eficiência na captura do DPPH• (Figuras 28 a 31).

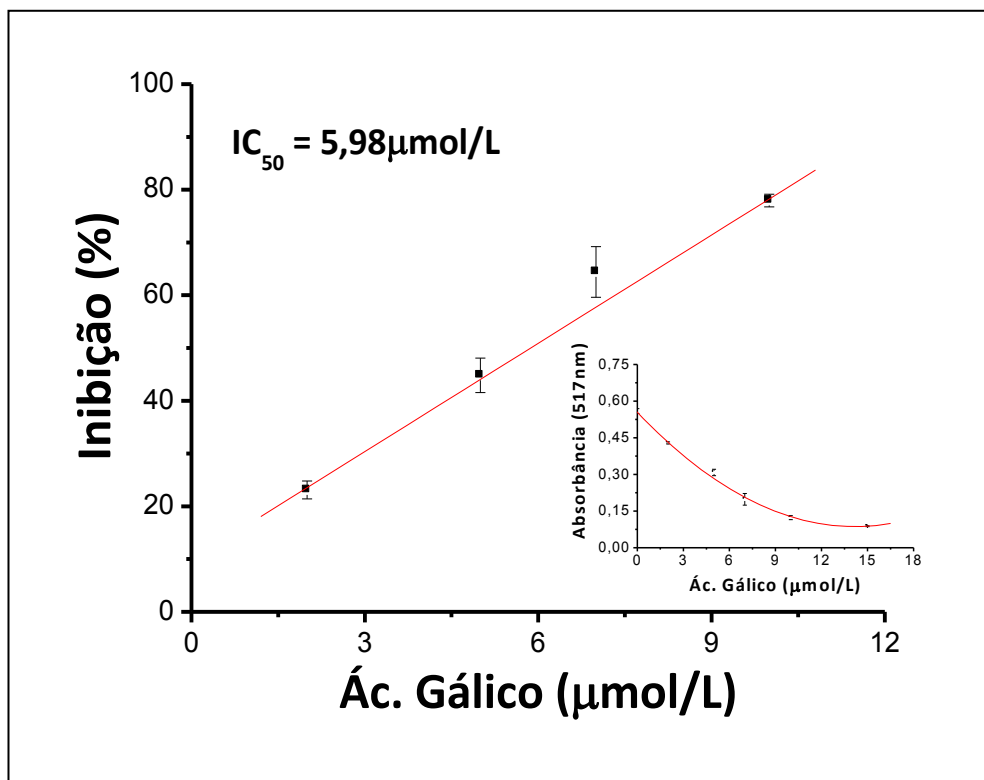


Figura 28: Inibição (captura) do DPPH• pelo Ác. Gálico, em etanol. $\lambda = 517 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do DPPH• na presença de diferentes concentrações do Ác. Gálico.

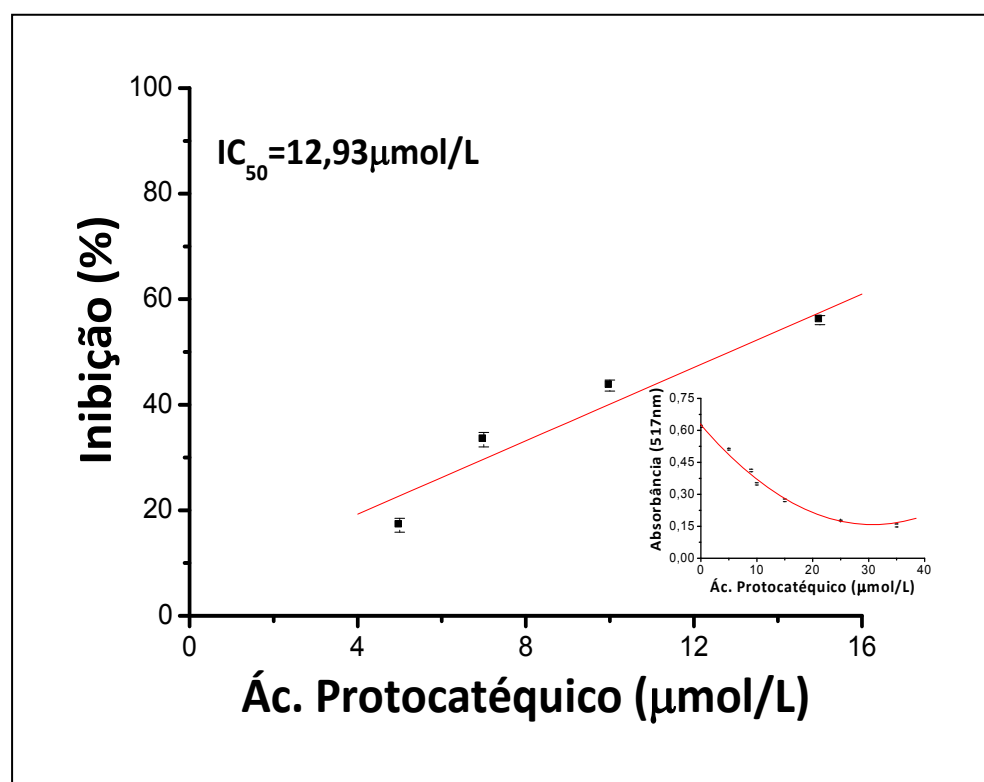


Figura 29: Inibição (captura) do DPPH• pelo Ác. Protocatéquico, em etanol. $\lambda = 517 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do DPPH• na presença de diferentes concentrações do Ác. Protocatéquico.

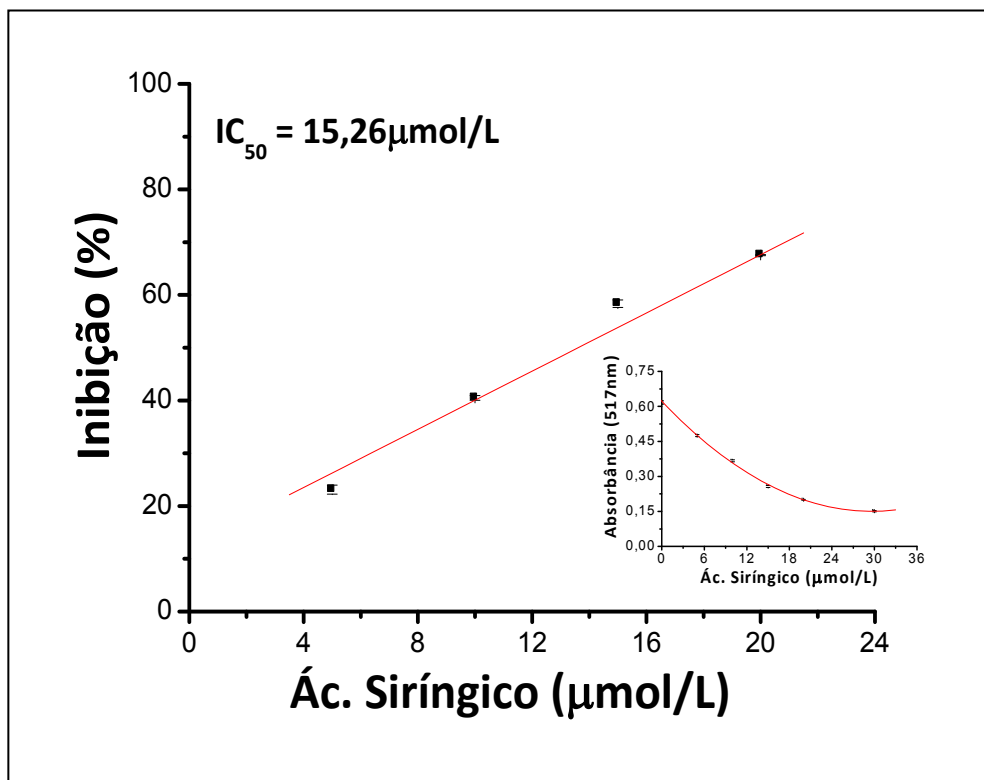


Figura 11: Inibição (captura) do DPPH* pelo Ác. Siríngico, em etanol. $\lambda = 517 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do DPPH* na presença de diferentes concentrações do Ác. Siríngico.

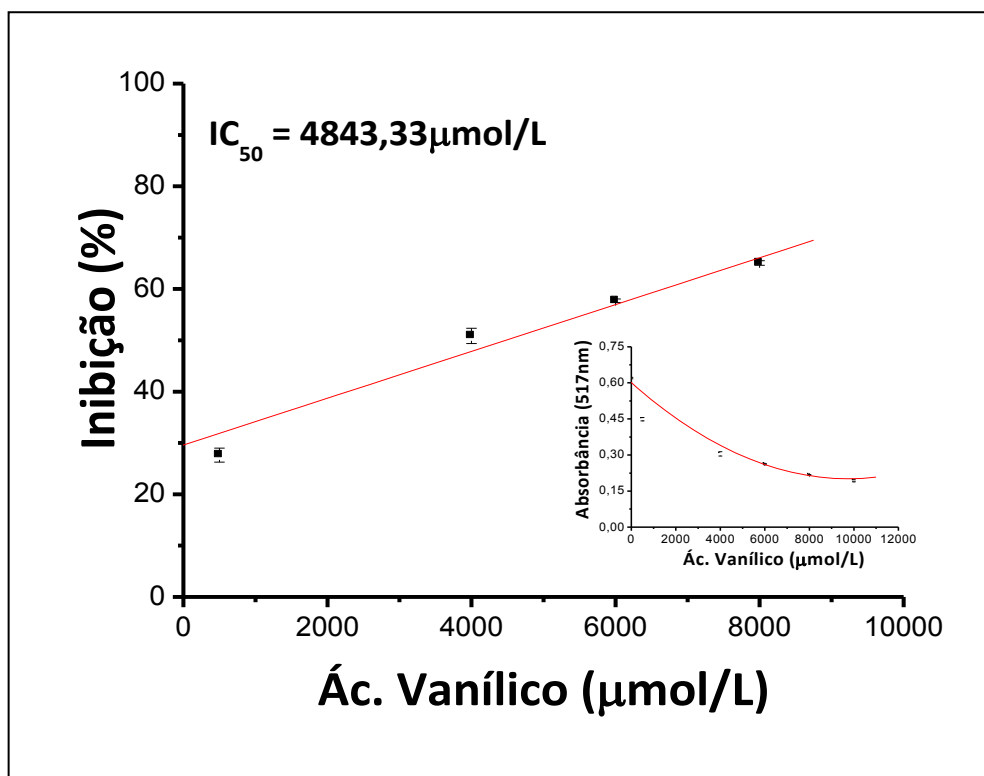


Figura 31: Inibição (captura) do DPPH* pelo Ác. Vanílico, em etanol. $\lambda = 517 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do DPPH* na presença de diferentes concentrações do Ác. Vanílico.

Na figura 32 são apresentados os valores do IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$) dos ácidos fenólicos e *padrões* utilizados para a captura do $\text{DPPH}^\bullet$.

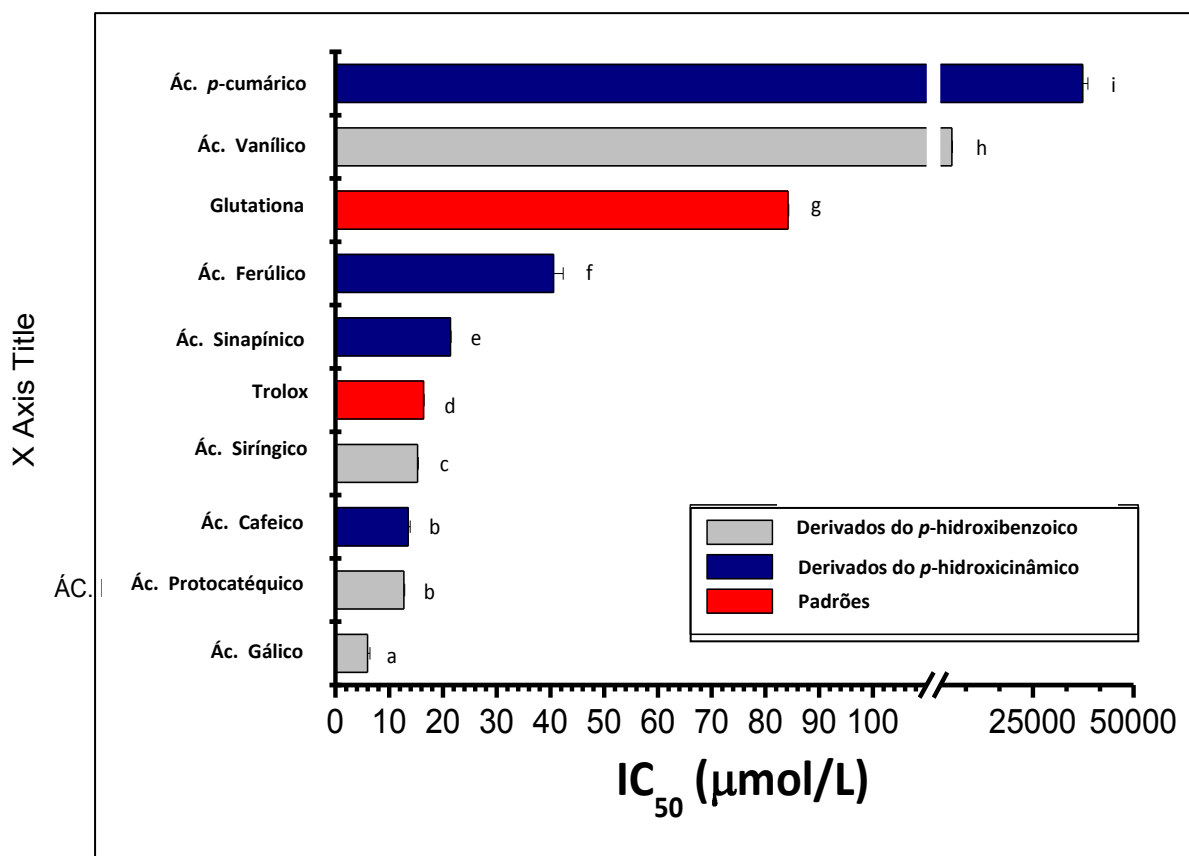


Figura 32: Inibição (Captura) do $\text{DPPH}^\bullet$ (IC_{50} $\mu\text{mol/L}$) pelos ácidos derivados do hidroxicinnâmico e hidroxibenzoico e padrões. Em etanol. $\lambda = 517$ nm. Letras iguais, sem diferença significativa ($p > 0,05$).

No ensaio de captura do $\text{DPPH}^\bullet$, novamente o ácido gálico mostrou-se o mais eficiente provavelmente devido à presença dos três grupamentos hidroxilas. Observou-se ainda que quanto menor o número de hidroxilas na estrutura dos derivados do hidroxicinnâmico e do hidroxibenzoico, menor é a sua capacidade de captura sobre o $\text{DPPH}^\bullet$. Com relação aos derivados metoxilados, a presença de duas metoxilas adjacentes ao grupamento hidroxila proporcionou uma maior atividade antioxidante em relação os mono-metoxilados.

Para o ácido *p*-hidroxibenzoico não foi possível observar o IC₅₀ até 35000 µmol/L.

A figura 03 mostra a estrutura do DPPH• e é postulado haver um impedimento estérico na molécula, o que facilitaria a interação do radical com pequenos compostos, os quais consequentemente teriam maior atividade antioxidante (MAGALHÃES et. al, 2008). Contudo, nesse estudo, predominou como melhor atividade antioxidante frente ao DPPH• os compostos mais hidroxilados, tanto para os derivados do ácido hidroxicinâmico quanto hidroxibenzoico.

De acordo com Ozcelink; Lee; Min (2003), e Huihua et al. (2013) este ensaio possui vantagens frente a outros ensaios antioxidantes por se tratar de um método de simples execução; o radical é estável em solventes orgânicos facilitando o manuseio, contudo pode haver influência do pH, luz e do oxigênio nos valores da absorbância do DPPH•.

4.3. Captura do HOCl / OCl⁻

O ácido hipocloroso (HOCl, pKa = 7,6), ou a sua forma dissociada (hipoclorito, OCl⁻), é um potente agente oxidante gerado em leucócitos polimorfonucleares neutrófilos, pela reação entre íons cloreto (Cl⁻) e peróxido de hidrogênio, catalisada pela mileoperoxidase (MPO). A produção de HOCl/OCl⁻ nesse sistema constitui um importante mecanismo de defesa celular contra micro-organismos, entretanto, a produção excessiva dessa ERO pode causar danos tissulares, contribuindo para o desenvolvimento de doenças como aterosclerose e câncer (KLEBANOFF et al., 2013; ALVES et al., 2010; KHALIL, 2005; WINTERBOURN; VISSERS; KETTLE, 2000).

Os valores do IC_{50} dos padrões glutathione e trolox estão apresentados nas figuras 33 e 34, respectivamente. Todos os ácidos fenólicos mostraram-se como sequestradores eficientes do ácido hipocloroso, permitindo assim, calcular os respectivos IC_{50} (figuras 35 a 38).

Os ácidos derivados do ácido hidroxicinâmico enumerados em ordem crescente para o IC_{50} foram bem efetivos e da ordem de ~ 3 até $5 \mu\text{mol/L}$, ácidos: *p*-cumárico < cafeico < ferúlico < sinapínico, o que significa ordem decrescente para eficiência na captura do HOCl/OCl^- .

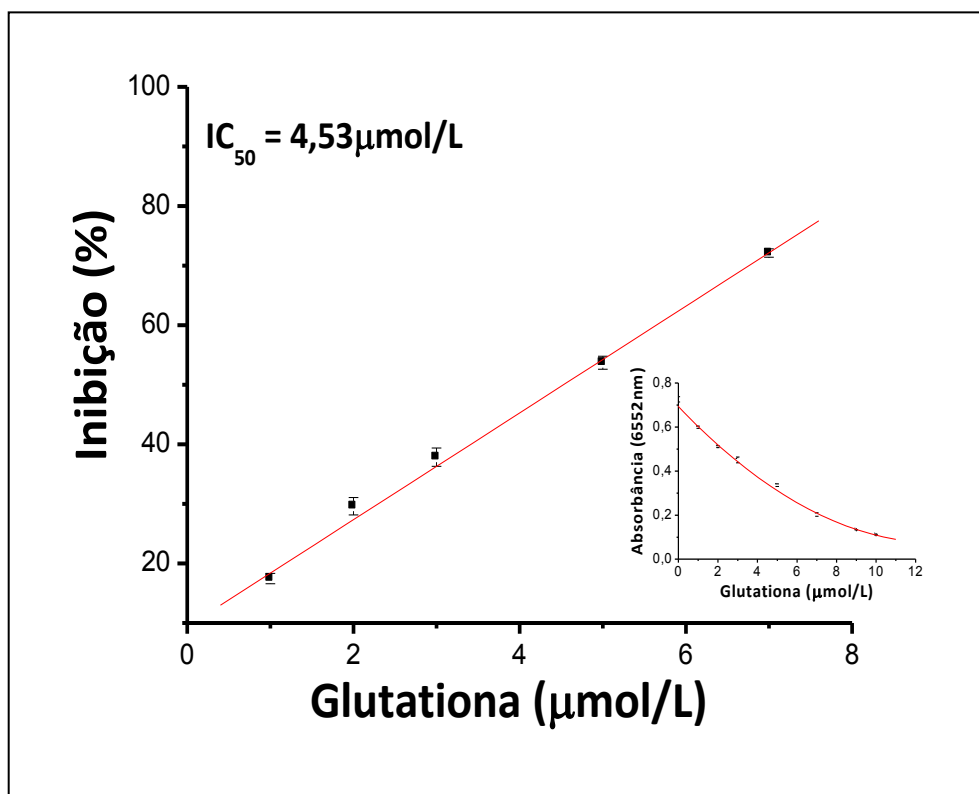


Figura 12: Inibição (captura) do HOCl/OCl^- pela Glutathione, em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 655 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do TMB oxidado na presença de diferentes concentrações de Glutathione.

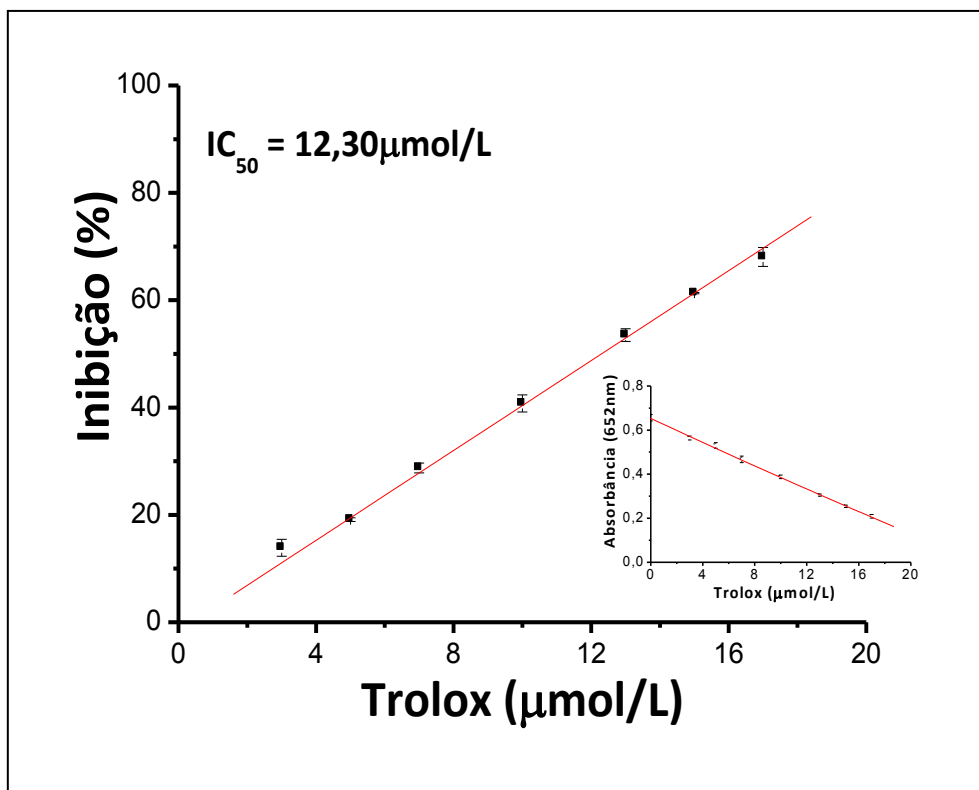


Figura 13: Inibição (captura) do HOCl/OCl⁻ pelo Trolox, em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. λ = 655 nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do TMB oxidado na presença de diferentes concentrações de Trolox.

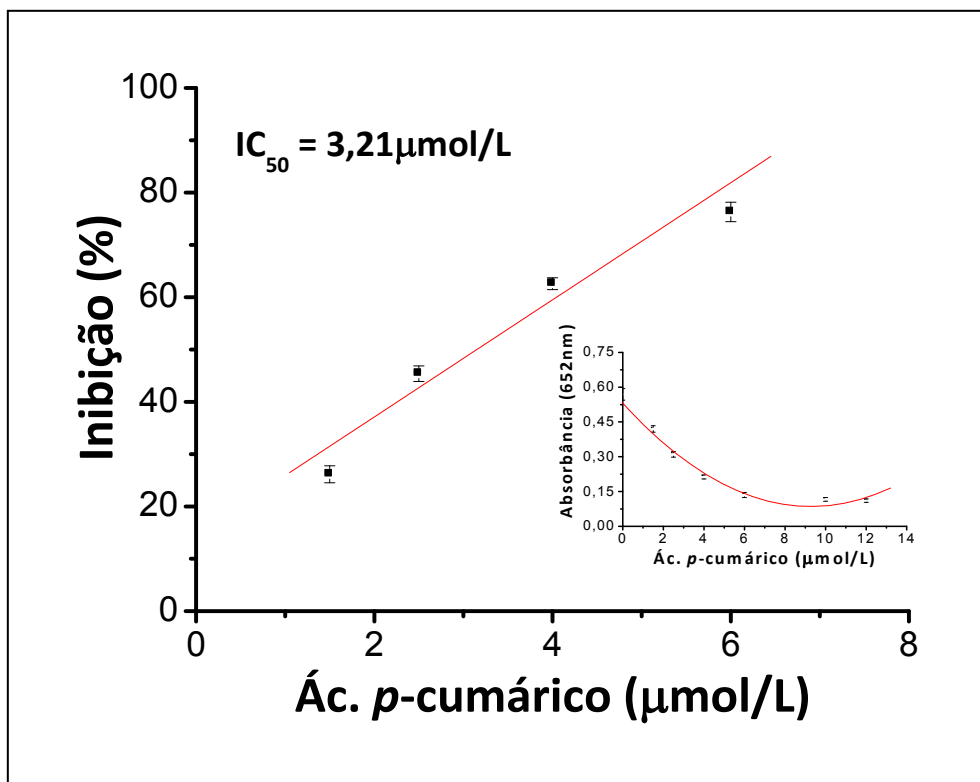


Figura 14: Inibição (captura) do HOCl/OCl⁻ pelo Ác. p-cumárico, em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. λ = 655 nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do TMB oxidado na presença de diferentes concentrações de Ác. p-cumárico.

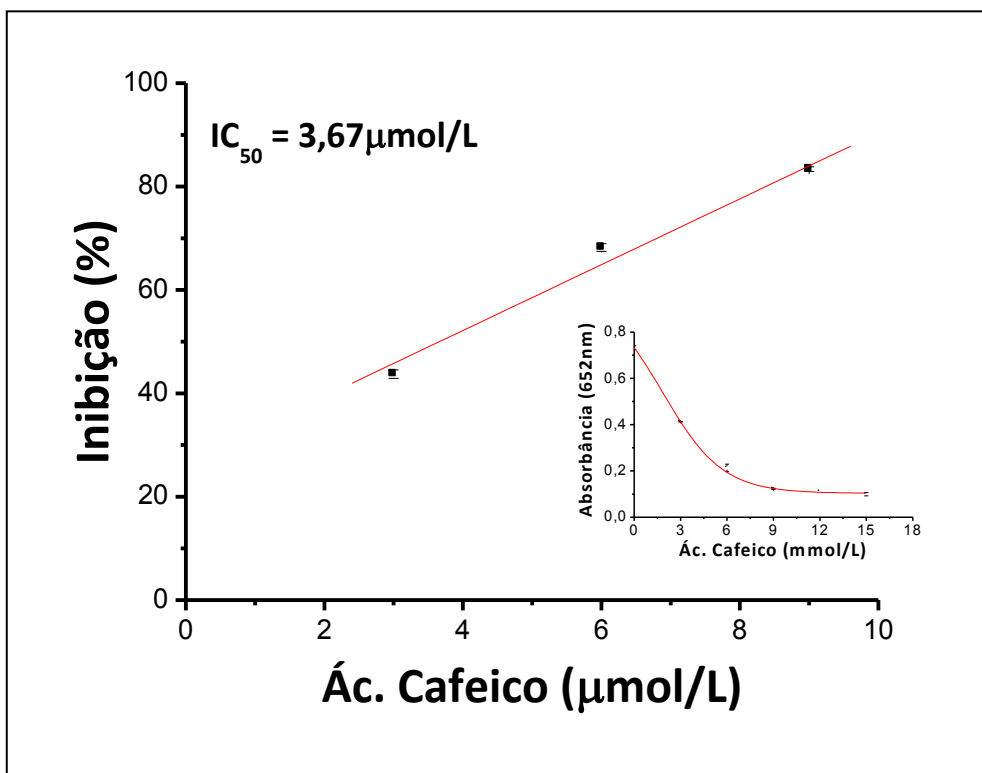


Figura 15: Inibição (captura) do HOCl/OCl^- pelo Ác. Cafeico, em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 655 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do TMB oxidado na presença de diferentes concentrações de Ác. Cafeico.

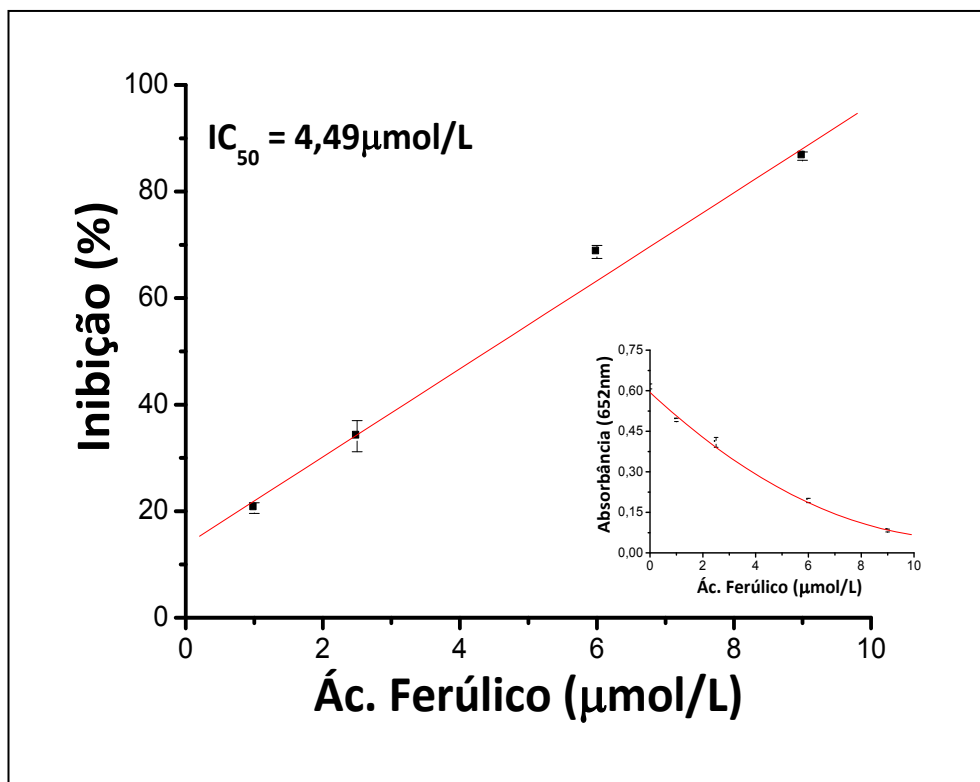


Figura 16: Inibição (captura) do HOCl/OCl^- pelo Ác. Ferúlico, em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 655 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do TMB oxidado na presença de diferentes concentrações de Ác. Ferúlico.

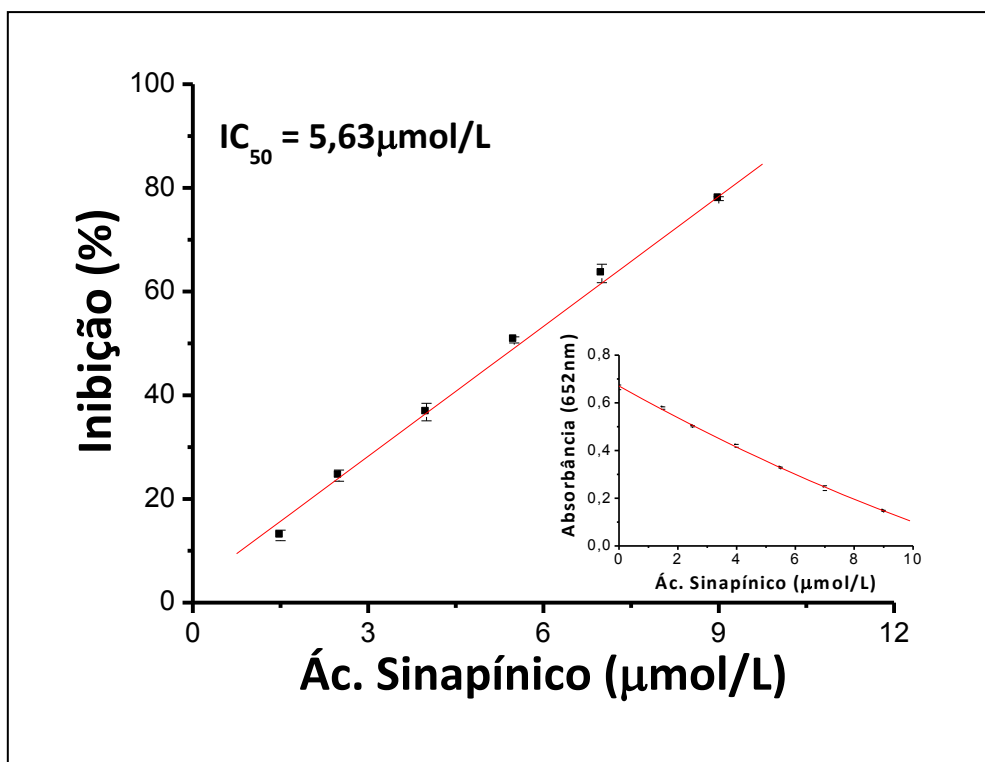


Figura 17: Inibição (captura) do HOCl/OC^- pelo Ác. Sinapínico, em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 655 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do TMB oxidado na presença de diferentes concentrações de Ác. Sinapínico.

Os ácidos derivados do hidroxibenzoico em ordem crescente para o IC_{50} foram efetivos na ordem de ~ 2 até $11 \mu\text{mol/L}$, ácidos: gálico < *p*-hidroxibenzoico < protocatéquico < vanílico < siríngico (Figuras 39 até 43).

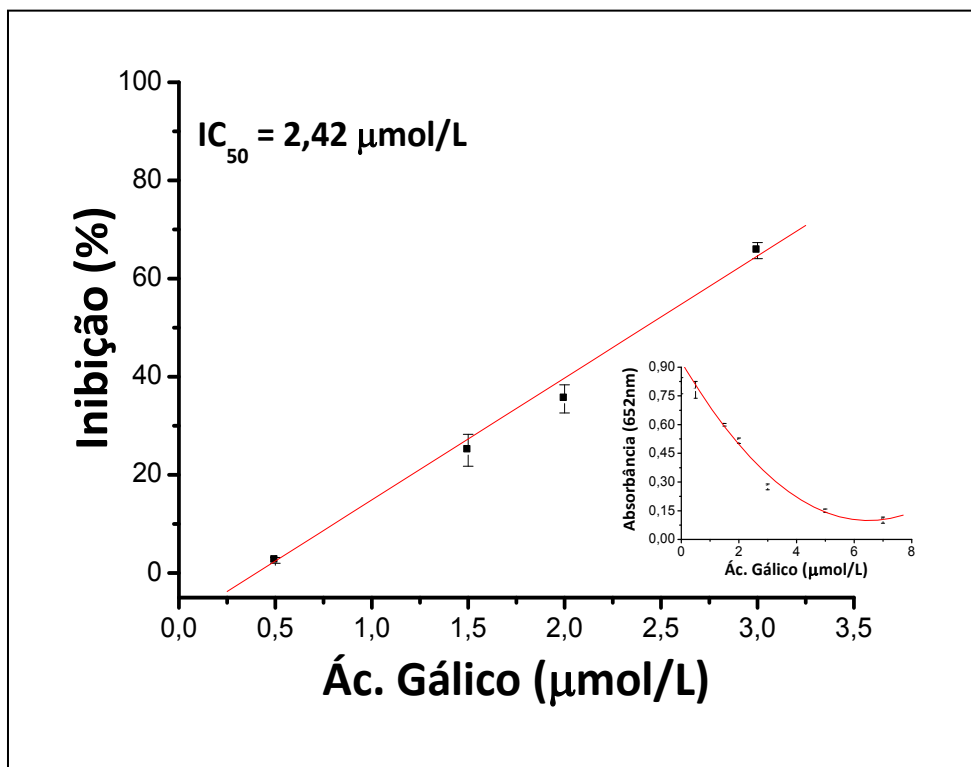


Figura 18: Inibição (captura) do HOCl/OCl⁻ pelo Ác. Gálico, em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 655 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do TMB oxidado na presença de diferentes concentrações de Ác. Gálico.

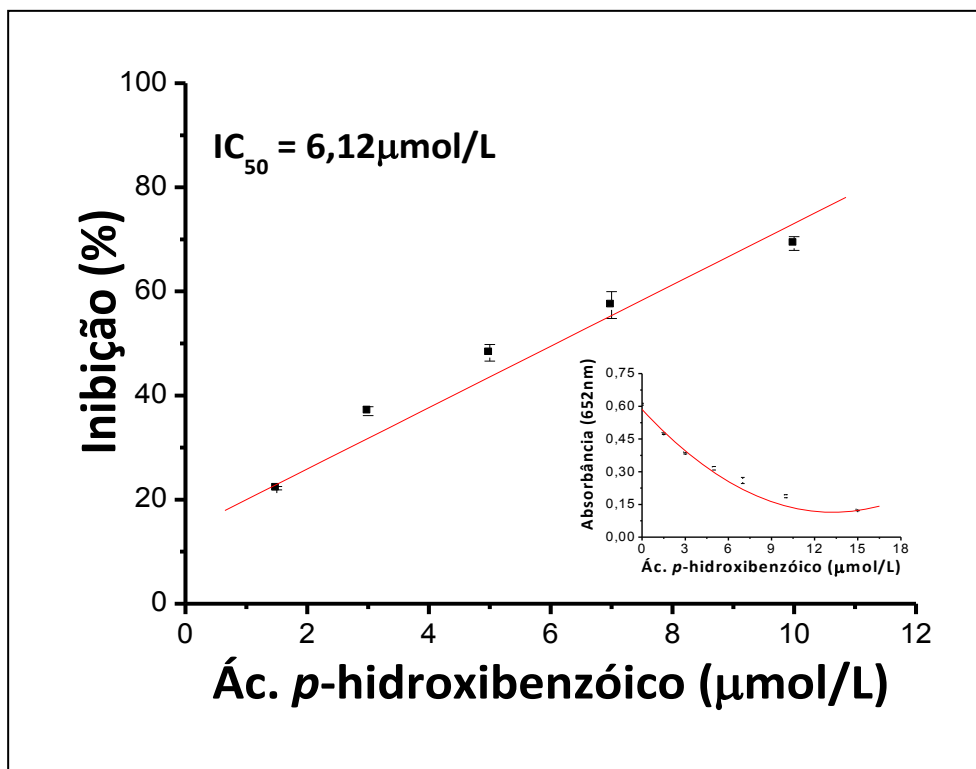


Figura 19: Inibição (captura) do HOCl/OCl⁻ pelo Ác. *p*-hidroxibenzoico, em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 655 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do TMB oxidado na presença de diferentes concentrações de Ác. *p*-hidroxibenzoico.

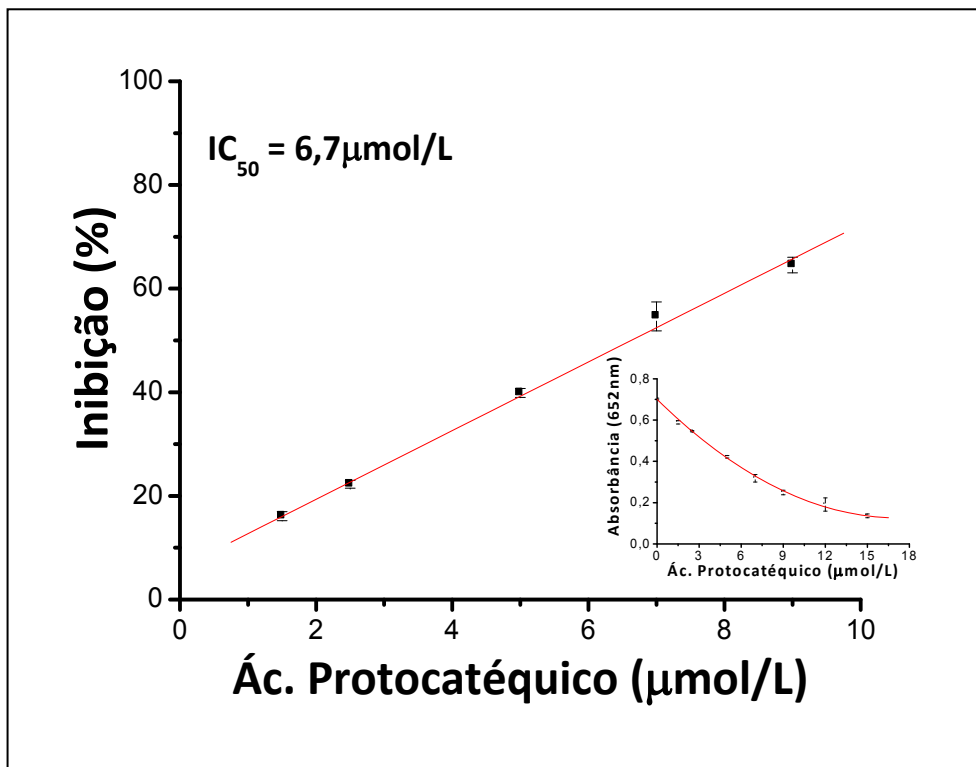


Figura 20: Inibição (captura) do HOCl/OCl⁻ pelo Ác. Protocatéquico, em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. λ = 655 nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do TMB oxidado na presença de diferentes concentrações de Ác. Protocatéquico.

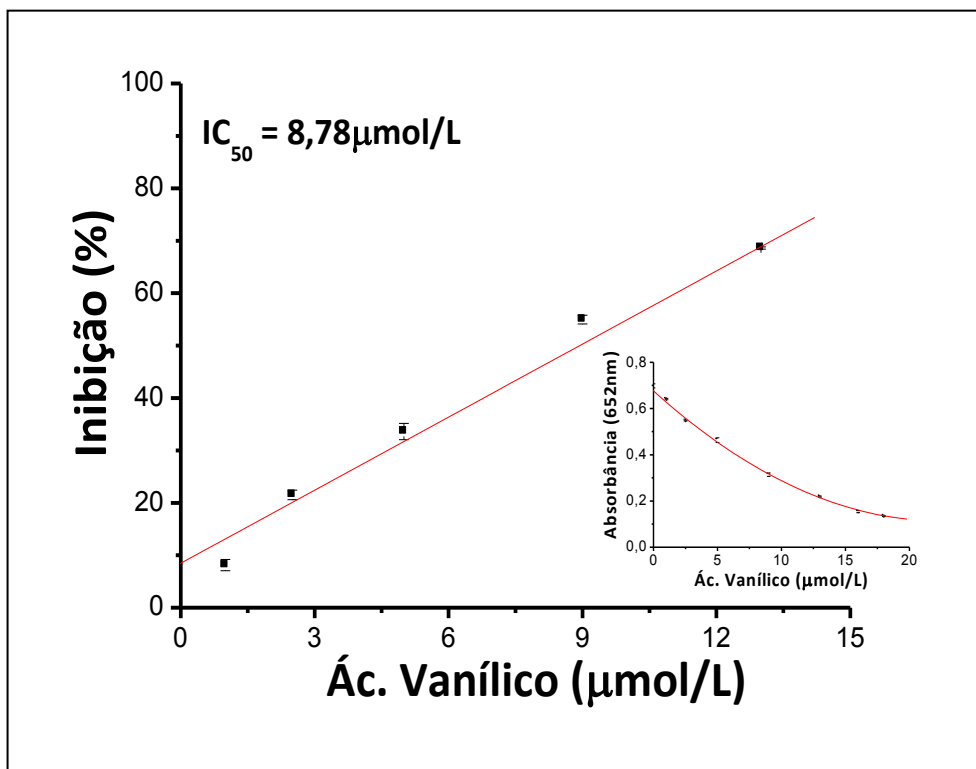


Figura 21: Inibição (captura) do HOCl/OCl⁻ pelo Ác. Vanílico, em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. λ = 655 nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do TMB oxidado na presença de diferentes concentrações de Ác. Vanílico.

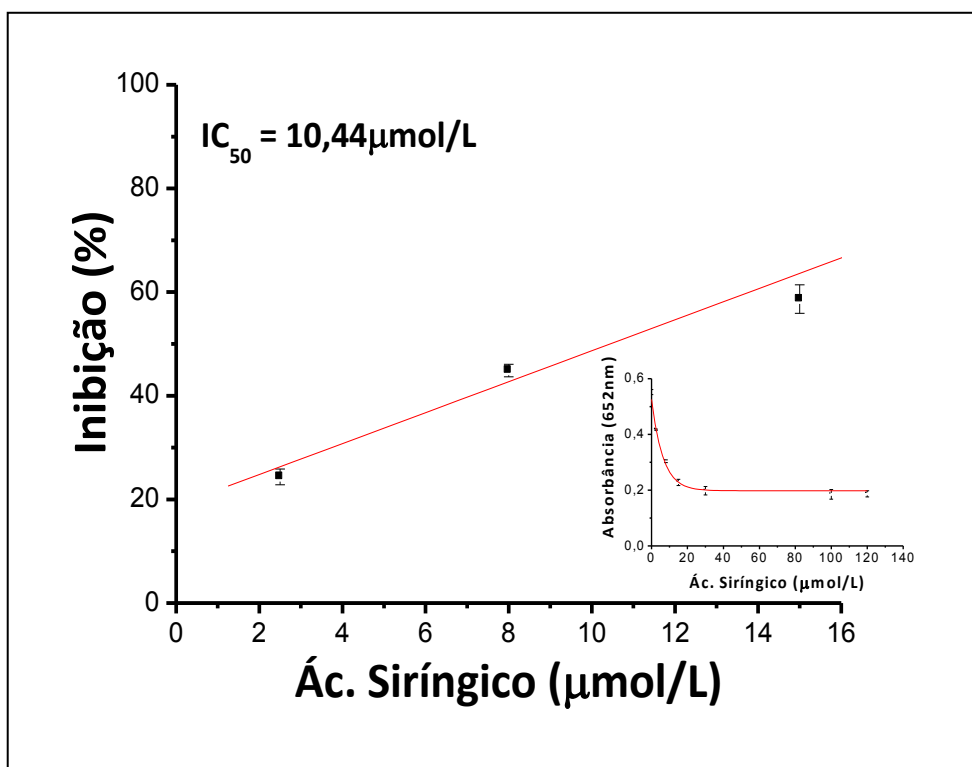


Figura 22: Inibição (captura) do HOCl/OCl⁻ pelo Ác. Siríngico, em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. λ = 655 nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do TMB oxidado na presença de diferentes concentrações de Ác. Siríngico.

Na figura 44 são apresentados os valores do IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$) dos compostos fenólicos e *padrões* utilizados para a captura do HOCl/OCl^- .

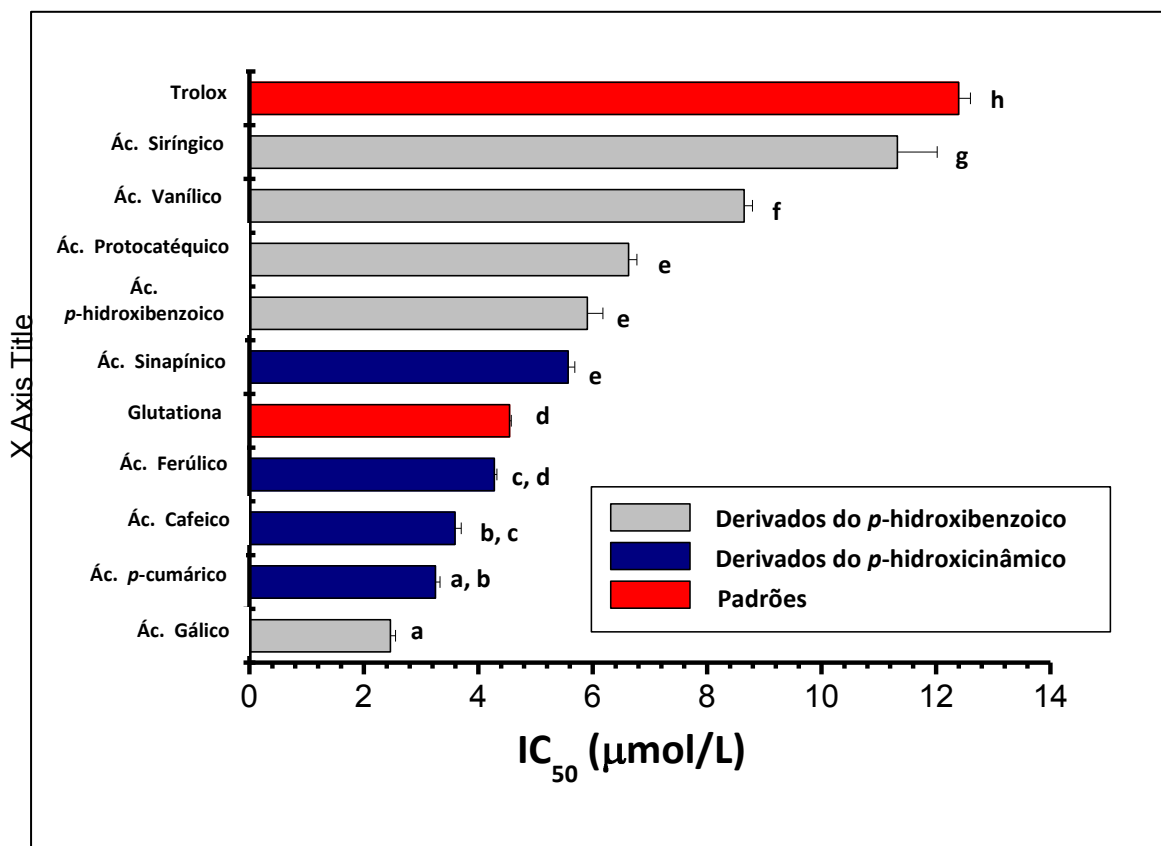


Figura 23: Inibição (Captura) do HOCl/OCl^- (IC_{50} $\mu\text{mol/L}$) pelos ácidos derivados do hidroxicinâmico e hidroxibenzoico e padrões. Em tampão fosfato de sódio 50mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 655$ nm. Letras iguais, sem diferença significativa ($p > 0,05$).

Para o ensaio de captura do HOCl/OCl^- todos os ácidos fenólicos se mostraram mais eficientes do que o Trolox.

Observou-se que o ácido gálico novamente apresenta o menor IC_{50} , junto com o ácido *p*-cumárico, pois não houve diferença significativa entre eles, na figura 41, pode-se observar ainda que os valores de IC_{50} obtidos foram muito próximos uns dos outros.

A presença das metoxilas não interferiu positivamente na atividade antioxidante, ao contrário do que foi observado nos ensaios anteriores. Nesse

ensaio não foi possível verificar a influência positiva significativa da quantidade de hidroxilas conforme o que está relatado na literatura.

4.4. Captura do $O_2^{\cdot-}$

O ânion superóxido é formado pela redução monoeletrônica do oxigênio molecular, produzido durante o metabolismo aeróbico celular, participando da sua homeostase. Sua produção ocorre com a ativação de fagócitos como os neutrófilos via NADPH oxidase de sua membrana ou na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. O $O_2^{\cdot-}$ pode interagir com biomoléculas; quando ocorre um desequilíbrio entre sua produção e desativação (e/ou biotransformação), há o favorecimento do estresse oxidativo (DIKALOV; UNGVARI, 2013; DIKALOV, 2011; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010). Essa espécie também serve como fonte para a geração de outros tipos de ERO, como H_2O_2 pela dismutação e o $HO^{\cdot}$ pelas reações de Fenton e Haber-Weiss (LIEBERMAN; MARKS, 2012; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010).

Os resultados neste ensaio também foram expressos via IC_{50} , os *padrões*, Glutathiona e Trolox apresentaram IC_{50} relativamente altos de ~ 7612 e 2203 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente (Figuras 45 e 46).

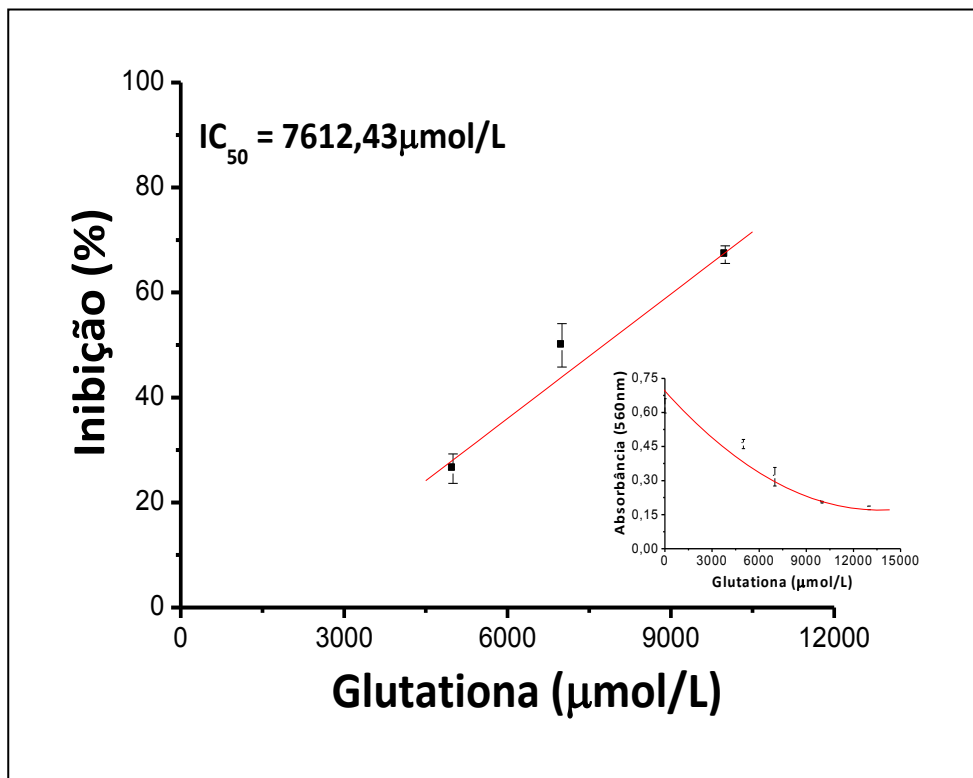


Figura 24: Inibição (captura) do $O_2^{\cdot -}$ pela Glutathione, em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 655 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias da formazana na presença de diferentes concentrações de Glutathione.

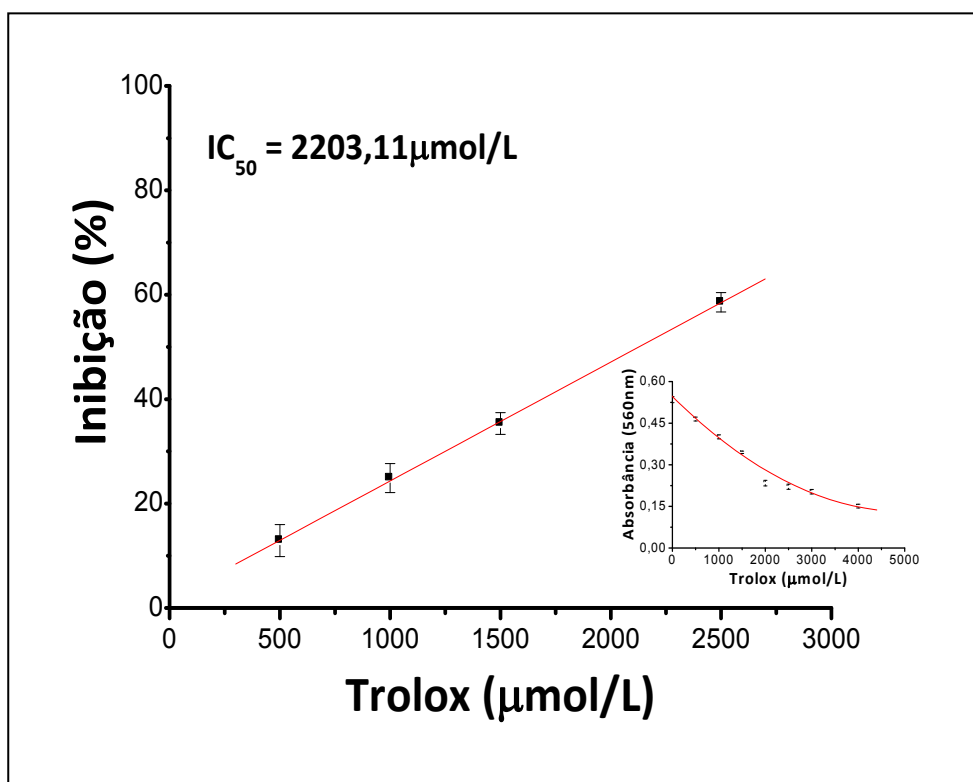


Figura 25: Inibição (captura) do $O_2^{\cdot -}$ pelo Trolox, em tampão pirofosfato de sódio 25 mmol/L, pH 8,3. $\lambda = 560 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias da formazana na presença de diferentes concentrações de Trolox.

A maioria dos ácidos fenólicos estudados mostraram atividade antioxidante frente ao radical $O_2^{\cdot-}$, isso pode ser observado por meio dos IC_{50} (Figuras 47 a 54), exceto para o ácido vanílico que até 7000 $\mu\text{mol/L}$ não teve qualquer efeito sobre o $O_2^{\cdot-}$, não sendo possível aumentar sua concentração devido à limitação de sua solubilidade.

Para os ácidos derivados do hidroxicinâmico os valores de IC_{50} variaram de ~ 160 até 6000 $\mu\text{mol/L}$. Em ordem crescente de IC_{50} observou-se: ácido cafeico < sinapínico < ferúlico < *p*-cumárico, o que representa uma ordem decrescente para eficiência sobre o $O_2^{\cdot-}$ (Figuras 47 a 50).

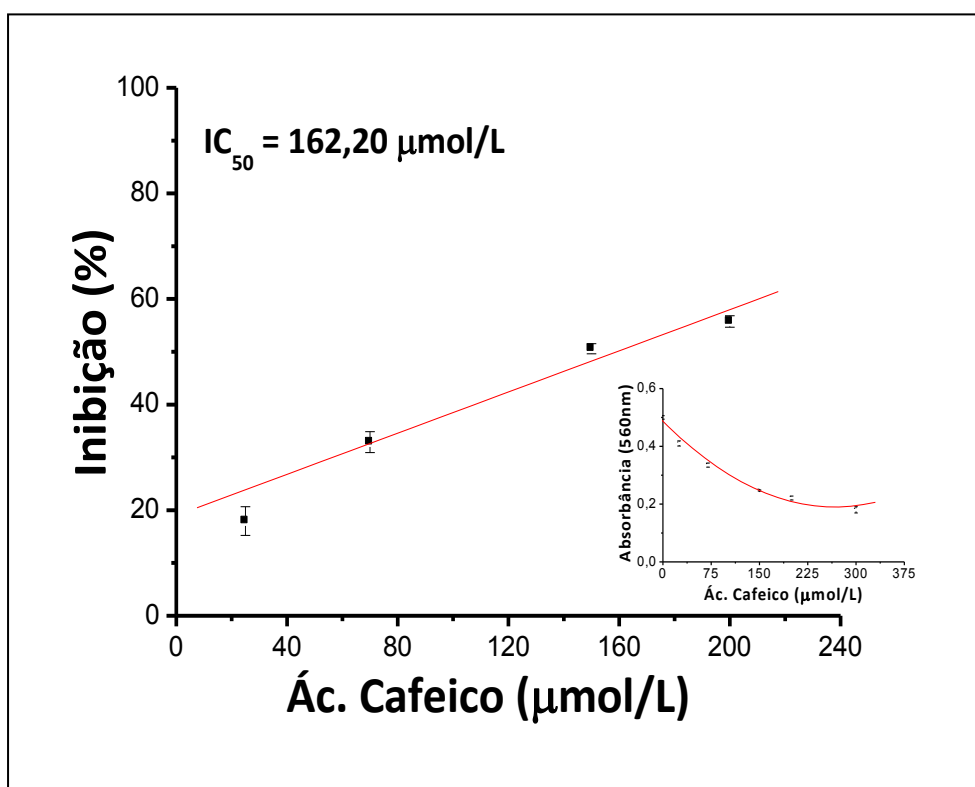


Figura 26: Inibição (captura) do $O_2^{\cdot-}$ pelo Ác. Cafeico, em tampão pirofosfato de sódio 25 mmol/L, pH 8,3. $\lambda = 560 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias da formazana na presença de diferentes concentrações de Ác. Cafeico.

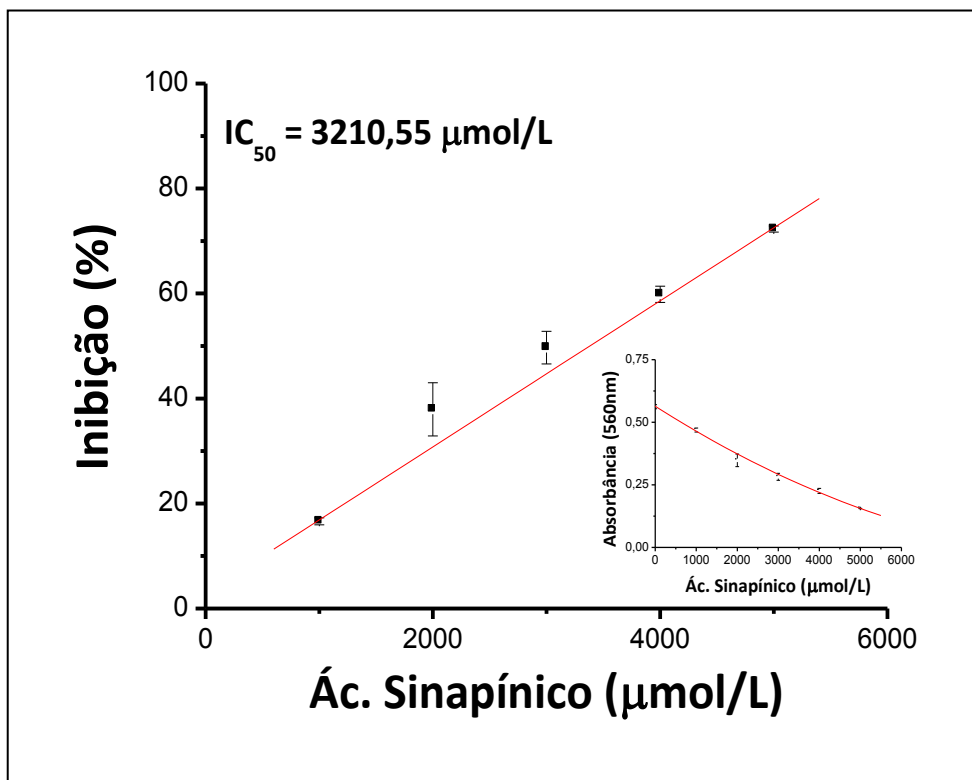


Figura 27: Inibição (captura) do $O_2^{\cdot -}$ pelo Ác. Sinapínico, em tampão pirofosfato de sódio 25 mmol/L, pH 8,3. $\lambda = 560$ nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias da formazana na presença de diferentes concentrações de Ác. Sinapínico.

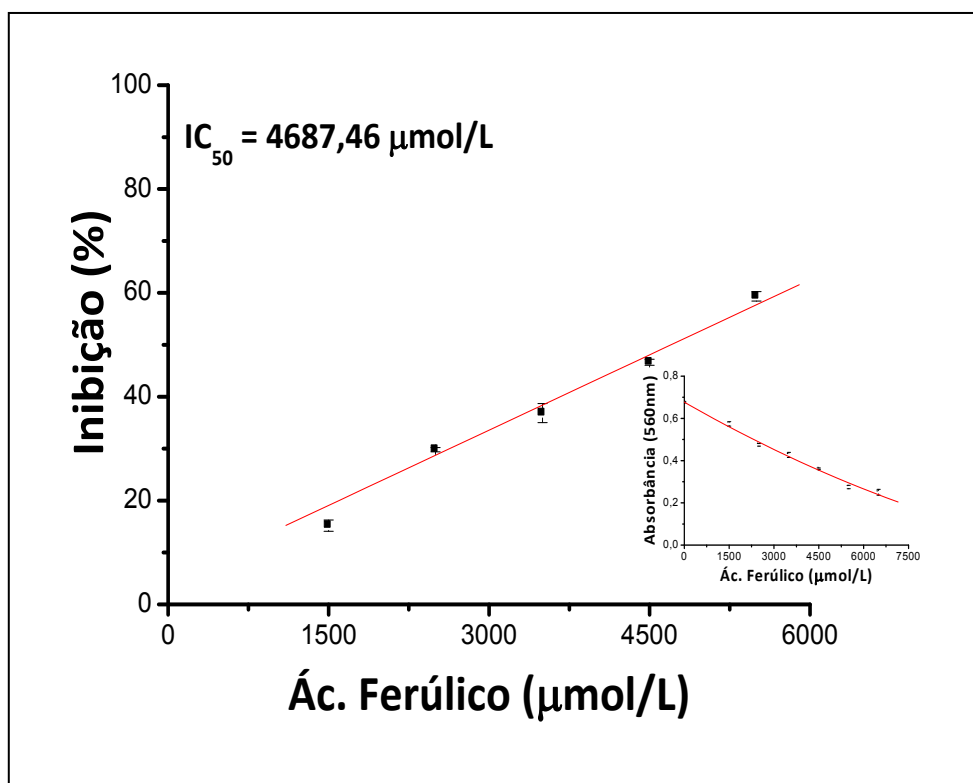


Figura 28: Inibição (captura) do $O_2^{\cdot -}$ pelo Ác. Ferúlico, em tampão pirofosfato de sódio 25 mmol/L, pH 8,3. $\lambda = 560$ nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias da formazana na presença de diferentes concentrações de Ác. Ferúlico.

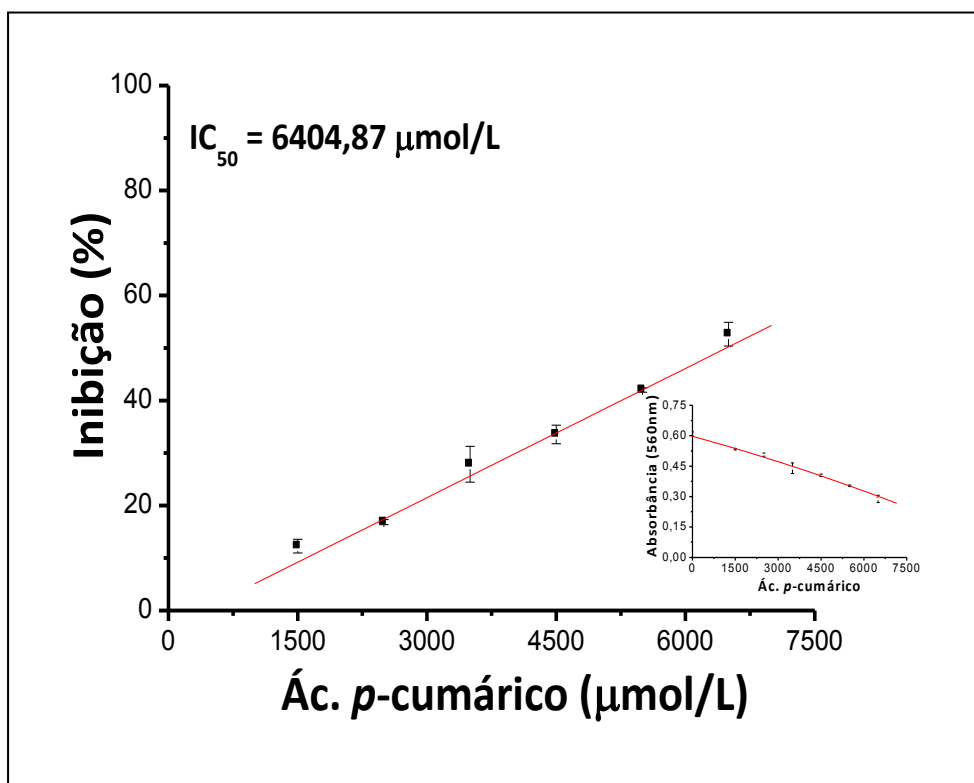


Figura 29: Inibição (captura) do $\text{O}_2^{\cdot -}$ pelo Ác. p-cumárico, em tampão pirofosfato de sódio 25 mmol/L, pH 8,3. $\lambda = 560 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias da formazana na presença de diferentes concentrações de Ác. p-cumárico.

Os ácidos derivados do hidroxibenzoico, em ordem crescente para o IC_{50} foram eficientes na ordem de $\sim 290 \mu\text{mol/L}$ até $9220 \mu\text{mol/L}$, ácidos: gálico < protocatéquico < siríngico < *p*-hidroxibenzoico (Figuras 51 até 54).

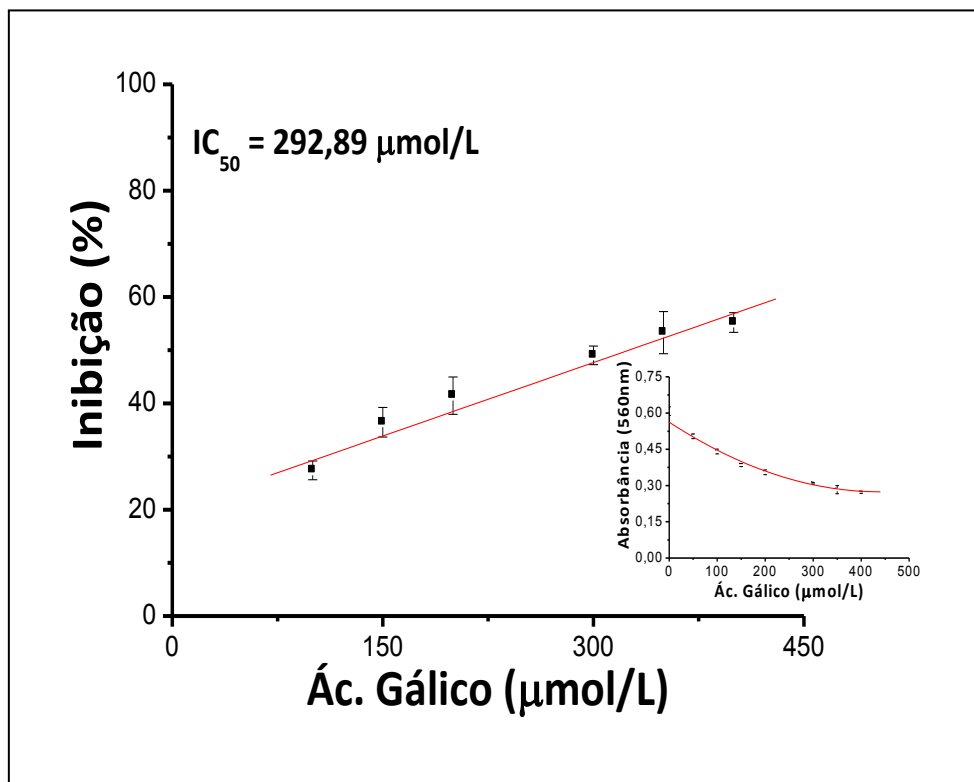


Figura 30: Inibição (captura) do $\text{O}_2^{\cdot-}$ pelo Ác. Gálico, em tampão pirofosfato de sódio 25 mmol/L, pH 8,3. $\lambda = 560 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias da formazana na presença de diferentes concentrações de Ác. Gálico.

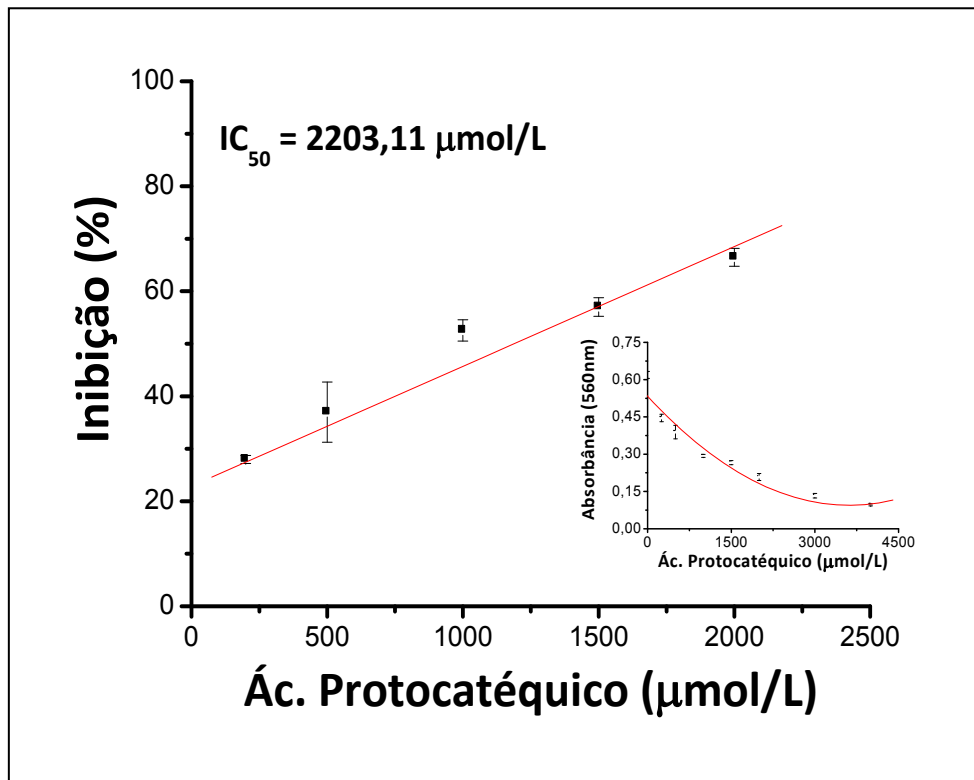


Figura 31: Inibição (captura) do $\text{O}_2^{\cdot-}$ pelo Ác. Protocatéquico, em tampão pirofosfato de sódio 25 mmol/L, pH 8,3. $\lambda = 560 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias da formazana na presença de diferentes concentrações de Ác. Protocatéquico.

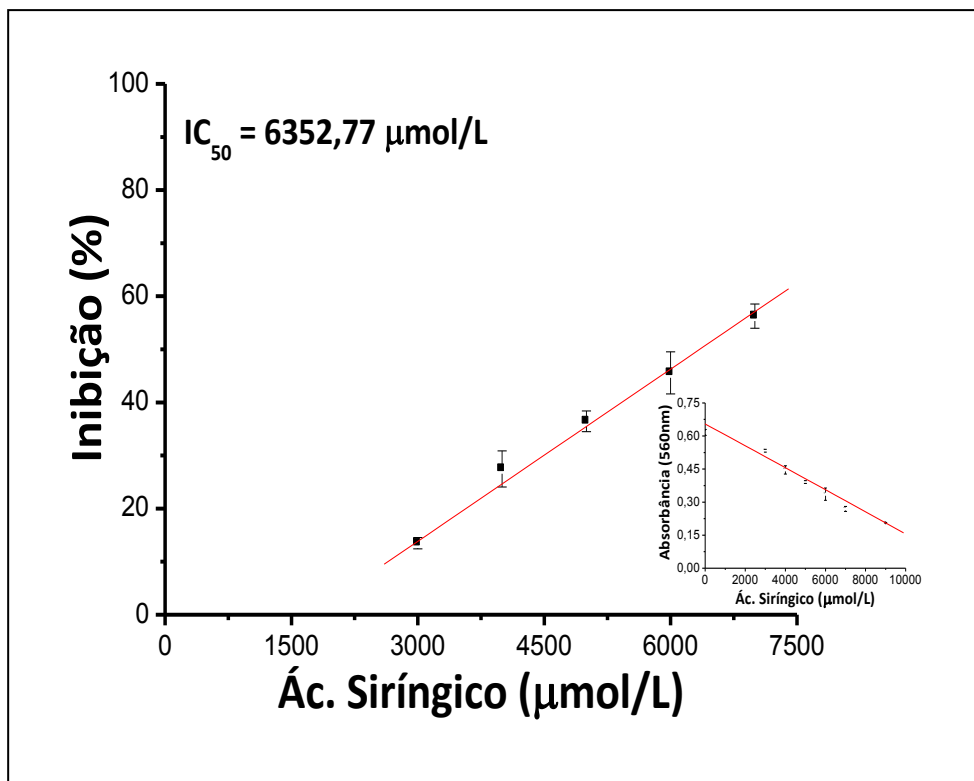


Figura 32: Inibição (captura) do $O_2^{\bullet-}$ pelo Ác. Siríngico, em tampão pirofosfato de sódio 25 mmol/L, pH 8,3. $\lambda = 560 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias da formazana na presença de diferentes concentrações de Ác. Siríngico.

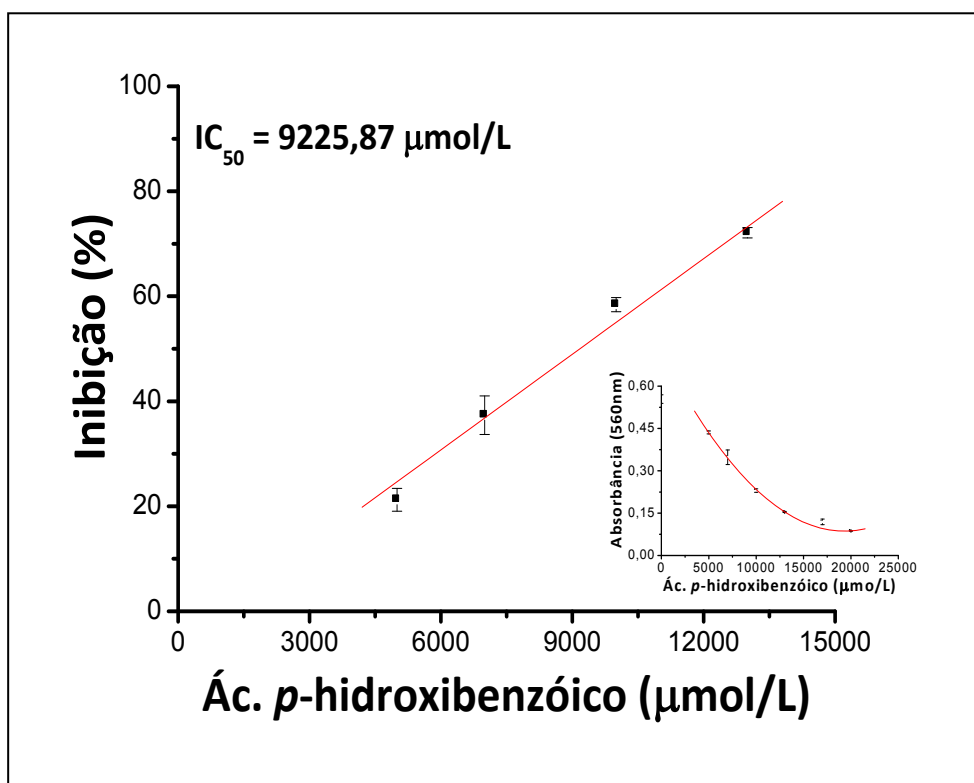


Figura 33: Inibição (captura) do $O_2^{\bullet-}$ pelo Ác. *p*-hidróxibenzoico, em tampão pirofosfato de sódio 25 mmol/L, pH 8,3. $\lambda = 560 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias da formazana na presença de diferentes concentrações de Ác. *p*-hidroxibenzoico.

Na figura 55 são apresentados os valores do IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$) dos compostos fenólicos estudados e *padrões* para a captura do $O_2^{\cdot-}$.

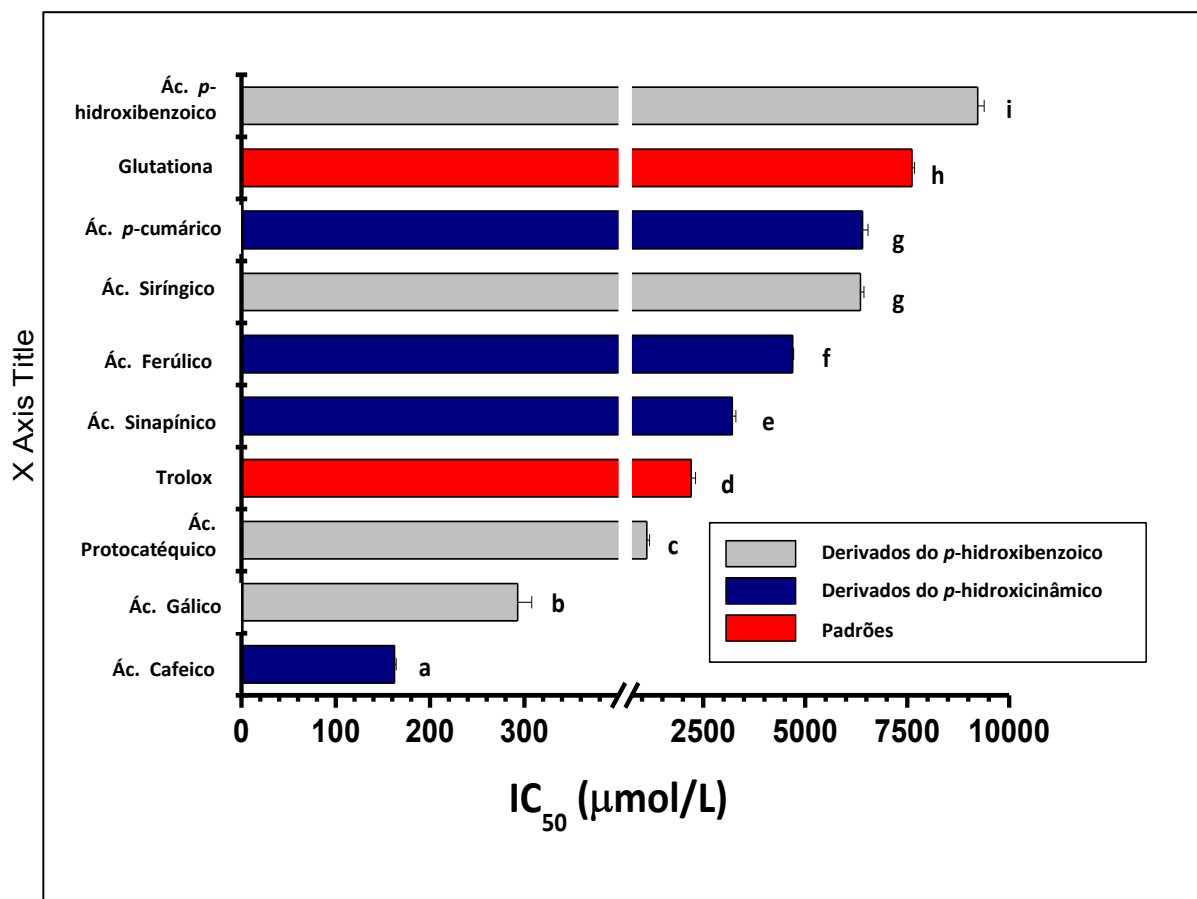


Figura 34: Inibição (Captura) do $O_2^{\cdot-}$ (IC_{50} $\mu\text{mol/L}$) pelos ácidos derivados do hidroxicinâmico e hidroxibenzoico e padrões. Em tampão pirofosfato de sódio 25mmol/L, pH 8,3. $\lambda = 560$ nm. Letras iguais, sem diferença significativa ($p > 0,05$).

Na figura 55 observa-se que todos os ácidos fenólicos e padrões atingiram o IC_{50} para o $O_2^{\cdot-}$, exceto o ácido vanílico.

No ensaio de captura sobre o $O_2^{\cdot-}$, os compostos que apresentaram melhor atividade frente a esse radical foi o ácido cafeico, seguido pelo ácido gálico. O ácido cafeico por ser derivado do hidroxicinâmico, de acordo com Balasundram; Sundram; Samman (2006), deveria apresentar um maior potencial antioxidante devido à cadeia lateral em comparação com os derivados do hidroxibenzoico e segundo Pannala, et

al. (2001), o número de hidroxilas vai influenciar nesse potencial, desse modo os resultados obtidos corroboram com a literatura, pois o ácido cafeico é o composto mais hidroxilado dos derivados do ácido hidroxicinâmico estudados.

4.5. Captura do H_2O_2

O H_2O_2 por não possuir elétrons desemparelhados na última camada não é considerado uma espécie radicalar; entretanto está envolvido direta e indiretamente em processos oxidativos contribuindo no desenvolvimento de diversas patologias; sua atuação em tais processos se dá principalmente pela sua capacidade de transpor membranas e gerar o $\text{HO}^\bullet$ (ALVES et al. 2010).

O H_2O_2 é formado quando o $\text{O}_2^\bullet$ recebe mais um elétron e dois prótons (íons hidrogênio), por um processo espontâneo denominado dismutação ou catalisado, pela superóxido dismutase. O H_2O_2 também pode ser produzido pela redução bieletrônica do O_2 molecular, catalisada *in vivo* por diversas oxidases, tais como: xantina, urato, glicose, coproporfirinogênio III, lisil, monoamina e D-aminoácidos, localizadas nos peroxissomas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; VASCONCELOS et al., 2007; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Neste ensaio, nenhum dos ácidos fenólicos estudados assim como o trolox foram capazes de capturar o H_2O_2 até 10 mmol/L. Portanto, para validar o ensaio utilizou-se a catalase, uma enzima eficiente e específica que catalisa a decomposição do H_2O_2 em água e oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010). Com a finalidade de avaliar a eficiência da enzima (“atividade *scavenging*”) e considerando a concentração do fabricante (expressa em 2950 unidades/mg de sólidos), utilizou-se uma solução de 20 unidades/mL. Assumindo ainda que a massa de sólido pesada estivesse pura, ou seja, somente catalase e considerando a sua massa molecular de

240.000 Da (BUDAVARI et al., 2006), pode-se converter o valor obtido do IC_{50} de 0,40 unid/mL (Figura 56) para 0,135 $\mu\text{g/mL}$ ou 56,25 nmol/L.

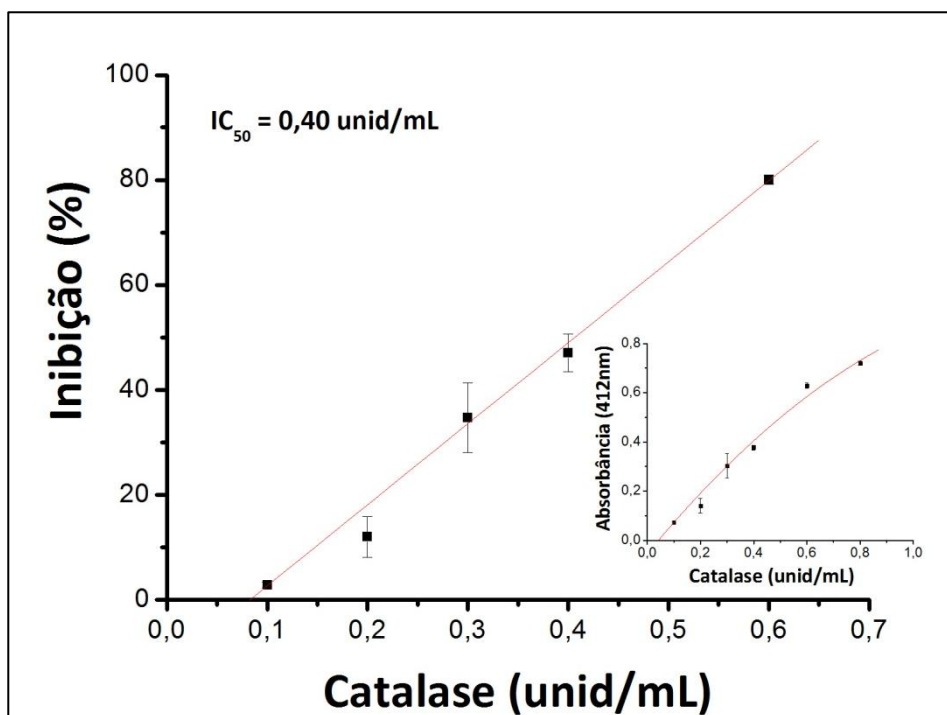


Figura 35: Inibição (captura) do H_2O_2 pela catalase, em tampão fosfato de potássio 50 mmol/L, pH 6,6. $\lambda = 412\text{nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do TNB na presença de diferentes concentrações de catalase.

No ensaio realizado utilizando a glutathiona como padrão, observou-se que no sistema completo, ou seja, TNB / glutathiona / H_2O_2 , não havia alteração da absorbância em relação ao sistema TNB / H_2O_2 ; estes resultados indicavam uma possível redução do DTNB à TNB, conforme já citado por Vasconcelos et al, 2007. Assim, enquanto o H_2O_2 oxida o TNB à DTNB, a glutathiona faz o caminho inverso, não permitindo a obtenção de resultados confiáveis.

A fim de comprovar que a glutathiona estava reduzindo eficientemente o DTNB, a solução de TNB foi preparada com adição de glutathiona 1 mmol/L, como agente redutor (no lugar do NaBH_4), a partir de uma solução de DTNB 0,05mmol/L e

EDTA 0,25mmol/L. A mistura foi incubada a 37°C por 3 horas. Para o monitoramento desse ensaio, determinou-se os espectros de 215 a 600nm nas seguintes condições: somente a solução de DTNB; solução de DTNB após a adição da glutathione (0 min); e após 5, 10, 20 e 180 minutos a adição da glutathione. Corroborando com a literatura, pode-se observar a absorção do DTNB na região ultravioleta (~325 nm), enquanto a geração do TNB mostra absorbância na região do visível, com pico em 412nm (JÚNIOR et al. 2001) (Figura 57).

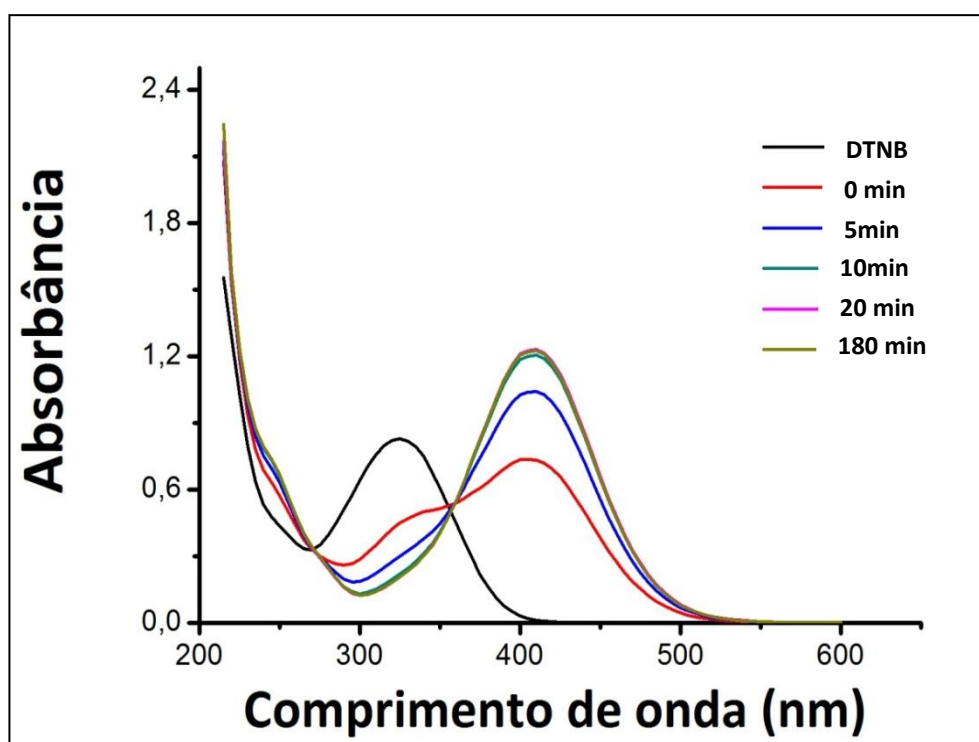


Figura 36: Espectro de absorção do DTNB, e da formação do TNB por ação da glutathione.

4.6. Ensaio de clareamento (*bleaching*) da crocina

Esse ensaio também é conhecido como ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*); o radical peroxila ($\text{ROO}^{\bullet}$) pode oxidar tanto lipídeos e fosfolipídeos das membranas celulares. A lipoperoxidação (LPO) quando ocorre de maneira descontrolada ocasiona danos na organização das membranas e perda de sua funcionalidade, tem sido postulado a participação da LPO na etiologia de muitas doenças e também na degradação de produtos alimentícios (SHICHIRI, 2014; HRÁDKOVÁ, et al., 2013; LUCIO, et al., 2009). Devido às graves consequências da LPO, tem-se estimulado estudos que abordem a eficácia de antioxidantes, como os ácidos fenólicos, para esse tipo de oxidação (HRÁDKOVÁ, et al., 2013).

A capacidade de inibir o clareamento da crocina pelo Trolox, Glutathione e pelos ácidos fenólicos, está apresentada nas figuras 58 a 68.

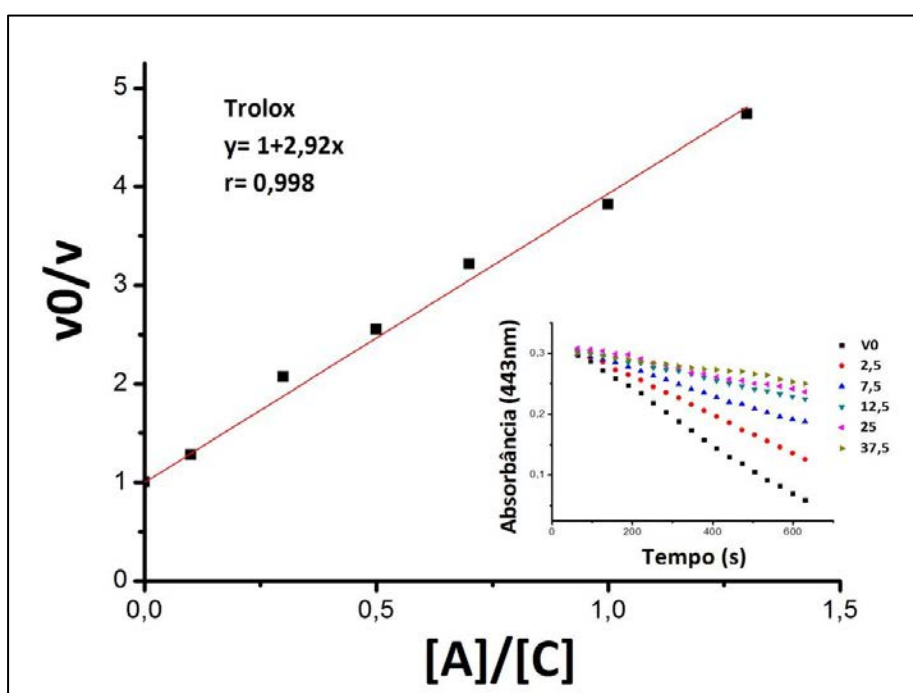


Figura 37: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Trolox. V_0 , velocidade na ausência de Trolox; V , velocidade na presença de Trolox; $[C]$, concentração de crocina constante ($25\mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração de Trolox. O gráfico inserido representa a queda da absorbância a 443nm, da crocina, na ausência e presença de Trolox ($\mu\text{mol/L}$), em função do tempo.

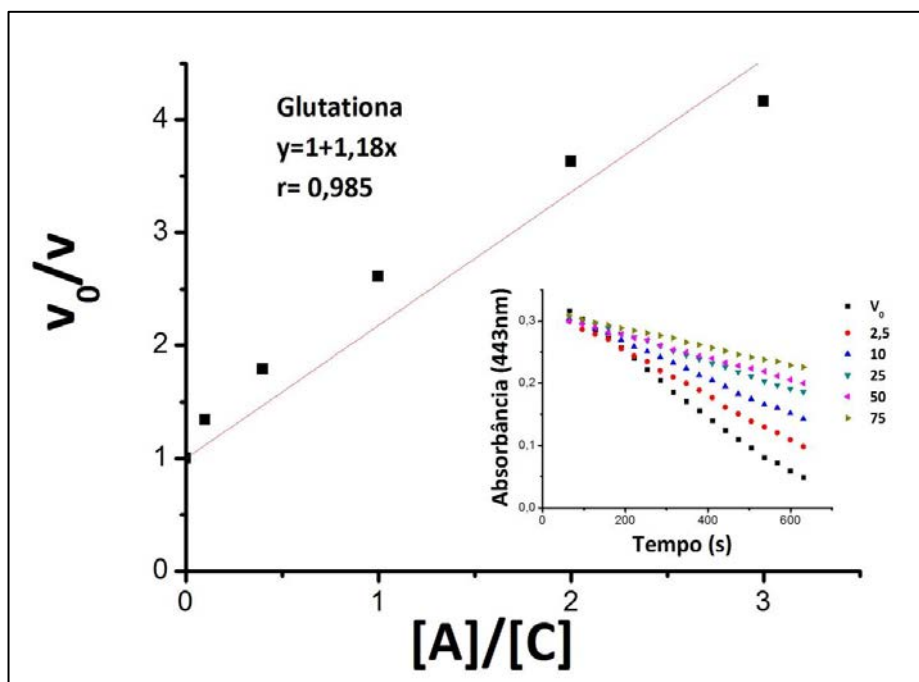


Figura 38: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Glutathione. V_0 , velocidade na ausência de Glutathione; V , velocidade na presença de Glutathione; $[C]$, concentração de crocina constante ($25\mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração de Glutathione. O gráfico inserido representa a queda da absorbância a 443nm, da crocina, na ausência e presença de Glutathione ($\mu\text{mol/L}$), em função do tempo.

Ao compararmos os resultados, os valores da inclinação das retas para os derivados do hidroxicinâmico e considerando-os em ordem de eficiência, ou seja, as maiores capacidades antioxidante foram, ácidos: Sinapínico > Cafeico > Ferúlico > *p*-cumárico (Figuras 60 a 63). Para os derivados do hidroxibenzoico, considerando a inclinação da reta e, portanto a ordem de eficiência: Gálico > Protocatéquico > Siríngico > Vanílico > *p*-hidroxibenzoico (Figuras 64 a 68). Para os ácidos fenólicos observa-se que houve redução da velocidade do *bleaching* da crocina, e, portanto atividade antioxidante (Tabela 1).

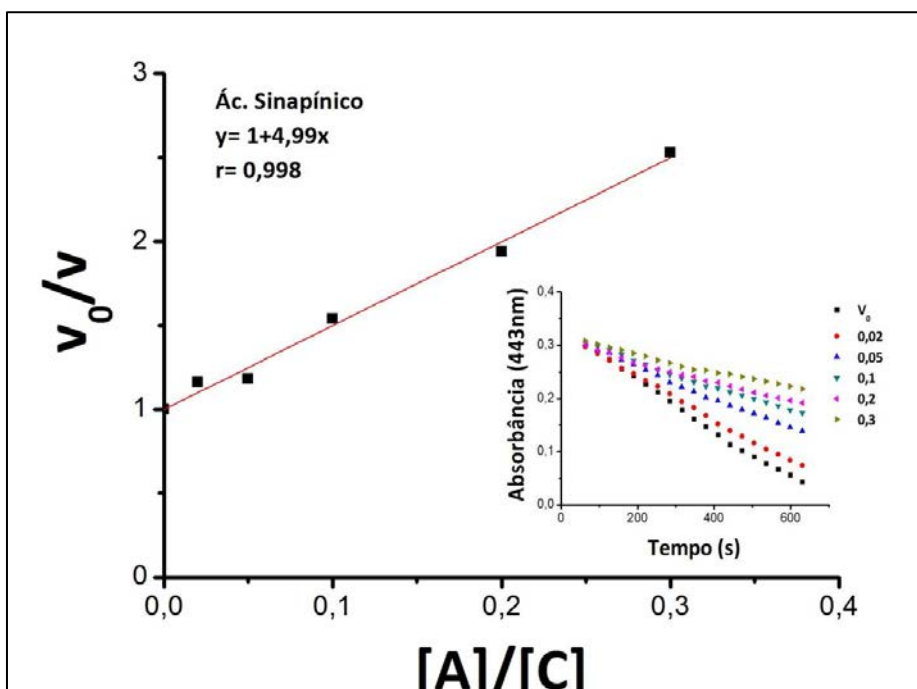


Figura 39: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Ác. Sinapínico. V_0 , velocidade na ausência de Ác. Sinapínico; V , velocidade na presença de Ác. Sinapínico; $[C]$, concentração de crocina constante ($25\mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração de Ác. Sinapínico. O gráfico inserido representa a queda da absorbância a 443nm, da crocina, na ausência e presença de Ác. Sinapínico ($\mu\text{mol/L}$), em função do tempo.

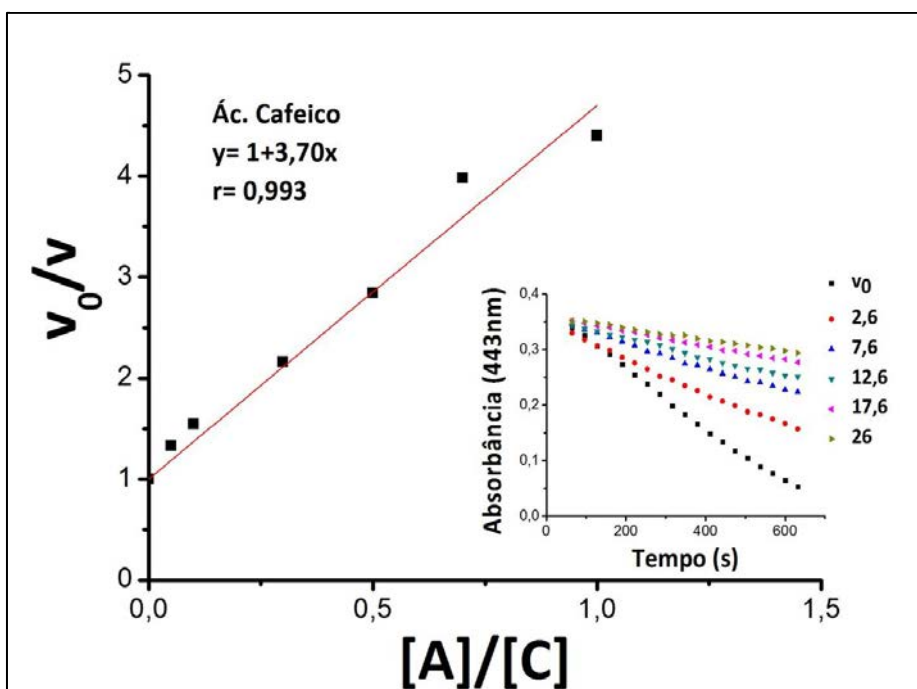


Figura 40: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Ác. Cafeico. V_0 , velocidade na ausência de Ác. Cafeico; V , velocidade na presença de Ác. Cafeico; $[C]$, concentração de crocina constante ($25\mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração de Ác. Cafeico. O gráfico inserido representa a queda da absorbância a 443nm, da crocina, na ausência e presença de Ác. Cafeico ($\mu\text{mol/L}$), em função do tempo.

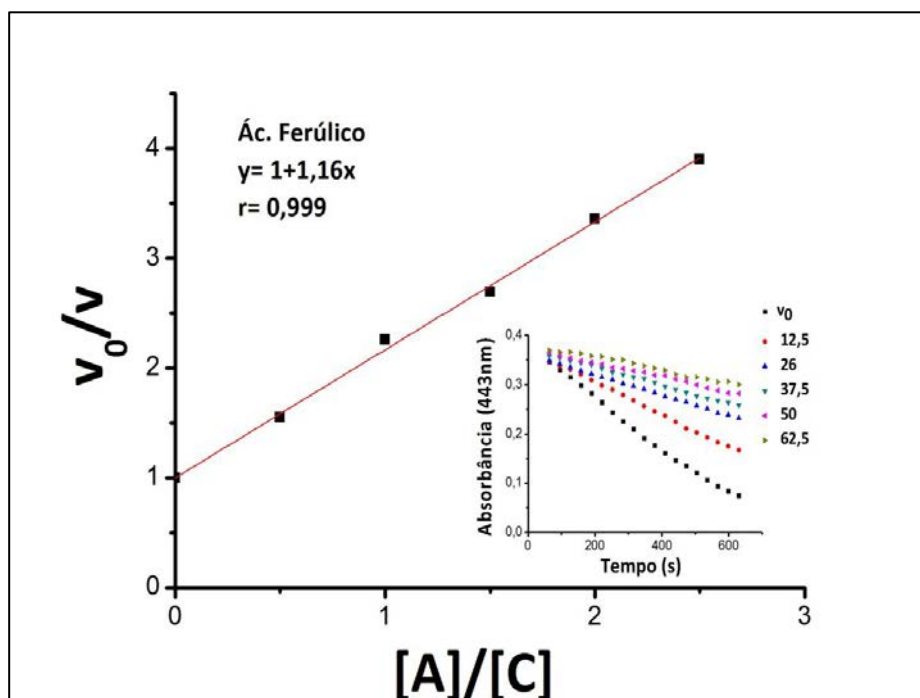


Figura 41: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Ác. Ferúlico. V_0 , velocidade na ausência de Ác. Ferúlico; V , velocidade na presença de Ác. Cafeico; $[C]$, concentração de crocina constante ($25\mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração de Ác. Ferúlico. O gráfico inserido representa a queda da absorbância a 443nm, da crocina, na ausência e presença de Ác. Ferúlico ($\mu\text{mol/L}$), em função do tempo.

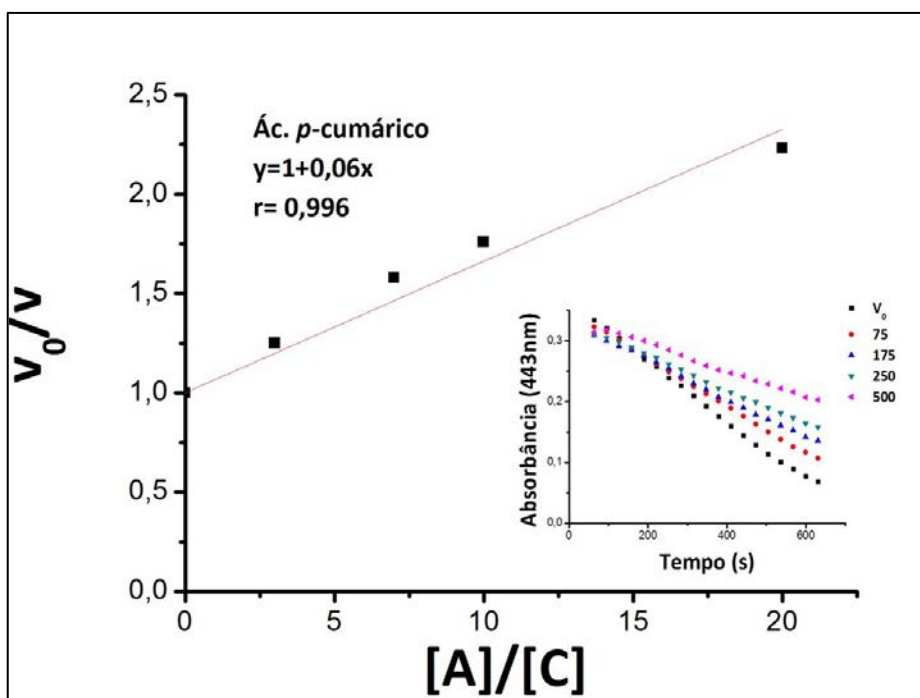


Figura 42: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Ác. *p*-cumárico. V_0 , velocidade na ausência de Ác. *p*-cumárico ; V , velocidade na presença de Ác. *p*-cumárico ; $[C]$, concentração de crocina constante ($25\mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração de Ác. *p*-cumárico. O gráfico inserido representa a queda da absorbância a 443nm, da crocina, na ausência e presença de Ác. *p*-cumárico ($\mu\text{mol/L}$), em função do tempo.

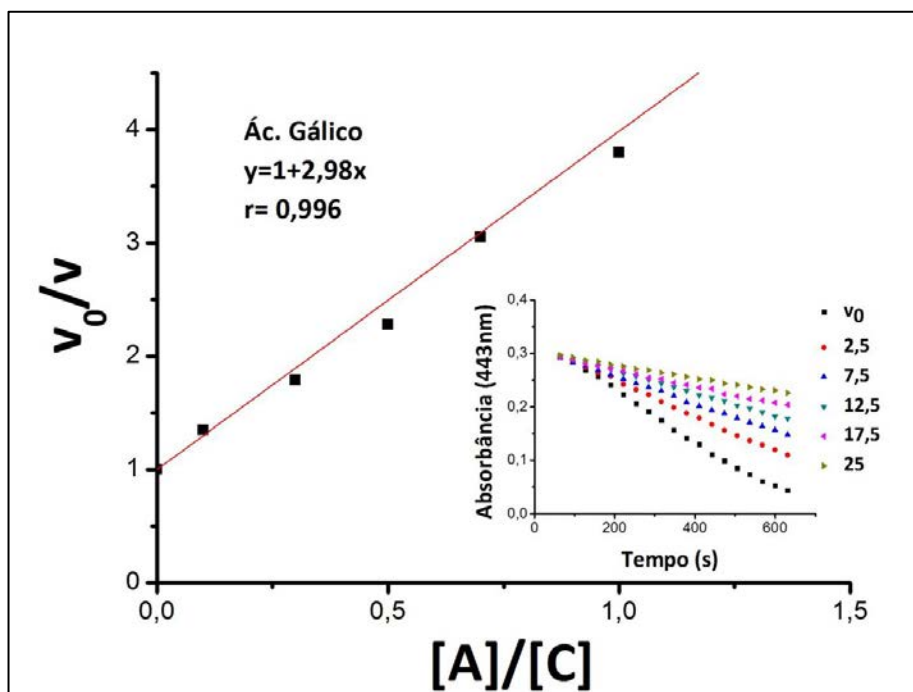


Figura 43: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Ác. Gálico. V_0 , velocidade na ausência de Ác. Gálico; V , velocidade na presença de Ác. Gálico; $[C]$, concentração de crocina constante ($25\mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração de Ác. Gálico. O gráfico inserido representa a queda da absorbância a 443nm, da crocina, na ausência e presença de Ác. Gálico ($\mu\text{mol/L}$), em função do tempo.

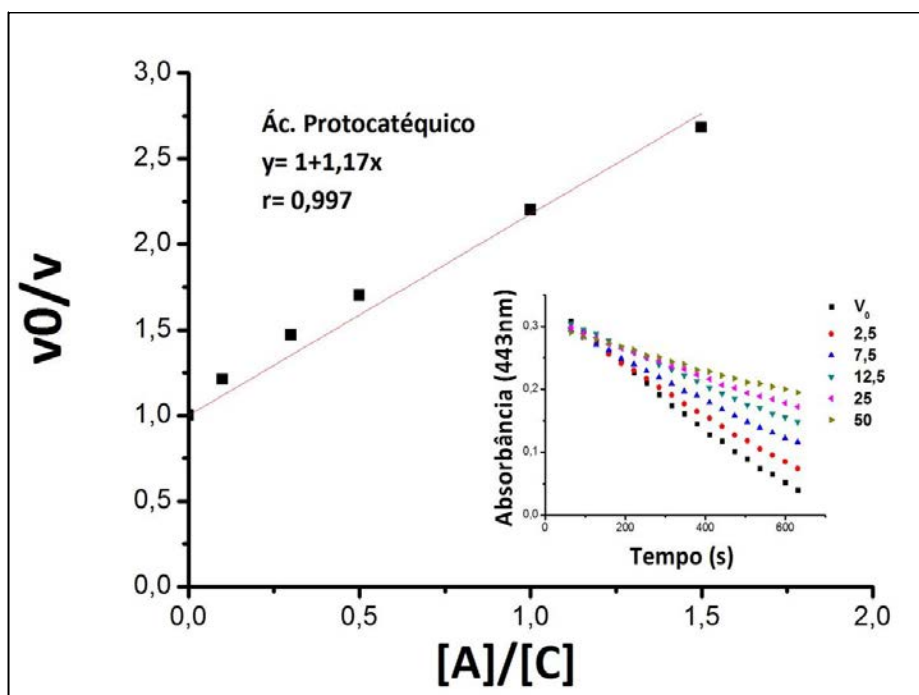


Figura 44: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Ác. Protocatéquico. V_0 , velocidade na ausência de Ác. Protocatéquico; V , velocidade na presença de Ác. Protocatéquico; $[C]$, concentração de crocina constante ($25\mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração de Ác. Protocatéquico. O gráfico inserido representa a queda da absorbância a 443nm, da crocina, na ausência e presença de Ác. Protocatéquico ($\mu\text{mol/L}$), em função do tempo.

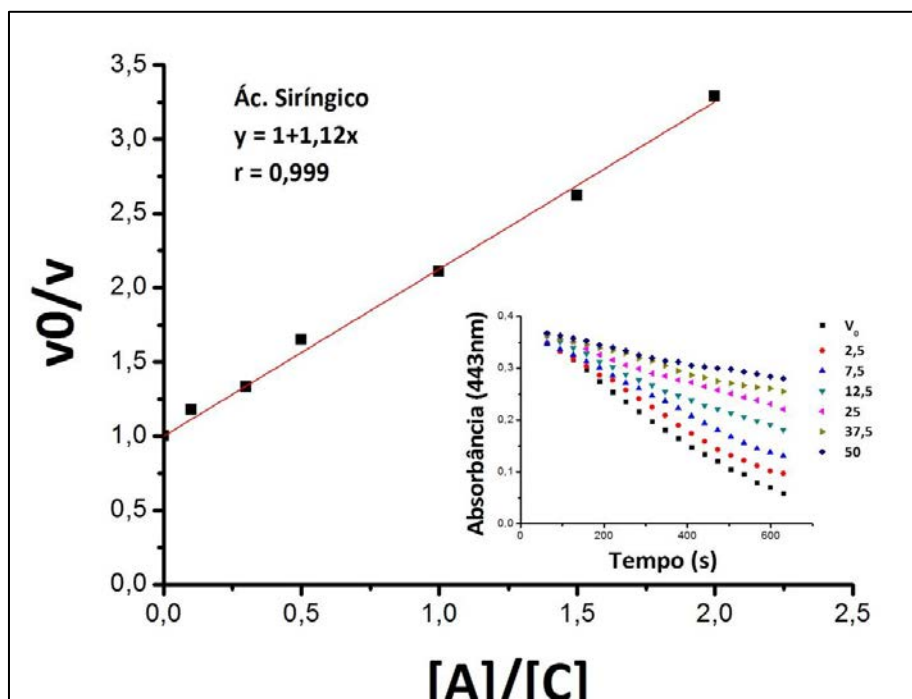


Figura 45: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Ác. Siríngico. V_0 , velocidade na ausência de Ác. Siríngico; V , velocidade na presença de Ác. Siríngico; $[C]$, concentração de crocina constante ($25\mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração de Ác. Siríngico. O gráfico inserido representa a queda da absorbância a 443nm, da crocina, na ausência e presença de Ác. Siríngico ($\mu\text{mol/L}$), em função do tempo

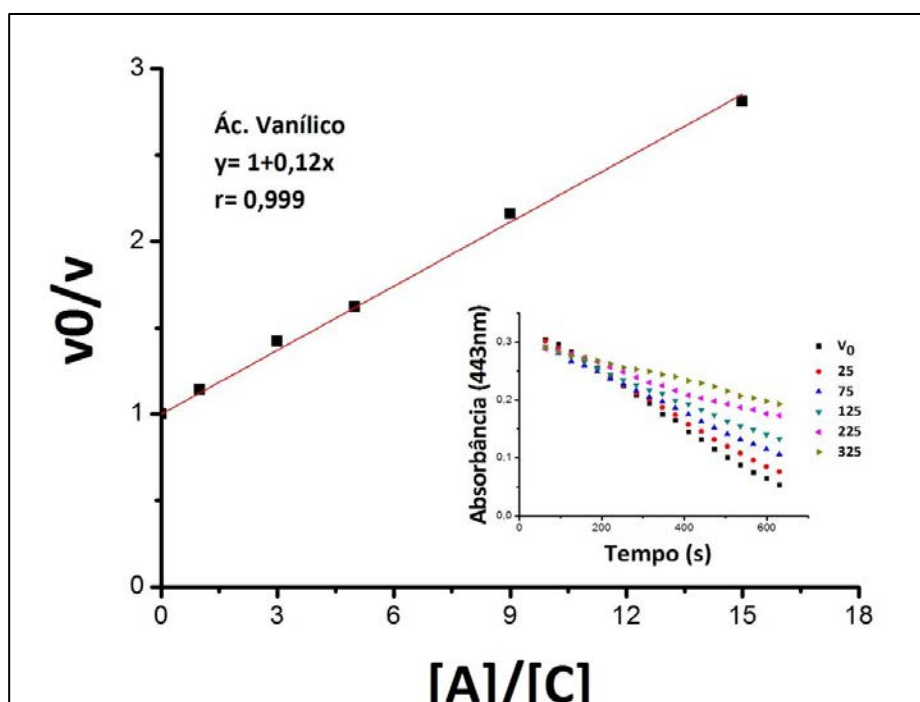


Figura 46: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Ác. Vanílico. V_0 , velocidade na ausência de Ác. Vanílico; V , velocidade na presença de Ác. Vanílico; $[C]$, concentração de crocina constante ($25\mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração de Ác. Vanílico. O gráfico inserido representa a queda da absorbância a 443nm, da crocina, na ausência e presença de Ác. Vanílico ($\mu\text{mol/L}$), em função do tempo.

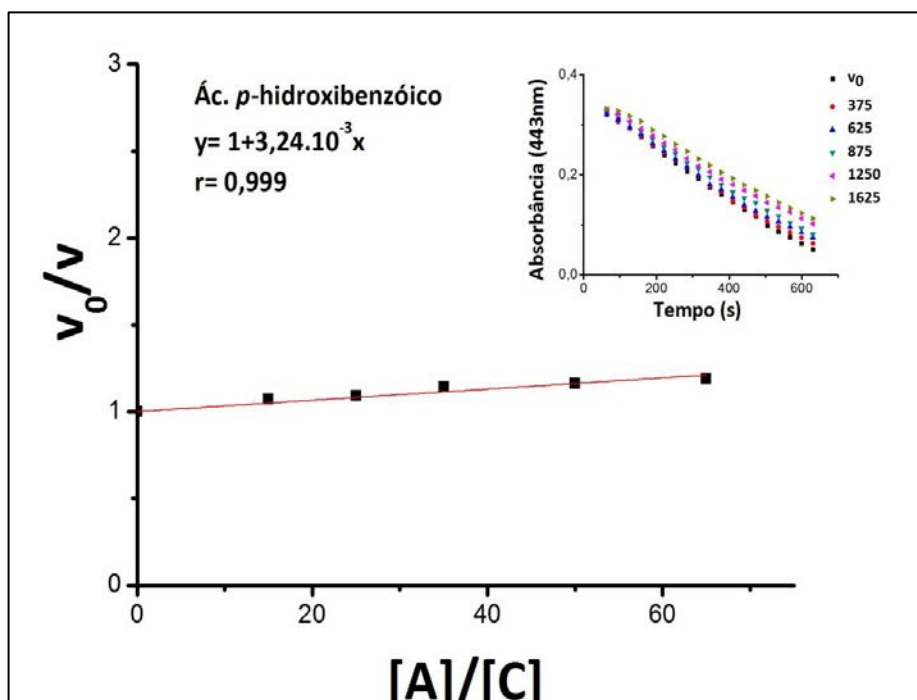


Figura 47: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Ác. *p*-hidroxibenzoico. V_0 , velocidade na ausência de Ác. *p*-hidroxibenzoico; V , velocidade na presença de Ác. *p*-hidroxibenzoico; $[C]$, concentração de crocina constante ($25\mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração de Ác. *p*-hidroxibenzoico. O gráfico inserido representa a queda da absorbância a 443nm, da crocina, na ausência e presença de Ác. *p*-hidroxibenzoico ($\mu\text{mol/L}$), em função do tempo.

De acordo com a equação de competição cinética, foi calculado o valor de equivalentes de Trolox para cada composto fenólico e também para a glutathione (Tabela 1).

Tabela 1: Equação de competição cinética entre os ácidos fenólicos, glutathiona e trolox (padrões).

Compostos	Equação de Competição Cinética $y=V_0/V$; $x=[A]/[C]$	r	Equivalentes de Trolox*
Trolox	$y=1+2,92x$	0,998	1,000
Glutathiona	$y=1+1,18x$	0,985	0,402
Ác. Sinapínico	$y=1+4,99x$	0,998	1,703
Ác. Cafeico	$y=1+3,70x$	0,993	1,264
Ác. Gálico	$y=1+2,98x$	0,996	1,019
Ác. Protocatéquico	$y=1+1,17x$	0,997	0,399
Ác. Ferúlico	$y=1+1,16x$	0,999	0,398
Ác. Siríngico	$y=1+1,12x$	0,999	0,384
Ác. Vanílico	$y=1+0,12x$	0,999	0,041
Ác. <i>p</i>-cumárico	$y=1+0,06x$	0,996	0,021
Ác. <i>p</i>-hidroxibenzoico	$y=1+3,24 \cdot 10^{-3}x$	0,999	0,001

*As análises foram realizadas conforme descrito em Materiais e Métodos, onde $y=v_0/v$; $x=[A]/[C]$. A inclinação da regressão linear indica a capacidade antioxidante relativa da amostra (ka/ kc).

Avaliou-se também o ensaio de clareamento da crocina utilizando o valor de porcentagem de inibição do clareamento da crocina (%In) (LUSSIGNOLI et al., 1999), e assim determinou-se os respectivos valores de IC₅₀. Naturalmente, os valores de IC₅₀ encontrados para os padrões e ácidos fenólicos seguem a mesma ordem de eficiência dos valores que foram encontrados para o coeficiente angular obtido na análise de competição para cada composto, mostrados na tabela 1. Portanto, quanto menor o valor do IC₅₀, mais eficiente é a amostra, enquanto que para a inclinação da regressão linear, quanto maior o valor, mais eficiente é a ação antioxidante (Tabela 2).

Para calcular o IC₅₀, utilizou-se a seguinte equação:

$$\%In = (1 - (\Delta v / \Delta v_0)) \times 100.$$

Tabela 2: Comparação entre valores de IC₅₀ e coeficiente angular, para o ensaio de clareamento da crocina.

Composto	Inclinação da Regressão Linear	IC ₅₀ (μmol/L)
Ác. Sinapínico	4,99	3,72
Ác. Cafeico	3,70	7,50
Ác. Gálico	2,98	10,57
Trolox	2,92	11,37
Glutathiona	1,18	14,32
Ác. Protocatéquico	1,17	20,47
Ác. Ferúlico	1,16	24,05
Ác. Siríngico	1,12	24,42
Ác. Vanílico	0,12	228,40
Ác. <i>p</i> -cumárico	0,06	419,07
Ác. <i>p</i> -hidroxibenzoico	3,24.10 ⁻³	---*

*sem efeito nas concentrações utilizadas

De acordo com a literatura, embora a atividade antioxidante dependa da interação do antioxidante com a espécie reativa, ou seja, de cada uma das estruturas moleculares, de um modo geral os derivados do ácido hidroxicinâmico tendem a ser mais efetivos do que os ácidos derivados do hidroxibenzoico; isso ocorre principalmente devido à presença do grupamento $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$, que confere aos ácidos cinâmicos uma maior capacidade de doar elétrons e assim estabilizar a espécie reativa, em comparação ao grupamento $-\text{COOH}$ dos benzoicos. (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; RICE – EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

Entre os ácidos fenólicos o ácido sinapínico, derivado do hidroxicinâmico, foi o composto mais eficiente, corroborando com a literatura que relata que os derivados do hidroxicinâmico possuem maior capacidade antioxidante. Em relação ao estudo estrutura atividade para cada série: i) derivados hidroxicinâmicos ou ii) hidroxibenzoicos, a literatura relata que os compostos com mais grupamentos hidroxila, como os ácidos cafeico (hidroxicinâmico) e gálico (hidroxibenzoico), tendem a ser mais eficientes (HRÁDKOVÁ, et al. 2013; ORDOUDI; TSIMIDOU; 2006).

Em sistemas lipofílicos a presença de um grupamento hidroxila na posição *orto*, nos hidroxicinâmicos aumenta a atividade antioxidante, o que foi comprovado observando-se o ácido cafeico que foi o segundo melhor composto frente ao ROO[•], e o acréscimo de grupos metoxila na posição *orto* em relação ao OH também eleva a atividade, como no caso do ácido sinapínico (EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

Para o ROO[•] também foram testados além dos ácidos fenólicos, dois metoxicatecóis (apocinina e vanilina) relacionados estruturalmente ao ácido vanílico (hidroxibenzoico).

A apocinina é extraída de plantas comuns do continente americano do gênero *Apocynum*, na medicina popular é utilizada para tratar doenças hepáticas, picada de escorpião e diarreia crônica; ensaios *in vitro* mostram que possui propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. (SIMONYI, et al. 2014).

A vanilina é proveniente principalmente da planta *Vanilla planifolia*, tem conhecida capacidade antioxidante, em especial com relação à lipoperoxidação e oxidação de proteínas; além disso, estudos indicam sua atuação nos mecanismos de defesa contra o câncer de mama; popularmente ela é utilizada como flavorizante em alimentos. (OLIVEIRA, et al. 2014; CHOU, et al. 2010; LIANG, et al. 2009).

A capacidade de inibir o clareamento da crocina pela apocinina e vanilina está apresentada nas figuras 69 e 70.

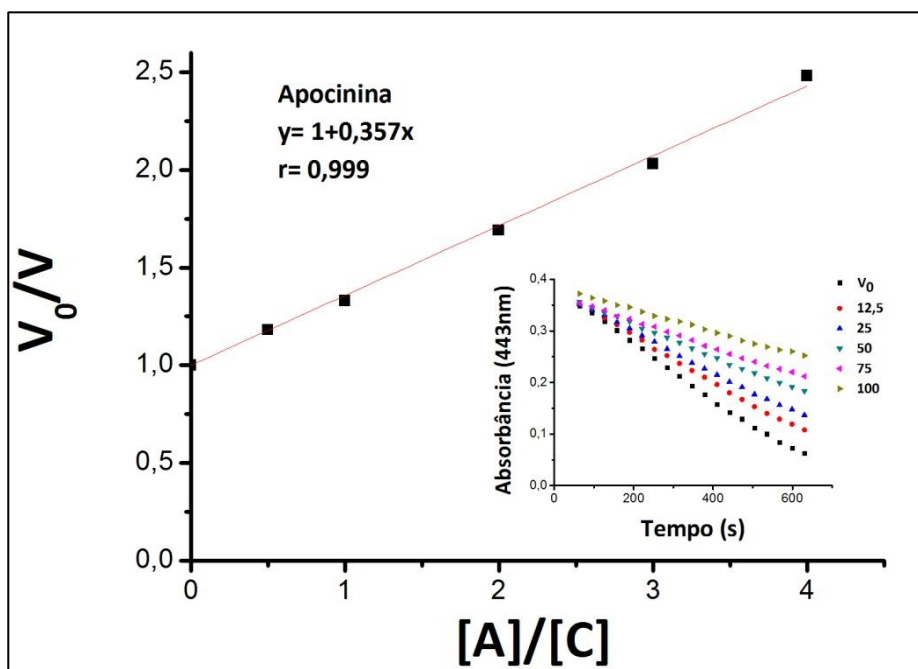


Figura 48: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Apocinina. V_0 , velocidade na ausência de Apocinina; V , velocidade na presença de Apocinina; $[C]$, concentração de crocina constante ($25\mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração de Apocinina. O gráfico inserido representa a queda da absorbância a 443nm, da crocina, na ausência e presença de Apocinina ($\mu\text{mol/L}$), em função do tempo.

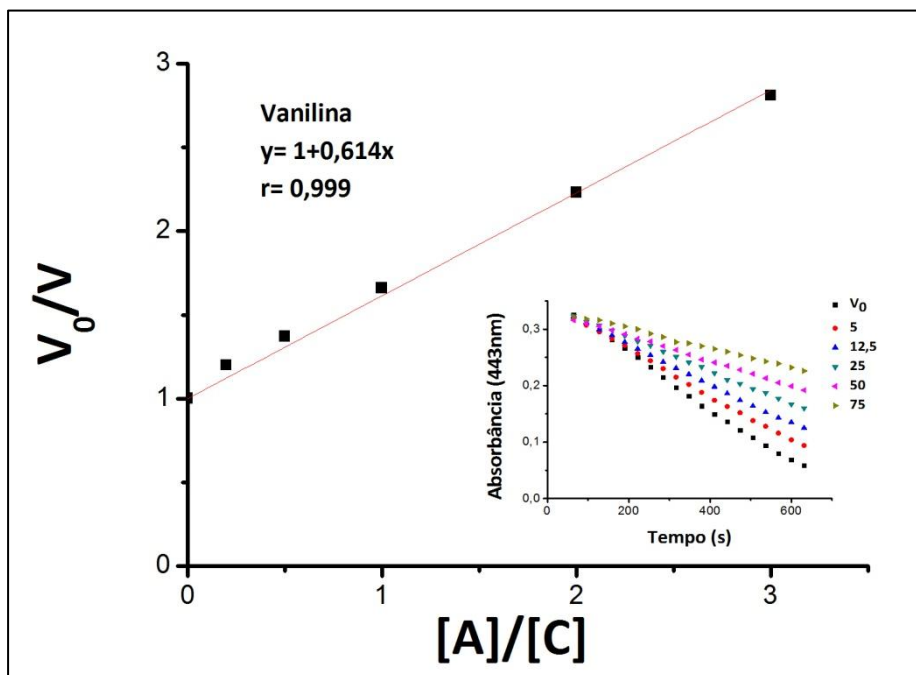


Figura 49: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Vanilina. V_0 , velocidade na ausência de Vanilina; V , velocidade na presença de Vanilina; $[C]$, concentração de crocina constante ($25\mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração de Vanilina. O gráfico inserido representa a queda da absorbância a 443nm, da crocina, na ausência e presença de Vanilina ($\mu\text{mol/L}$), em função do tempo.

A apocinina apresentou equivalência ao trolox de 0,121 e IC_{50} de $76\mu\text{mol/L}$, enquanto a vanilina 0,209 e IC_{50} de $41,52\mu\text{mol/L}$.

Ao comparar os resultados dos metoxicatecóis com o ácido vanílico foi observado que o ácido teve um menor desempenho na captura do $\text{ROO}^{\bullet}$. Ordoudi e Tsmidou (2006) também observaram esse resultado ao comparar a vanilina ao ácido vanílico, entretanto não está elucidada a razão pela qual o aldeído teve melhor desempenho.

O ensaio de clareamento da crocina é considerado um método sensível para avaliação da atividade antioxidante contra o radical peroxila, sendo aplicável

também no estudo da relação estrutura-atividade de compostos fenólicos (ORDOUDI, et al., 2011; ORDOUDI; TSIMIDOU; 2006).

5. Conclusão

Os ácidos fenólicos estudados mostraram ser eficientes para captura das espécies reativas $ABTS^{++}$, $DPPH^{\bullet}$, $HOCl/Cl^{\bullet}$, $O_2^{\bullet-}$ e $ROO^{\bullet}$. Para o ensaio de captura do H_2O_2 , os compostos fenólicos e o padrão trolox não apresentaram atividade.

Dentre todos os compostos analisados, o composto com melhor atividade antioxidante foi o ácido gálico, sendo este derivado do ácido hidroxibenzoico com três grupos hidroxila, ele apresentou o menor IC_{50} nos ensaios de captura sobre $ABTS^{++}$, $DPPH^{\bullet}$, $HOCl/Cl^{\bullet}$. O ácido mono-hidroxilado, *p*-hidroxibenzoico foi o composto menos eficiente frente às espécies $ABTS^{++}$, $O_2^{\bullet-}$; contudo não foi possível estabelecer o seu IC_{50} nos ensaios de captura do $DPPH^{\bullet}$ e $ROO^{\bullet}$. Para a captura do $O_2^{\bullet-}$ e do $ROO^{\bullet}$ os melhores “scavengers” foram os derivados do ácido hidroxicinâmico: ácidos cafeico (di-hidroxilado) e sinapínico, respectivamente. Esses resultados também evidenciam ser o número de hidroxilas importante para a atividade antioxidante.

Os métodos utilizados foram sensíveis, em especial o *bleaching* da crocina, nesse estudo inicial da relação estrutura-atividade; todavia tornam-se necessárias a utilização de moléculas com maior número de modificações estruturais e técnicas com maior resolução para uma avaliação aprofundada.

6. Referências Bibliográficas

- ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.V. Métodos para a determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos **Quim. Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.66, p.1-9, 2007.
- ASSIS, R.P. Efeito dos solutos urêmicos sobre espécies reativas de oxigênio em sistemas-modelo *in vitro*. **Tese (Mestrado em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia) – Universidade Estadual Paulista- Faculdade de Ciências Farmacêuticas**, Araraquara, 2012.
- BALASUNDRAM,N.; SUNDAM,K.; SAMMAN,S. Phenolic compounds in plants and afri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potencial uses. **Food Chemistry**, v.99, p.191-203, 2006.
- BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N. M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev Nutr**, v.23, p.629-643, 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p. 113-123, 2006.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr**, v.12, p. 123-130, 1999.
- BORS, W.; MICHAEL, C.; SARAN, M. Inhibition of the bleaching of the carotenoid crocin a rapid test for quantifying antioxidant activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 796, p.312-319, 1984.
- BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p.317-333, 1998.
- BRESTEL, E. P. Co-oxidation of luminol and hydrogen peroxide. Implications for neutrophil chemiluminescence. **Biochemical Biophysical Research Communication**, v. 126, p. 482-488, 1985.
- BUDAVARI, S.; O'NEIL, M.J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P.E. **THE MERCK INDEX (an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals)**.14^a ed. Whitehouse Station, NJ, USA: MERCK & CO.,INC, 2006.
- CHING, T.; JONG, J.; BAST, A. A method for screening hypochlorous acid scavengers by inhibition of the oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid: application to antiasthmatic drugs. **Analitical. Biochemistry**, v. 218, p. 377-381, 1994.

CHOU, T.H.; DING, H.Y.; HUNG, W.J.; LIANG, C.H. Antioxidative characteristics and inhibition of α -melanocyte-stimulating hormone-stimulated melanogenesis of vanillin and vanillic acid from *Origanum vulgare*. **Experimental Dermatology**, v.19, p.742–750, 2010.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades Antioxidantes de Compostos Fenólicos. **Visão Acadêmica**, v.5, n.1, p. 33-40, 2004.

DIKALOV, S.I.; UNGVARI, Z. Role of mitochondrial oxidative stress in hypertension. **AJP-Heart Circ Physiol**, 2013.

DIKALOV, S.I. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radical Biology & Medicine*. v. 51, p.1289-1301, 2011.

DROGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiol Ver.** v 82, 2002.

DURACKOVÁ, Z. Some current insights into oxidative stress. **Physiol Res**, v. 59, p. 459-469, 2010.

FERREIRA, A.L.; MATSUBARA, L.S. Free radicals: concepts, diseases, defense system and oxidative stress. **Rev. Assoc. Méd. Bras.**, v.43, p.61-68, 1997.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v.408, p. 239-247, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4^oed; New York, Oxford, 2010.

HAZRA, B.; BISWAS, S.; MANDAL, N. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. **BMC Complement Altern Med**. v.8, n.63, p.1-10, 2008.

HRÁDKOVÁ, I.; MERKL, R.; SMIDRKAL, J.S.; KYSELKA, J.; FILIP, V. Antioxidant effect of mono- and dihydroxyphenols in sunflower oil with different levels of naturally present tocopherols. **Eur. J. Lipid Sci. Technol**, v. 115, p. 747–755, 2013.

HUIHUA, Z.; ZHICAI, Z.; HUI, C.; ZHENLE, T.; WEILIN, Q.; WEIJIE, W. Antioxidant activity of ethanol extract from *Ganoderma lucidum* cultivated in the medium supplemented with herbs. **Academia Journal of Medicinal Plants**. v.1, p.006 - 013, 2013.

JÚNIOR, L.R.; HOEHR, N.F.; VELLASCO, A.P.; KUBOTA, L.T. Sistema Antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim. Nova**. v.24, n.1, p.112-119, 2001.

KAJARIA, D.K.; GANGWAR, M.; SHARMA, A.K.; TRIPATHI, Y.B.; TRIPATHI, J.S.; TIWARI, S. In vitro antioxidant potential and radical scavenging activity of polyherbal drug Shrishadi. **Oxidants and Antioxidants in Medical Science**. p.225-229, 2012.

KAKKAR, P.; DAS, B.; VISWANATHAN, P. N. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. **Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 21, p. 130-132, 1984.

KANEGAE, M.P.P. Apocinina e metóxi-catecóis correlatos: relação entre estrutura molecular e inibição da ativação do complexo NADPH oxidase. **Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia)** – Universidade Estadual Paulista- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2009.

KHALIL, N.M. Interação das aminas terciárias nicotina, quinina, ranitidina e trimetilamina com o ácido hipocloroso: efeitos em biomoléculas e sistemas enzimáticos. **Tese (Doutorado em Análises Clínicas)** – Universidade Estadual Paulista- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2005.

KIRITSAKIS, A.K. Flavor Components of Olive Oil—A Review. **JAACS**, v.75, n.6, 1998.

KLEBANOFF, S.J.; KETTLE, A.J.; ROSEN, H.; WINTERBOURN, C.C.; NAUSEEF, W.M. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. **Journal of leukocyte biology**, v.93, p.185-198, 2013.

LIANG, J.; WU, S.; LO, H.; HSIANG, C.; HO, T. Vanillin Inhibits Matrix Metalloproteinase-9 Expression through Down-Regulation of Nuclear Factor- κ B Signaling Pathway in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. **Mol Pharmacol**, v.75, p.151–157, 2009.

LIEBERMAN, M.; MICHAEL, A.D. **Basic Medical Biochemistry, A clinical approach**. 4^aed. 2012.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n.3, 2001.

LIN, Y.; YAN, Y. Biosynthesis of caffeic acid in Escherichia coli using its endogenous hydroxylase complex. **Microbial Cell Factories**, 2012.

LÚCIO, M.; NUNES, C.; GASPAR, D.; FERREIRA, H.; LIME, J.L.F.C.; REIS, S. Antioxidant Activity of Vitamin E and Trolox: Understanding of the Factors that Govern lipid Peroxidation Studies In Vitro. **Food Biophys**, v.4, p.312-320, 2009.

LUSSIGNOLI, S.; FRACCAROLI, M.; ANDRIOLI, G.; BROCCO, G.; BELLAVITE, P. A microplate based colorimetric assay of the total peroxyl radical trapping capability of human plasma. **Anal Biochem**, v. 269, p. 38-44, 1999.

MACHADO, H.; NAGEM, T.J.; PETERS, V.M.; OLIVEIRA, T.T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v.27, n.1/2, p.33-39, 2008.

MAGALHÃES, L.M.; SEGUNDO, M.A.; REIS,S.; LIMA, J.L.F.C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica chimica acta**. v.613, p.1-19, 2008.

MAMEDE,M.E.O.; PASTORE,G.M. Compostos Fenólicos do Vinho: Estrutura e Ação Antioxidante. **B.CEPPA**, v.22, n.2, p.233-252, 2004.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ª ed.Porto Alegre: Artmed, cap.19 e 22,707-721, 2011.

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and vivo. **Free Radic Biol Med**, v.49, p. 503-515, 2010.

ORDOUDI, S.A.; TSIMIDOU, M.Z. Crocin Bleaching Assay (CBA) in Structure-Radical Scavenging Activity Studies of Selected Phenolic Compounds. **J. Agric. Food Chem**. v. 54, n. 05, p. 9347-9356, 2006.

ORDOUDI, S.A.; TSIMIDOU, M.Z. Crocin Bleaching Assay Step by Step: Observations and Suggestions for an Alternative Validated Protocol. **J. Agric. Food Chem**. v. 54, n. 05, p.1663-1671, 2006.

ORDOUDI, S.A.; TSERMENTSELI, S.K.; NENADIS, N.; ASSIMOPOULOU, A.N.; TSIMIDOU, M.Z.; PAPAGEORGIOU, V.P. Structure-radical scavenging activity relationship of alkannin/shikonin derivatives. **Food Chemistry**, v. 124, p.171–176, 2011.

OLIVEIRA, A.C.O.; VALENTIM,I.O.; GOULART, M;O;F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S.Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quim. Nova**, v.32, n.3, p.689 – 702, 2009.

OLIVEIRA, C.B.S.; MEURER, Y.S.R.; OLIVEIRA M.G.; MEDEIROS, W.M.T.Q.; SILVA, F.O.N.; BRITO, A.C.F.; PONTES, D.L.; ANDRADE-NETO,V.F. Comparative Study on the Antioxidant and Anti-*Toxoplasma* Activities of Vanillin and Its Resorcinarene Derivative. **Molecules**. v.19, p. 5898-5912, 2014.

OLIVEIRA, D.M.; BASTOS, D.H.M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Quim. Nova**, v.34, n.6, p.1051-1056, 2011.

OWENS, J.L.; HANSON, S.J.; MCARTHUR,J.A.; MIKHAILOV, T.A. The Need for Evidence Based Nutritional Guidelines for Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Patients: Acute and Longg-Term Following Treatment. **Nutrients**, v.5, p.4333-4346; 2013.

OZCELINK, B.; LEE, J.H.; MIN, D.B. Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. **Journal of Food Science**. v.68, n.2, p.487 – 490, 2003.

PADURARIU, M.; CIOBICA, A.; LEFTER, R.; SERBAN,I.L.; STEFANESCU,C.; CHIRITA,R. The oxiative stress hypothesis in alzheimer's disease. **Psychiatria Danubina**. v. 24, n.4, p.401-409, 2013.

PANNALA, A.S.; CHAN, T.S.; BRIEN, P.J.; EVANS, A.R. Flavonoid B-Ring Chemistry and antioxidant activity: Fast Reaction Kinetics. **Biochemical and Biophysical research communications**. v.282, n.5, p.1161-1168, 2001.

PELLEGRINI, N.; RE, R.; YANG, M.; EVANS, C. R. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6 sulfonic acid radical cation decolorization assay. **Methods Enzymol.**, v. 299, p. 379-389, 1999.

PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v.3, p.146-152, 2012.

PRABHU P, R.; HEGDE, K.; SHABARAYA, A.R.; RAO, M. N. A. Scavenging potential of reactive oxygen species by Tetra-hydrocurcumin. **J Applied Pharmaceutical Science**, v.1, n.5, p.114-118, 2011.

RAMALHO,V.C.; JORGE,N. Antioxidantes Utilizados em Óleos, Gorduras e alimentos Gordurosos. **Quim. Nova**, v.29, n.4, p.755-760, 2006.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RHEE,S.G.; CHANG, T.; BAE, Y.S.; LEE, S.; KANG S.W. Cellular Regulation by Hydrogen Peroxide. **J Am Soc Nephrol**. v.14, p. S211–S215, 2003.

RODRIGUES, A.P. Oxidação de compostos β -dicarbonílicos por peroxidase. 2007. 141 f. **Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Universidade Estadual Paulista-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara**, 2007.

RONSEIN, G.E.; MIYAMOTO, S.; BECHARA, E.; MASCIU, P.; MARTINEZ, G.R. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Quim. Nova**, v.29, n. 3, p.563-568, 2006.

SANTOS,I.S.N. Avaliação do potencial antioxidante dos compostos fenólicos de extractos de plantas da flora portuguesa. **Trabalho para obtenção do grau de licenciado em Ciências Farmacêuticas – Universidade Fernando Pessoa**, Porto, 2011.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte**, v. 10, n. 4, 2004.

SHICHIRI, M. The role of lipid peroxidation in neurological disorders. **J. Clin. Biochem. Nutr.** v. 54 , n. 3 p. 151–160, 2014.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**. v.62, p.1315-1321,1995.

SILVA, D.C.; CERCHIARO, G.; HONÓRIO, K.M. Relações fisiopatológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Quim. Nova**. v. 34, n.2, p.300-305, 2011.

SILVA,M.L.C.; COSTA,R.S.; SANTANA,A.S.; KOBLITZ,M.G.B. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v.31, n.3, p.669-682, 2010.

SIMONYI, A.; SERFOZO, P.; LEHMIDI, T.M.; CUI,J.; GU,Z.; LUBAHN, D.B.; SUN, A.Y.; SUN,Y. The neuroprotective effects of apocynin. **Front Biosci**.v. 4, p.2183–2193, 2014.

SOARES, J. R.; DINIS, T. C.; CUNHA, A. P.; ALMEIDA, L. M. Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. **Free Radic Res.**, v. 26, p. 469-478, 1997.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev Nutr**, v.15, p.71-81, 2002.

SOUZA, R.A.M. Potencial antioxidante e composição fenólica de infusões de ervas consumidas no Brasil. 2007. 60f. **Tese (Mestrado em ciências) - Universidade de São Paulo** - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. 2007.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10º ed. Porto Alegre, Artmed, p. 934, 2012.

TUBARO, F. ;GHISELLI, A.; RAPUZZI, P.; MAIORINO, M.; URSINI, F. Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. **Free Radic Biol Med**, v. 24, n. 7/8, p. 1228–1234, 1998.

TUBARO, F.; RAPUZZI, P.; URSINI, F. Kinetic analysis of antioxidant capacity of wine. **BioFactors** v.9. p. 37-47, 1999.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZACOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Interact.**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

WINTERBOURN, C.C.; VISSERS, M.; KETTLE, A. Myeloperoxidase. **Current Opinion in Hematology** v.7, p.53-58, 2000.

ZGLICZYNSKI,T.J.M.; STELMASZYNNNSKA,T.; DOMANSKA,J.; OSTROWISKI,W. Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. **Biochim Biophys Acta**. v.235, p.419-424, 1971.

7. Dados Finais

Araraquara, 06 de janeiro de 2015.

De acordo.

Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti

Bianca Taíse Roim Varotto