**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**

**INSTITUTO DE FÍSICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA**

# Estudo da atividade antioxidante do 4-nerolidilcatecol por métodos analíticos e biofísicos.

**KELLY DE SOUZA FERNANDES**

**GOIÂNIA**

**2011**

**KELLY DE SOUZA FERNANDES**

# Estudo da atividade antioxidante do 4-nerolidilcatecol por métodos analíticos e biofísicos

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás como requisito para obtenção do título de Mestre em Física.**

**Orientador:** ***Prof. Dr. Antonio Alonso***

**GOIÂNIA**

**2011**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)**
**GPT/BC/UFG**

F363e

Fernandes, Kelly de Souza.
Estudo da atividade antioxidante do 4-nerolidilcatecol por métodos analíticos e biofísicos [manuscrito] / Kelly de Souza Fernandes. - 2011.
104 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Alonso.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Física, 2011.
Bibliografia.
Inclui lista de figuras, abreviaturas e tabelas.

1. Radicais Livres. 2. Antioxidantes. 3. 4-nerolidilcatecol. I. Título.

CDU: 577.3:544.431.15

*Aos meus pais, Jany Fernandes e Eni Batista de Souza Fernandes.*

# Agradecimentos


- ✓ À minha mãe Eni Batista de Souza Fernandes e ao meu pai Jany Fernandes, pelo amor, incentivo e confiança. Eu não chegaria até este estágio da minha vida se não fosse por eles;
- ✓ Ao meu irmão Jany Fernandes Júnior, pelo carinho e amizade que sempre me deu força;
- ✓ Ao professor Dr. Antonio Alonso pela oportunidade, paciência e por todos os ensinamentos científicos durante a realização deste trabalho;
- ✓ Ao meu amigo Adolfo Henrique de Moraes Silva, pela inestimável ajuda, paciência e dedicação na realização deste trabalho;
- ✓ Aos demais amigos da Biofísica, Sebastião Antônio Mendanha Neto e Jorge Luiz Vieira dos Anjos pela amizade e grande ajuda na realização deste trabalho;
- ✓ Ao Msc. Marcus Carrião dos Santos pelo companheirismo, ajuda e incentivo na etapa final deste trabalho;
- ✓ A todos os professores do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás (IF-UFG), por terem me proporcionado desenvolvimento e crescimento intelectual durante o curso de pós-graduação;
- ✓ Aos meus amigos do IF-UFG, que sempre foram a injeção de ânimo necessária para continuar esta caminhada difícil;
- ✓ A todos os meus familiares e amigos, os quais, mesmo longe, sempre me apoiaram e incentivaram a seguir em frente;
- ✓ Ao professor Dr. Fernando Pelegrini, por ceder o laboratório de Ressonância Eletrônica;
- ✓ Ao Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia (INGOH), por cederem as amostras de sangue;
- ✓ A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado;
- ✓ Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro;
- ✓ A Universidade Federal de Goiás (UFG) e ao Instituto de Física pelas oportunidades;

*"Nunca deixe o medo de errar impedir que você jogue"*

*Albert Einstein*

# Sumário

**Lista de Abreviaturas** ..... **viii**

**Lista de Figuras** ..... **x**

**Lista de Tabelas** ..... **xiv**

**Resumo** ..... **xv**

**Abstract** ..... **xvi**

**1 Introdução** ..... **17**

**2 Membranas Biológicas** ..... **19**

2.1 Estrutura e dinâmica das membranas biológicas ..... 19

2.2 Lipossomas como modelo de membrana ..... 21

2.3 Membranas eritrocitárias ..... 23

**3 Radicais Livres e Consequências Biológicas** ..... **25**

3.1 Radicais livres ..... 25

3.2 Danos oxidativos induzidos por radicais livres ..... 27

3.2.1 Estresse oxidativo ..... 27

3.2.2 Peroxidação lipídica (LPO) ..... 28

**4 Sistemas Antioxidantes** ..... **30**

**5 4 – Nerolidilcatecol** ..... **35**

**6 Objetivos** ..... **38**

**7 Espectrometria de Absorção Molecular no Utravioleta/Visível (EAM UV/Vis)** ..... **39**

7.1 Fundamentos da EAM UV/Vis ..... 39

7.2 Lei de Lambert-Beer ..... 39

7.3 O espectrofotômetro ..... 40

7.4 A natureza das transições eletrônicas ..... 42

**8 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)** ..... **45**

8.1 O espectrômetro de RPE ..... 45

8.2 Fenômeno de Ressonância e o efeito Zeeman ..... 48

8.3 A absorção como função da população de spin ..... 51

8.4 O fator g ..... 53

8.5 Interação nuclear hiperfina ..... 54

8.6 O método de marcadores de spin aplicado em membranas biológicas ..... 57

**9 Materiais e Métodos ..... 62**
9.1 Preparação dos lipossomas ..... 62
9.2 Preparação dos “ghosts” ..... 62
9.3 Incorporação dos antioxidantes ..... 63
9.4 Indução da peroxidação lipídica ..... 63
9.5 Métodos para a avaliação da capacidade antioxidante ..... 64
9.5.1 Teste do ácido 2-tiobarbitúrico ..... 64
9.5.2 Marcação das amostras e condições do espectrômetro de RPE ..... 65
9.5.3 Método DPPH ..... 66
**10 Resultados ..... 69**
10.1 Padronização do método do ácido 2-tiobarbitúrico ..... 69
10.2 Avaliação da atividade antioxidante ..... 73
10.2.1 Estudo da proteção à peroxidação lipídica através do teste ácido 2-tiobarbitúrico ..... 73
10.2.2 Efeito protetor do 4-NC analisado por RPE do marcador de spin 5-DSA em membrana eritrocitária. ..... 81
10.2.3 Teste de neutralização do radical DPPH ..... 85
**11 Discussões ..... 90**
**12 Conclusões ..... 94**
**13 Perspectivas Futuras ..... 95**
**14 Referências Bibliográficas ..... 96**

# Lista de Abreviaturas

4-NC - 4-nerolidilcatecol

5-DSA - 5-DOXIL estearato

AAPH - 2,2 '-Azobis (amidinopropano) dicloridrato

ADN - Ácido desoxirribonucleico

AGPI - Ácidos graxos poliinsaturados

BHA - Butilhidroxianisol

BHT - Butilhidroxitolueno

CAT - Catalase

DPPH - 2,2-Difenil-1-picril-hidrazila

EAM UV/Vis - Espectrometria de Absorção Molecular na região do Ultravioleta/Visível

EPC - Fosfatidilcolina de gema de ovo

EROs - Espécies reativas de oxigênio

$FeSO_4$ - Sulfato ferroso

GPx - Glutationa peroxidase

GSH - Glutationa

HCl - Ácido clorídrico

HClO - Ácido hipocloroso

$H_2O_2$ - Peróxido de hidrogênio

$HO_2^{\cdot}$ - Radical hidroperoxila

$HO^{\cdot}$ - Radical hidroxila

LPO - Peroxidação lipídica

$LO^{\cdot}$ - Radical alcoxila

$LOO^{\cdot}$ - Radical peroxila

MDA - Malondialdeído

NaCl - Cloreto de sódio

$O_2^{\cdot -}$ - Radical superóxido

$^1O_2$ - Oxigênio singleto

$O_3$ - Ozônio

PC - Fosfatidilcolina

PG - Galato de propila

PBS - Tampão fosfato salino

*P. umbellata* - *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.

QL - Quimiluminescência

RPE - Ressonância Paramagnética Eletrônica

SOD - Superóxido dismutase

TBA - Ácido tiobarbitúrico

TBHQ - *Terc*-butil hidroquinona

TCA - Ácido tricloroacético

Tris - Tris(hidroximetil)aminometano

# Lista de Figuras

Figura 1: (A) - Modelo de membrana biológica proposto por Singer e Nicholson (1972); (B) - Estrutura de uma molécula de fosfolipídio [20]. ..... 20

Figura 2: Representação esquemática da formação de vesículas fosfolipídicas artificiais (lipossomas) [20]. ..... 21

Figura 3: Estrutura molecular e características da EPC [20]. ..... 22

Figura 4: Modelo esquemático da membrana eritrocitária. Proteínas Integrais; B3: banda 3, Gf-A: glicoforina A, e Gf-C: glicoforina C. Proteínas ancoradas; Anq: anquirina e P-4.2: proteína 4.2. Proteínas do citoesqueleto; α-Spc: α-espectrina, β-Spc: β-espectrina, Adc: aductina, Tms: tropomiosina e Tmd:tropomodulina. Adaptado de [31]. ..... 24

Figura 5: Estrutura química básica dos flavonóides. ..... 32

Figura 6: Estrutura química das várias subclasses de flavonóides. Adaptado de [56]. .. 32

Figura 7: Estrutura molecular de alguns ácidos fenólicos: ácido ferúlico, (A), ácido gálico, (B), ácido salicílico, (C), ácido cafeico, (D), ácido $\gamma$-cinâmico, (E), ácido *p*-cumárico, (F). Adaptado de [59]. ..... 34

Figura 8: *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq [64]. ..... 35

Figura 9: Estrutura química da molécula de 4-nerolidilcatecol [68]. ..... 36

Figura 10: Sistema esquemático de um espectrofotômetro de feixe duplo adaptado de [79]. ..... 42

Figura 11: Esquema ilustrativo do processo de excitação de um elétron após absorver radiação eletromagnética. Adaptado de [85]. ..... 43

Figura 12: Os orbitais moleculares adaptados de [85]. ..... 43

Figura 13: Os níveis de energia e as transições eletrônicas permitidas. Adaptado de [85]. ..... 44

Figura 14: Diagrama de blocos de um espectrômetro de RPE típico de banda X operando em um campo de modulação equivalente a 100 KHz. Adaptado de [88]..... 47

Figura 15: Níveis de energia Zeeman em função da intensidade do campo magnético. $Hr$ é o campo de ressonância e $E_\alpha$ e $E_\beta$ são as energias associadas aos valores de $M_s = {}^{1}/_{2}$ e ${}^{-1}/_{2}$, respectivamente. ..... 51

Figura 16: Níveis de energia desdobrados pela interação hiperfina entre o momento magnético eletrônico e nuclear do núcleo de nitrogênio. ..... 54

Figura 17: Espectro de absorção do radical nitróxido; *g* define a posição da linha central e a constante de desdobramento hiperfino. ..... 58

Figura 18: Estrutura molecular geral do radical nitróxido. $R_1$ e $R_2$ representam grupos químicos que variam de acordo com o marcador de spin. ..... 58

Figura 19: Sistema de coordenadas do radical nitróxido demonstrando os ângulos formados entre a direção do campo magnético externo *H* e os eixos de coordenadas do nitróxido. ..... 59

Figura 20: Espectro de RPE do marcador de spin 5-DSA obtido em temperatura ambiente com a indicação dos parâmetros espectrais $2A_{\parallel}$ e $2A_{\perp}$ ..... 60

Figura 21: Marcador de spin 5-DSA que possui o anel do radical nitróxido ligado ao 5º carbono da cadeia acil. ..... 61

Figura 22: Estrutura molecular do α-tocoferol. ..... 63

Figura 23: Reação pela qual o AAPH se torna radical livre. Adaptado de [97]. ..... 64

Figura 24: Reação entre o MDA e o ácido TBA para a formação do complexo MDA-TBA. Adaptado de [99]. ..... 65

Figura 25: Estrutura molecular do DPPH radical (A) e do não radical (B). ..... 66

Figura 26: Estrutura química da molécula (+)-Catequina. ..... 67

Figura 27: Variação da concentração do complexo MDA-TBA em função da concentração de AAPH na qual aproximadamente 1,6 mM de vesículas de EPC foram incubadas durante 3 horas a 37 °C para a reação com o AAPH. A absorbância foi monitorada em comprimento de onda, $\lambda = 532$ nm, e o valor utilizado do coeficiente de absortividade molar foi de $1,56 \times 10^5$ $M^{-1}cm^{-1}$. ..... 69

Figura 28: Concentração de MDA-TBA em função da concentração de 4-NC no qual aproximadamente 1,6 mM de EPC foram incubadas com as concentrações requeridas de 4-NC por 1 h e 30 min a 37 °C. A peroxidação lipídica foi induzida por 30 mM de AAPH incubado por 3 horas a 37°C. ..... 73

Figura 29: Efeito antioxidante do 4-NC. As membranas de EPC diluídas em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) (~1,6 mM)) foram incubadas com as concentrações requeridas de 4-NC por 1 h e 30 min a 37°C, e com 30 mM de AAPH a 37°C por 3 horas. O valor da porcentagem de proteção foi calculado de acordo com a equação (10.1). ..... 74

Figura 30: Efeito antioxidante do α-tocoferol. As membranas de EPC diluídas em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) (~1,6 mM)) foram incubadas com as concentrações requeridas de α-tocoferol por 1 h e 30 min a 37°C, e com 30 mM de AAPH a 37°C por 3 horas. ..... 75

Figura 31: Variação da concentração de MDA-TBA em função da concentração de 4-NC no qual aproximadamente 1,6 mM de EPC foram incubadas com as concentrações requeridas de 4-NC por 1 h e 30 min a 37°C. A peroxidação lipídica foi induzida por 100 μM/1 mM de $Fe^{2+}/H_2O_2$ a 37°C por 1 hora. ..... 76

Figura 32: Efeito Antioxidante do 4-NC. As membranas de EPC diluídas em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) (~1,6 mM)) foram incubadas com as concentrações requeridas de 4-NC por 1 h e 30 min a 37°C e com 100 μM/ 1 mM de $Fe^{2+}/H_2O_2$ por 1 hora a 37°C. O valor da porcentagem de proteção foi calculado de acordo com a equação (10.1). ..... 76

Figura 33: Concentração de MDA formado pela peroxidação dos lipídios em função da concentração de AAPH. As membranas "ghosts" diluídas em tampão PBS (fosfato 5 mM, NaCl 154 mM, pH 7,4) foram incubadas com diferentes concentrações de agente oxidante AAPH por 3 horas a 37 °C [105]. ..... 77

Figura 34: Produção de MDA-TBA (A) e proteção do antioxidante 4-NC (B) em função de sua concentração. As membranas "ghosts" diluídas em tampão PBS (fosfato 5 mM, NaCl 154 mM, pH 7,4) (~4 mg de lipídio/mL) foram incubadas com as concentrações requeridas de 4-NC por 1 h e 30 min a 37°C. A peroxidação lipídica foi induzida por 50 mM de AAPH incubado por 3 horas a 37°C. ..... 78

Figura 35: Concentração de MDA-TBA (A) e percentual de proteção do antioxidante 4-NC (B) em função de sua concentração. As membranas "ghosts" diluídas em tampão PBS (fosfato 5 mM, NaCl 154 mM, pH 7,4) a ~4 mg de lipídio/mL foram incubadas com as concentrações requeridas de 4-NC por 1 h e 30 min a 37°C. A peroxidação lipídica foi induzida por 200 μM/1mM de $Fe^{2+}/H_2O_2$ por 1 hora a 37°C. O valor da porcentagem de proteção foi calculado de acordo com a equação (10.1). ..... 79

Figura 36: Concentração de MDA-TBA (A) e percentual de proteção dos antioxidantes 4-NC (quadrado verde) e α-tocoferol (círculo roxo) (B) em função de suas concentrações. A peroxidação lipídica foi induzida por 200 μM/2 mM de $Fe^{2+}/H_2O_2$ por 3 horas a 37°C. ..... 80

Figura 37: (A): Espectros experimentais de RPE do marcador de spin 5-DSA em membranas de ..... 81

Figura 38: (A): Espectros experimentais de RPE do marcador de spin 5-DSA em membranas de eritrócitos não oxidadas, oxidada com 50 mM de AAPH e previamente incubada com 100 μM do composto 4-NC; (B): Atividade antioxidante dos compostos α-tocoferol (círculo roxo) e 4-NC (quadrado verde) avaliada através do parâmetro espectral $2A_{\parallel}$, tendo como controle a membrana não oxidada (losango vinho). As membranas "ghosts" foram previamente incubadas com o antioxidante por 1 h e30 min a 37°C, e depois com 50 mM de AAPH a 37°C por 3 horas. ..... 82

Figura 39: Influência da concentração do agente oxidante no grau de oxidação dos componentes da membrana "ghost" avaliada através do parâmetro espectral $2A_{\parallel}$. As soluções contendo aproximadamente 4 mg de lipídios/mL diluídas em tampão PBS (fosfato 5 mM, NaCl 154 mM e pH 7,4) foram incubadas com diferentes concentrações de $FeSO_4$ por 3 horas a 37°C. ..... 83

Figura 40: (A): Espectros experimentais de RPE do marcador de spin 5-DSA em membranas de eritrócitos não oxidadas, oxidada com 200 μM/2 mM de $Fe^{2+}/H_2O_2$ e previamente incubada com 100 μM do composto α-tocoferol e 100 μM de 4-NC; (B): Atividade antioxidante dos compostos α-tocoferol (círculo roxo) e 4-NC (quadrado verde) avaliada através do parâmetro espectral $2A_{\parallel}$, tendo como controle a membrana não oxidada (losango vinho). As membranas "ghosts" foram previamente incubadas com o antioxidante por 1 h e30 min a 37°C, e depois com 200 μM/2 mM de $Fe^{2+}/H_2O_2$ a 37°C por 3 horas. ..... 84

Figura 41: Espectro de absorção do DPPH em solução metanólica. Seu pico de absorção máxima ocorre em 515 nm. ..... 85

Figura 42: Espectro de absorção do 4-NC a uma concentração de 14,5 μM em solução de etanol. ..... 86

Figura 43: Decaimento no valor da absorbância do DPPH · em função do tempo na presença de 4-NC. Soluções de metanol contendo 75 μM de DPPH e 5 μM (roxo), 15 μM (vinho), 25 μM (verde), 37,5 μM (verde água) e 50 μM (azul) de 4-NC foram monitoradas por 30 minutos, sendo as absorbâncias medidas a cada 30 segundos em um comprimento de onda igual a 515 nm. ..... 86

Figura 44: Decaimento no valor da absorbância do DPPH ·em função do tempo na presença de 4-NC, α-tocoferol e (+)-Catequina. Soluções de metanol contendo 75 μM de DPPH e 5 μM (A), 15 μM (B), 25 μM (C) de 4-NC, α-tocoferol e (+)-Catequina e 37,5 μM (D) e 50 μM (E) de 4-NC e α-tocoferol foram monitoradas por 30 minutos, sendo as absorbâncias medidas a cada 30 segundos em um comprimento de onda igual a 515 nm. ..... 88

Figura 45: Porcentagem de inibição do radical DPPH pelos antioxidantes (+)-Catequina (vinho), 4-NC (verde) e α-Tocoferol (roxo) em função de suas concentrações. A porcentagem foi calculada após 30 minutos de reação com DPPH · (75 μM) obedecendo a equação (9.2). ..... 89

# Lista de Tabelas

Tabela 1: Espécies reativas de Oxigênio (EROs). ..... 25

Tabela 2: Exemplos de substâncias que constituem as subclasses de flavonóides. ..... 33

Tabela 3: Absorbância dos controles oxidados e não oxidados e do α-tocoferol inserido à vesícula de EPC antes da indução da oxidação em razão da variação do tempo de incubação para a sua incorporação à EPC. Aproximadamente 1,6 mM de vesículas de EPC foram incubadas com 250 μM de α-tocoferol a 37ºC. A oxidação foi induzida por 30 mM de AAPH, sendo o tempo de incubação com este de 3 horas e a 37°C. A absorbância foi monitorada em comprimento de onda, λ = 532 nm. ..... 70

Tabela 4: Absorbância dos controles oxidados e não oxidados variando a temperatura e o tempo em que as amostras contendo aproximadamente 1,6 mM de vesículas de EPC permaneceram em banho-maria para a reação em que o complexo MDA-TBA é formado. A oxidação foi induzida por 30 mM de AAPH, sendo o tempo de incubação com este de 3 horas e a 37°C. A absorbância foi monitorada em comprimento de onda, λ = 532 nm. ..... 71

Tabela 5: Absorbância dos controles oxidados e não oxidados variando a velocidade de rotação das amostras após a incubação com AAPH e a temperatura da água do banho-maria para a reação em que o complexo MDA-TBA é formado..... 72

# Resumo

Acredita-se que o estresse oxidativo esteja diretamente envolvido com o desenvolvimento de inúmeras patologias, dentre as quais se podem destacar a arteriosclerose, artrite, diabetes, Mal de Parkinson, Mal de Alzheimer, esquizofrenia, doenças inflamatórias e a isquemia cardíaca. Como consequência, a busca por moléculas que minimizem os efeitos de agentes oxidativos é de grande importância. Sabe-se que as plantas possuem vários antioxidantes naturais, tais como carotenóides, vitaminas e compostos fenólicos, que apresentam considerável potencial anti-radical livre. Neste trabalho avaliou-se a atividade antioxidante do composto 4-nerolidilcatecol (4-NC), um catecol isolado do extrato de raízes de uma planta nativa da Mata Atlântica Brasileira, *Pothomorphe umbellata* L. Miq., conhecida popularmente como "pariparoba". Os experimentos foram feitos em fosfatidilcolina de gema de ovo (EPC) e em membranas isoladas de células vermelhas do sangue ("ghosts"). Seus efeitos antioxidantes foram investigados através do monitoramento da formação do malondialdeído (MDA), da capacidade de reduzir o radical livre 2,2-difenil, 1- picril-hidrazila (DPPH) e por espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) utilizando o método de marcadores de spins lipídicos. A peroxidação lipídica em EPC e em membranas “ghosts” foi induzida por ferro e peróxido de hidrogênio ($Fe^{2+}/H_2O_2$) ou por 2,2 '-Azobis (amidinopropano) dicloridrato (AAPH). Testes com o DPPH e os de formação de MDA mostraram que o 4-NC, possui uma forte atividade antioxidante quando comparado com o α-tocoferol e outros antioxidantes conhecidos na literatura. Através do estudo das alterações biofísicas nas membranas das hemácias utilizando o marcador de spin conhecido como 5-DOXIL estearato (5-DSA), observou-se uma rigidez na membrana após a indução da peroxidação dos lipídios, a qual foi monitorada pelo valor do parâmetro $2A_{\|}$ do marcador e o 4-NC foi capaz de proteger a membrana desta rigidez.

# Abstract

It is believed that oxidative stress is directly involved with the development of numerous diseases, such as arteriosclerosis, arthritis, diabetes, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, schizophrenia, inflammatory diseases and cardiac ischemia. As a result, the search for molecules that minimize the effects of oxidative agents is of great importance. It is known that plants possess several natural antioxidants such as carotenoids, vitamins and phenolics compounds, which have considerable potential anti-free radical. In the present work we evaluated the antioxidant activity of the compound 4-nerolidylcatechol (4-NC), a catechol isolated from the root extracts of a native plant of the Brazilian Atlantic Forest, *Pothomorphe umbellata* L. Miq., also known as "pariparoba". The experiments were done in egg phosphatidylcoline (EPC) and in isolated red blood cells membranes (ghosts). Their antioxidant effects were investigated by monitoring the formation of malondialdehyde (MDA), the ability to reduce free radical 2,2-diphenyl, 1-picrihidrazila (DPPH) and by Electron Paramagnetic Resonance spectroscopy (RPE) of lipid spin labels. Lipid peroxidation in EPC and ghosts membranes was induced by iron plus hydrogen peroxide ($Fe^{2+}/H_2O_2$) or 2,2'-Azobis (amidinopropane) Dihydrochloride (AAPH). Tests of reduction of DPPH and MDA formation showed that the 4-NC has a strong antioxidant activity when compared with α-tocopherol and others antioxidants known in the literature. Through the study of biophysical changes in red blood cells membranes using the spin label known as 5-DOXIL stearic acid (5-DSA), observed a rigidity in the membrane after the induction of lipid peroxidation, which was monitored by value of the $2A_{\|}$ parameter of spin label and 4-NC was able to almost completely protect the membrane from this rigidity effect.

# 1 Introdução

Os radicais livres estão envolvidos em muitos processos bioquímicos e fisiológicos. Estes são formados devido ao uso contínuo de oxigênio pelas células aeróbicas. Seus níveis são mantidos sob controle por diferentes antioxidantes, os quais removem espécies oxidantes a uma taxa similar a que eles são formados. Como consequências da exposição de sistemas biológicos a um fluxo de radical oxigênio incontrolado tem-se danos funcionais, danos estruturais, envelhecimento, desordens fisiológicas e, por último, a morte celular [1-9]. O estresse oxidativo afeta principalmente os sistemas membranosos de células aeróbicas, sendo os fosfolipídios as biomoléculas mais instáveis dos organismos vivos. Logo, a peroxidação lipídica é uma consequência comum das reações em cadeia mediadas por radicais livres e, alguns dos produtos finais, tais como hidroperóxidos lipídicos e várias espécies que contém elétrons desemparelhados, como radicais alcoxila ($LO^{\cdot}$) e peroxila ($LOO^{\cdot}$), possuem potencial de danificar o ADN e atividade carcinogênica [10].

Oxidação do ADN, proteínas e lipídios possivelmente ocorre quando sistemas biológicos são expostos a espécies reativas de oxigênio, drogas ou agentes tóxicos. Antioxidantes têm sido ligados à prevenção de diversas doenças [11]. Incluem neste grupo: proteínas, enzimas e uma variedade de pequenas moléculas. A atividade antioxidante destas é resultado de um sequestro específico de radicais livres reativos ou sequestro de compostos contendo oxigênio ou da quelação de um metal qualquer.

A proteção dos organismos vivos contra a toxicidade dos radicais livres por antioxidantes endógenos e exógenos diminui o risco de muitas doenças crônicas, tais como câncer, desordens cardiovasculares, entre outras [12]. Terapias usando antioxidantes têm obtido muito sucesso no tratamento de algumas doenças. Além disso, há, atualmente, uma intensiva busca por antioxidantes naturais extraídos de plantas, como forma de substituir os antioxidantes sintéticos por estes serem, muitas vezes, tóxicos ao organismo.

Este trabalho foca no estudo da atividade antioxidante do 4-nerolidilcatecol (4-NC), composto extraído da raiz e folhas de uma planta brasileira conhecida popularmente como “Pariparoba”. A atividade antioxidante desta molécula já é conhecida [13,14], mas ainda não há um estudo completo sobre o seu verdadeiro

potencial antioxidante e o quão pode proteger contra a ação dos radicais livres. Seu estudo foi feito através do aprimoramento de técnicas já conhecidas e que são usadas para o teste de potencial antioxidante de diversas substâncias.

Membranas modelo (lipossomas) e membranas naturais (“ghosts”) foram utilizadas para o estudo da proteção do 4-NC contra a peroxidação lipídica, a qual foi induzida por 2,2'-Azobis (amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) e pelo sistema sulfato de ferro/peróxido de hidrogênio ($FeSO_4/H_2O_2$). A proteção foi monitorada através do decréscimo da formação de malondialdeído (MDA), um subproduto da oxidação dos lipídios e pela técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) associada ao método de marcadores de spin, a qual permite monitorar o grau de fluidez das membranas.

Outra metodologia também empregada aqui para os testes da atividade antioxidante do 4-NC foi o método de redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), através do controle colorimétrico à medida que o radical é reduzido.

# 2 Membranas Biológicas

## 2.1 Estrutura e dinâmica das membranas biológicas

Membranas biológicas são estruturas flexíveis de matéria condensada que delimitam todas as células e suas organelas. Elas estão envolvidas em uma variedade de processos celulares, como: regular o transporte de moléculas e íons, permeabilidade e interações intercelulares [15], organizar sequências complexas de reações, atuar na recepção de sinais e na transformação de energia [16], entre outros.

Para entender como essas funções são desempenhadas pelas biomembranas é necessário conhecer sua composição e estrutura física. Sabe-se que as membranas são constituídas basicamente por lipídios e proteínas, apresentando pequenas quantidades de carboidratos. O modelo que melhor descreve sua dinâmica e organização estrutural é o conhecido como "mosaico fluido" desenvolvido por Singer e Nicholson [17] em 1972 (Figura 1). Segundo este modelo, as membranas são compostas por uma bicamada lipídica fluída onde estão depositados os carboidratos e as proteínas. Algumas destas proteínas ficam aderidas à superfície da membrana, enquanto outras estão totalmente mergulhadas entre a bicamada, atravessando a membrana de lado a lado.

A bicamada lipídica forma a estrutura básica de todas as membranas celulares. Cerca de 50% da massa da maioria das membranas das células animais é constituída por lipídios. Há aproximadamente $5x10^6$ moléculas lipídicas em uma área de 1 μm x 1μm de bicamada lipídica, ou cerca de $10^9$ moléculas lipídicas na membrana plasmática de uma pequena célula animal [18].

Os principais lipídios que constituem as membranas celulares são os fosfolipídios, colesterol e glicolipídios, sendo os fosfolipídios um dos tipos mais abundantes. O suporte principal de um fosfolipídio é o grupo glicerol ao qual uma cabeça polar hidrofílica e duas cadeias de hidrocarbonetos estão conectadas. O grupo principal consiste de um grupo fosfato e um grupo álcool (Figura 1). As cadeias de hidrocarbonetos variam na sua extensão e normalmente possuem de 12 a 20 átomos de carbono [19], podendo ser saturados ou insaturados, dependendo da presença ou não de uma ou mais ligações duplas entre átomos de carbonos consecutivos**.**

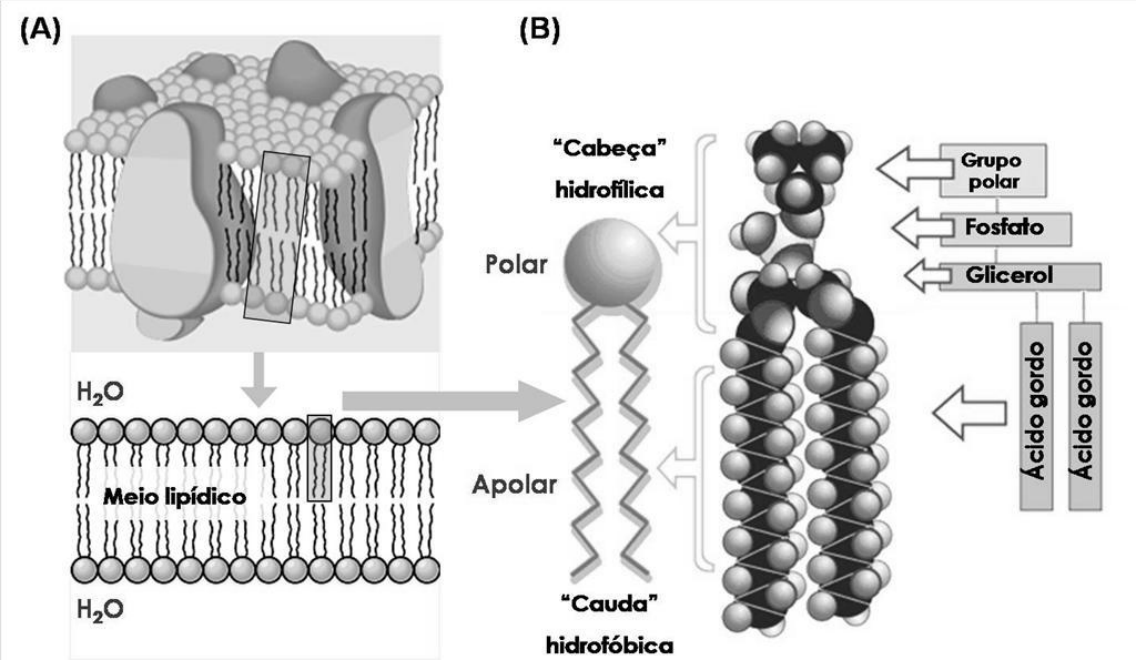


**Figura 1: (A) - Modelo de membrana biológica proposto por Singer e Nicholson (1972); (B) - Estrutura de uma molécula de fosfolipídio [20].**

Um dos mais comuns fosfolipídios encontrados em biomembranas é a fosfatidilcolina (PC). Estes lipídios são moléculas anfifílicas, que em soluções aquosas, formam micelas, agregados globulares cujos grupos de hidrocarbonetos não estão em contato com a água. Esse arranjo molecular elimina contatos desfavoráveis entre a água e as caudas hidrofóbicas, ao mesmo tempo permitindo a solvatação das cabeças polares [21]. A formação dessas estruturas é causada pelo efeito hidrofóbico [22], no entanto forças atrativas de van der Waals, interações eletrostáticas e formação de ligação de hidrogênio também contribuem para a estabilização destas estruturas [18].

Avanços nas pesquisas multidisciplinares em membranas têm demonstrado uma ligação fundamental entre a composição química das bicamadas lipídicas e suas propriedades estruturais e biofísicas. Assim, é natural que as características físico-químicas de uma membrana, tais como, espessura, deformação da curvatura, elasticidade, perfil da pressão lateral e densidade de carga superficial, sejam governadas tanto pela natureza química dos lipídios das membranas como pela heterogeneidade na sua organização lateral e transversal em regiões com composição diferenciada [23]. Além disso, essas propriedades das bicamadas lipídicas são cada vez mais reconhecidas

e desempenham importantes papéis na funcionalidade das proteínas de membranas e, portanto, possuem vastas implicações fisiológicas [24,25].

## 2.2 Lipossomas como modelo de membrana

A complexidade estrutural das membranas biológicas de origem natural representa um grande desafio para a ciência experimental. Devido a isso, vesículas fosfolipídicas artificiais, conhecidas como lipossomas (Figura 2), têm sido frequentemente usadas como modelos de bicamadas fosfolipídicas.

Lipossomas são vesículas esféricas preparadas a partir de uma (unilamelares) ou várias camadas (multilamelares) concêntricas de PC contendo ácidos graxos polinsaturados (AGPI). Esses sistemas se organizam na presença de água, sendo que, em parte, a orientação da bicamada é determinada pela natureza dos grupos polares e das cadeias carbônicas [26].

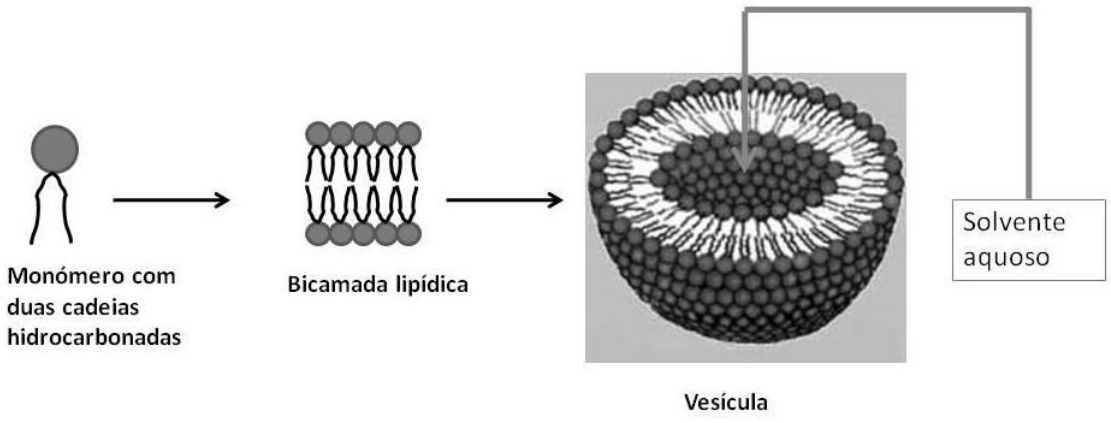


**Figura 2: Representação esquemática da formação de vesículas fosfolipídicas artificiais (lipossomas) [20].**

Tipicamente, o diâmetro médio dos lipossomas varia de 20 a 5000 nm [27]. Segundo Danilo D. Lasic [28], os lipossomas variam de tamanho e homogeneidade, conforme o método de preparação, podendo ser preparados por simples dispersão de um filme anfifílico com agitação mecânica, sonificação, evaporação em fase reversa, extrusão, etc.

A grande vantagem da utilização destas vesículas artificiais prende-se ao fato de se assemelharem às membranas celulares. Devido a isso, são extensivamente estudas como modelo para biomembranas artificiais. No presente trabalho, foi escolhido como alvo de estudo, os lipossomas preparados a partir de lecitina ou fosfatidilcolina de gema de ovo (EPC) (Figura 3). Estes são fosfolipídios naturais extraídos de gema de ovo, sendo o mais abundante na natureza e, como já dito anteriormente, constituem o maior componente das membranas naturais, portanto são bastante utilizados na formação de lipossomas para as mais variadas aplicações.

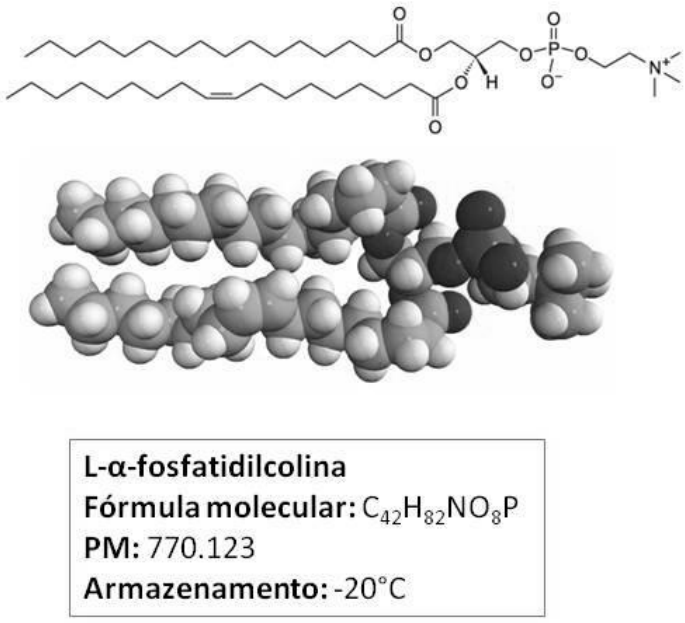


**Figura 3: Estrutura molecular e características da EPC [20].**

As lecitinas são moléculas zwitteriônicas a pH fisiológico, relativamente inertes quimicamente e passíveis de serem obtidas a baixo custo. À EPC não se pode atribuir um valor definido da temperatura de transição de fase. Devido a sua composição heterogênea, constituída por vários fosfolipídios de diferentes tamanhos e insaturações das cadeias hidrocarbonadas, este valor encontra-se entre -15°C a -7°C e, portanto, estes lipossomas encontram-se no estado fluido a temperatura ambiente. Exige apenas alguns cuidados na preparação das vesículas como a preparação na ausência de luz e de

oxigênio, uma vez que os fosfolipídios são sensíveis a temperatura, ao oxigênio/luz e aos agentes oxidantes [29].

## 2.3 Membranas eritrocitárias

Os eritrócitos, células vermelhas do sangue, também designadas como hemácias ou glóbulos vermelhos são células anucleadas de forma bicôncava originadas na medula óssea e incapazes de sofrer divisão celular [9]. Sua função essencial é transportar oxigênio para os tecidos através das moléculas de hemoglobina. São caracterizadas por acentuadas particularidades metabólicas e estruturais.

O eritrócito é um excelente modelo experimental graças a sua relativa simplicidade, a facilidade com que pode ser obtido e por ser de fácil preservação. Dodge e colaboradores [30] mostraram ser possível obter as membranas celulares dos eritrócitos livres de hemoglobina, o que possibilitou o estudo detalhado das características estruturais dessas membranas.

A membrana eritrocitária (Figura 4) é constituída por 43,6% de lipídios, 49,2% de proteínas e 7,2% de carboidratos [31]. Entre os lipídios, o colesterol e os fosfolipídios são os que aparecem em maiores quantidades, 25% e 47,5%, respectivamente [32]. Os fosfolipídios estão distribuídos assimetricamente entre as monocamadas interna e externa da membrana do eritrócito. A fosfatidilserina (PS) e a fosfatidiletanolamina (PE) estão localizadas predominantemente na monocamada interna da membrana [33] enquanto que a PC e a esfingomielina são mais abundantes na monocamada externa [34]. Já o colesterol se distribui uniformemente na bicamada lipídica.

A membrana celular dos eritrócitos apresenta uma grande variedade de proteínas, as quais podem ser classificadas em dois grandes grupos: as integrais e as periféricas [31]. As proteínas integrais, cujas principais são as proteínas da banda 3 e glicoforinas, estão firmemente associadas aos lipídios por conterem cadeias de resíduos de aminoácidos apolares, podendo assim, interagir com as cadeias carbônicas hidrofóbicas dos lipídios. As proteínas periféricas, espectrinas, anquirinas, proteínas da banda 4.1 e actina, estão envolvidas na formação de um extenso retículo submembranar, o citoesqueleto eritrocitário [35]. A interação dessas proteínas com a bicamada lipídica

e com as proteínas integrais é responsável pela flexibilidade e deformabilidade do eritrócito.

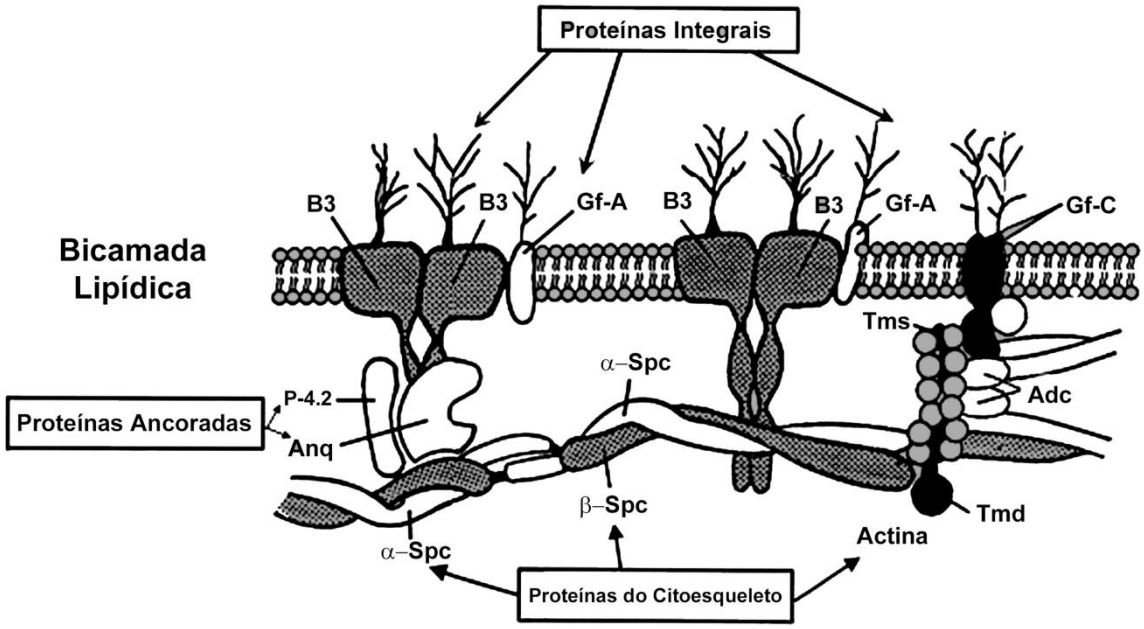


**Figura 4: Modelo esquemático da membrana eritrocitária. Proteínas Integrais; B3: banda 3, Gf-A: glicoforina A, e Gf-C: glicoforina C. Proteínas ancoradas; Anq: anquirina e P-4.2: proteína 4.2. Proteínas do citoesqueleto; α-Spc: α-espectrina, β-Spc: β-espectrina, Adc: aductina, Tms: tropomiosina e Tmd:tropomodulina. Adaptado de [31].**

# 3 Radicais Livres e Consequências Biológicas

## 3.1 Radicais livres

Radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados, sendo desta forma muito instáveis, altamente reativos e com tempo de meia vida curto [36]. A abstração ou ganho de um elétron por uma molécula não radical pode (ou não) convertê-la em espécie radical. Para atingir a estabilidade, essas moléculas precisam adquirir ou perder elétrons e, portanto, reagem com a maioria dos compostos vizinhos [37].

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídios ou ácido desoxirribonucleico (ADN)) está relacionado com o local de sua formação [38]. Em virtude da alta concentração de oxigênio molecular, $O_2$, utilizado no metabolismo de sistemas aeróbicos, os radicais livres originados por reações desta molécula, denominados de espécies reativas de oxigênio (EROs), são os radicais mais importantes em estudos que envolvem sistemas biológicos. Este termo é uma denominação coletiva, não só para radicais livres como também substâncias capazes de reagir quimicamente e gerá-los. As EROs que apresentam maior relevância nos sistemas biológicos são apresentadas na tabela 1:

**Tabela 1: Espécies reativas de Oxigênio (EROs).**

| Radicais | Livres | Não | Radicais |
|---|---|---|---|
| $O_2^{\cdot-}$ | Radical Superóxido | $^1O_2$ | Oxigênio Singleto |
| $HO_2^{\cdot}$ | Radical Hidroperoxila | $H_2O_2$ | Peróxido de Hidrogênio |
| $HO^{\cdot}$ | Radical Hidroxila | $HClO$ | Ácido Hipocloroso |
| $LO^{\cdot}$ | Radical Alcoxila | $O_3$ | Ozônio |
| $LOO^{\cdot}$ | Radical Peroxila | | |

O radical superóxido, $O_2^{\cdot -}$, gerado a partir do oxigênio molecular pela adição de um elétron, é o mais comum e abundante na célula. Sua formação ocorre espontaneamente, especialmente na membrana mitocondrial, através da cadeia respiratória. Por apresentar pouca habilidade de penetração em membranas celulares, este radical permanece no compartimento onde é produzido sendo, portanto, pouco reativo [39].

O radical hidroxila, $HO^{\cdot}$, é considerado a espécie radicalar mais reativa em sistemas biológicos, sendo capaz de causar mais danos que as outras EROs. Por essa razão, o local onde é formado é o mais afetado. Sua formação pode ser dada pela ação de radiações ionizantes, por meio de processo de radiólise da água e por reações envolvendo íons de metais de transição, como, por exemplo, a reação de Fenton (equação 3.1) [40]. Os principais alvos da ação dos radicais hidroxilas são o ADN que sofre danos na suas bases, levando a alterações na expressão genética e os AGPI que sofrem peroxidação.

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + {}^{\cdot}OH + OH^- \qquad (3.1)$$

O peróxido de hidrogênio, $H_2O_2$, não é propriamente um radical livre, mas é uma importante ERO, devido a sua capacidade de gerar o radical $HO^{\cdot}$, principalmente na presença de metais de transição. Este composto possui vida longa e é capaz de atravessar as membranas biológicas, sendo desta forma altamente tóxico para as células [41].

O oxigênio singleto, $^1O_2$, forma excitada do oxigênio tripleto, é uma espécie não radical de meia vida relativamente longa (microsegundos) com elétrons de spins antiparalelos (↑↓). Não possui restrição na transferência de elétrons e reage com facilidade com compostos ricos em elétrons que formam duplas ligações. Pode ser gerado por células fagocitárias, por indução luminosa, e por diversas outras reações, tais como as catalisadas por peroxidases. O oxigênio singleto apresenta alto poder oxidante e é hábil em atacar membranas ricas em AGPI, resíduos de ácidos graxos em proteínas, ADN e carotenóides [42].

A geração destas espécies, radicalares ou não, pode ocorrer durante os processos oxidativos biológicos, dentre os quais se destaca a fosforilação oxidativa, reação que ocorre na mitocôndria e gera energia no organismo dos mamíferos. A molécula de

oxigênio que entra na reação recebe quatro elétrons, reduzindo-se até formar água (equações 3.2 - 3.5). Do oxigênio consumido, parte não é reduzido completamente produzindo EROs como produtos intermediários:

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot -} \quad (3.2)$$

$$O_2^{\cdot -} + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 \quad (3.3)$$

$$H_2O_2 + e^- \rightarrow OH^- + OH^{\cdot} \quad (3.4)$$

$$OH^{\cdot} + e^- + H^+ \rightarrow H_2O \quad (3.5)$$

Além dos radicais livres serem gerados no processo endógeno fisiológico, também são gerados por fontes exógenas, tais como radiação, fumo, poluição, álcool, fármacos, e diversas substâncias tóxicas, como solventes, herbicidas e drogas.

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das EROs. Porém, a membrana celular é um dos mais atingidos decorrendo na peroxidação lipídica. Esta acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade da membrana, provocando a perda da seletividade e da troca iônica e a formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular [41].

## 3.2 Danos oxidativos induzidos por radicais livres

### 3.2.1 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e metabólitos reativos, os então chamados de oxidantes ou EROs, e sua eliminação por meio de mecanismos de proteção, os antioxidantes [43]. Esse desequilíbrio leva a danos de importantes biomoléculas e células, o que causa um grande impacto no organismo. Tais danos oxidativos têm sido relacionados com a etiologia de várias patologias, incluindo aterosclerose, a hipertensão, o mal de Parkinson, a nefropatia, a diabete, a artrite inflamatória, o mal de Alzheimer, a síndrome de Down, doenças cardiovasculares e envelhecimento [1-9].

O conceito de estresse oxidativo não se aplica somente aos seres humanos, animais de laboratório ou células de mamíferos. Vários estudos têm focado na

toxicologia por radicais livres em invertebrados e vertebrados menores, como em plantas, fungos e bactérias. O aumento da formação de radicais solicita uma resposta celular adaptativa através da mobilização ou aumento da biossíntese de antioxidantes endógenos. No entanto, sob certas circunstâncias, o sistema antioxidante é insuficiente para o excesso de radicais livres, levando então, à condição de estresse oxidativo [42].

Os alvos majoritários do estresse oxidativo a nível celular são a membrana (inativação de enzimas e alterações do transporte transmembranar), o citoplasma e seus constituintes (proteínas e lipídios) e, principalmente, o ADN do núcleo das células eucarióticas (mutagênese) [44].

### 3.2.2 Peroxidação lipídica (LPO)

Uma das principais consequências do estresse oxidativo é a LPO. Esta tem recebido uma atenção especial em diversas áreas do conhecimento, como na química, na bioquímica, na biologia, na nutrição e na medicina. Estudos revelaram que, como proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos, lipídios também são alvos de várias EROs, e oxidado, gera uma diversificada gama de produtos [45].

Os principais alvos da LPO são os lipídios ricos em AGPI, fazendo da bicamada lipídica o componente celular mais atingido, sofrendo alterações em sua estrutura e permeabilidade. A presença das duplas ligações carbono-carbono dos AGPI enfraquece as ligações carbono-hidrogênio dos grupos metilenos, o que facilita a abstração do átomo de hidrogênio pelos radicais livres.

A LPO consiste de uma reação em cadeia, a qual pode ser representada por três etapas: iniciação, propagação e terminação, cuja sequência de reações está esquematizada abaixo, onde L representa um lipídio poliinsaturado da membrana celular:

Iniciação: $$LH \rightarrow L^{\cdot} + H^{\cdot} \quad (3.6)$$

Propagação: $$L^{\cdot} + O_2 \rightarrow LOO^{\cdot} \quad (3.7)$$

$$LOO^{\cdot} + LH \rightarrow L^{\cdot} + LOOH \quad (3.8)$$

Terminação: $$LOO^{\cdot} + L^{\cdot} \rightarrow LOOL \quad (3.9)$$

$$LOO^{\cdot} + LOO^{\cdot} \rightarrow LOOL + O_2 \quad (3.10)$$

O processo de LPO se inicia com o sequestro do hidrogênio do AGPI (LH) da membrana celular, formando o radical lipídico ($L^{\cdot}$). Este, por sua vez, reage com o oxigênio molecular resultando em um radical peroxila ($LOO^{\cdot}$), o qual na presença de outro lipídio (LH) forma o lipídio hidroperóxido ($LOOH$) e outro radical lipídico ($L^{\cdot}$). O término do processo ocorre quando os radicais lipídicos ($LOO^{\cdot}$ e $L^{\cdot}$) se combinam e formam um lipídio não radical.

Sob condições que envolvem amostras biológicas, os lipídios são degradados em vários produtos, incluindo alcanos, alcenos, hidroxialcenos, cetonas, aldeídos, entre outros [46]. A identificação e mensuração desses compostos são importantes como índices de LPO [47]. Um dos resultados dessa reação é a produção de MDA em tecidos submetidos à peroxidação dos AGPI dentro das membranas fosfolipídicas [48].

Um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres e consequentemente contra a LPO são moléculas que em pequenas quantidades atuam interferindo nos processos de oxidação dos lipídios, evitando ou interrompendo a cadeia de reações, conhecidas como antioxidantes.

# 4 Sistemas Antioxidantes

Antioxidantes são compostos capazes de neutralizar os radicais livres, inibindo ou retardando a sua ação de oxidação. O primeiro envolve a inibição da formação dos radicais que possibilitam a etapa de iniciação do processo de LPO. Enquanto que o segundo abrange a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como $LO^{\cdot}$ e $LOO^{\cdot}$, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia [49].

Os antioxidantes estão em constante atividade nos organismos vivos, necessitando estar em quantidades suficientes para neutralizar os efeitos tóxicos dos radicais livres que são constantemente produzidos [50]. Pode-se classificar os antioxidantes em dois grandes grupos, enzimáticos e os não enzimáticos.

O sistema enzimático é uma forma de intercepção que atua como detoxificadora de agente oxidantes antes que estes causem lesões. A intercepção enzimática é realizada por um conjunto de enzimas que são produzidas endogenamente pelo organismo, dentre as quais se podem destacar: a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa (GSH) e a glutationa peroxidase (GPx) [51]. Já o sistema não enzimático pode ser de origem endógena ou exógena, mas independente da origem, eles apresentam uma grande capacidade de defesa, atuando de maneira direta ou indireta, a fim de manter o equilíbrio celular. As ações destes compostos são principalmente a de neutralizar radicais, quelar metais e bloquear a ação de espécies reativas, principalmente as EROs [40]. Estão incluídos neste grupo, o α-tocoferol, β-caroteno, ubiquinol-10, bilirrubina, licopeno, flavonóides, urato, ascorbato, entre outros [51].

Para que uma substância seja considerada um bom antioxidante é necessário que apresente algumas características essenciais, tais como: capacidade de extinguir espécies reativas ou contribuir para que isso ocorra, interagir com outros antioxidantes (sinergismo), ser de fácil absorção, caso seja um antioxidante adquirido de forma exógena, ter uma concentração em tecidos e biofluídos a um nível fisiologicamente pertinente, conseguir se agregar a membrana e, efetivamente, evitar danos por espécies reativas.

Hoje, já se conhece excelentes antioxidantes e estes podem ser divididos em duas categorias básicas, nomeadas de sintéticos e naturais. Antioxidantes sintéticos são comumente utilizados para preservação de alimentos. A deterioração de óleos e

gorduras nos alimentos é responsável pelos odores e sabores rançosos, com consequente diminuição na qualidade nutricional e segurança, causados pela formação de compostos secundários, potencialmente tóxicos. A adição de antioxidantes é necessária para preservar o sabor e cor dos alimentos e evitar a destruição das vitaminas. Entre os antioxidantes sintéticos, os mais usados para preservar os alimentos são o butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), galato de propila (PG) e *terc*-butil hidroquinona (TBHQ). No entanto, o uso desses compostos tem sido relacionado a vários riscos para a saúde, devido a sua toxicidade e propriedade carcinogênica [52,53]. Por isso, há uma crescente busca por antioxidantes naturais como forma de substituir os antioxidantes sintéticos.

Os antioxidantes naturais estão presentes principalmente nas plantas e vegetais. Entre estes, os mais ativos e frequentemente encontrados são os compostos fenólicos ou polifenóis. A atividade antioxidante desses compostos está atribuída principalmente as suas propriedades redox, que lhes permitem agir como agentes redutores, doadores de hidrogênio e supressores de oxigênio singleto [54]. Os compostos fenólicos são os maiores e mais diversos metabolitos secundários das plantas. São formados por diversas hidroxilas ligadas a anéis aromáticos e podem ser classificados em diferentes grupos em função do número de anéis fenóis que eles contem e dos elementos estruturais que ligam esses anéis um ao outro [55]. Tais grupos são divididos em flavonóides e não flavonóides, sendo ambos, compostos de baixo peso molecular.

Os flavonóides (Figura 5) constituem um numeroso e poderoso grupo de antioxidantes e estão presentes principalmente em frutas, verduras, temperos e chás. Sua estrutura química básica consiste de dois anéis aromáticos (A e B) ligados por uma cadeia de 3 átomos de carbono que formam um heterociclo oxigenado (anel C). Em função do tipo de heterociclo envolvido, os flavonóides podem ser divididos ainda em 6 subclasses: flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas, e flavanóis [55] (Figura 6).

Os flavanonas possuem um carbonila no carbono 4, enquanto que os flavonas além desta carbonila apresenta uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3. Já os flavonóis possuem o carbonila no carbono 4, a dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 e ainda um grupo hidroxila no carbono 3. Os flavanóis apresentam apenas o hidroxila no carbono 3. Os antocianidinas são constituídos pelo grupo hidroxila na posição 3 e duas duplas ligações, uma entre o átomo de oxigênio e o carbono 2 e outra entre os carbonos 3 e 4. Os isoflavonas possuem o grupo carbonila na posição 4 e o anel B encontra-se

ligado a restante molécula através do carbono 3, podendo ainda possuir uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3.

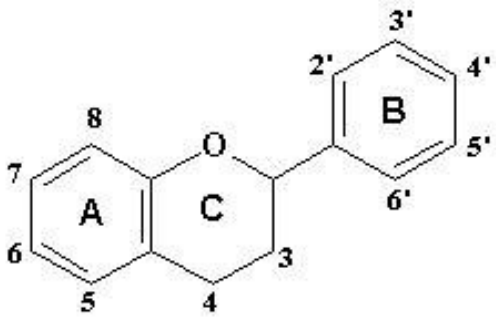


**Figura 5: Estrutura química básica dos flavonóides.**

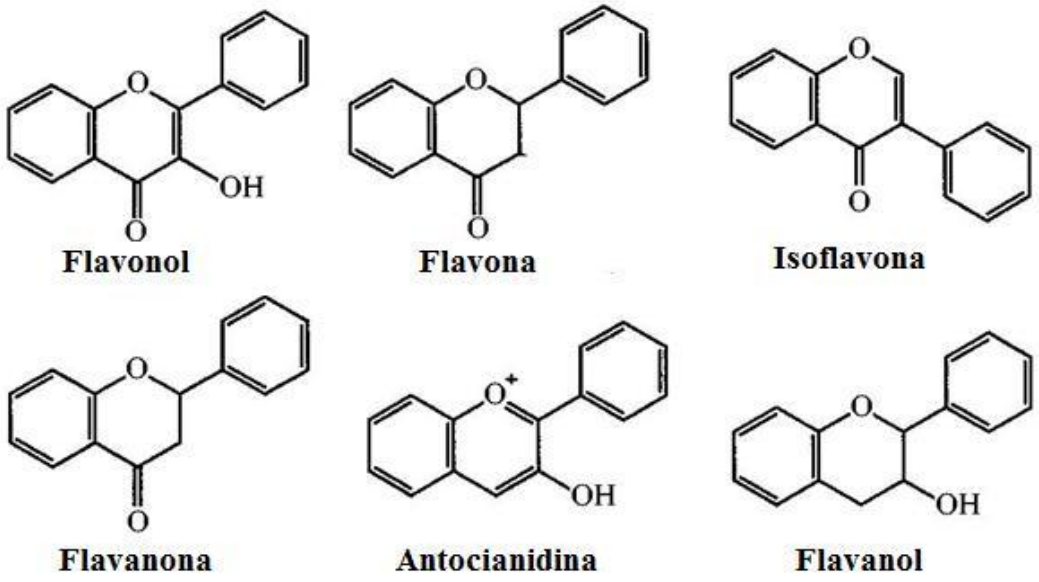


**Figura 6: Estrutura química das várias subclasses de flavonóides. Adaptado de [56].**

Na tabela abaixo encontram-se algumas substâncias que constituem estes grupos de flavonóides:

**Tabela 2: Exemplos de substâncias que constituem as subclasses de flavonóides.**

| Grupos | Substâncias |
|---|---|
| Flavonóis | Quercetina<br>Kaempferol |
| Flavonas | Apigenina<br>Luteoleína |
| Isoflavonas | Genisteína<br>Coumestrol |
| Flavanonas | Miricetina<br>Hesperidina |
| Antocianidinas | Cianidina<br>Petunidina |
| Flavanóis | (+)-Catequina<br>(-)-Epicatequina |

A ação antioxidante dos flavonóides depende de sua estrutura química. Segundo [57], a presença do grupo *orto*-catecol no anel B é determinante para uma alta capacidade antioxidante. Capacidade esta, que também está associada a presença da ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 e ao grupo hidroxila no carbono 3.

Os compostos fenólicos não flavonóides são classificados como: os derivados das estruturas químicas C6-C1 específicas dos ácidos hidroxi-benzóicos, gálico e elágico; os derivados das estruturas químicas C6-C3 específicas dos ácidos cafeico e p-cumárico hidroxicinamatos e os derivados das estruturas químicas C6-C2-C6 específicas do trans-resveratrol, cis-resveratrol e trans-resveratrol-glucosídio [58].

Dentro do grupo dos não flavonóides, os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos hidroxi-benzóicos e hidroxicinamatos) são os mais abundantes. Estas substâncias caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupo carboxílico e um ou mais

grupos hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo as suas propriedades antioxidantes (Figura 7).

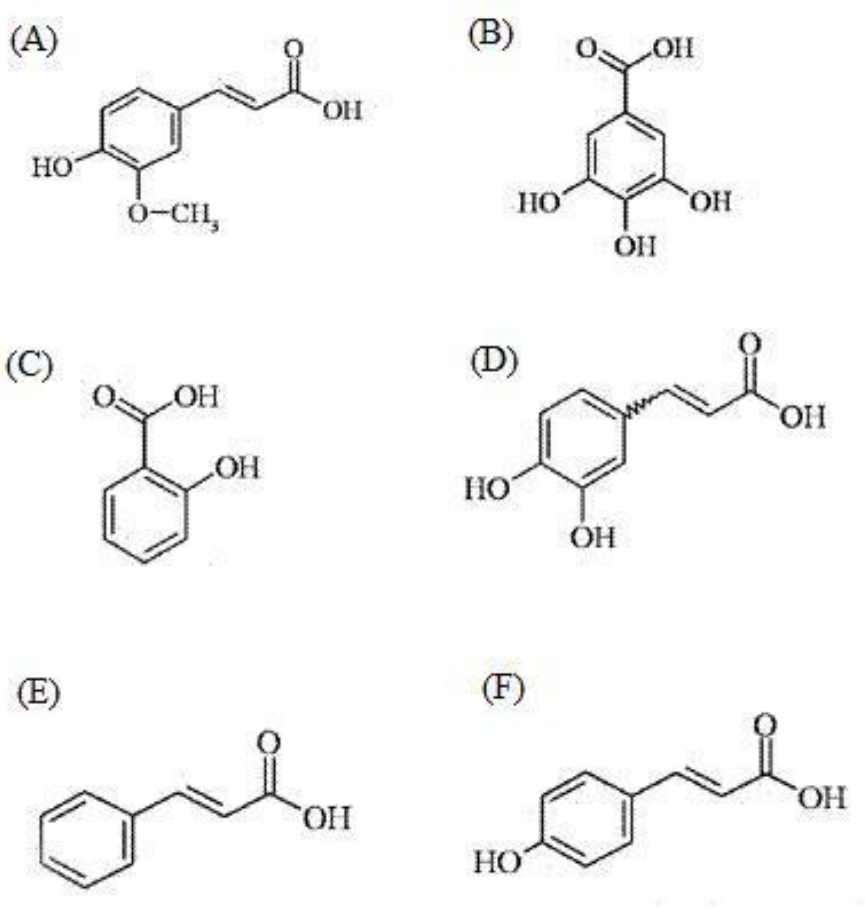


**Figura 7: Estrutura molecular de alguns ácidos fenólicos: ácido ferúlico, (A), ácido gálico, (B), ácido salicílico, (C), ácido cafeico, (D), ácido $\gamma$-cinâmico, (E), ácido *p*-cumárico, (F). Adaptado de [59].**

# 5 4 – Nerolidilcatecol

Nos últimos anos, houve um considerável crescimento do uso de produtos naturais com potencial terapêutico, especialmente os derivados das plantas. Tamanho interesse se dá por diversas razões, dentre os quais temos: que a medicina convencional muitas vezes é ineficiente e abusiva, o uso de drogas sintéticas pode resultar em diversos efeitos colaterais e outros problemas, além de que uma grande porcentagem da população mundial não tem acesso ao tratamento farmacológico convencional [60].

O Brasil, com a grandeza de seu litoral, de sua flora e, sendo o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, não pode abdicar de sua vocação para produtos naturais [61]. Dentre as plantas que apresentam interesse terapêutico e que podem ser encontradas no Brasil, estão as do gênero *Pothomorphe*, da família *Piperaceae*, mais precisamente, a *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.(*P. umbellata*) e *Pothomorphe peltata* (L.) Miq.(*P. peltata*).

A espécie *P. Umbellata,* conhecida no Brasil como "caapeba", "caapeba do norte", ou "pariparoba" é uma planta nativa da Mata Atlântica Brasileira [62]. Tem sido usada como analgésico, diurético, agente anti-espasmódico e no tratamento de uma variedade de doenças, incluindo desordens inflamatórias, malária, asma e doenças gastrointestinais. Pode atingir até 1,5 m de altura, possuindo folhas grandes arredondadas, com ramos finos e pequenas flores cônicas com no máximo 10 cm de comprimento [63] (Figura 8).

**Figura 8: *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq [64].**

O extrato da raiz e folhas da *P. umbellata* demonstrou uma significante atividade antioxidante, a qual foi atribuída ao 4-NC [65], principal metabólito secundário desta planta [66]. Este composto, de fórmula molecular $C_{21}H_{30}O_2$, é um catecol prenilado [67] de aspecto oleoso e que apresenta uma coloração amarelo ouro. Sua estrutura molecular está representada abaixo (Figura 9).

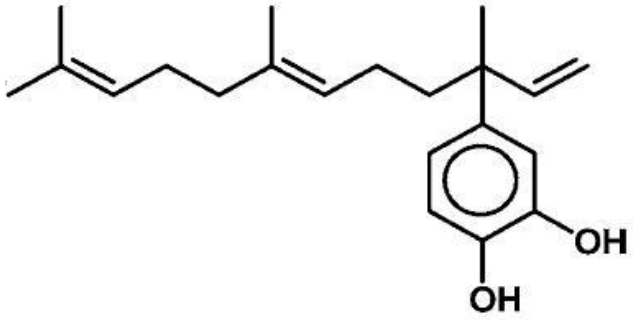


**Figura 9: Estrutura química da molécula de 4-nerolidilcatecol [68].**

O 4-NC foi isolado, pela primeira vez, a partir do extrato hexânico [67], o qual apresentava também vários fenilpropanoides tais como apiol [69], dilapiol [70] e o sesquiterpeno nerolidol. Desde então, diversas outras substâncias foram identificadas em muitos extratos polares [71]: dímeros de catecol (peltatol A) [72]; aristolactamas (piperumbelactama D e E) [73] e substâncias flavonóides.

Alguns estudos farmacológicos têm demonstrado que o 4-NC pode ser usado no tratamento de várias enfermidades. O uso na medicina popular se deve à sua atividade antimalárica [74,75], antimicrobiana [76], antifúngica [73], citotóxica [77], antiflamatória e analgésica [63] e fotoprotetora [78].

Hoje, já se sabe que o 4-NC apresenta, além de todas as apresentadas acima, uma significativa atividade antioxidante. Talvez essa seja a principal característica atribuída a esta molécula e a mais estudada atualmente. Barros *et al.* [13] avaliaram a atividade antioxidante in vitro do extrato etanólico da raiz e das folhas da *P. umbellata*. Teste de formação de MDA e quimiluminescência (QL) foram os parâmetros empregados para avaliar a autoxidação espontânea dos homogenatos de cérebro. Os resultados demonstraram uma importante atividade na prevenção da peroxidação lipídica dos homogenatos, a qual foi atribuída ao 4-NC. Este apresentou uma atividade

antioxidante superior a do composto α-tocoferol, molécula bastante conhecida na literatura usada como referência nos estudos de antioxidantes.

O potencial antioxidante do 4-NC foi confirmado por Desmarchelier *et al.* [14], o qual demonstrou que o 4-NC e extratos metanólicos de *P. umbellata* podem sequestrar os radicais peroxilas e hidroxilas. As propriedades antioxidantes dos fenóis são devido aos grupos hidroxilas e fenólicos presentes em sua estrutura química. No entanto, a maior atividade antioxidante observada para o 4-NC, quando comparado com o α-tocoferol, de sequestrar radicais peroxilas, pode ser atribuída também à presença da cadeia alifática insaturada [13, 14].

# 6 Objetivos

Visando estudar os efeitos antioxidantes do 4-NC, este trabalho tem como principais objetivos:

- O aprimoramento do teste do ácido 2-tiobarbitúrico para avaliar a proteção do 4-NC contra a peroxidação lipídica;

- Avaliar o potencial antioxidante do 4-NC na membrana modelo de EPC e membrana de eritrócito através das técnicas de espectrofotometria e RPE. Neste último utilizando o Método de Marcadores de Spin;

- O estudo da atividade antioxidante do 4-NC em solução metanólica, testando assim sua capacidade de reduzir o radical DPPH.

# 7 Espectrometria de Absorção Molecular no Utravioleta/Visível (EAM UV/Vis)

## 7.1 Fundamentos da EAM UV/Vis

A Espectrometria de Absorção Molecular na região do Ultravioleta/Visível (EAM UV/Vis) é uma técnica analítica amplamente usada há mais de 50 anos. Este é um dos métodos mais empregado para análise quantitativa de muitas espécies moleculares orgânicas, inorgânicas e bioquímicas, devido a sua robustez, custo relativamente baixo e pelo grande número de aplicações desenvolvidas [79].

A técnica de EAM UV/Vis é baseada na propriedade das espécies iônicas ou moleculares de absorverem determinados comprimentos de onda da radiação eletromagnética UV/Vis. No processo de absorção da radiação, a energia dos fótons é transferida para as moléculas do meio em análise para provocar transições eletrônicas associadas a transições vibracionais e rotacionais. Tendo em vista que os níveis energéticos das moléculas são quantizados, apenas aqueles comprimentos de onda cujos fótons têm energia idêntica à de uma transição permitida são absorvidos. Assim, a absorção de energia pode ser considerada como um processo específico relacionado com a estrutura da espécie absorvente, a qual determina a energia envolvida na transição, e com a probabilidade de que esta ocorra [80].

## 7.2 Lei de Lambert-Beer

A EAM UV/Vis é fundamentada na lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético [81]. A intensidade da absorção não é diretamente mensurável, mas ela determina uma atenuação da radiação que incide na amostra que pode ser medida e relacionada com a concentração da espécie absorvente.

Quando um feixe de radiação monocromática atravessa uma solução contendo uma espécie absorvente, uma parte da energia radiante é absorvida, a parte restante

atravessa o meio. Chama-se de potência radiante, a quantidade de energia transportada por segundo através de uma unidade de seção transversal. A razão entre a potência da radiação transmitida ($P$) e a potência da radiação incidente ($P_o$) é denominada transmitância (T), equação, que representa, portanto, a fração da potência da radiação incidente que é transmitida pela solução [80].

$$T = \frac{P}{P_o} \tag{7.1}$$

A absorbância A de uma solução corresponde ao inverso do logaritmo decimal da transmitância. Para medidas de absorção de radiação em determinado comprimento de onda tem-se:

$$A = -logT = log\frac{P_o}{P} = \varepsilon bc, \tag{7.2}$$

onde $\varepsilon$ é a absortividade molar (coeficiente de extinção molar) do analito, b é o comprimento do percurso óptico e c é a concentração da substância absorvente. A absortividade molar é característica de uma substância, e indica qual a quantidade de luz que é absorvida num determinado comprimento de onda. É expressa em $M^{-1}cm^{-1}$, tornando o produto $\varepsilon bc$ adimensional.

A obediência estrita à lei de Beer é observada apenas com radiação verdadeiramente monocromática. Infelizmente o uso da radiação restrita a um único comprimento de onda quase nunca é prático, porque dispositivos que isolam partes do espectro de uma fonte contínua produzem uma banda mais ou menos simétrica de comprimentos de onda em torno daquele desejado [79].

## 7.3 O espectrofotômetro

Um espectrofotômetro, instrumento para medir a absorção de radiação UV/Vis, é constituído por uma ou mais fontes, um monocromador e um detector. Para o propósito de medidas de absorção molecular, necessita-se de uma fonte contínua cuja potência não varie bruscamente em uma faixa considerável de comprimento de onda.

Em um espectrofotômetro UV/Vis típico há duas fontes de luz: uma que emite radiação eletromagnética na região UV do espectro, geralmente de deutério, e outra usada para emissão de comprimentos de onda na região visível do espectro, normalmente de tungstênio. A troca entre as lâmpadas de deutério e tungstênio é feita em torno de 360 nm, de forma que esteja usando sempre a fonte mais intensa [82].

O monocromador é uma rede de difração e sua função é selecionar uma estreita faixa de comprimentos de onda do feixe incidente. A luz "monocromática" passa pela amostra de caminho óptico b, e a energia radiante da luz emergente é então medida. Em geral, o detector é um tubo fotomultiplicador, apesar de serem usados também fotodiodos em instrumentos mais modernos [83,84].

Em comum com os outros elementos ópticos de um instrumento de absorção, as células, ou cubetas, que contêm a amostra e o solvente precisam ser construídas com um material que deixe passar radiação na região espectral de interesse. Assim, necessita-se de quartzo ou sílica fundida para se trabalhar na região UV (abaixo de 350 nm); ambas as substâncias são transparentes na região visível. Recipientes de plástico têm aplicação na região visível. A qualidade de dados de absorbância depende fundamentalmente do modo como as células casadas são usadas e mantidas. Impressões digitais, gordura ou outros depósitos nas paredes alteram significativamente as características de transmissão de uma célula [79].

Muitos espectrofotômetros modernos são baseados em um projeto de feixe duplo. Um feixe passa através da solução-referência até um fototransdutor e o outro atravessa simultaneamente a amostra até o segundo fotodetector casado. As duas saídas são amplificadas e sua razão (ou logaritmo da razão) é determinada eletronicamente e exibida em um dispositivo de leitura. A Figura 10 mostra detalhes da construção de um espectrofotômetro de feixe duplo UV/Vis típico. Nesse instrumento, a radiação é dispersa por uma rede côncava, que também focaliza o feixe em um espelho giratório de setores. São instrumentos apropriados para trabalhos quantitativos, nos quais a aquisição do espectro todo nem sempre é necessária [79].

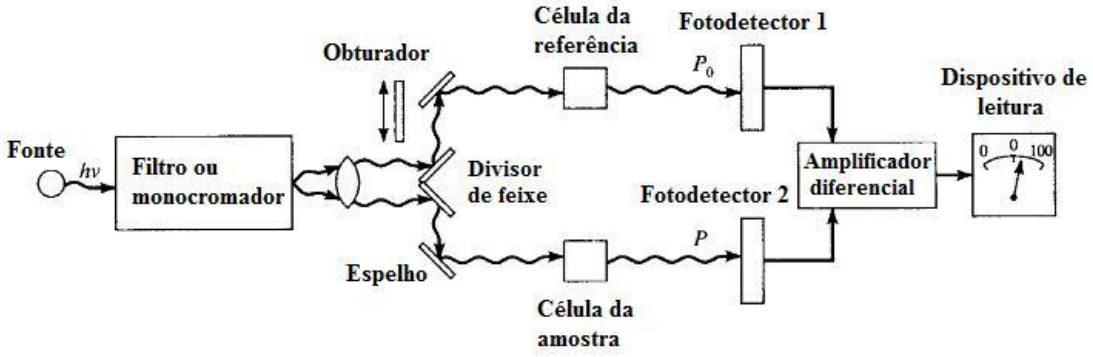


**Figura 10: Sistema esquemático de um espectrofotômetro de feixe duplo adaptado de [79].**

## 7.4 A natureza das transições eletrônicas

A absorção de radiação UV/Vis geralmente resulta da excitação de elétrons de ligação; como consequência, os comprimentos de onda dos picos de absorção estão relacionados com os tipos de ligações nas espécies em estudo. A EAM UV/Vis é, portanto, valiosa para identificar grupos funcionais em uma molécula. Mais importantes, no entanto, são as aplicações da EAM UV/Vis na determinação quantitativa de compostos contendo grupos absorventes.

Quando uma radiação contínua passa através de um material transparente, uma parte da radiação pode ser absorvida. Se isso ocorrer, a radiação residual produzirá um espectro denominado de espectro de absorção. Como resultado da absorção de energia, átomos ou moléculas passam de um estado de menor energia (estado fundamental ou inicial) para um estado de maior energia (estado excitado) (Figura 11). A radiação eletromagnética que é absorvida tem energia exatamente igual à diferença de energia entre o estado excitado e o fundamental.

No caso da espectroscopia UV/Vis, as transições que resultam na absorção da radiação eletromagnética nessa região do espectro são transições entre níveis de energia eletrônicos. Quando uma molécula absorve energia, um elétron é transferido de um orbital ocupado para um orbital desocupado de energia potencial maior. Os orbitais moleculares associados com ligações simples são designados por orbitais sigma (σ) e os elétrons correspondentes são elétrons σ. A distribuição de densidade de carga de um orbital σ é rotacionalmente simétrica em relação ao eixo de ligação. Os orbitais π são formados pela superposição paralela de orbitais *p* atômicos. Sua distribuição de carga é

caracterizada por um plano nodal (região de densidade de carga baixa) ao longo do eixo de ligação e densidade máxima em regiões acima e abaixo do plano. Há ainda os orbitais não ligantes, designados pelo símbolo *n* e os orbitais antiligantes σ* e π* (Figura 12). As energias dos vários tipos de orbitais moleculares diferem significativamente (Figura 13(A)). Quase sempre o nível de energia de um elétron não ligante situa-se entre os níveis de energia dos orbitais σ e π ligantes e antiligantes [79].

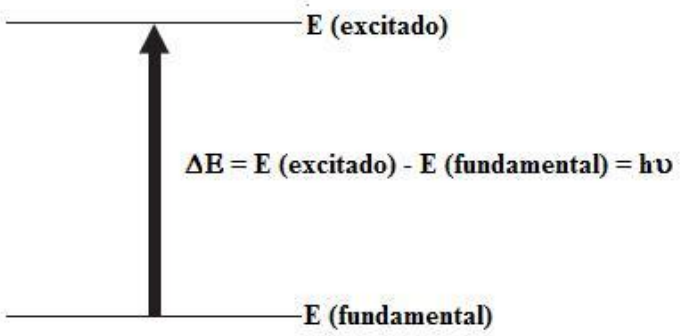


**Figura 11: Esquema ilustrativo do processo de excitação de um elétron após absorver radiação eletromagnética. Adaptado de [85].**

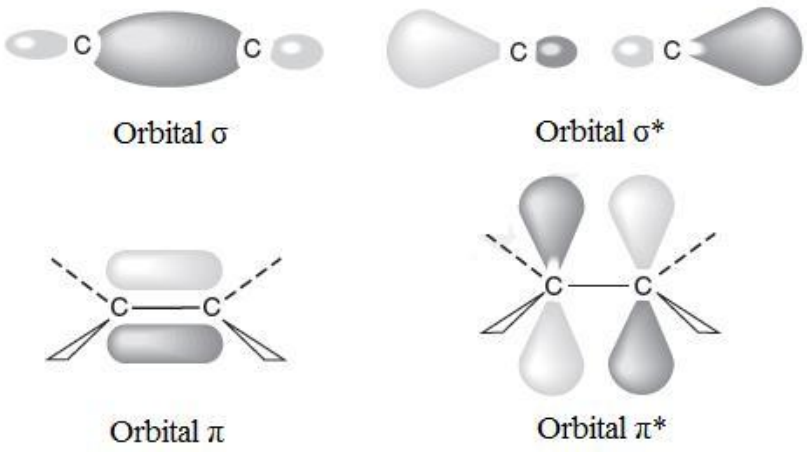


**Figura 12: Os orbitais moleculares adaptados de [85].**

Há diversas transições possíveis entre os níveis de energia, pelas quais os elétrons podem passar. As mais importantes são: transições σ → σ*, que ocorre em alcanos; transições *n* → σ*, em compostos contendo oxigênio, nitrogênio, enxofre e

halogênio; transições $n \rightarrow \pi^*$, em compostos carbonílicos e transições $\pi \rightarrow \pi^*$, em alcenos, compostos carbonílicos, alcinos, compostos azo, entre outros [85]. A Figura 13(B) ilustra essas transições.

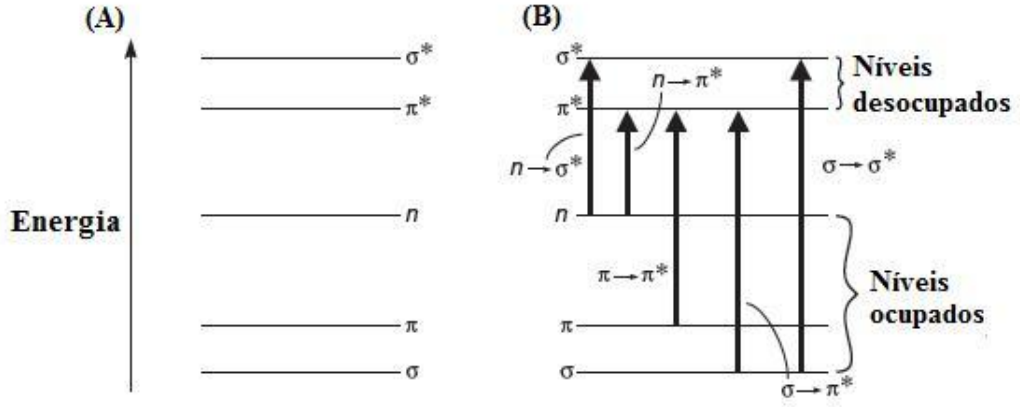


**Figura 13: Os níveis de energia e as transições eletrônicas permitidas. Adaptado de [85].**

A maioria das aplicações da espectroscopia de absorção a compostos orgânicos está baseada em transições de elétrons *n* ou π para o estado π*, pois as energias necessárias para esses processos situam-se em uma região espectral experimentalmente conveniente (200 a 700 nm). Ambas as transições requerem a presença de um grupo funcional insaturado para fornecer os orbitais π.

Uma diferença característica entre estes dois tipos de transições é o efeito exercido pelo solvente sobre o comprimento de onda dos picos de absorção. Picos associados a transições $n \rightarrow \pi^*$ geralmente são deslocados para comprimentos de ondas menores ao aumentar a polaridade do solvente. Esse tipo de deslocamento é conhecido como deslocamento hipsocrômico ou deslocamento para o azul. Normalmente, uma tendência oposta é observada para transições $\pi \rightarrow \pi^*$. Neste caso ocorre um deslocamento batocrômico ou deslocamento para o vermelho [79]. Esses fenômenos estão intimamente associados à natureza dos cromóforos, átomos ou grupos de átomos associados a uma molécula que possuem características bem definidas de absorção de radiação eletromagnética, presente nas moléculas. Tais grupos são insaturados e contêm elétrons de valência com energias de excitação relativamente baixas.

# 8 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

A espectroscopia de RPE, também conhecida como Ressonância de Spin Eletrônico (RSE), é uma técnica física que permite a detecção e caracterização de moléculas com elétrons desemparelhados sem alterar ou destruir as moléculas. Esta é uma forma de espectroscopia muito útil ao estudo de estruturas e dinâmicas moleculares. Pode ser aplicada a moléculas biológicas fornecendo informações a respeito de mudanças químicas e estruturais do sistema bioquímico [86].

O método de RPE foi descoberto em 1945 por Evgeniy K. Zavoisky em Kazan na União Soviética e confirmado independentemente por Halliday e Cummerow nos Estados Unidos poucos meses depois [87]. Desde aquele tempo, a RPE tem-se mostrado uma eficiente técnica para o estudo de diversos sistemas físicos, químicos e biológicos. Isso se explica por ser uma técnica sensível, não destrutiva e necessitar apenas de uma pequena quantidade de amostra para obter o sinal de RPE. Radicais livres e compostos biológicos contendo elementos de transição tornaram os tipos de moléculas com elétrons desemparelhados mais investigados por RPE em pesquisas biológicas.

## 8.1 O espectrômetro de RPE

Qualquer espectrômetro envolve três elementos básicos: uma fonte de radiação, uma amostra, a qual absorve parte da radiação, e um detector que mede a intensidade da radiação transmitida. A fonte de radiação normalmente usada é uma válvula osciladora conhecida como Klystron. Klystrons são tubos de vácuo conhecidos por serem fontes estáveis de microondas de alta potência, as quais apresentam pouco ruído, o que lhe dá uma alta sensibilidade. Em um espectrômetro típico o Klystron está ligado a um circulador por meio de um isolador e um atenuador variável.

O circulador é um dispositivo não recíproco, ou seja, possui propriedades distintas para ondas incidentes no sentido direto ou reverso. Este é utilizado para direcionar a microonda para a amostra e o sinal refletido da amostra para o detector. O

isolador é um dispositivo que atenua fortemente os sinais em um sentido e, no sentido contrário apresenta baixa atenuação. Deste modo, os sinais refletidos pela ponte são impedidos de retornar a Klystron prevenindo a instabilidade nas oscilações. Após o isolador, tem-se o atenuador variável, o qual bloqueia o fluxo de microondas, sendo possível assim, controlar a intensidade de microondas que atingirá a amostra [88].

A onda eletromagnética produzida pela fonte, a qual pode ser contínua ou pulsada, é conduzida por meio de uma guia de onda. A amostra é colocada dentro de uma cavidade ressonante que consiste de uma caixa metálica, normalmente com seu interior banhado a ouro, com dimensões que permitem obter um valor mínimo para a componente do campo elétrico da radiação eletromagnética incidente na amostra, e um valor máximo para a componente magnética [89]. Para o bom desempenho de uma cavidade ressonante é necessário que esta esteja sintonizada com a frequência do oscilador, a amostra está localizada em uma região de campo magnético intenso e não haver materiais com forte absorção dielétrica na região do campo elétrico. A guia de onde se acopla à cavidade por meio de aberturas na parede da mesma, chamadas de íris.

A cavidade encontra-se entre duas bobinas geradoras do campo de modulação. O eletroímã produz o campo magnético e a varredura do campo. O campo magnético estático na amostra deve ser homogêneo e constante. A estabilidade do campo é realizada por uma fonte de alimentação altamente regulada. A maioria dos sistemas modernos usa um dispositivo sensível ao campo magnético tais como um cristal de efeito Hall para a estabilização do campo. A tensão de saída de um cristal Hall é uma função linear do campo magnético e é usada não só para estabilizar o campo, como também para permitir varreduras lineares [90]. O eletroímã deve ter sua temperatura constante para um melhor desempenho. Devido a isso, são utilizados sistemas de refrigeração à água para uma proteção maior contra o aquecimento excessivo das bobinas.

O sistema de detecção de um espectrômetro é sensível à fase e utiliza um diodo detector para medir a intensidade da microonda. O detector age como um retificador de microondas, convertendo a microonda em corrente contínua. Esta conversão é acompanhada por um ruído considerável. Para que haja uma melhora na relação sinal-ruído, um campo magnético alternado, o campo de modulação, é adicionado ao campo estático, limitando assim, as contribuições de ruído muito próximas à frequência de modulação. Para que isso ocorra na detecção em RPE, duas bobinas de Helmhotz impulsionadas por um oscilador são colocadas, uma em cada lado da cavidade, de modo

que um campo magnético de pequena amplitude em uma frequência, normalmente igual a 100 KHz, sobrepõe-se ao campo [88,90].

Quando a amostra está em ressonância ou próxima desta, uma componente do sinal detectado será modulada nesta frequência. Esse sinal é amplificado em um amplificador de bandas estreitas, a saída deste serve como uma entrada para o detector sensível à fase; a outra entrada é uma parte do sinal vindo das bobinas de modulação. A saída filtrada do detector sensível à fase é proporcional tanto à amplitude como a diferença de fase dos dois sinais de entrada [90]. Todo o sistema de detecção está interligado a um computador que permite ao usuário monitorar as condições operacionais do equipamento e a registrar o espectro. A Figura 14 (sistema de blocos) mostra como a microonda segue da fonte até o detector.

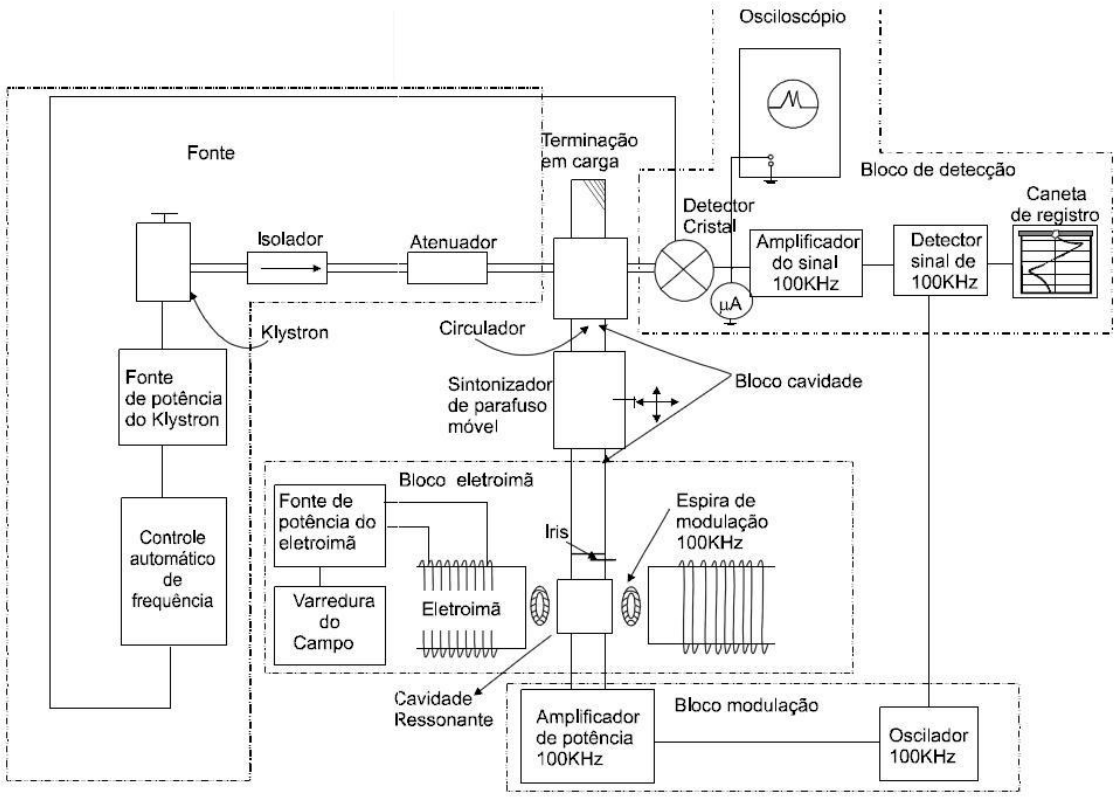


**Figura 14: Diagrama de blocos de um espectrômetro de RPE típico de banda X operando em um campo de modulação equivalente a 100 KHz. Adaptado de [88].**

## 8.2 Fenômeno de Ressonância e o efeito Zeeman

Espectroscopia de RPE, como todas as outras formas de espectroscopias, monitora a absorção líquida de energia a partir de uma radiação eletromagnética (microonda) quando as moléculas mudam seu estado de energia. Associados à microonda está o campo elétrico e o magnético oscilantes e perpendiculares entre si. Em várias formas de espectroscopias é a componente do campo elétrico que interage com as moléculas para causar a mudança no estado energético. A energia necessária para atingir essas transições é absorvida na forma de quanta de luz. Para que a absorção ocorra, duas condições devem ser seguidas:

1 – O pacote de energia contido no quantum de luz (hν) precisa corresponder à separação (ΔE) entre os níveis de energia, entre os quais ocorre uma transição, ou seja,

$$h\upsilon = \Delta E. \tag{8.1}$$

Relação conhecida como condição de ressonância.

2 – A componente magnética (ou elétrica) oscilante da luz precisa ser capaz de estimular um dipolo magnético (ou elétrico) oscilante na molécula. Se essa condição é satisfeita, então dizemos que a transição é permitida [90].

Se uma molécula contém um dipolo magnético, deve-se esperar uma interação com a componente magnética da radiação eletromagnética. Tais absorções são de fato observadas, mas somente na presença de um campo magnético estático. Os dipolos magnéticos em uma molécula estão associados tanto com os elétrons quanto com os núcleos. A espectroscopia de RPE lida principalmente com os dipolos magnéticos do elétron. Dois tipos de dipolos magnéticos são possíveis, um surgindo do movimento dos elétrons sobre o núcleo de um átomo (dipolo magnético orbital), e o outro do hipotético giro do elétron em torno do seu eixo (dipolo magnético do spin). Na maioria dos casos encontrados, mais de 99% dos dipolos magnéticos se devem ao momento angular de spin, com uma pequena contribuição orbital [91].

Dipolos magnéticos são usualmente caracterizados por uma quantidade conhecida como momento de dipolo magnético ($\hat{\mu}$), o qual é definido em termos da interação de um dipolo magnético com um campo magnético. O momento magnético e o momento angular são proporcionais tanto na mecânica clássica quanto na mecânica quântica.

Quando um campo magnético externo $\boldsymbol{H}$ é aplicado sobre um material paramagnético, os momentos de dipolo dos spins tenderão a se orientar na direção do campo, paralela ou antiparalelamente a este. Estas duas situações apresentam energias diferentes, sendo o primeiro conhecido como estado de spin "up" e o segundo como estado de spin "down". O operador Hamiltoniano que descreve a energia deste sistema é

$$\hat{\mathrm{H}} = -\boldsymbol{H} \cdot \hat{\boldsymbol{\mu}}. \tag{8.2}$$

O momento de dipolo magnético eletrônico pode ser expresso em termos de seu momento angular intrínseco ou spin ($\hat{S}$);

$$\hat{\boldsymbol{\mu}} = -\frac{ge\hbar}{2mc}\hat{\boldsymbol{S}} = \gamma\hbar\hat{\boldsymbol{S}} = -g\beta\hat{\boldsymbol{S}} \tag{8.3}$$

onde $\gamma = -ge/2mc$ é a razão giromagnética, $g = 2{,}00232$ para o elétron livre, $m$ é a massa do elétron, $c$ a velocidade da luz, $\beta = e\hbar/2mc$ é o magnéton de Bohr. Substituindo (8.3) em (8.1), pode-se escrever o hamiltoniano de Zeeman em função do spin do elétron desemparelhado (equação 8.4).

$$\hat{\mathcal{H}} = g\beta\boldsymbol{H}.\hat{S} \tag{8.4}$$

Na presença de um campo magnético aplicado, os spins do elétron experimentam um torque, o qual o induz a efetuar um movimento de precessão em torno do campo com uma frequência bem definida. Este movimento de rotação, análogo ao movimento de precessão de um pião na presença do campo gravitacional da Terra, é denominado precessão de Larmor. A frequência de precessão depende das características físicas do elétron e da intensidade do campo magnético aplicado. Essa relação é dada por:

$$\omega = \gamma H_r \tag{8.5}$$

A quantização do momento angular de spin em uma direção específica conduz a uma quantização dos níveis de energia. Sendo, portanto, admitido apenas valores discretos para a energia do sistema, comumente referidos como energias Zeeman. As energias $E_i$ dos sistemas são obtidas a partir da equação de Schroedinger:

$$\widehat{\mathcal{H}}\,\psi_i = E_i\psi_i, \tag{8.6}$$

sendo $E_i$ o autovalor energia correspondente a autofunção $\Psi_i$. Usando a notação de Dirac para um sistema de spins com $S = {}^1/_2$, onde os dois estados de spin são caracterizados por números quânticos $\mathcal{M}_s = \pm {}^1/_2$, temos para a componente z do operador de spin ($\hat{S}_z$),

$$\hat{S}_z \left|\alpha\right\rangle = +\frac{1}{2}\left|\alpha\right\rangle \qquad e \qquad \hat{S}_z \left|\beta\right\rangle = -\frac{1}{2}\left|\beta\right\rangle. \tag{8.7}$$

Os autovalores de $\hat{S}_z$ são então $\mathcal{M}_s = +{}^1/_2$ e $\mathcal{M}_s = -{}^1/_2$. Desde que $g\beta H$ seja uma constante, $|\alpha\rangle$ e $|\beta\rangle$ também são autofunções de $\widehat{\mathcal{H}}$; assim

$$\widehat{\mathcal{H}}\left|\alpha\right\rangle = g\beta H\hat{S}_z\left|\alpha\right\rangle = +\frac{1}{2}g\beta H|\alpha\rangle \tag{8.8}$$

e

$$\widehat{\mathcal{H}}\left|\beta\right\rangle = g\beta H\hat{S}_z\left|\beta\right\rangle = -\frac{1}{2}g\beta H|\beta\rangle. \tag{8.9}$$

Portanto, podemos escrever a energia Zeeman como:

$$E = \pm\frac{1}{2}g\beta H. \tag{8.10}$$

A condição de ressonância pode ser reescrita de acordo com a equação (8.11), ou seja, para que ocorra ressonância, deve ser incidida na amostra radiação eletromagnética cuja energia $h\upsilon$ seja coincidente com a diferença de energia entre os níveis Zeeman ($\Delta E = g\beta H_r$):

$$h\upsilon = g\beta H_r; \tag{8.11}$$

$H_r$ é chamado campo de ressonância. A Figura 15 mostra um esquema onde estão representados os níveis de energia Zeeman para um elétron.

A segunda condição de ressonância é satisfeita quando a componente magnética da onda eletromagnética é polarizada perpendicularmente a direção do campo magnético estático. As transições entre esses dois estados de energia ocorrem tanto por absorção quanto por emissão de radiação eletromagnética, desde que a condição 1 seja satisfeita.

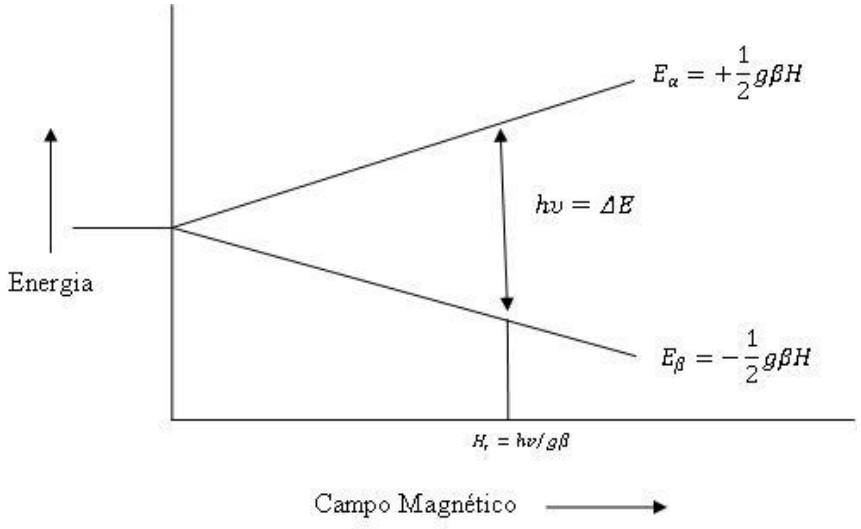


**Figura 15: Níveis de energia Zeeman em função da intensidade do campo magnético. $H_r$ é o campo de ressonância e $E_\alpha$ e $E_\beta$ são as energias associadas aos valores de $M_s = {}^{1}/_{2}$ e $^{-1}/_{2}$, respectivamente.**

## 8.3 A absorção como função da população de spin

Se o sistema paramagnético detectável for exposto a uma radiação eletromagnética com frequência apropriada, haverá indução de transições eletrônicas de spin entre os dois níveis de energia Zeeman com igual probabilidade para absorção e para emissão. Assim a absorção da energia requer uma diferença na população entre os dois níveis, dentre os quais as transições são induzidas.

Os elétrons são distribuídos entre os níveis de energia, α e β, obedecendo à lei de distribuição de Boltzman:

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = exp\left(-\frac{\Delta E}{K_B T}\right) = exp\left(-\frac{g\beta H_r}{K_B T}\right) \quad (8.12)$$

onde $N_\alpha$ e $N_\beta$ são os números de populações de partículas nos estados α e β, respectivamente, $\Delta E$ é a diferença de energia entre esses estados, $K_B$ é a constante de Boltzman e T é a temperatura absoluta. Como $\Delta E$ é muito pequeno quando comparado a energia térmica $K_B T$ (da ordem de três vezes), haverá um ligeiro excesso de spins no estado $\beta$ e, portanto, a absorção de energia se dará no sentido de $\beta$ para $\alpha$. Em um determinado momento, as populações dos spins no estado de menor e maior energia se igualariam (saturação), impossibilitando qualquer detecção do sinal de RPE. Porém, processos dissipativos de energia entre os spins e suas vizinhanças provocam a reposição da população dos spins no nível de mais baixa energia através de mecanismos de relaxação, possibilitando assim, a ocorrência do fenômeno de ressonância e de sua detecção.

Para reduzir a saturação e produzir um sinal de absorção facilmente detectável, a relaxação deveria ocorrer muito rapidamente, ou seja, o tempo de vida do estado excitado deveria ser pequeno. Outro fator é que a relação inversa entre o tempo de vida de um estado excitado e a largura de sua linha de absorção se opõe à vantagem de tempos de vida muito curtos. Assim, quando as velocidades de relaxação são altas, ou os tempos de vida são curtos, o alargamento das linhas impede medidas de alta resolução.

Há dois mecanismos de relaxação em espectroscopia de RPE [79]: a relaxação spin-rede ou longitudinal, na qual os spins retornam para os seus estados de menor energia liberando energia para os modos de vibração da rede molecular em um tempo característico $T_1$ (tempo de relaxação spin-rede), e a relaxação spin-spin ou transversal, que é caracterizada pela perturbação exercida pelos spins não excitados na população de spins no estado de maior energia, o que provoca o retorno da componente transversal da magnetização desses spins para a posição de equilíbrio. O tempo necessário para que ocorra esse fenômeno é o tempo de relaxação spin-spin ($T_2$).

## 8.4 O fator g

O fator g num ambiente molecular está relacionado à facilidade de o campo aplicado introduzir correntes eletrônicas locais no esqueleto molecular e à intensidade dos campos gerados por essas correntes. Elétrons podem migrar através do esqueleto molecular utilizando os estados excitados. Esse caminho adicional para a circulação dos elétrons produz um campo magnético local que se soma ao campo aplicado. Assim, a facilidade de induzir correntes é inversamente proporcional à separação entre os níveis de energia, $\Delta E$, da molécula [92]. É conveniente definir o campo de ressonância e permitir que o fator g varie, em resposta a diferentes magnetizações da amostra;

$$g_{eff} = \frac{hv}{\beta H_r} \tag{8.13}$$

A principal fonte de campo magnético local, a qual causa desvios do fator g em relação ao do elétron livre, é um momento magnético orbital introduzido por uma mistura de estados excitados no nível fundamental. Para a maioria das moléculas o fator g é anisotrópico, isto é, a magnitude do campo local induzido (portanto o fator g) depende da orientação da molécula em relação ao respectivo campo magnético aplicado [90].

Há alguns compostos que se tornam isotrópicos por fatores físicos não moleculares, como por exemplo, substâncias diluídas em líquidos de baixa viscosidade ou pó de cristais triturados. Nestes casos a isotropia é obtida devido à orientação randômica, seja das moléculas no estado líquido ou das partículas de pó do cristal [40].

A anisotropia do fator g é usualmente resumida na forma de um tensor de segunda ordem. Geralmente, em sistemas de eixos cartesianos, g é escrito como

$$g = \begin{pmatrix} g_{XX} & g_{XY} & g_{XZ} \\ g_{YX} & g_{YY} & g_{YZ} \\ g_{ZX} & g_{ZY} & g_{ZZ} \end{pmatrix} \tag{8.14}$$

O tensor g é, na maioria das vezes, simétrico ($g_{XY} = g_{YX}$, $g_{ZY} = g_{YZ}$, etc), contendo apenas seis elementos independentes.

Para um radical com sinal isotrópico, $g_{XX} = g_{YY} = g_{ZZ} = g_{eff}$. Alguns sistemas apresentam uma simetria axial onde $g_{XX} = g_{YY} \neq g_{ZZ}$, ou seja, os eixos X e Y são equivalentes e apenas o eixo Z possui anisotropia. Nestes casos, o valor de $g_{ZZ}$ é conhecido como $g_{\parallel}$, enquanto que $g_{XX}$ e $g_{YY}$ são denominados de $g_{\perp}$. Sistemas sem nenhum tipo de isotropia, $g_{XX} \neq g_{YY} \neq g_{ZZ}$, são chamados de ortorrômbicos.

## 8.5 Interação nuclear hiperfina

A interação hiperfina é responsável pelo aparecimento de múltiplos picos nos espectros de RPE. O fato de o elétron desemparelhado sofrer a ação dos campos magnéticos que agem sobre ele, constitui a principal condição para que possamos analisar o efeito da ressonância magnética. A ação de um campo magnético externo sobre o elétron já foi analisada anteriormente, no entanto este mesmo elétron pode sentir também a ação do campo magnético gerado pelos núcleos vizinhos, sendo que este se adiciona ao campo magnético externo. Esta interação é chamada de interação nuclear hiperfina e faz com que os níveis de energia do elétron (Figura 16) sofram um desdobramento criando uma estrutura espectral chamada de estrutura hiperfina [93].

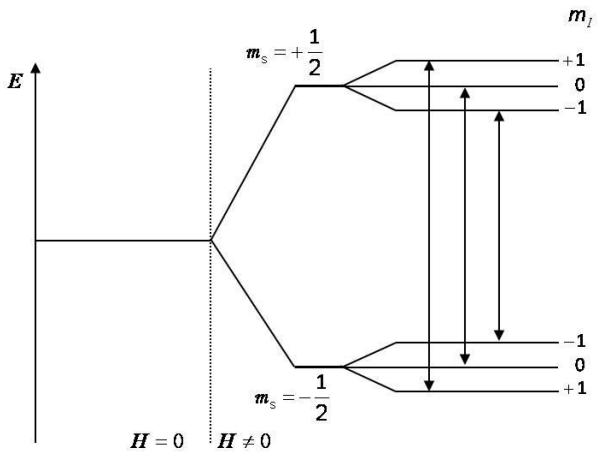


**Figura 16: Níveis de energia desdobrados pela interação hiperfina entre o momento magnético eletrônico e nuclear do núcleo de nitrogênio.**

Os prótons possuem spin nuclear e um momento nuclear resultante, que é uma fonte de campo magnético. Assim como os elétrons, os núcleos também possuem um momento angular de spin intrínseco, caracterizado pelo número quântico de spin *I.* As componentes do vetor momento angular de spin nuclear são quantizadas e, assim como no caso eletrônico, assume valores de $M_I$que vão de –*I* a +*I*. A interação do spin nuclear com o spin eletrônico é que produz a interação hiperfina e desdobra as linhas do espectro de ressonância em 2*I* + 1componentes, para o caso de um elétron que interage com um núcleo que possui $I \neq 0$.

O campo de ressonância $H_r$ representa o campo experimentado pelo elétron desemparelhado. Se há um campo magnético local, este deve ser adicionado vetorialmente ao campo magnético externo $\boldsymbol{H}$ para gerar o campo magnético efetivo, que é dado por

$$\boldsymbol{H}_{eff} = \boldsymbol{H} + \boldsymbol{H}_{local} \tag{8.15}$$

O sistema mais simples que exibe interação nuclear hiperfina é o átomo de hidrogênio (um elétron e um próton; $I = {}^{1}/_{2}$). Neste caso, $M_I$ pode assumir dois valores possíveis ($\pm {}^{1}/_{2}$) e assim produzir duas linhas de ressonância de igual intensidade. De (8.15) temos que,

$$\boldsymbol{H}_{eff} = \boldsymbol{H}' \mp \frac{a}{2} = \boldsymbol{H}' - aM_I \tag{8.16}$$

onde ${}^{a}/_{2}$ é a magnitude do campo magnético local $\boldsymbol{H}'$ é o campo de ressonância quando $a$ = 0. Podemos medir $a$ pelo intervalo entre duas linhas hiperfinas de ressonância. Por esse motivo, $a$ é comumente chamada de *constante de desdobramento hiperfino*.

A interação hiperfina é, então, uma interação entre os momentos magnéticos de um elétron não emparelhado e os núcleos. Há duas contribuições para essa interação.

Um elétron num orbital *p* pouco se aproxima do núcleo e sofre, por isso, a ação de um campo que parece ser de um dipolo magnético puntiforme. A interação resultante é uma interação dipolo-dipolo. A estrutura hiperfina devido a esse tipo de interação só é observada em radicais confinados em sólidos.

Um elétron *s* distribui-se com simetria esférica em torno de um núcleo e por isso tem interação dipolo-dipolo com média nula, mesmo numa amostra sólida. Porém,

como a probabilidade do elétron *s* estar no núcleo não é nula, não é correto tratar a interação como a de dois dipolos puntiformes. Neste caso, um elétron *s* tem uma interação de contato de Fermi com o núcleo, que é uma interação magnética que ocorre quando a aproximação de dipolo puntiforme não é válida. A interação de contato é isotrópica, isto é, independe da orientação do radical, e por isso é exibida mesmo por moléculas que basculam rapidamente nos fluidos [92]. A equação (8.17) apresenta o Hamiltoniano que descreve essa interação.

$$\widehat{\mathcal{H}}_{con} = g_n \beta_n \frac{8\pi(\hat{\boldsymbol{I}} \cdot \boldsymbol{r})\delta(\boldsymbol{r})}{3} \tag{8.17}$$

Escrevendo a equação (8.17) em uma forma mais compacta, obtém-se

$$\widehat{\mathcal{H}}_{con} = g\beta A_0 \hat{\boldsymbol{I}} \cdot \hat{\boldsymbol{S}}, \tag{8.18}$$

em que a constante de acoplamento, $A_0$, depende da probabilidade de se encontrar o elétron no núcleo, $|\psi(0)|^2$ , sendo representada pela seguinte expressão:

$$A_0 = \left(\frac{8\pi}{3}\right) g_n \beta_n |\psi(0)|^2 \tag{8.19}$$

A outra forma de contribuição para a interação hiperfina é a interação clássica entre dois dipolos, $\vec{\mu}$ (momento magnético eletrônico) e $\vec{\mu}_N$ (momento magnético nuclear), separados por uma distância $\vec{r}$. Esta interação depende do ângulo entre a linha que une os dois dipolos e a direção do campo externo aplicado. Graças à dependência angular, essa interação é conhecida como interação anisotrópica ou dipolar, e é descrita pelo seguinte Hamiltoniano:

$$\widehat{\mathcal{H}}_{dip} = g\beta \boldsymbol{g}_n \beta_n \left[\frac{3(\hat{\boldsymbol{I}} \cdot \boldsymbol{r})(\hat{\boldsymbol{S}} \cdot \boldsymbol{r})}{r^5} - \frac{(\hat{\boldsymbol{I}} \cdot \hat{\boldsymbol{S}})}{r^3}\right], \tag{8.20}$$

onde $g_N$ e $\beta_N$ são o fator g do núcleo e o magnéton de Bohr nuclear, respectivamente. A equação (8.20) pode ser reescrita na forma tensorial:

$$\widehat{\mathcal{H}}_{dip} = g\beta \hat{\boldsymbol{I}} \cdot \overleftrightarrow{\boldsymbol{T}} \cdot \hat{\boldsymbol{S}}, \tag{8.21}$$

sendo $\overleftrightarrow{\boldsymbol{T}}$ o tensor de acoplamento hiperfino.

O Hamiltoniano de interação hiperfina (8.22) é dado pela soma da interação anisotrópica (dipolar) e isotrópica (interação de Fermi):

$$\widehat{\mathcal{H}}_h = g\beta\hat{\boldsymbol{I}} \cdot \overleftrightarrow{\boldsymbol{T}} \cdot \hat{\boldsymbol{S}} + g\beta A_0 \hat{\boldsymbol{I}} . \hat{\boldsymbol{S}} = g\beta\hat{\boldsymbol{S}} \cdot \overleftrightarrow{\boldsymbol{A}} \cdot \hat{\boldsymbol{I}} \tag{8.22}$$

Somando as equações (8.4) e (8.22), obtém-se o hamiltoniano total (8.23),

$$\widehat{\mathcal{H}} = \beta \boldsymbol{H} . \boldsymbol{g} . \hat{\boldsymbol{S}} + h\hat{\boldsymbol{S}} . \boldsymbol{A} \ . \hat{\boldsymbol{I}} \tag{8.23}$$

sendo $\boldsymbol{g}$ o tensor g, **A** o tensor de acoplamento hiperfino e $\hat{\boldsymbol{I}}$ o operador que representa o spin nuclear.

## 8.6 O método de marcadores de spin aplicado em membranas biológicas

A RPE tem sido largamente utilizada no estudo não somente de espécies intrinsecamente paramagnéticas, mas também de radicais livres intermediários formados em reações bioquímicas. Grande parte dos sistemas biológicos de interesse não apresenta centros paramagnéticos, tornando-se necessária a utilização de sondas específicas, usualmente conhecidas como marcadores de spin. Estas sondas são amplamente empregadas devido à grande sensibilidade do espectro de RPE à sua mobilidade, bem como à extraordinária estabilidade química do fragmento paramagnético, geralmente o radical nitróxido, mesmo quando submetido a condições extremas de pH e temperatura [94].

Uma importante característica dos espectros de RPE é que o fator g e o desdobramento hiperfino dos marcadores de spin variam com a polaridade do solvente. Assim, podemos identificar através dos espectros se o marcador está inserido em um ambiente de natureza hidrofóbica ou hidrofílica.

Os radicais nitróxidos desde o seu desenvolvimento há mais de 30 anos têm sido uma importante ferramenta em muitos estudos de Biofísica, especialmente de membranas e proteínas. Isso se deve a grande estabilidade destes radicais e a

possibilidade de participar em reações químicas sem o envolvimento do elemento paramagnético. Além disso, a química desses radicais e em especial a sua síntese obtiveram um avanço considerável nos últimos anos.

Os nitróxidos contem como parte essencial o fragmento paramagnético N∸O, onde o elétron desemparelhado responsável pelo paramagnetismo interage com o núcleo de nitrogênio (I=1), e devido a essa interação, o espectro de RPE de um radical nitróxido em solução é um triplete com intensidades muito próximas e iguais distâncias entre as linhas (Figura 17) [95].

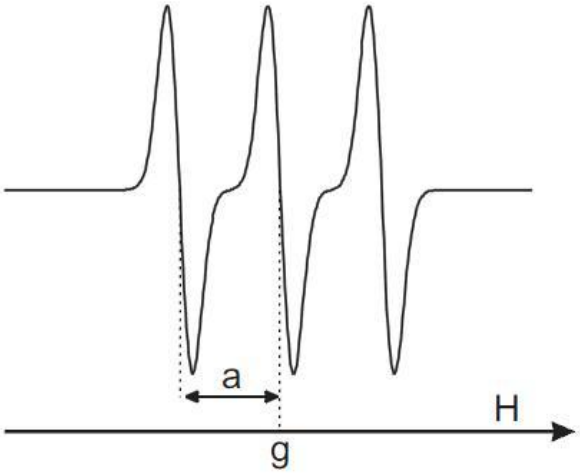


**Figura 17: Espectro de absorção do radical nitróxido; *g* define a posição da linha central e a constante de desdobramento hiperfino.**

A fórmula geral dos nitróxidos é a seguinte:

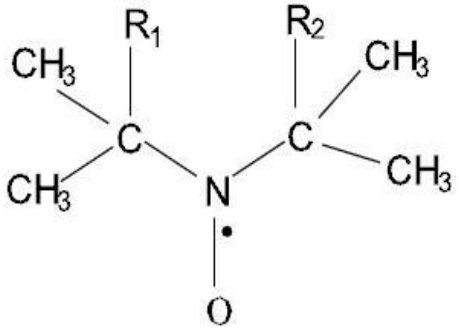


**Figura 18: Estrutura molecular geral do radical nitróxido. $R_1$ e $R_2$ representam grupos químicos que variam de acordo com o marcador de spin.**

$R_1$ e $R_2$ são radicais convenientes para a ligação do marcador à molécula que se quer estudar formando assim os diversos marcadores de spin de radicais nitróxido. Estes marcadores podem ser ligados covalentemente às proteínas e, no caso de membranas e micelas, serem intercalados fisicamente. O sinal de RPE produzido pelo nitróxido é extremamente sensível à dinâmica molecular, polaridade, viscosidade, acidez, estrutura e ordem do meio.

A anisotropia espectral é a base fundamental da utilidade do método de marcadores de spin. A Figura 19 apresenta o sistema de coordenadas do radical nitróxido demonstrando o ângulo formado entre a direção do campo magnético externo ***H*** e o eixo Z das coordenadas do radical.

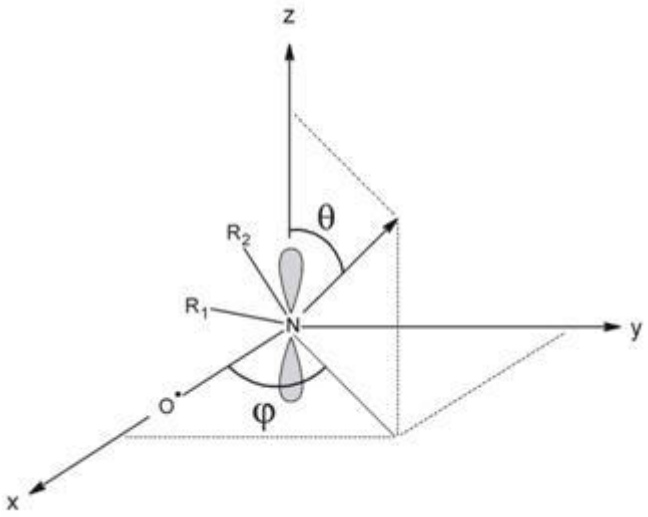


**Figura 19: Sistema de coordenadas do radical nitróxido demonstrando os ângulos formados entre a direção do campo magnético externo *H* e os eixos de coordenadas do nitróxido.**

A anisotropia do espectro em relação às três direções principais é vista claramente. O desdobramento hiperfino e o fator g que define o centro dos espectros dependem da direção do campo magnético.

A anisotropia espectral é normalmente especificada pelos três valores do fator g e da constante hiperfina obtidas nas direções paralelas aos eixos principais: $A_{ZZ}$, $A_{XX}$, $A_{YY}$ e $g_{ZZ}$, $g_{XX}$, $g_{YY}$. Em muitos casos o sistema molecular é simétrico axialmente e os valores principais valores são designados como: $A_{\parallel} = A_{ZZ}$, $A_{\perp} = A_{XX} = A_{YY}$ e similarmente $g_{\parallel} = g_{ZZ}$ e $g_{\perp} = g_{XX} = g_{YY}$. A anisotropia de $g\ e\ A$ é base do cálculo dos parâmetros de ordem em membranas [95].

Em estudos com marcadores de spin, supõe-se que o espectro de RPE do marcador reproduz fielmente a estrutura e mobilidade do sistema biológico. Este deve ser o caso, quando o marcador tem uma semelhança estrutural aos componentes biológicos. Por esse motivo, no estudo de membranas têm sido usados derivados nitróxidos de ácidos graxos ou de fosfolipídios.

Vale ressaltar que o movimento molecular mais importante não é o movimento do grupo radical nitróxido, e sim da molécula na qual ele está ligado. Em membranas biológicas, o eixo principal dos marcadores de spin pode assumir todos os possíveis ângulos em relação à direção do campo magnético externo. Sendo assim, o espectro de RPE desses marcadores será uma superposição dos espectros de todas as possíveis orientações das cadeias carbônicas em relação ao campo magnético externo, cujos desdobramentos máximos ocorrerão quando uma determinada população de marcadores de spin possuir suas cadeias carbônicas alinhadas paralelamente ao campo externo, e mínimo quando estiver alinhada perpendicularmente.

Os parâmetros $2A_{\parallel}$ e $2A_{\perp}$ podem ser medidos diretamente a partir dos espectros experimentais de RPE de marcadores de spin como mostrado na Figura 20.

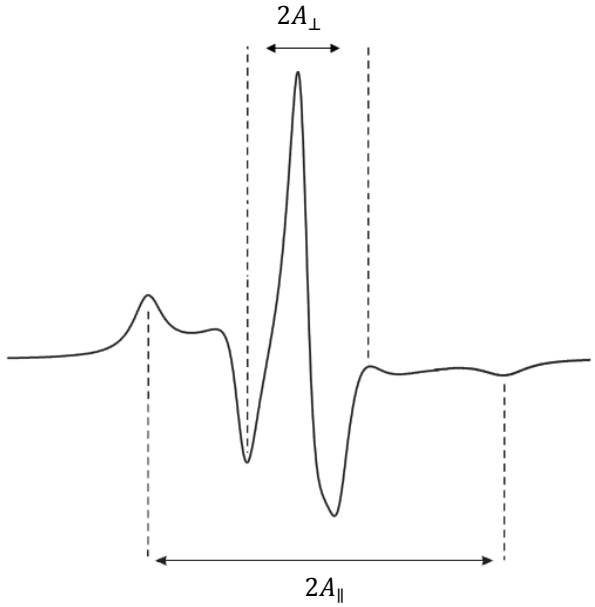


**Figura 20: Espectro de RPE do marcador de spin 5-DSA obtido em temperatura ambiente com a indicação dos parâmetros espectrais $2A_{\parallel}$ e $2A_{\perp}$.**

Os parâmetros experimentais apresentados anteriormente, $\mathbf{2}\boldsymbol{A}_{\|}$ e $\mathbf{2}\boldsymbol{A}_{\perp}$, refletem a anisotropia dos fatores g e A. Em solução, os marcadores assumem um regime de movimento molecular rápido. As rápidas flutuações do marcador de spin nesse ambiente promedia as anisotropias apresentadas anteriormente fazendo com que não mais se observe a diferença entre os valores de $\mathbf{2}\boldsymbol{A}_{\|}$ e $\mathbf{2}\boldsymbol{A}_{\perp}$. Nesse regime de movimento, os espectros dos marcadores de spin passam a exibir um caráter isotrópico, onde os tensores $\vec{\mathbf{g}}$ e $\vec{\mathbf{A}}$ são substituídos pelas médias aritméticas de suas componentes matriciais no sistema de coordenadas do grupo nitróxido.

Os marcadores de spin derivados do ácido esteárico, principalmente o 5-DOXIL estearato (5-DSA) (Figura 21), (possui o anel do radical nitróxido ligado ao 5° carbono da cadeia acil) são frequentemente usados no método de marcadores de spin para obter informações sobre a fluidez dos lipídios da membrana. Tais informações são obtidas através da medida do parâmetro de ordem ($S$), o qual é dado por:

$$S = \frac{A_{\|} - A_{\perp}}{A_{ZZ} - \frac{1}{2}(A_{XX} + A_{YY})} \tag{8.24}$$

Quanto menor for o valor de $S$, mais fluída é a região próxima ao centro paramagnético do marcador de spin, ou seja, maior é a sua mobilidade rotacional na membrana na qual se encontra inserido.

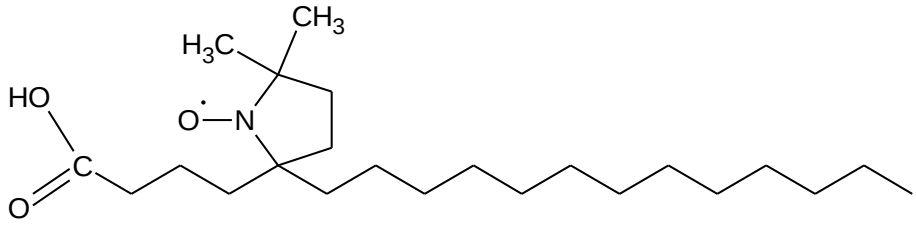


**Figura 21: Marcador de spin 5-DSA que possui o anel do radical nitróxido ligado ao 5º carbono da cadeia acil.**

A oxidação das biomoléculas que compõem a membrana biológica altera a composição e consequentemente modifica as propriedades físicas dessa estrutura. Uma dessas principais mudanças é justamente na fluidez da bicamada lipídica, e esta pode ser monitorada pelo parâmetro espectral $2A_{\|}$.

# 9 Materiais e Métodos

## 9.1 Preparação dos lipossomas

Lipossomas de EPC foram preparados pelo método de extrusão. Uma quantidade conhecida de EPC foi dissolvida em clorofórmio/metanol (2:1). Foi formado um filme lipídico no tubo de ensaio com a evaporação dos solventes pela aplicação de fluxo de gás de nitrogênio. Este foi colocado sob vácuo permanecendo por 3 horas, com o intuito de remover o solvente orgânico restante na amostra. O filme foi então hidratado com um volume apropriado de tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4), vortexado e logo após, já com as vesículas multilamelares formadas, submetido ao processo de extrusão utilizando um extrusor manual equipado com um filtro de policarbonato de 0,4 μm (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL) para garantir uniformidade no tamanho das membranas [96].

## 9.2 Preparação dos “ghosts”

As amostras de sangue foram cedidas pelo laboratório INGOH. O sangue diluído em tampão fosfato salino (PBS; NaCl 154 mM, pH 7,4) foi centrifugado a $200 \times g$ por 10 minutos. Repetindo este procedimento por mais duas vezes, obteve-se um concentrado de hemácias, o qual foi colocado na presença de tampão lisante (sem sal, 5 mM de fosfato pH 8,0) por aproximadamente 3 horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas cinco vezes a $20.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C. Com o intuito de que as membranas celulares recuperassem sua conformação original, o sangue foi exposto a mais duas centrifugações adicionais utilizando novamente o tampão PBS. Após todo esse procedimento, um concentrado de membranas de coloração embranquecida foi obtido e então armazenado a -20 ºC até o momento da sua utilização nos ensaios oxidativos.

## 9.3 Incorporação dos antioxidantes

O 4-NC foi isolado do óleo vegetal da *P. umbellata* e purificado no laboratório de Biofarmácia e Farmacocinética coordenado pela Professora Doutora Kênnia Rocha Rezende da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás. As amostras foram diluídas em etanol. Diversas concentrações foram colocadas nos tubos de ensaio, os quais foram levados à estufa (37°C) para a evaporação do solvente. Logo em seguida adicionou-se 20 µL de EPC (40 mM) e 20 µL de tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4). A solução foi incubada por 1 hora e meia para a incorporação das moléculas de 4-NC. O mesmo procedimento foi realizado para o α-tocoferol (Figura 22). Já para a incorporação do 4-NC em membranas "ghosts" foi seguida a mesma sequência descrita acima, porém com concentração de membrana maior. Neste caso foram usados 50 µL de "ghosts" equivalendo a aproximadamente 4mg de lipídios/ml na solução final.

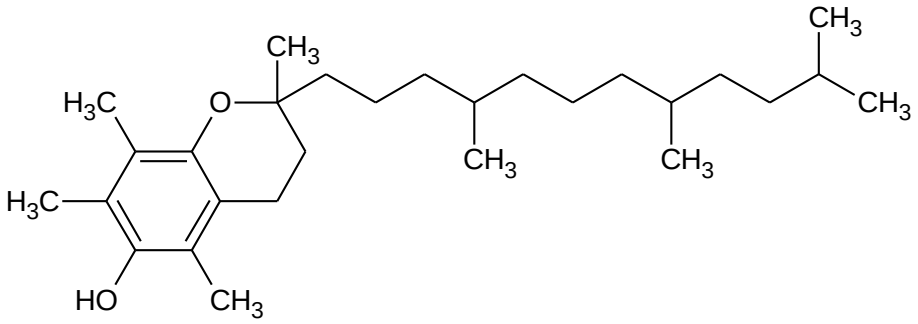


**Figura 22: Estrutura molecular do α-tocoferol.**

## 9.4 Indução da peroxidação lipídica

Diversas substâncias têm sido usadas como modelo de agentes oxidantes para estudar o mecanismo do estresse oxidativo. Neste trabalho utilizamos o AAPH, um azo composto hidrossolúvel e gerador de radicais livres e o composto $FeSO_4$ adicionado ao $H_2O_2$, os quais, após reagirem, resultam no radical hidroxila ($HO^{\cdot}$) por meio da reação de Fenton (equação 3.1).

Foi adicionada às membranas de EPC, já agregadas ao antioxidante, 460 µL de solução de AAPH (33 mM), preparada em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4), obtendo uma solução final de 500 µL à 30 mM de AAPH. As amostras foram incubadas por 3

horas a 37ºC agitadas de 30 em 30 minutos. Já as membranas de "ghosts" foram tratadas com 1,450 mL de solução de tampão PBS contendo AAPH (50 mM, concentração final) e incubadas também por 3 horas a 37 °C.

A reação, pela qual o AAPH se torna radical, está representa na figura abaixo;

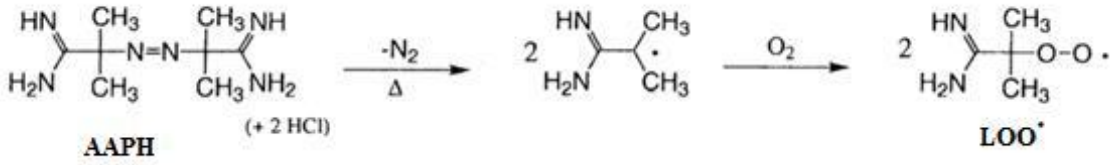


**Figura 23: Reação pela qual o AAPH se torna radical livre. Adaptado de [97].**

A solução de $FeSO_4$ /$H_2O_2$ foi preparada em solução neutra (pH 7.0), obtendo uma concentração final de 100 μM/1 mM, nas soluções de EPC e 200 μM/1mM ou 200 μM/2mM nas soluções contendo "ghosts". O procedimento utilizado aqui foi o mesmo para os experimentos com o AAPH, exceto que o tempo de incubação da solução de $FeSO_4$ /$H_2O_2$ com a molécula antioxidante incorporada à membrana foi de apenas 1hora nos testes contendo a concentração de 200 μM/1mM.

## 9.5 Métodos para a avaliação da capacidade antioxidante

### 9.5.1 Teste do ácido 2-tiobarbitúrico

Trata-se de um teste baseado na reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com os produtos finais de decomposição dos hidroperóxidos. Um dos principais produtos formados no processo significativo é MDA, um aldeído com três átomos de carbonos e de baixo peso molecular [98]. Neste ensaio uma molécula de MDA reage com duas moléculas de TBA para formar um complexo de cor rosa (MDA-TBA), o qual apresenta absorbância óptica máxima em comprimento de onda $\lambda = 532$ nm. Esta reação ocorre pelo ataque nucleofílico envolvendo o carbono 5 do TBA e o carbono 1 do MDA, seguida por uma reação similar com uma segunda molécula de TBA (Figura 24). A velocidade da reação depende da temperatura, pH e concentração de TBA [99].

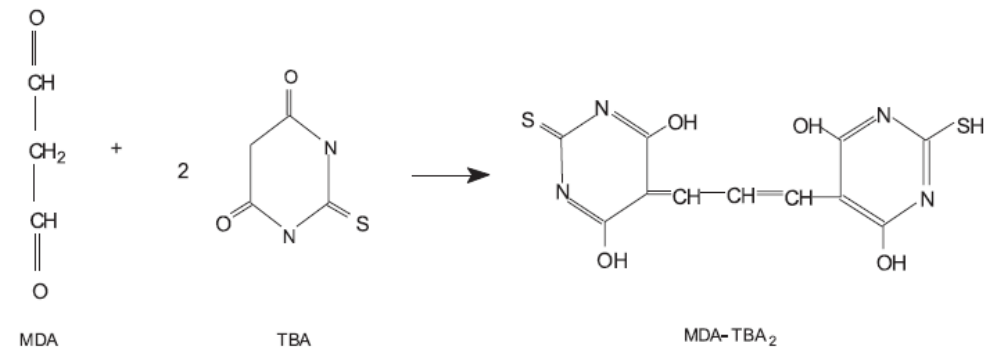


**Figura 24: Reação entre o MDA e o ácido TBA para a formação do complexo MDA-TBA. Adaptado de [99].**

Após o processo de oxidação, toda a solução contendo membranas de EPC foi centrifugada a $1.000 \times g$ e a contendo "ghosts" a $20.000 \times g$. Foram retirados 480 μL do sobrenadante da primeira e 1200 μL da segunda. A eles foram adicionados 2 mL de solução contendo 15 % de ácido tricloroacético (TCA), 0,375% de TBA e 0,25 M de HCl [100]. Logo em seguida, as amostras foram aquecidas a 95°C em banho maria por 15 minutos para a EPC e 30 minutos para os "ghosts" e, imediatamente depois, resfriada. As soluções foram novamente centrifugadas, desta vez a $20.000 \times g$ por 10 minutos. Os sobrenadantes, os quais contem as substâncias resultantes da reação com TBA, foram transferidos para uma cubeta de quartzo e a absorção foi lida em 532 nm, utilizando o espectrofotômetro da PG Instruments, modelo T80+, alocado no Laboratório de Biofísica do Instituto de Física da UFG. As concentrações de MDA foram obtidas substituindo os valores da absorbância, A, medidos experimentalmente, na equação de Lambert-Beer (equação 6.2) usando o coeficiente de extinção molar $\varepsilon = 1{,}5\text{x}10^{5}\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, nos permitindo, indiretamente, monitorar a peroxidação dos lipídios das membranas.

### 9.5.2 Marcação das amostras e condições do espectrômetro de RPE

Após o processo de oxidação, as membranas "ghosts" foram centrifugadas, na presença de tampão PBS (NaCl 154 mM, pH 7,4), duas vezes a $20.000 \times g$ e 4 °C durante 10 minutos para que o excesso dos agentes oxidantes fosse retirado. Após esse

procedimento foi adicionado o marcador de spin derivado do ácido esteárico 5-DSA (Figura 21) nas membranas. Nossas medidas experimentais foram realizadas no laboratório de Ressonância Paramagnética Eletrônica da Universidade Federal de Goiás (UFG). Utilizamos um espectrômetro Bruker ESP300 equipado com uma cavidade ressonante ER4102 ST operando em banda-X (9,4 GHz aproximadamente) seguido dos seguintes parâmetros: frequência e amplitude de modulação, 100 KHz e 1,024 G respectivamente; potência de microonda, 20 mW; varredura do campo magnético, 100 G; tempo de varredura, 168s e constante de tempo de detecção, 41 s.

### 9.5.3 Método DPPH

Este método é baseado na capacidade de antioxidantes sequestrarem o radical livre estável DPPH· (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (Figura 25) [101]. Este é caracterizado como um radical livre devido à vantagem de deslocalização do elétron livre sobre a molécula como um todo. A deslocalização também dá origem a uma cor violeta profunda, caracterizada por uma banda de absorção em solução de etanol ou metanol centrada em cerca de 515 nm.

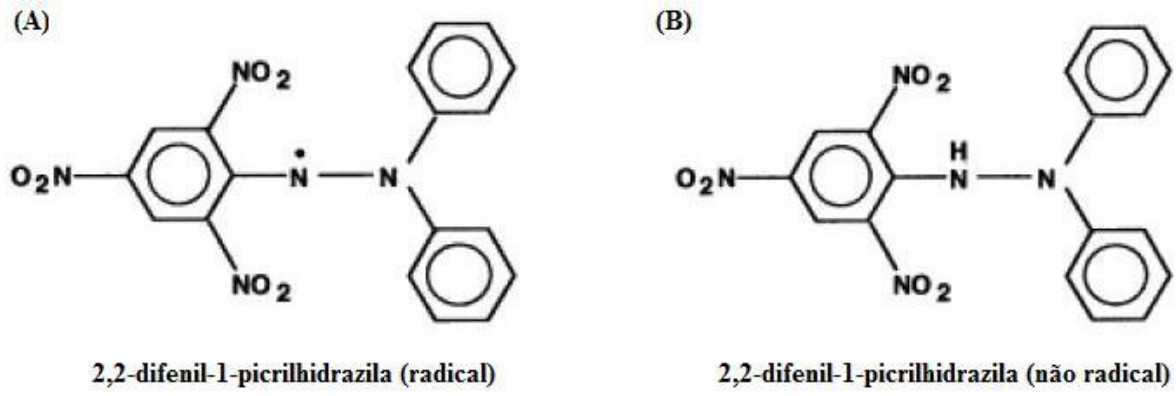


**Figura 25: Estrutura molecular do DPPH radical (A) e do não radical (B).**

A redução do DPPH·, como indicado a seguir (equação 9.1), é seguida pelo monitoramento do decréscimo de sua absorbância no comprimento de onda característico durante a reação. Quando uma solução de DPPH· é acrescida de uma

substância que pode doar um átomo de hidrogênio, dá lugar à forma reduzida com perda da cor violeta. A cor da solução resultante dessa reação é um amarelo pálido residual provindo do grupo picril ainda presente [102].

Representando o radical DPPH$^{\cdot}$ por Z e a molécula doadora de hidrogênio, ou seja, o antioxidante por XH, temos que:

$$Z^{\cdot} + XH = ZH + X^{\cdot}, \tag{9.1}$$

onde $ZH$ é a forma reduzida do DPPH$^{\cdot}$ e $X^{\cdot}$ é o radical livre formado nesta primeira etapa da reação. O radical $X^{\cdot}$ é relativamente estável e não reage com os lipídios.

Do ponto de vista metodológico, o método DPPH é considerado um método fácil e válido para avaliar a atividade antioxidante de compostos puros e/ou extratos complexos, visto que é utilizado um radical estável e que não necessita ser gerado como em outros métodos baseados na neutralização de radicais. Outra vantagem importante é que os resultados são altamente reprodutíveis e comparáveis a outros métodos utilizados para esse tipo de estudo [103].

A solução de DPPH em metanol (10 mM) foi preparada e estocada em "eppendorfs" cobertos com folhas de alumínio, mantidas no escuro a 4 °C até o momento das determinações [104]. O decréscimo na absorbância foi medido para diversas concentrações de antioxidantes, 4-NC, α-tocoferol e (+)-Catequina (Figura 26), em 515 nm. A concentração de DPPH usada foi de 75 μM. As leituras foram feitas durante 30 minutos em intervalos de 30 segundos.

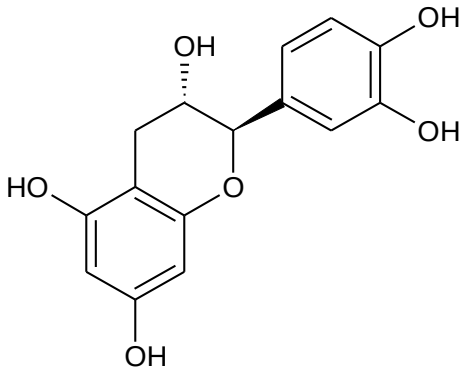


**Figura 26: Estrutura química da molécula (+)-Catequina.**

Quanto maior a atividade antioxidante das amostras testadas, mais estável o radical DPPH se torna, provocando a descoloração da solução (DPPH + antioxidante) e

diminuindo a absorbância. Deste modo, o percentual de inibição das amostras testadas sobre o radical DPPH foi calculado conforme a equação (9.2) [104]:

$$\%\ Inibição = \left[\frac{A_{DPPH} - A_{antioxidante}}{A_{DPPH}}\right] \times 100 \qquad (9.2)$$

onde A é o valor da absorbância lida pelo espectrofotômetro.

# 10 Resultados

## 10.1 Padronização do método do ácido 2-tiobarbitúrico

Para o teste do ácido 2-tiobarbitúrico foi seguido o mesmo procedimento descrito por [100], porém com algumas modificações. Estas foram realizadas como forma de encontrar uma melhor qualidade e confiabilidade dos resultados. Além do que, padronizando o método pode-se utilizá-lo no estudo de atividades antioxidantes de outras moléculas e/ou em diferentes sistemas. Como esta é uma linha de pesquisa, a qual nosso laboratório está se dedicando, é de grande importância que a metodologia fique bem definida. Alguns testes foram realizados para que tal objetivo fosse alcançado.

Primeiramente, foi realizado um teste para definir a concentração do agente oxidante, AAPH, que deveria ser utilizada para a indução da peroxidação lipídica dos fosfolipídios da EPC. Este procedimento foi feito monitorando-se a quantidade do complexo MDA-TBA formado na reação. As concentrações do complexo (μM) formadas pela oxidação dos lipídios insaturados da EPC estão plotadas na Figura 27 em função das concentrações de AAPH (mM) utilizadas.

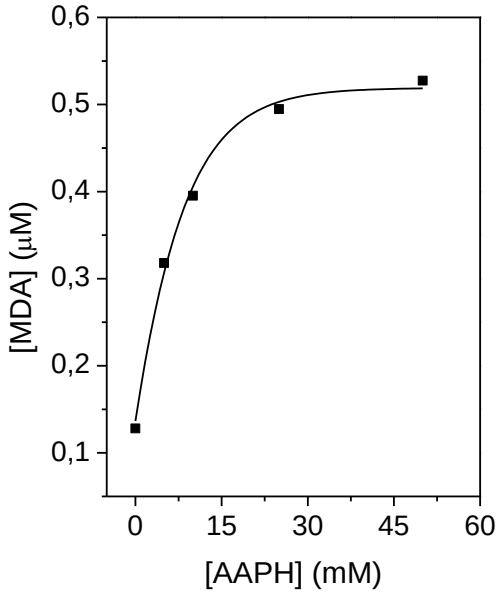


**Figura 27: Variação da concentração do complexo MDA-TBA em função da concentração de AAPH na qual aproximadamente 1,6 mM de vesículas de EPC foram incubadas durante 3 horas a 37 °C para a reação com o AAPH. A absorbância foi monitorada em comprimento de onda, λ = 532 nm, e o valor utilizado do coeficiente de absortividade molar foi de $1,56 \times 10^5$ $M^{-1}cm^{-1}$.**

Definiu-se então, que a concentração de AAPH mais adequada para ser usada em todos os experimentos com EPC seria 30 mM, pois representa uma concentração próxima do início do platô do gráfico da Figura 27.

Com o intuito de encontrar o tempo necessário para a incorporação total dos antioxidantes às membranas de EPC, foram realizados experimentos variando o tempo de incubação destas. Para tal, usamos como referência, a molécula α-tocoferol (vitamina E) (Figura 22) que é um antioxidante natural e de membrana bem conhecido.

Na Tabela 3 tem-se os resultados da absorbância do α-tocoferol a uma concentração de 250 μM em razão do tempo de incubação desta com a EPC. Vale ressaltar que a incubação com o agente oxidante (AAPH) foi feita a 37°C.

**Tabela 3: Absorbância dos controles oxidados e não oxidados e do α-tocoferol inserido à vesícula de EPC antes da indução da oxidação em razão da variação do tempo de incubação para a sua incorporação à EPC. Aproximadamente 1,6 mM de vesículas de EPC foram incubadas com 250 μM de α-tocoferol a 37ºC. A oxidação foi induzida por 30 mM de AAPH, sendo o tempo de incubação com este de 3 horas e a 37°C. A absorbância foi monitorada em comprimento de onda, λ = 532 nm.**

| Tempo | Absorbância | | |
|---|---|---|---|
| | Controles | | α-Tocoferol |
| | Não oxidado | Oxidado | |
| 0h | 0,034 | 0,094 | 0,088 |
| 30 min | 0,035 | 0,089 | 0,074 |
| 1h | 0,035 | 0,092 | 0,082 |
| 1h e 30min | 0,036 | 0,088 | 0,070 |

Nota-se que houve pouca variação na absorbância lida no espectrofotômetro, porém o valor mínimo foi encontrado para a incubação de 1 hora e 30 minutos. Logo, este foi o tempo que os antioxidantes juntamente com a solução de membrana EPC ficaram na estufa nos testes realizados. Lembrando que com uma melhor incorporação dos antioxidantes às membranas, há uma proteção maior.

O procedimento experimental para se obter a produção de MDA gera alguma oxidação. Com o objetivo de minimizar o valor de absorbância na ausência do agente oxidante, foi realizada a variação da temperatura e do tempo em que as amostras ficaram aquecidas em banho-maria. Além disso, foi realizado um experimento em que a 95°C a amostra também foi centrifugada a $20.000 \times g$ por 10 minutos a temperatura ambiente (23°C) logo após as 3 horas de incubação com o AAPH. Neste caso, a solução de TBA com TCA e HCl foi adicionada apenas ao sobrenadante da solução. As absorbâncias obtidas nestes diversos sistemas estão apresentadas na tabela 4.

**Tabela 4: Absorbância dos controles oxidados e não oxidados variando a temperatura e o tempo em que as amostras contendo aproximadamente 1,6 mM de vesículas de EPC permaneceram em banho-maria para a reação em que o complexo MDA-TBA é formado. A oxidação foi induzida por 30 mM de AAPH, sendo o tempo de incubação com este de 3 horas e a 37°C. A absorbância foi monitorada em comprimento de onda, λ = 532 nm.**

| Temperatura (ºC) | Tempo (min) | Absorbância controles | |
|---|---|---|---|
| | | Oxidado | Não oxidado |
| 90 | 30 | 0,057 | 0,012 |
| | 20 | 0,061 | 0,014 |
| | 15 | 0,062 | 0,019 |
| 95 | 15 | 0,084 | 0,012 |
| 95* | 15 | 0,031 | 0,006 |
| 95** | 15 | 0,000 | 0,000 |

* A amostra foi centrifugada a $20.000 \times g$ por 10 min a 23 ºC antes da reação com a solução de TBA com TCA e HCl;

** Amostra com ausência de EPC.

Observa-se que em relação à temperatura não houve uma diferença significativa na absorbância dos controles não oxidados, porém em se tratando do controle oxidado, a 95°C houve uma formação maior do complexo MDA-TBA, o que é justificado pelo alto valor da absorbância lida nesta temperatura. Quanto ao tempo de aquecimento em

banho-maria, as diferenças nos valores obtidos foram mínimas, o que nos permitiu definir 15 minutos como um tempo suficiente para as medidas. O teste feito com ausência de EPC na solução comprova que a formação do complexo MDA-TBA, ou seja, a oxidação ocorre exclusivamente devido à presença dos fosfolipídios da membrana, uma vez que não houve nenhuma absorção por esta solução.

O único controle que obteve praticamente uma ausência de oxidação dos fosfolipídios insaturados foi o submetido à centrifugação antes da reação com a solução de TBA. Neste, o valor da absorbância foi praticamente nulo para o controle não oxidado, o que seria um ótimo resultado se não tivesse havido um importante decréscimo na absorbância do controle oxidado também. Isto pode ocasionar uma perda na confiabilidade do experimento, pois submetendo a amostra a uma centrifugação com tamanha rotação, pode levar à precipitação de alguns produtos resultantes da peroxidação lipídica, prejudicando assim os resultados e suas análises. Então, foi feito este mesmo teste, porém centrifugando a velocidades menores, para tentar reproduzir o resultado obtido para o controle não oxidado, mas não prejudicar o experimento como um todo. Na tabela 5, estão os resultados obtidos. Analisando os dados, é visto que, a centrifugação a $1.000 \times g$ é a mais adequada ao objetivo proposto.

**Tabela 5: Absorbância dos controles oxidados e não oxidados variando a velocidade de rotação das amostras após a incubação com AAPH e a temperatura da água do banho-maria para a reação em que o complexo MDA-TBA é formado.**

| Temperatura (ºC) | Tempo (min) | Absorbância controles | |
|---|---|---|---|
| | | Não oxidado | Oxidado |
| 80 | 30 | 0,024 | 0,058 |
| 85 | | 0,025 | 0,063 |
| 95* | 15 | 0,002 | 0,037 |
| 95** | | 0,005 | 0,050 |

* A amostra foi centrifugada a $5.000 \times g$ por 10 min a 23 ºC antes da reação com a solução de TBA com TCA e HCl;

** A amostra foi centrifugada a $1.000 \times g$ por 10 min a 23 ºC antes da reação com a solução de TBA com TCA e HCl;

## 10.2 Avaliação da atividade antioxidante

### 10.2.1 Estudo da proteção à peroxidação lipídica através do teste ácido 2-tiobarbitúrico

Após a padronização do teste ácido 2-tiobarbitúrico deu-se início ao estudo da atividade antioxidante do 4-NC, ressaltando que todos os experimentos realizados para este trabalho foram feitos em triplicatas. Primeiramente obteve-se a curva da concentração do complexo MDA-TBA (μM) formado em função da concentração de 4-NC (μM) (Figura 28) incorporado a lipossomas de EPC. As reações nestes primeiros testes foram iniciadas com o agente oxidante AAPH com concentração final de 30 mM.

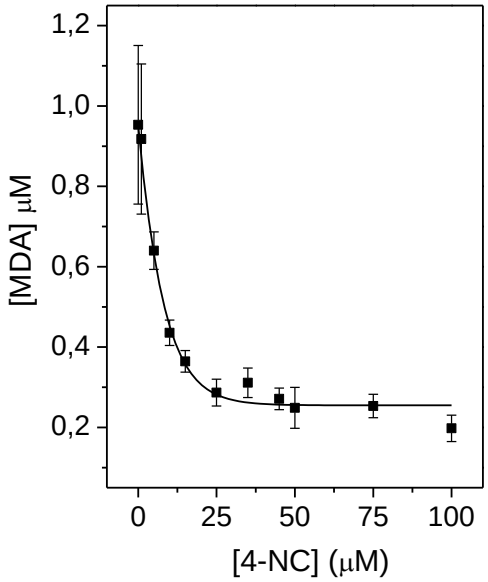


**Figura 28: Concentração de MDA-TBA em função da concentração de 4-NC no qual aproximadamente 1,6 mM de EPC foram incubadas com as concentrações requeridas de 4-NC por 1 h e 30 min a 37 °C. A peroxidação lipídica foi induzida por 30 mM de AAPH incubado por 3 horas a 37°C.**

A Figura 28 mostra um decréscimo significativo na formação do complexo MDA-TBA com o aumento da concentração do 4-NC, confirmando assim, o potencial desta molécula em proteger as membranas modelos contra a ação de radicais livres. Logo, o 4-NC incorporado à vesícula de EPC evita que esta tenha a maioria dos seus lipídios oxidados, interrompendo a propagação das reações em cadeia da peroxidação, impedindo assim, os danos que poderiam causar.

Para um melhor entendimento desta eficiência do 4-NC em proteger os AGPI dos fosfolipídios da vesícula de EPC contra a ação dos radicais gerados a partir da decomposição térmica do AAPH, foi calculada e plotada a porcentagem de proteção desta molécula em função do aumento de sua concentração (Figura 29). O cálculo foi feito utilizando a seguinte equação (10.1) [100]:

$$\text{Proteção (\%)} = 100 - \left[\frac{(\text{A})_{\text{antioxidante}} - (\text{A})_{\text{controle}}}{(\text{A})_{\text{AAPH}} - (\text{A})_{\text{controle}}} \text{ x } 100\right] \qquad (10.1)$$

sendo A o valor da absorbância.

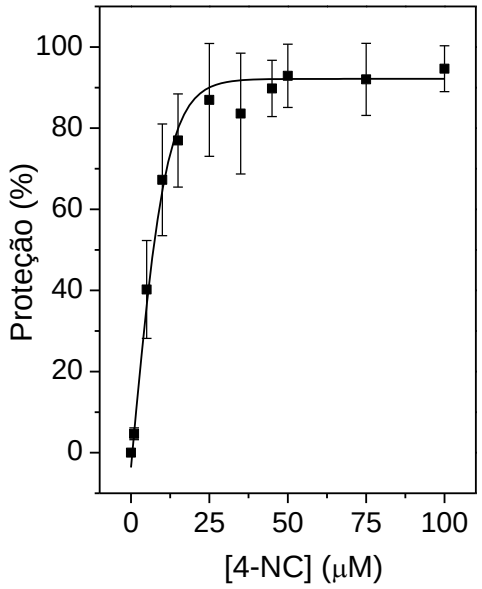


**Figura 29: Efeito antioxidante do 4-NC. As membranas de EPC diluídas em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) (~1,6 mM)) foram incubadas com as concentrações requeridas de 4-NC por 1 h e 30 min a 37°C, e com 30 mM de AAPH a 37°C por 3 horas. O valor da porcentagem de proteção foi calculado de acordo com a equação (10.1).**

Verifica-se que a proteção do 4-NC é proporcional a sua concentração até aproximadamente 25 μM e a proteção chega próximo de 100%. Em pequenas quantidades de 4-NC já houve uma porcentagem significativa de proteção, sendo que com 100 μM deste quase não houve mais indícios de formação de complexo MDA-TBA, obtendo aproximadamente 90% de proteção. Como forma de comparação o mesmo teste foi realizado para o α-tocoferol, molécula clássica, já conhecida por

apresentar um forte potencial antioxidante. Os resultados estão apresentados na Figura 30.

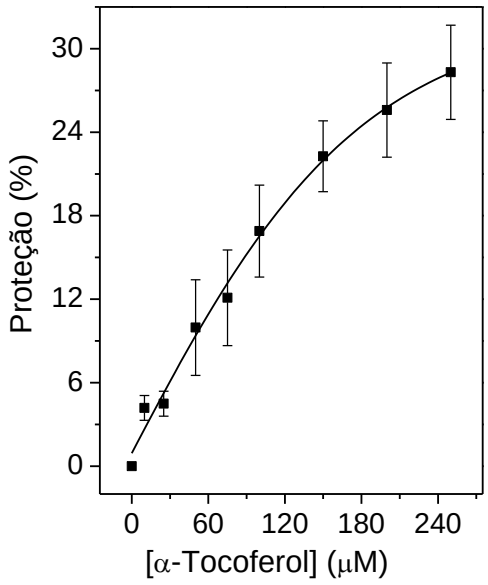


**Figura 30: Efeito antioxidante do α-tocoferol. As membranas de EPC diluídas em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) (~1,6 mM)) foram incubadas com as concentrações requeridas de α-tocoferol por 1 h e 30 min a 37°C, e com 30 mM de AAPH a 37°C por 3 horas.**

Interessante que até hoje não foi compreendido porque a vitamina E, sendo o antioxidante que a natureza escolheu para a proteção de membrana do organismo humano, em testes *in vitro*, apresenta atividade antioxidante muitas vezes superada por outros antioxidantes pouco conhecidos na literatura. No teste apresentado na Figura 30, a molécula de α-tocoferol protegeu em apenas 30% a vesícula de EPC da oxidação dos lipídios, e esse nível de proteção foi atingido para uma concentração de 250 μM da molécula, enquanto para o 4-NC, apenas 5 μM já havia protegido 40%. Visto que o 4-NC é um protetor contra a ação dos radicais livres nas membranas modelos, deu-se prosseguimento ao trabalho testando sua atividade quanto à oxidação induzida pela reação de Fenton (equação 3.1), a qual gera diretamente a hidroxila ($HO^{\cdot}$), o mais nocivo dos radicais livres. Como já foi dito anteriormente, o procedimento foi o mesmo, o que mudou foi apenas o agente oxidante. A concentração de $FeSO_4/H_2O_2$ utilizada nestes experimentos e o tempo de incubação destes em presença do antioxidante incorporado à membrana já havia sido padronizado em outros trabalhos desenvolvidos no laboratório do grupo de biofísica. Assim, para o 4-NC foram utilizadas as mesmas

condições experimentais. A curva da concentração do complexo MDA-TBA em função da concentração de 4-NC está apresentada na Figura 31.

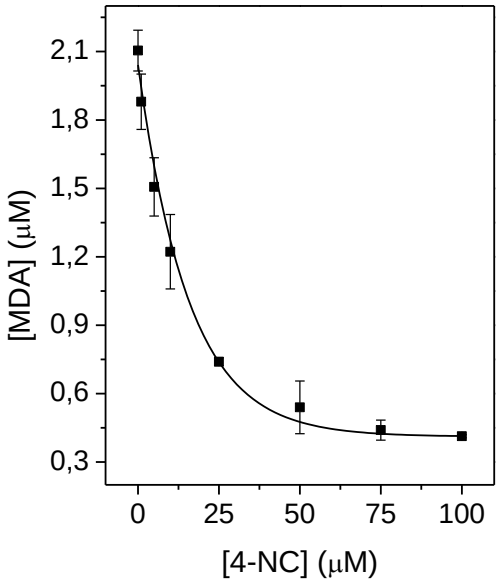


**Figura 31: Variação da concentração de MDA-TBA em função da concentração de 4-NC no qual aproximadamente 1,6 mM de EPC foram incubadas com as concentrações requeridas de 4-NC por 1 h e 30 min a 37°C. A peroxidação lipídica foi induzida por 100 μM/1 mM de $Fe^{2+}/H_2O_2$ a 37°C por 1 hora.**

Observa-se novamente o decréscimo na formação de MDA graças à presença do 4-NC, o que é um indicativo que este também protege contra o radical $HO^{\cdot}$. O gráfico da proteção também foi feito para este caso e está mostrado na Figura 32.

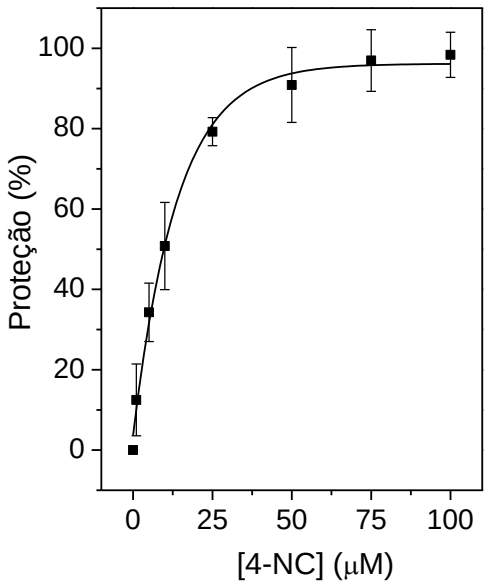


**Figura 32: Efeito Antioxidante do 4-NC. As membranas de EPC diluídas em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) (~1,6 mM)) foram incubadas com as concentrações requeridas de 4-NC por 1 h e 30 min a 37°C e com 100 μM/ 1 mM de $Fe^{2+}/H_2O_2$ por 1 hora a 37°C. O valor da porcentagem de proteção foi calculado de acordo com a equação (10.1).**

Comparando os resultados da Figura 29 com os da Figura 32 percebe-se uma semelhança nos resultados, o que significa que o 4-NC apresenta aproximadamente o mesmo potencial protetor contra os radicais $HO^{\cdot}$ e os radicais $LOO^{\cdot}$ nos lipossomas de EPC.

Lipossomas são ótimos modelos de bicamadas fosfolipídicas devido à sua semelhança com as membranas celulares. No entanto, as membranas celulares isoladas representam um sistema biológico ainda mais próximo da realidade. O próximo passo realizado neste trabalho foi testar a atividade antioxidante do 4-NC em membranas isoladas de eritrócitos, os "ghosts". Em trabalho anterior de nosso laboratório, foi estudada a produção de MDA induzida por AAPH em membranas isoladas de eritrócitos [105]. Foi verificado que para uma concentração de "ghosts" de aproximadamente 4 mg de lipídio/mL a concentração de AAPH que atingiu um máximo de oxidação foi de 50 mM (Figura 33) para um período de incubação de 3 horas e, assim, estas condições experimentais foram utilizadas na indução da lipoperoxidação. Na Figura 34 estão os gráficos da concentração do complexo MDA-TBA (A) e da porcentagem da proteção (B) versus a concentração de 4-NC.

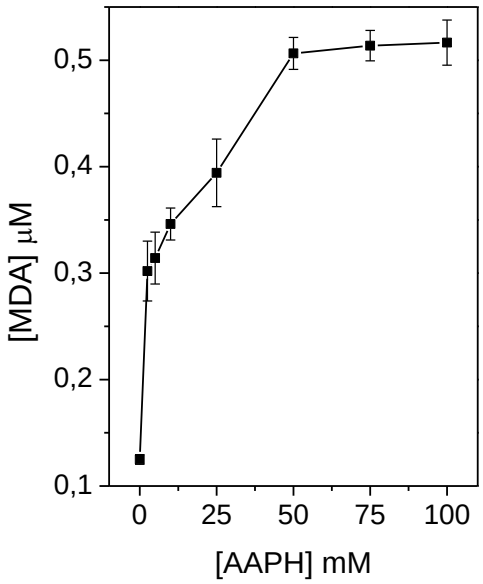


**Figura 33: Concentração de MDA formado pela peroxidação dos lipídios em função da concentração de AAPH. As membranas "ghosts" diluídas em tampão PBS (fosfato 5 mM, NaCl 154 mM, pH 7,4) foram incubadas com diferentes concentrações de agente oxidante AAPH por 3 horas a 37 °C [105].**

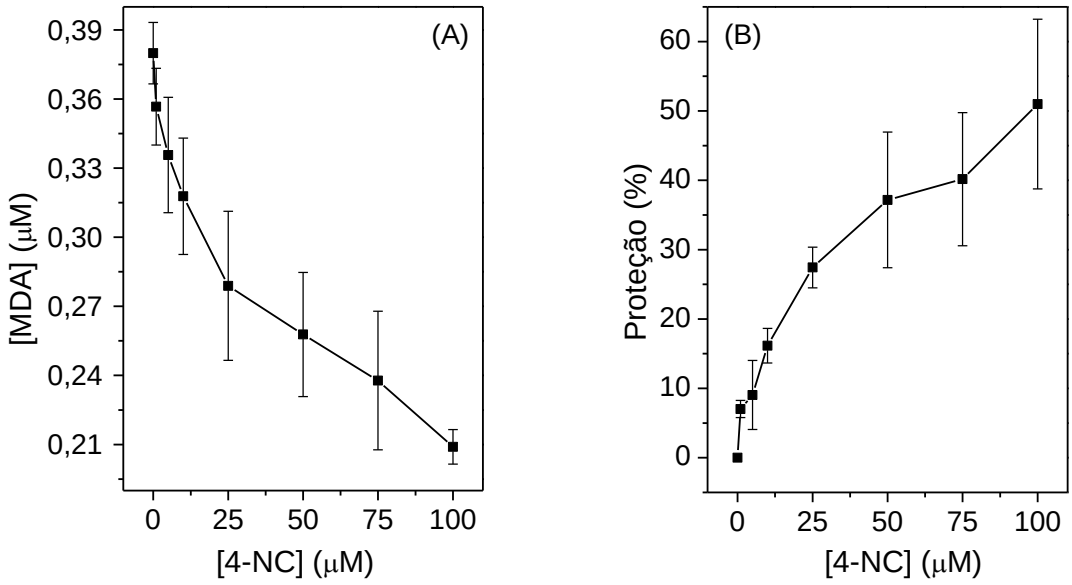


**Figura 34: Produção de MDA-TBA (A) e proteção do antioxidante 4-NC (B) em função de sua concentração. As membranas "ghosts" diluídas em tampão PBS (fosfato 5 mM, NaCl 154 mM, pH 7,4) (~4 mg de lipídio/mL) foram incubadas com as concentrações requeridas de 4-NC por 1 h e 30 min a 37°C. A peroxidação lipídica foi induzida por 50 mM de AAPH incubado por 3 horas a 37°C.**

De acordo com o gráfico da Figura 34 (A) houve a diminuição da formação do complexo MDA-TBA com o aumento da concentração do 4-NC, porém neste caso a concentração de MDA-TBA foi aproximadamente 2,5 vezes menor que em EPC, mesmo esta última estando em menor concentração na solução final. Isso se deve ao fato de os "ghosts" apresentarem além dos lipídios, proteínas e carboidratos, os quais podem ser suscetíveis à oxidação pelos radicais gerados pelo AAPH. Como o complexo MDA-TBA é formado a partir da oxidação dos AGPI dos fosfolipídios da membrana, a oxidação destas outras substâncias não é computada por este método.

Analisando a Figura 34 (B) conclui-se que houve proteção por parte do 4-NC, mas em porcentagens menores que as observadas na Figura 29. Como no caso dos lipossomas de EPC, para os "ghosts" também foi realizado o teste do ácido 2-tiobarbitúrico usando o sistema $FeSO_4/H_2O_2$ como desencadeador da oxidação dos fosfolipídios. Os dados estão plotados na Figura 35, onde pode ser notado que para este sistema houve uma formação de MDA-TBA consideravelmente alta, comparando com os resultados obtidos com AAPH e, neste caso, o 4-NC apresentou maior eficiência de proteção à membrana. Percebe-se da Figura 35 (A) que os fosfolipídios dos "ghosts" são bastante vulneráveis ao ataque dos radicais $HO^{\cdot}$, porém o 4-NC demonstrou um elevado potencial de bloquear a ação destes nas membranas naturais. Uma concentração

de 2,5 μM de 4-NC obteve 95% de proteção (Figura 35 (B)), ou seja, em baixíssimas concentrações o 4-NC já atingiu o máximo de proteção.

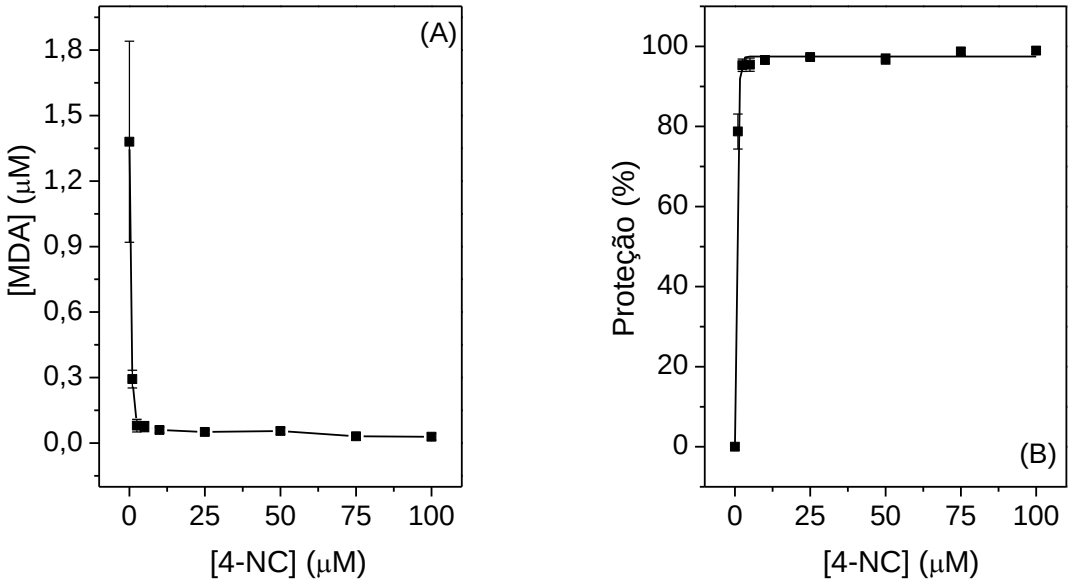


**Figura 35: Concentração de MDA-TBA (A) e percentual de proteção do antioxidante 4-NC (B) em função de sua concentração. As membranas "ghosts" diluídas em tampão PBS (fosfato 5 mM, NaCl 154 mM, pH 7,4) a ~4 mg de lipídio/mL foram incubadas com as concentrações requeridas de 4-NC por 1 h e 30 min a 37°C. A peroxidação lipídica foi induzida por 200 μM/1mM de $Fe^{2+}/H_2O_2$ por 1 hora a 37°C. O valor da porcentagem de proteção foi calculado de acordo com a equação (10.1).**

Este teste descrito acima foi refeito, porém com algumas modificações. Uma destas foi a concentração de $H_2O_2$, que passou de 1 para 2 mM e outra foi o tempo de incubação do sistema membrana/antioxidante com $FeSO_4/H_2O_2$, que passou a ser três horas, assim como foi feito quando utilizamos o AAPH como agente oxidante. A justificativa para esta escolha é um dos experimentos que vem a seguir e que só pôde ser concluído devido a estas condições citadas. Isto será mais bem entendido no próximo item deste trabalho. Aqui também foi testada a molécula de α-tocoferol como forma de comparação. Os resultados, tanto da formação do complexo MDA-TBA como da porcentagem de proteção em função da concentração dos antioxidantes se encontram nas figuras 36 (A) e (B), respectivamente. Os resultados mostraram uma semelhança com os obtidos na Figura 35 para o 4-NC, ou seja, em baixas concentrações já houve uma proteção de aproximadamente 100% da membrana contra a ação do radical $HO^{\cdot}$. Quando comparado com o antioxidante α-tocoferol, o 4-NC apresentou uma eficiência contra o ataque dos radicais livres um pouco maior, porém o comportamento foi o mesmo, isto é, o máximo de proteção é atingindo em concentrações muito pequenas.

Este comportamento do α-tocoferol não era esperado, pois em todos os outros testes realizados neste trabalho, sua atividade antioxidante foi consideravelmente menor que a do 4-NC. Isso mostra que sua ação contra os radicais $HO^{\cdot}$ é maior que contra os radicais provindos da decomposição térmica do AAPH.

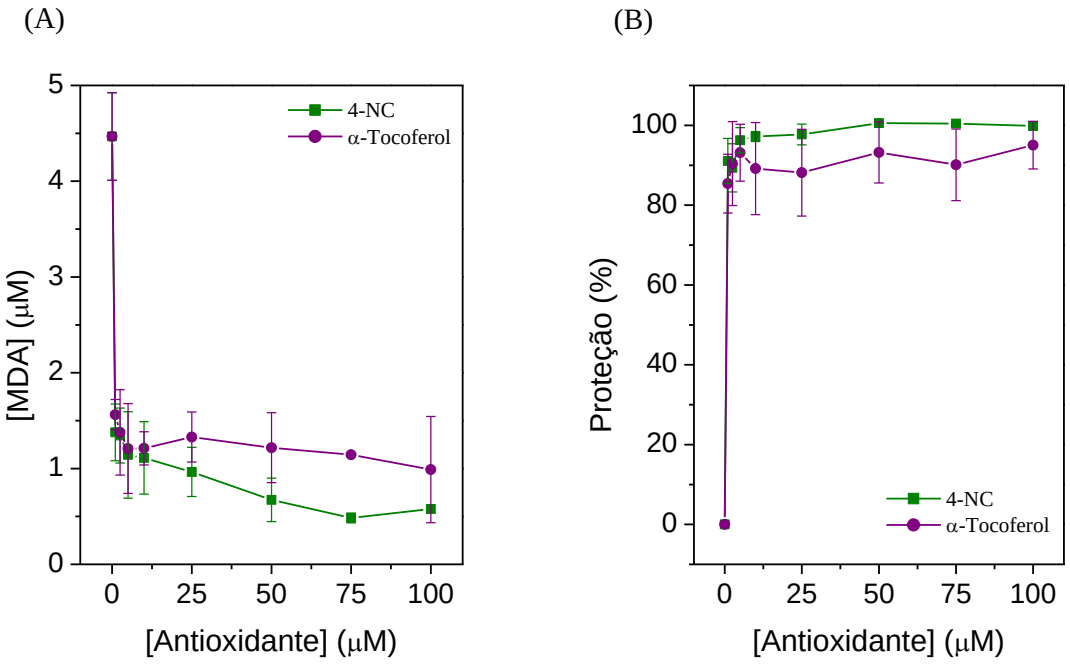


**Figura 36: Concentração de MDA-TBA (A) e percentual de proteção dos antioxidantes 4-NC (quadrado verde) e α-tocoferol (círculo roxo) (B) em função de suas concentrações. A peroxidação lipídica foi induzida por 200 μM/2 mM de $Fe^{2+}/H_2O_2$ por 3 horas a 37°C.**

Se compararmos esta última figura (Figura 36 (A)) com a Figura 35 (A) é possível perceber que a formação do complexo MDA-TBA aqui foi aproximadamente duas vezes maior, o que já era esperado, pois a concentração de $H_2O_2$ foi duplicada, aumentando a quantidade de radicais $HO^{\cdot}$ formados e consequentemente a quantidade de lipídios da membrana atacados.

O teste do ácido 2-tiobarbitúrico demonstrou ser eficiente para o estudo do 4-NC atuando como bloqueador da ação de radicais livres tanto em membranas modelos de fosfolipídios como em membranas isoladas de eritrócitos. Entretanto, na área de pesquisa dos radicais livres em especial é importante comprovar os resultados através de outros métodos. Na próxima seção serão apresentados os resultados obtidos com a espectroscopia de RPE de marcadores de spin, a qual permite analisar os processos da oxidação examinando a dinâmica molecular dos sistemas biológicos.

### 10.2.2 Efeito protetor do 4-NC analisado por RPE do marcador de spin 5-DSA em membrana eritrocitária.

O potencial antioxidante do 4-NC utilizando a técnica de RPE foi feito monitorando a rigidez da membrana de "ghosts" pela aferição do parâmetro $2A_{\parallel}$, de tal forma que quanto maior for o valor deste parâmetro, mais rígida se encontra a membrana, implicando na oxidação de uma quantidade maior de lipídios. O primeiro passo, para o desenvolvimento desse estudo foi conhecer qual a concentração mínima necessária de AAPH para se obter uma diferença segura do parâmetro $2A_{\parallel}$, das membranas oxidadas em relação às membranas não oxidadas (membranas controle). Com o objetivo de obter essa resposta foi realizado um experimento com variação da concentração de AAPH e medida do parâmetro espectral $2A_{\parallel}$ (Figura 37).

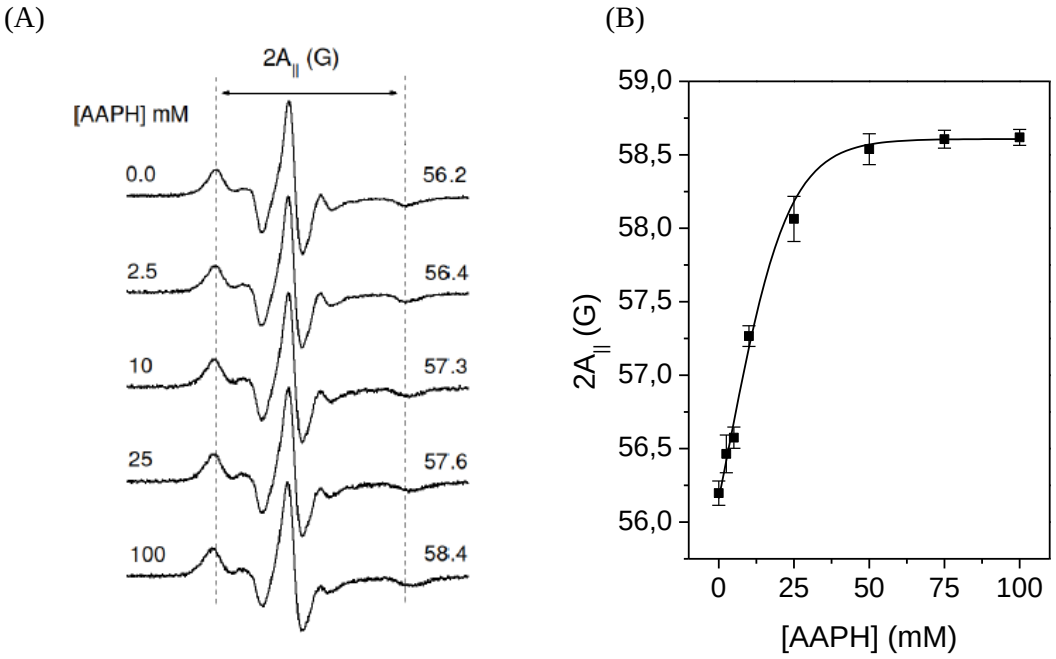


**Figura 37: (A): Espectros experimentais de RPE do marcador de spin 5-DSA em membranas de eritrócitos oxidadas com AAPH. (B): Influência da concentração do agente oxidante no grau de oxidação dos componentes da membrana avaliada através do parâmetro espectral $2A_{\parallel}$. As soluções contendo aproximadamente 4 mg de lipídios/mL diluídas em tampão PBS (fosfato 5 mM, NaCl 154 mM e pH 7,4) foram incubadas com diferentes concentrações de AAPH por 3 horas a 37°C.**

Nota-se na Figura 37 que o parâmetro $2A_{\parallel}$ alcança um máximo a partir de 50 mM de AAPH com uma variação de aproximadamente 2 G em relação às amostras de controle (não oxidadas). Como o erro experimental deste parâmetro é de 0,5 G, a diferença total do $2A_{\parallel}$ é suficientemente ampla para ser efetuada uma análise. Assim foi escolhida a concentração de 50 mM de AAPH e a atividade antioxidante do 4-NC foi

testada em comparação com a do α-tocoferol. A Figura 38 apresenta os valores do parâmetro $2A_{\|}$ do marcador de spin 5-DSA inserido em "ghosts" de eritrócitos após oxidação com 50 mM de AAPH em presença de diferentes concentrações de antioxidantes.

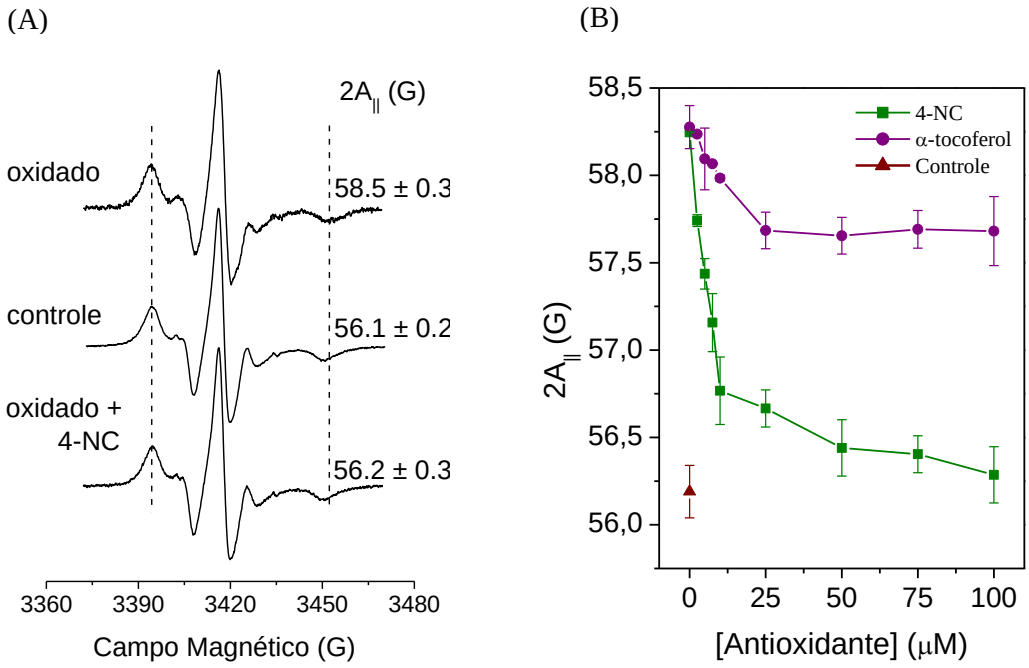


**Figura 38: (A): Espectros experimentais de RPE do marcador de spin 5-DSA em membranas de eritrócitos não oxidadas, oxidada com 50 mM de AAPH e previamente incubada com 100 μM do composto 4-NC; (B): Atividade antioxidante dos compostos α-tocoferol (círculo roxo) e 4-NC (quadrado verde) avaliada através do parâmetro espectral $2A_{\|}$, tendo como controle a membrana não oxidada (losango vinho). As membranas "ghosts" foram previamente incubadas com o antioxidante por 1 h e30 min a 37°C, e depois com 50 mM de AAPH a 37°C por 3 horas.**

Analisando a Figura 38 observa-se que houve um decréscimo de 2 G do parâmetro $2A_{\|}$ do marcador de spin inserido na membrana com 4-NC presente, confirmando sua proteção contra o ataque das espécies radicalares oriundas do AAPH nas membranas naturais. Com 50 μM, o 4-NC protegeu em praticamente 100% os "ghosts" das hemácias em relação ao controle, enquanto que o α-tocoferol, nesta mesma concentração, apresentou uma diferença de menos de 1 G no parâmetro espectral $2A_{\|}$. Os resultados mostraram que o potencial do 4-NC em evitar a peroxidação lipídica e consequentemente o enrijecimento da membrana eritrocitária foi de aproximadamente 3 vezes maior que o do α-tocoferol.

O mesmo teste foi realizado utilizando como indutores da oxidação os agentes $FeSO_4/H_2O_2$. Em trabalhos já realizados em nosso laboratório foi visto que uma concentração ideal de $H_2O_2$ para a percepção da oxidação das membranas de eritrócitos através da análise do parâmetro $2A_{\parallel}$ é de 2 mM enquanto que a de $FeSO_4$, se observarmos a figura abaixo (Figura 39), é de 200 μM. Nesta concentração houve uma diferença considerável do parâmetro $2A_{\parallel}$ (aproximadamente 1,7G), a qual é suficiente para a realização dos estudos desejados. E esta diferença no $2A_{\parallel}$ só é possível com 2 mM de $H_2O_2$, justificando assim a utilização desta concentração tanto neste experimento como no demonstrado na Figura 36, que na verdade é o mesmo experimento, porém no teste do ácido 2-tiobarbitúrico (Figura 36) as medidas foram feitas com o sobrenadante após a centrifugação de $20.000 \times g$, e o parâmetro $2A_{\parallel}$ com o concentrado das membranas "ghosts".

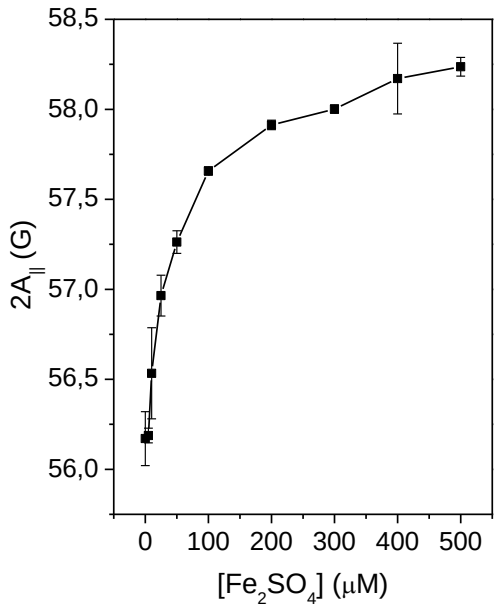


**Figura 39: Influência da concentração do agente oxidante no grau de oxidação dos componentes da membrana "ghost" avaliada através do parâmetro espectral $2A_{\parallel}$. As soluções contendo aproximadamente 4 mg de lipídios/mL diluídas em tampão PBS (fosfato 5 mM, NaCl 154 mM e pH 7,4) foram incubadas com diferentes concentrações de $FeSO_4$ por 3 horas a 37°C.**

A seguir, nas Figuras 40 (A) e (B), estão representados os valores do parâmetro $2A_{\parallel}$ do marcador de spin 5-DSA inserido em "ghosts" de eritrócitos após oxidação com 200 μM/2mM de $FeSO_4/H_2O_2$ em presença de diferentes concentrações de antioxidantes.

(A) (B)

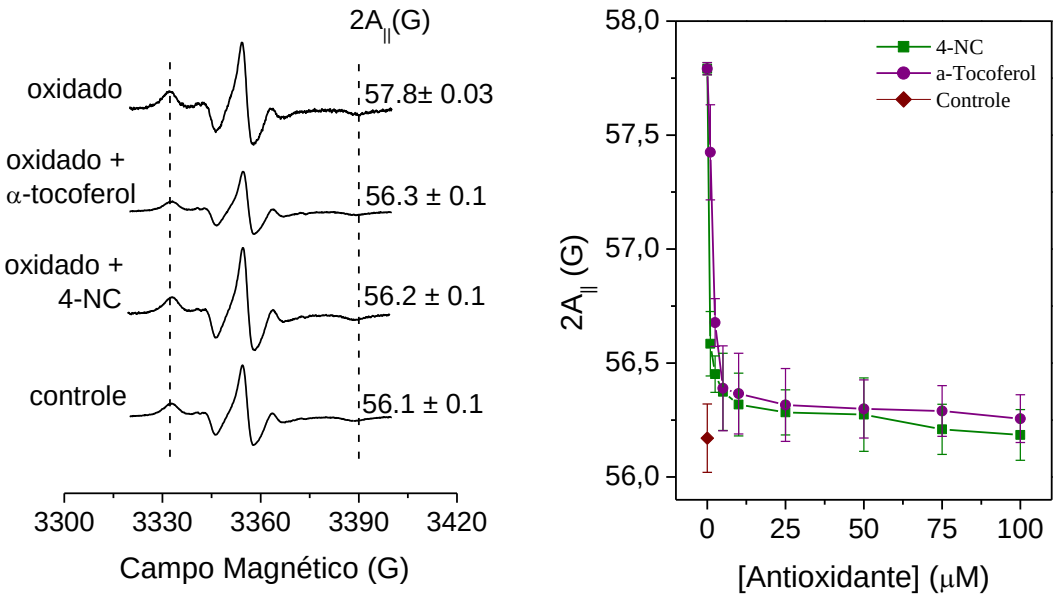


**Figura 40: (A): Espectros experimentais de RPE do marcador de spin 5-DSA em membranas de eritrócitos não oxidadas, oxidada com 200 μM/2 mM de $Fe^{2+}/H_2O_2$ e previamente incubada com 100 μM do composto α-tocoferol e 100 μM de 4-NC; (B): Atividade antioxidante dos compostos α-tocoferol (círculo roxo) e 4-NC (quadrado verde) avaliada através do parâmetro espectral $2A_{\parallel}$, tendo como controle a membrana não oxidada (losango vinho). As membranas "ghosts" foram previamente incubadas com o antioxidante por 1 h e30 min a 37°C, e depois com 200 μM/2 mM de $Fe^{2+}/H_2O_2$ a 37°C por 3 horas.**

A Figura 40 nos mostra que o efeito dos antioxidantes contra a ação dos radicais oriundos da reação de Fenton foi melhor se comparado com suas atividades em relação aos radicais provindos do agente AAPH (Figura 38). Foi visto que em baixíssimas concentrações de antioxidantes já houve uma grande queda no valor do parâmetro $2A_{\parallel}$, de mais de 1G, e em apenas 25 μM o valor deste praticamente se iguala ao controle não oxidado, demonstrando assim uma considerável proteção contra a rigidez da membrana eritrocitária.

Comparando a atividade antioxidante do 4-NC com a do α-tocoferol avaliada através do parâmetro $2A_{\parallel}$, vimos que a diferença entre as duas foi muito pequena, não sendo suficiente para concluir qual das moléculas apresenta uma melhor atividade contra a ação dos radicais $HO^{\cdot}$, mesmo o 4-NC atingindo valores um pouco menores para o $2A_{\parallel}$. Este efeito não era esperado pelo mesmo motivo já explicado anteriormente neste trabalho.

### 10.2.3 Teste de neutralização do radical DPPH

Para os testes de redução do radical DPPH foi, inicialmente, adquirido o espectro da absorção deste para uma concentração de 75 μM em solução metanólica, com o intuito de encontrar seu máximo de absorção. A Figura 41 mostra o espectro de absorção óptica característico da solução de DPPH˙, onde pode ser observado um pico de absorção em 515 nm.

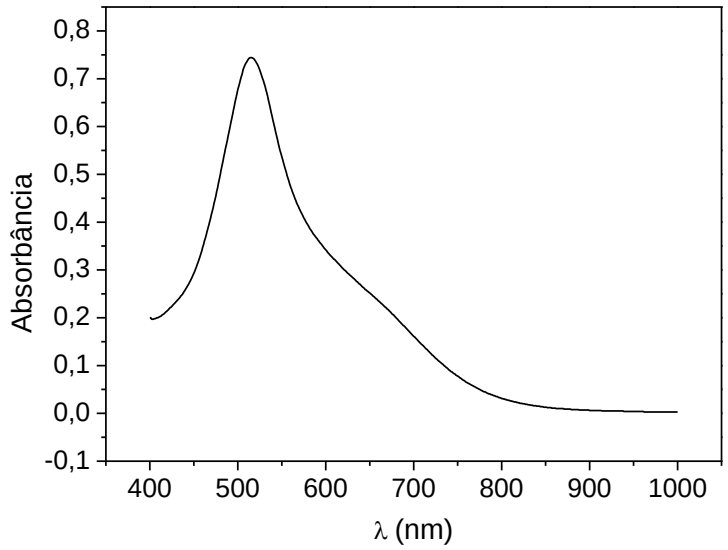


**Figura 41: Espectro de absorção do DPPH em solução metanólica. Seu pico de absorção máxima ocorre em 515 nm.**

No espectro de absorção do 4-NC (Figura 42) é possível observar que não há nenhuma absorção desta molécula no comprimento de onda de 515 nm que será utilizado para acompanhar a redução do DPPH. Uma vez que o 4-NC foi diluído em etanol e as amostras de DPPH˙ em metanol, o branco ou linha de base usada para zerar o espectrofotômetro foi realizado sempre com uma solução destas duas substâncias nas quantidades iguais as utilizadas nos experimentos seguintes.

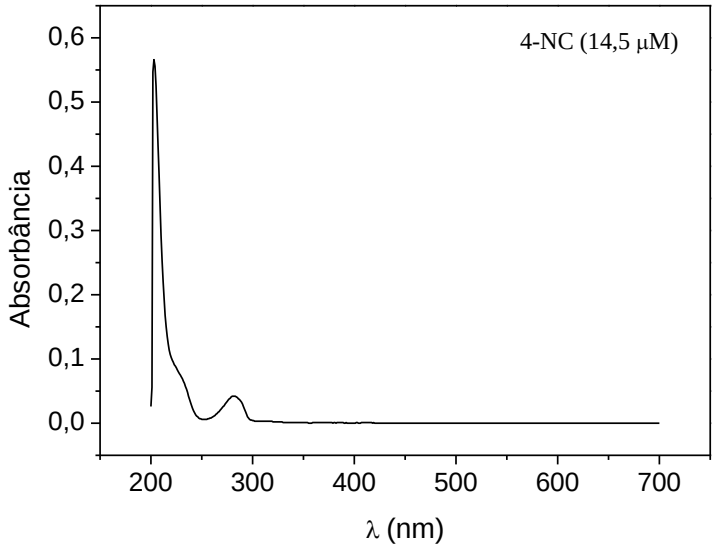


**Figura 42: Espectro de absorção do 4-NC a uma concentração de 14,5 μM em solução de etanol.**

Para dar continuação aos estudos sobre a atividade antioxidante do 4-NC, foi verificado o potencial deste de reduzir o radical DPPH. Para isso foi obtido o gráfico (Figura 43) do decréscimo da absorção das soluções de DPPH· contendo diversas concentrações de 4-NC, para monitorar a cinética destas reações entre o radical e o antioxidante. As leituras foram feitas de 30 em 30 segundos por 30 minutos, todas em triplicatas.

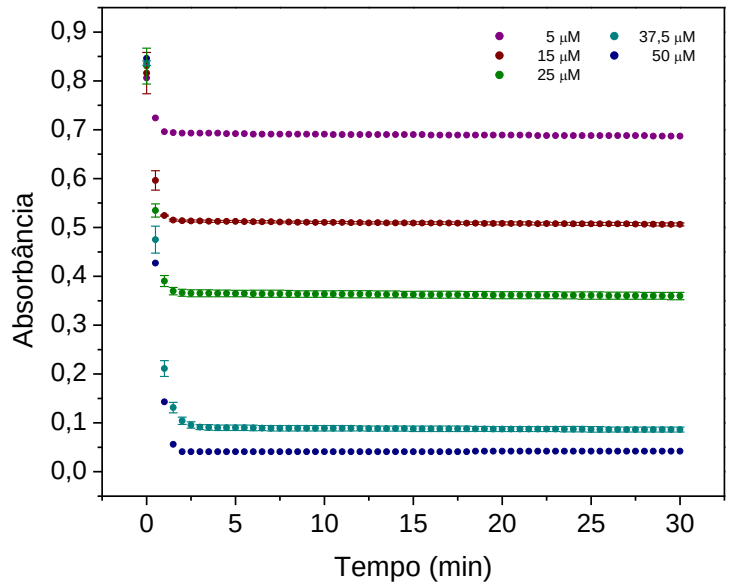


**Figura 43: Decaimento no valor da absorbância do DPPH· em função do tempo na presença de 4-NC. Soluções de metanol contendo 75 μM de DPPH e 5 μM (roxo), 15 μM (vinho), 25 μM (verde), 37,5 μM (verde água) e 50 μM (azul) de 4-NC foram monitoradas por 30 minutos, sendo as absorbâncias medidas a cada 30 segundos em um comprimento de onda igual a 515 nm.**

Observa-se pelo decréscimo da absorbância na Figura 43 que o 4-NC reduz rapidamente o DPPH$^{\cdot}$, e que esta redução é diretamente proporcional a sua concentração presente na solução. Em 50 μM houve redução praticamente de todo DPPH$^{\cdot}$ contido na amostra. A partir destes resultados foi realizado o cálculo da estequiometria total da reação informando quantas moléculas de radical DPPH são reduzidas por uma de 4-NC em 30 minutos de reação. Para isso foi preciso encontrar o valor da absortividade molar ($\varepsilon$) do DPPH utilizando a lei de Lambert-Beer. Sabendo que $\varepsilon$ depende do solvente usado para a diluição do DPPH$^{\cdot}$, o cálculo foi realizado com o mesmo sistema de todos os experimentos feitos através deste método, ou seja, utilizando o valor da absorbância lida em uma concentração de 75 μM de DPPH$^{\cdot}$ em solução de metanol e etanol. O valor encontrado para $\varepsilon$ foi de 11 129 $M^{-1}cm^{-1}$, a partir disso conclui-se que uma molécula de 4-NC reduz 1,9 ± 0,4 moléculas de radical DPPH. Como forma de comparação, este mesmo experimento foi realizado para as moléculas de α-tocoferol e (+)-Catequina e plotado juntamente com os resultados encontrados para o 4-NC (Figura 44).

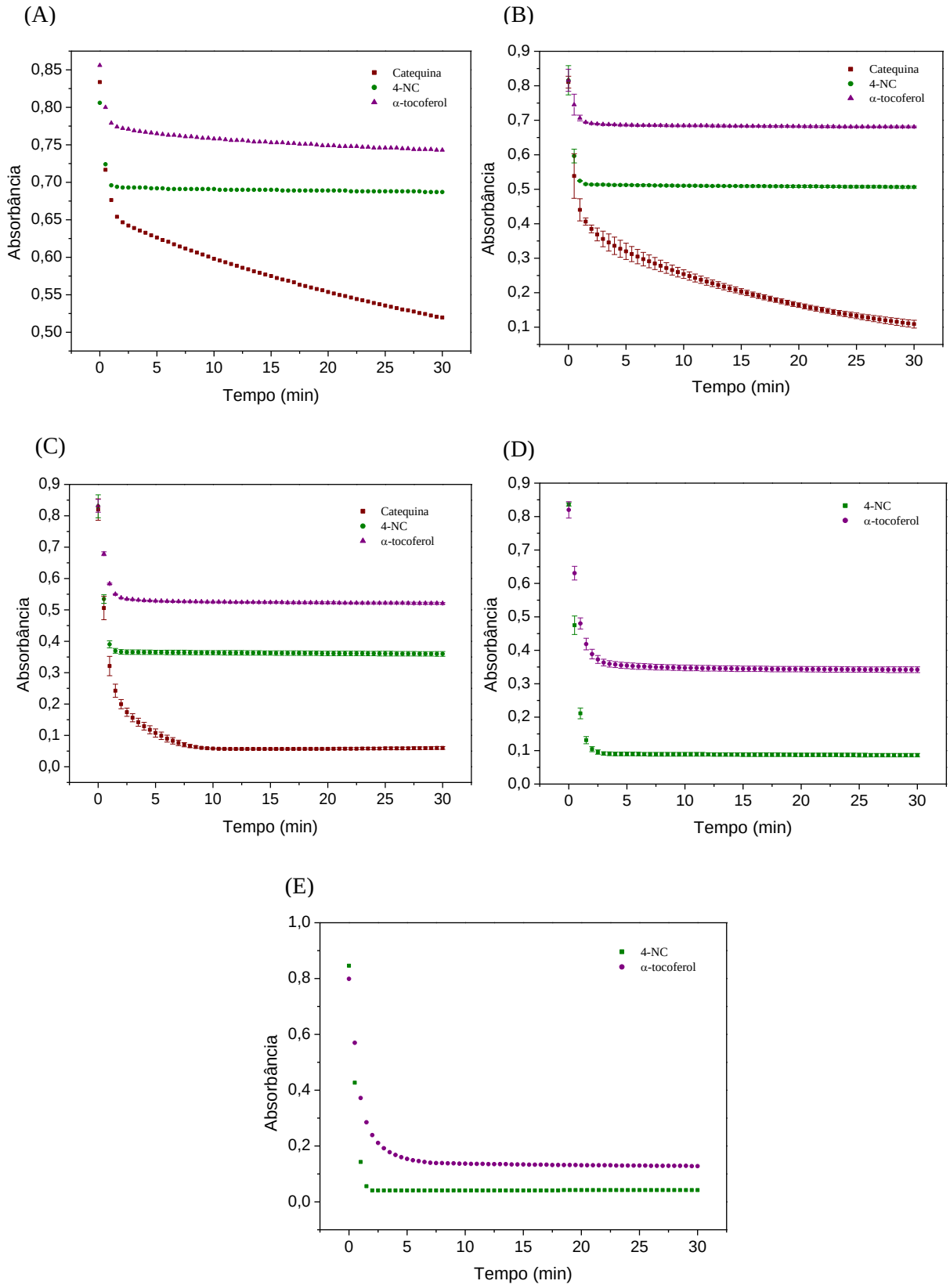


**Figura 44: Decaimento no valor da absorbância do DPPH˙em função do tempo na presença de 4-NC, α-tocoferol e (+)-Catequina. Soluções de metanol contendo 75 µM de DPPH e 5 µM (A), 15 µM (B), 25 µM (C) de 4-NC, α-tocoferol e (+)-Catequina e 37,5 µM (D) e 50 µM (E) de 4-NC e α-tocoferol foram monitoradas por 30 minutos, sendo as absorbâncias medidas a cada 30 segundos em um comprimento de onda igual a 515 nm.**

Analisando o decréscimo na absorbância nos gráficos da Figura 44, nota-se que a (+)-Catequina apresentou a maior capacidade de reduzir o DPPH·, seguida pelo 4-NC e o menor efeito foi do α-tocoferol. Pelos cálculos da estequiometria das reações, como apresentado, encontrou-se que a (+)-Catequina reduz 4,3 ± 1,4 moléculas de DPPH enquanto que o α-tocoferol reduz 1,2 ± 0,2 em menos de 30 minutos de reação.

Muitos autores demonstram o potencial antioxidante de uma molécula em função da porcentagem de inibição de DPPH·. Esta pode ser calculada através da seguinte equação:

$$\%\, Inibição = \left[\frac{A_{DPPH} - A_{antioxidante}}{A_{DPPH}}\right] \times 100 \qquad (9.2)$$

onde A é o valor da absorbância. Na Figura 45 está representada a porcentagem de inibição do DPPH· em função das concentrações de antioxidantes. O cálculo foi realizado em 30 minutos de reação antioxidante/$DPPH^{\cdot}$.

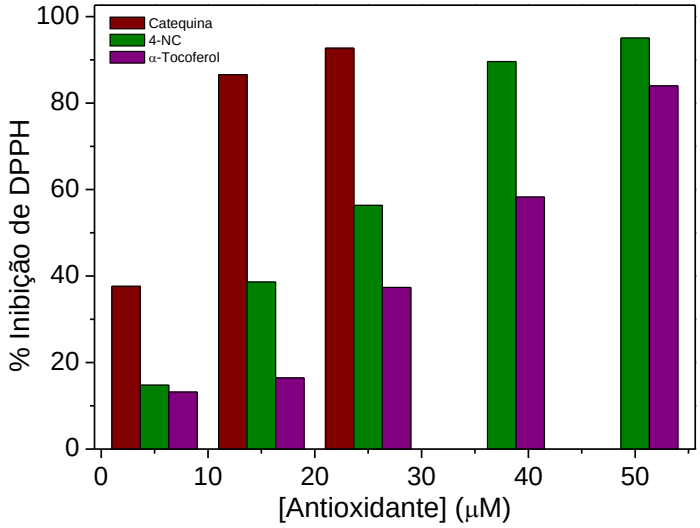


**Figura 45: Porcentagem de inibição do radical DPPH pelos antioxidantes (+)-Catequina (vinho), 4-NC (verde) e α-Tocoferol (roxo) em função de suas concentrações. A porcentagem foi calculada após 30 minutos de reação com DPPH· (75 μM) obedecendo a equação (9.2).**

A (+)-Catequina apresentou uma porcentagem de inibição de DPPH· maior que as demais moléculas, chegando a reduzir quase 100% com 25 μM, enquanto que o 4-NC conseguiu aproximadamente o mesmo resultado com o dobro de concentração. Muitas vezes o valor da inibição é dado em $EC_{50}$, capacidade da molécula antioxidante de reduzir 50% do DPPH·. Para o 4-NC, vê-se que este resultado é obtido em uma concentração próxima a 25 μM.

# 11 Discussões

O elevado número de lipídios encontrados nas membranas celulares, fazem destas um dos principais alvos dos ataques de radicais livres, principalmente das EROs, as quais são geradas in vivo por reações enzimáticas e não enzimáticas. Estes radicais danificam a estrutura das células levando a uma variedade de patologias, dentre as quais podemos destacar inflamação, câncer, envelhecimento e outras que já foram comentadas no início deste trabalho. Hoje, medicamentos empregados em tratamentos de patologias relacionadas ao estresse oxidativo incluem antioxidantes tais como vitamina E e C, β-caroteno e macroelementos responsáveis pela atividade de algumas enzimas antioxidantes [13]. Estes compostos são capazes de neutralizar os efeitos tóxicos dos radicais livres, inibindo ou retardando a sua ação de oxidação. Neste trabalho foi avaliada a atividade antioxidante do catecol 4-NC, molécula isolada dos extratos de raízes de uma planta conhecida popularmente por "pariparoba". O estudo foi realizado por meio da utilização de diversas metodologias, sendo o potencial antioxidante do 4-NC comparado com outras moléculas que já tinham sua atividade antioxidante conhecida na literatura, α-tocoferol e catequina.

Para avaliar o efeito antioxidante do 4-NC, o composto AAPH e o sistema $Fe^{2+}/H_2O_2$ foram utilizados como descrito no capítulo de materiais e métodos. Reações foram iniciadas pela adição dos sistemas oxidativos e a extensão do processo de peroxidação lipídica foi avaliada, inicialmente, pelo teste do ácido 2-tiobarbitúrico por espectroscopia ótica. Os resultados demonstraram que houve um decréscimo significativo na formação do complexo MDA-TBA tanto no sistema contendo 4-NC incorporado às membranas de EPC como nos sistemas em que o 4-NC se encontrava incorporado às membranas eritrocitárias, comprovando assim, seu potencial antioxidante. Nota-se nas Figuras 30 e 36 (B) que a proteção contra a ação dos radicais livres, consequentes dos ataques oxidativos do composto AAPH e da reação $Fe^{2+}/H_2O_2$, é menor para a molécula de α-tocoferol, comparada à do 4-NC. Este resultado está de acordo com os resultados encontrados por Barros, S.B.M. e colaboradores [13]. Eles utilizaram homogenatos de cérebro de ratos para avaliar a atividade antioxidante do 4-NC e compará-la a do α-tocoferol. MDA e quimiluminescência (QL) foram os parâmetros empregados para avaliar a autoxidação espontânea de homogenato de

cérebro. Os valores de $Q_{\frac{1}{2}}$ (concentração necessária para inibir 50% da autoxidação do homogenato), calculados a partir das medidas de MDA e QL para o 4-NC e α-tocoferol foram 0,75 e 0,68 μM e 14,4 e 10,9 μM, respectivamente. Estes resultados indicam uma atividade antioxidante do 4-NC maior que a do α-tocoferol. A explicação para esse fato, segundo os autores, é a presença de dois grupos hidroxilas, posições meta e para, e uma cadeia alifática insaturada na molécula de 4-NC, enquanto que o α-tocoferol possui apenas um grupo hidroxila no anel aromático e uma cadeia lateral saturada. A atividade antioxidante maior observada para o 4-NC, quando comparado com o α-tocoferol, pode ser atribuída à presença da cadeia alifática insaturada [13].

A adição de baixas concentrações de íons de metais de transição tais como $Fe^{2+}$ no ADN causa degradação oxidativa da desoxirribose em MDA e outros compostos relacionados, os quais formam um cromógeno com o ácido TBA (TBARS). Segundo Desmarchelier *et al.* [14] acrescentando a molécula de 4-NC na reação contendo ADN e sais de $Fe^{2+}$, há uma diminuição da produção de TBARS, o que indica uma redução nos danos oxidativos da desoxirribose. Os autores também demonstraram o potencial do 4-NC em eliminar os radicais peroxilas ($LOO^{\cdot}$) e hidroxilas ($HO^{\cdot}$) e então reduzir o estresse oxidativo, o qual leva à peroxidação lipídica e aos danos no ADN. Estes autores, assim como Barros, S.B.M *et al.,* também afirmaram que as propriedades antioxidantes dos fenóis são devido aos grupos hidroxilas e fenólicos presentes em sua estrutura química.

A espectroscopia de RPE de marcadores de spin tem sido largamente utilizada no estudo da dinâmica e do ordenamento estrutural de membranas lipídicas. Dentre os marcadores de spin, os derivados do ácido esteárico são um dos mais utilizados devido principalmente a sua alta capacidade de incorporação em membranas lipídicas e naturais. O decréscimo de fluidez de membrana acompanhando a lipoperoxidação tem sido associado à diminuição na razão de ácidos graxos insaturados/saturados presentes na membrana [106]. Cadeias acilas insaturadas tornam a membrana mais fluida em comparação com as de ácidos graxos saturados, devido ao menor empacotamento das cadeias de ácidos graxos na configuração cis da dupla ligação na membrana [107]. Mas, também há evidências de que a rigidez da membrana causada pela lipoperoxidação é principalmente devido à formação de ligações covalentes entre os radicais lipídicos adjacentes [108], que levaria à diminuição da liberdade de movimento das cadeias graxas. Estas ligações cruzadas entre as cadeias lipídicas da membrana diminuiriam a

qualidade do empacotamento das mesmas, gerando inclusive vazamento de eletrólitos das células [109].

Neste trabalho, foi utilizado o marcador de spin derivado do ácido esteárico 5-DSA no estudo das alterações na dinâmica dos lipídios de membranas de eritrócitos sujeitos ao processo de peroxidação por moléculas radicais oriundas da degradação do composto AAPH e do sistema $Fe^{2+}/H_2O_2$. Esse marcador de spin possui o grupo nitróxido na 5ª posição da cadeia carbônica, o que permite o monitoramento das alterações na fluidez da bicamada lipídica. O processo de oxidação das biomoléculas presentes nesses sistemas acarretou o aumento do parâmetro $2A_{||}$, o que demonstra a diminuição da fluidez da membrana. Os resultados, neste caso, foram similares aos obtidos através da análise da formação do complexo MDA-TBA. Esse fato sugere uma forte correlação entre o processo de peroxidação lipídica e a perda da fluidez das membranas eritrocitárias. As atividades antioxidantes dos compostos $\alpha$-tocoferol e 4-NC foram monitorados por meio das alterações nos espectros de RPE dos marcadores de spin 5-DSA promovidas pelo processo de oxidação dos lipídios. O composto antioxidante 4-NC, em concentrações relativamente baixas, evitou a perda de mobilidade dos marcadores de spin 5-DSA. Já o $\alpha$-tocoferol apresentou atividade antioxidante relativamente baixa no sistema onde a indução da peroxidação foi realizada com o AAPH e relativamente alta quando induzida com $Fe^{2+}/H_2O_2$, quando comparado ao 4-NC. A característica anfifílica da molécula de 4-NC, com uma cadeia carbônica hidrofóbica e uma cabeça polar, a torna um composto com alta afinidade por membranas biológicas.

A avaliação da fluidez de membrana por RPE através do parâmetro $2A_{||}$ do marcador de spin 5-DSA como forma de monitorar o grau de peroxidação lipídica vem sendo utilizada já algum tempo. De acordo com [110], raízes de café incubadas a 10°C na ausência de luz apresentaram, através de estudos realizados com RPE utilizando o marcador de spin 5-DSA, aumento da rigidez das raízes, inibição do crescimento das plantas, mudança nos processos metabólicos e formação de MDA, sendo estes fenômenos, todos relacionados ao processo de peroxidação lipídica. Alterações similares foram encontradas em membranas de mitocôndrias sujeitas à ação de radicais livres produzidos pela presença de ferro [111]. As variações encontradas nas membranas de mitocôndria foram evitadas quando essas membranas foram incubadas previamente com o fármaco dipiridamol.

No método do radical livre DPPH, a eficiência antioxidante é medida à temperatura ambiente para eliminar o risco de degradação térmica das moléculas testadas. No entanto, o mecanismo de reação entre o antioxidante e DPPH˙ depende da conformação estrutural da molécula antioxidante [112]. O número de grupos hidroxilas presentes nas moléculas e os produtos da reação, tais como dímeros e quinonas, capazes de reagirem com o DPPH˙, influenciam na estequiometria de forma a aumentá-la [113]. Como o 4-NC apresenta dois grupos hidroxilas, é capaz de reduzir aproximadamente duas moléculas de DPPH˙, e isso se repete para as outras duas substâncias. A (+)-Catequina reduz aproximadamente cinco DPPH˙ e o α-tocoferol apenas um. Quando se passa a observar a cinética das reações, isto é, a quantidade de radical DPPH reduzido em função do tempo, vê-se que o 4-NC reduz o DPPH˙ a uma velocidade maior que as outras duas moléculas usadas como referência, uma vez que a curva da absorção na presença deste satura rapidamente significando estabilização da reação. Isso é notado também em relação ao α-tocoferol, pois este apresenta uma capacidade de reduzir o DPPH˙ menor que a (+)-Catequina, mas a redução é feita quase que instantaneamente. Uma explicação para este acontecimento pode ser a distribuição dos grupos hidroxilas nas moléculas. Como na (+)-Catequina os grupos hidroxilas estão espalhados, esta gasta um tempo maior para que todos reduzam um DPPH˙. Esta pode ser uma característica de importância considerável para uma molécula antioxidante.

# 12 Conclusões

- ✓ A molécula de 4-NC foi capaz de proteger tanto as vesículas de EPC como as membranas "ghosts" da formação de MDA quando submetidas ao estresse oxidativo. Em membranas de EPC sua eficiência contra a ação dos radicais livres oriundos da decomposição térmica do AAPH e da reação de Fenton (equação 3.1) foi aproximadamente a mesma, já para as membranas eritrocitárias a proteção foi significativamente maior para o sistema com $Fe^{2+}/$ $H_2O_2$ ($HO^{\cdot}$) que para o sistema com AAPH ($LOO^{\cdot}$);

- ✓ O potencial em proteger os fosfolipídios da EPC da ação dos radicais livres, através do monitoramento da formação de MDA foi consideravelmente maior para a molécula de 4-NC que para a molécula de α-tocoferol. Já em membranas "ghosts" oxidadas a partir da reação $Fe^{2+}/$ $H_2O_2$, a diferença foi pequena no efeito protetor destas duas moléculas.

- ✓ As membranas eritrocitárias na forma de "ghosts" apresentaram uma diferença considerável no parâmetro $2A_{\parallel}$ quando submetidas à oxidação com AAPH (2G) ou $Fe^{2+}/$ $H_2O_2$ (1,7G), significando assim, um aumento da rigidez da bicamada lipídica. O 4-NC foi capaz de proteger a membrana contra essa rigidez com um potencial maior que a molécula de α-tocoferol no sistema com AAPH. Já contra a ação de radicais oriundos da reação $Fe^{2+}/$ $H_2O_2$ em "ghosts", estas duas moléculas apresentaram praticamente um mesmo potencial de proteção.

- ✓ Em relação à redução do radical livre DPPH, a molécula de (+)-Catequina apresentou uma eficiência maior em sequestrar esses radicais quando comparado com as moléculas de 4-NC e α-tocoferol. Isto acontece devido à quantidade de grupos hidroxilas presentes nesta molécula ser maior que nas outras duas. Porém a redução dos radicais DPPH pelo 4-NC acontece instantaneamente, ou seja, mais rápida que pela molécula de (+)-Catequina. Quando comparado com a molécula de α-tocoferol, a redução dos radicais DPPH por meio da molécula de 4-NC é maior e razoavelmente mais rápida também.

# 13 Perspectivas Futuras

- Alguns testes foram realizados para o estudo do potencial da molécula de 4-NC em quelar metais. Os testes foram feitos utilizando um sistema de ferro em solução na presença de 4-NC analisado por espectrofotometria, no qual um deslocamento espectral significa que o metal foi quelado. Porém, devido a baixa solubilidade do 4-NC em água, e o $FeSO_4$ ser dissolvido neste solvente, não foi possível a conclusão destes experimentos, sendo necessária a realização de mais alguns testes. O desenvolvimento de uma metodologia que resolveria este problema seria uma perspectiva para dar continuidade ao estudo da atividade antioxidante do 4-NC e outras moléculas antioxidantes que apresentem este mesmo empecilho;

- Outro estudo com a molécula de 4-NC que também já teve início em nosso laboratório e que já possui alguns testes realizados, é o de seu potencial antioxidante para o radical $HO^{\cdot}$ através do método do spin trap DMPO por RPE. Estes ensaios são feitos em solução, portanto, devido à baixa solubilidade do 4-NC em água não teve como dar prosseguimento aos experimentos, por isso os resultados não estão apresentados neste trabalho. Outra perspectiva seria encontrar a solução para este problema e continuar os estudos da atividade antioxidante do 4-NC e outras moléculas através deste método utilizando tanto RPE como EAM-UV/Vis.

- Seria interessante avaliar os efeitos antioxidantes do 4-NC em LDL, monitorando a fluidez do componente lipídico desta lipoproteína.

# 14 Referências Bibliográficas


1. DURAK, I. et al. Blood oxidant / antioxidant status of atherosclerotic patients. **International Journal of Cardiology**, v. 77, p. 293–297, 2001.

2. MIGLIORE, L.; COPPEDÈ, F. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. **Mutation Research**, v. 674, p. 73–84, 2009.

3. TSANG, A. H. K.; CHUNG., K. K. K. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1792, p. 643–650, 2009.

4. ZHU, X. et al. Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease. **Brain Research**, v. 1000, p. 32–39, 2004.

5. CALÒ, L. A. et al. Antioxidant effect of l-carnitine and its short chain esters Relevance for the protection from oxidative stress related cardiovascular damage. **International Journal of Cardiology**, v. 107, p. 54 – 60, 2006.

6. PÉREZ, V. I. et al. Is the oxidative stress theory of aging dead? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, p. 1005–1014, 2009.

7. VASAVADA, N.; AGARWAL, R. Role of Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 12(2), p. 146-154, 2005.

8. ZANA, M.; JANKA, Z.; KÁLMÁN., J. Oxidative stress: A bridge between Down's syndrome and Alzheimer's disease, v. 28, p. 648-676, 2007.

9. ÇIMEN, M. Y. B. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clinica Chimica Acta**, v. 390, p. 1–11, 2008.

10. BURCHAM, P. C. Genotoxic lipid peroxidation products: Their DNA damaging properties and role information of endogenous DNA adducts. **Mutagenesis**, v. 13, p. 287 - 305, 1998.

11. GORDON, M. H. Dietary antioxidants in disease prevention. **Natural Product Reports**, v. 13, p. 265 - 273, 1996.

12. BLOCK, G.; LANGSETH, L. Antioxidant vitamins and disease prevention. **Food Technology**, v. 74, p. 1031 - 1040, 1994.

13. BARROS, S. B. M. et al. Antioxidant activity of ethanolic extracts of Pothomorphe umbellata (L.) Miq. (Pariparoba). **Ciência e Cultura**, v. 48, n.1-2, p. 114-116, 1996.

14. DESMARCHELIER, C. et al. 4-Nerolidylcatechol from Pothomorphe spp. scavenges peroxyl radicais and inhibits Fe(II)-dependent DNA damage. **Planta Medica**, v. 63, p. 561 - 563, 1997.

15. RICHTER, C. Biophysical Consequences of Lipid Peroxidation in Membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 44, n. Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd., p. 175 - 189, 1987.

16. LEHNINGER, A. L. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4ª. ed. São Paulo: Sarvier, 368 - 413, 2006.

17. SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. **Science**, 175, 720-731, 1972.

18. ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 617 - 619, 2010.

19. VENTUROLI, M. et al. Mesoscopic models of biological membranes. **Physics Reports**, 437, 1-54, 2006.

20. CARNEIRO, C. A. V. **O papel das interações fármaco-membrana nos efeitos cardiovasculares de β-bloqueadores**. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto. 2010.

21. VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2006.

22. MAIBAUM, L.; DINNER, A. R.; CHANDLER, D. Micelle Formation and the Hydrophobic Effect. **J. Phys. Chem**, 108, 6778-6781, 2004.

23. JANMEY, P. A.; KINNUNEN, P. K. J. Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. **TRENDS in Cell Biology**, 16, 538-546, 2006.

24. NYHOLM, T. K.; OZDIREKCAN, S.; KILLIAN, J. A. How protein transmembrane segments sense the lipid environment. **Biochemistry**, 46, 1457-1465, 2007.

25. ESCRIBÁ, P. V. et al. Membranes: a meeting point for lipids, proteins, and therapies. **J. Cell. Mol. Med.**, 12, 829-875, 2008.

26. ISRAELASCHVILI, J. N. **Intermolecular and surface forces**. 2ª. ed. San Diego: Academic Press, 1991.

27. FRÉZARD, F. et al. Lipossomas: Propriedades Físico-Químicas e Farmacológicas, Aplicações na Quimioterapia à Base de Antimônio. **Quim. Nova**, v. 28, p. 511 - 518, 2005. ISSN 3.

28. LASIC, D. D. The mechanism of vesicle formation. **Biochem. J.**, v. 256, p. 1 - 11, 1988.

29. FERREIRA, H. et al. Utilização de modelos membranares na avaliação da actividade de fármacos. **QUÍMICA**, v. 99, p. 39 - 51, 2005.

30. DODGE, J. T.; MICHEL, C.; HANAHAN., D. J. The preparation and chemical caracteristic of hemoglobin-free ghosts of human erythrocyts. **Archives of Biophysics**, v. 100, p. 119 - 130, 1963.

31. YAWATA, Y. **Cell Membrane:** The red blood cell as a model. 1ª. ed. [S.l.]: Weinheim, 27 - 41, 2003.

32. STORCH, J.; KLEINFELD., A. M. The lipid structure of biological membranes. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 10, p. 418 - 421, 1985.

33. CONNOR, L.; GILLUM, K.; SCHROIT., A. J. Maintenance of lipid assymetry in red blood cells and ghosts: effect of divalent cations and serum albumin on transbilayer distribuilserine. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1025, p. 82 - 86, 1990.

34. DEVAUX, P. F. Static and dynamic lipid assimetry in cell membranes. **Biochemistry**, v. 30, p. 1163 - 1173, 1991.

35. BENETT, V. The membrane skeleton of human erythrocytes and its implication for more complex cells. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 54, p. 273 - 304, 1985.

36. BASKIN, S. I.; SALEM, H. **Oxidants, Antioxidants, and Free Radicals**. Washington: Taylor & Francis, 1-21, 1997.

37. SÁNCHEZ-MORENO, C. Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Sci Tech Int**, 8(3), 121-137, 2002.

38. BIANCHI, M. D. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais Livres e os Principais Antioxidantes da Dieta. **Rev. Nutr.**, v. 12(2), p. 123-130, 1999.

39. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease: An Overview. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 1-85, 1990.

40. SANTOS, A. B. **Atividade antioxidante de extratos vegetais da flora brasileira: Estudo com ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e teoria funcional da densidade (TFD)**. Tese (doutorado em Física Aplicada a Medicina e Biologia)- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade Federal de São Paulo**,**

Ribeirão Preto, 9-11, 2006.

41. FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, 43(1), 61-68, 1997.

42. HERMES-LIMA, M. **Functional Metabolism:** Regulation and Adaptation. New Jersey: Copyright, 319 - 382, 2004.

43. REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 1603–1616, 2010.

44. VIEIRA., A. J. D. S. C. Radicais oxidantes: da Química à Biologia. **Química**, v. 100, p. 66 - 71, 2006.

45. NIKI, E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. **Free Radical Biology & Medicine** , v. 47, p. 469–484, 2009.

46. SLATER, T. F. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. **Methods in Enzymolooy**, v. 105, p. 283 - 293, 1984. ISSN 33.

47. CHEESEMAN, H. E. K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products. Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymolooy**, v. 186, p. 407 - 421, 1990. ISSN 42.

48. SJÖDIN, B.; WESTING, Y. H.; APPLE, F. S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. **Sports Medicine**, v. 10 (4), p. 236 – 254, 1990.

49. SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.**, v. 15(1), p. 71-81, 2002.

50. RAMARATHNAM, N. et al. The contribution of plant food antioxidants to human health. **Trends in Food Science & Technology March**, 6, 1995.

51. SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem**, v. 215, p. 213-219, 1993.

52. MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145 - 171, 2001.

53. VELIOGLU, Y. S. et al. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits,Vegetables, and Grain Products. **J. Agric. Food Chem.**, 46, 4113-4117, 1998.

54. GÜLÇIN, I. et al. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 3, p. 43–53, 2010.

55. MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr**, v. 79, p. 727 - 747, 2004.

56. ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M. Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids. **Analyst**, v. 122, p. 11R - 34R, 1997.

57. SILVA, M. M. et al. Structure-antioxidant Activity Relationships of Flavonoids: A Re-examination. **Free Radical Research**, v. 36 (11), p. 1219–1227, 2002.

58. BURNS, J. et al. Extraction of Phenolics and Changes in Antioxidant Activity of Red Wines during Vinification. **J. Agric. Food Chem**, v. 49, p. 5797-5808, 2001.

59. CHRZANOWSKI, G.; SEMPRUCH, C.; SPRAWKA, I. Investigation of Phenolic Acids in Leaves of Blackcurrant (Ribes Nigrum L.) and Sour Cherry (Prunus Cerasus L.). **Eletronic Journal of Polish Agricultural Universities**, v. 10, 2007.

60. RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon** , v. 39, p. 603–613, 2001.

61. PINTO, A. C. et al. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Quim. Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

62. BROHEM, C. A. et al. Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines. **C.A. Brohem et al. / Toxicology in Vitro**, 23, 111–119, 2009.

63. PERAZZO, F. F. et al. Anti-inflammatory and analgesic properties of water-ethanolic extract from Photomorphe umbellata (Piperaceae) aerial parts. **Journal of Ethnopharmacology**, 99, 215-220, 2005.

64. HERNANDES, L. S. Farmacologia e Fitoquímica dos extratos Pothomorphe umbellata (L.) Miq., direcionadas à atividade antiúlcera, São Paulo, 2010.

65. RÖPKE, C. D. et al. Evaluation of percutaneous absorption of 4-nerolidylcathecol from four topical formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, 249, 109-116, 2002.

66. SOARES, L. A. et al. Host–guest system of 4-nerolidylcatechol in 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin: preparation, characterization and molecular modeling. **J Incl Phenom Macrocycl Chem**, v. 64, p. 23–35, 2009.

67. KIJJOA, A. et al. 4-Nerolidylcatechol from Potomorphe Umbellata. **Planta Medica**, n. 39, p. 85 - 87, 1980.

68. RÖPKE, C. D. et al. Pothomorphe umbellata Extract Prevents a-Tocopherol Depletion After UV-irradiation. **Photochemistry and Photobiology**, 78(5), 436-439, 2003.

69. SILVA, G. A. A. B.; BAVER, L. Contribuição ao estudo do óleo essencial de Heckeria umbellata (L.) Kunth. **Rev. Bras. Farm.**, v. 53, p. 59-61, 1972.

70. BERNARD, H. O.; TIELI, K. Isolierrung von 1-Allyl-2,3-dimethoxy-4,5-methylendioxybenzol (=dill-apiol) aus Heckeria umbellata (L.) Kunth (Piperaceae). **Helv. Chim. Acta.** , v. 61, p. 215 - 216, 1978.

71. REZENDE, K. R.; BARROS., S. B. D. M. Quantification of 4-nerolidylcatechol from Pothomorphe umbellata (Piperaceae) in rat plasma samples by HPLC-UV. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40(3), p. 373 - 380, 2004.

72. GUSTAFSON, K. R. et al. The peltatols, novel HIV-inhibitory catechol derivates from Pothomorphe peltata. **J. Org. Chem.**, v. 57, p. 2809-2811, 1992.

73. TABOPDA, T. K. et al. Bioactive aristolactams from Piper umbellatum. **J.Phytochem.**, v. 69, p. 1726-1731, 2008.

74. KAUR, K. et al. Antimalarials from nature. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 3229–3256, 2009.

75. AMORIM, C. Z. et al. Screening for antimalarial activity in genus Pothomorphe. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 24, p. 101-106, 1988.

76. MONGELLI, E. et al. Actividad antimicrobiana e interacción com el ADN de plantas medicinales de la Amazonia Peruana. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 27, p. 199-203, 1995.

77. BROHEM, C. A. et al. Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines. **Toxicology in Vitro**, 23,111-119, 2009

78. ROPKE, C. D. et al. Photoprotective effect of Pothomorphe umbellata root extract against ultraviolet radiation induced chronic skin damage in the hairless mouse. **Clinical and Experimental Dermatology**, 30, 272–276, 2005.

79. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5ª. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

80. LEAL, A. A. X. et al. Validação e estimativa da incerteza do método de determinação de fósforo por espectrofotometria UV-VIS. **Revista Analytica**, v. 32, p. 28 - 34, 2008.

81. ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Quim. Nova**, v. 27 (5), p. 807-812, 2004.

82. PAVANELLI, S. P. **Degradação de Corantes da Indústria Alimentícia por Processos Oxidativos e Redutivos: Monitoramento por Espectrometria de Massas com Ionização Electrospray (ESI-MS).** Dissertação (mestrado em Química) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

83. HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 7ª. ed. Rio de Janeiro: LTC, 415 - 498, 2008.

84. PAVIA, D. L. et al. **Introdução À Espectroscopia**. 4ª. ed. São Paulo: CENGAGE Learning, 2010. 365 - 398 , 2010.

85. PAVIA, D. L. et al. **Introduction to Spectroscopy**. 4ª. ed. Belmont: BROOKS/COLE CENGAGE Learning, 381 - 417.

86. PERUSSI, J. R.; RUGGIERO, A. C.; TABAK, M. O método de marcadores de spin aplicado a bioquímica. **Química Nova**, v. 8 (4), p. 313 - 324, 1985.

87. MCMILLAN, J. A. **Paramagnetismo Eletrônico**. Washington D.C.: The General Secretariat of the Organization of American States, 1975.

88. SILVA, F. R. D. **Construção de um Espectrômetro de Ressonância Paramagnética Eletrônica em Banda S**. Tese (doutorado em Engenharia Elétrica) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Carlos , São Carlos, 2007.

89. ANJOS, J. L. V. D. **Efeitos de terpenos nas membranas de estrato córneo estudados por Ressonância Paramagnética Eletrônica**. Dissertação (mestrado em Física) - Instituto de Física, Universidade Federal de Góias, Goiânia, 2008.

90. SWARTZ, H. M.; BOLTON, J. R.; BORG, D. C. **Biological Applications of Electron Spin Resonance**. 1ª edição. ed. New York: John Wiley & Sons, 1972.

91. WERTZ, J. E.; BOLTON, J. E. **Electron spin ressonance elementary theory and practical applications**. 1ª. ed. New York: McGraw-Hill Book Company, 1972.

92. ATKINS, P. W. **Físico química**. 6ª. ed. Rio de Janeiro: LTC, v. 2, 1997.

93. POOLE, C. P. **Electron spin resonance:** a comprehensive treatise on experimental techniques. 2ª ed. ed. New York : Wiley-Interscience, 1983.

94. SALMON, C. E. G. et al. Simulação de espectros de Ressonânica Paramagnética Eletrônica (RPE) através do programa NLSL.. **Quim. Nova**, v. 30 (5), p. 1240-

1248, 2007.

95. PERUSSI, J. R.; RUGGIERO, A. C.; TABAK, M. O método de marcadores de spin aplicado à bioquímica. **Química Nova**, v. 8, p. 313 - 324, 1985.

96. VIRIYAROJ, A.; KASHIWAGI, H.; UENO, M. Solubilization of egg phosphatidylcholine liposomes by sodium taurocholate: partition behavior and morphology. **Colloid Polym Sci** , v. 284, p. 1131–1138, 2006.

97. DUNLAP, W. et al. A Microtiter Plate Assay for Screening Antioxidant Activity in Extracts of Marine Organisms. **Mar. Biotechnol.**, 5, 294–301, 2003.

98. SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **QUÍMICA NOVA**, 22(1), 94-103, 1999.

99. GROTTO, D. et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. **Quim. Nova**, 32, 169-174, 2009.

100. GUTIÉRREZ, M. E. et al. Interaction of tocopherols and phenolic compounds with membrane lipid components: Evaluation of their antioxidant activity in a liposomal model system. **Life Sciences**, 72, 2337-2360, 2003.

101. BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v. 28, p. 25-30, 1995.

102. MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant. **Songklanakarin J. Sci. Technol.**, v. 26(2), p. 211-219, 2004.

103. SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Sci Tech Int** , v. 8(3), p. 121–137, 2002.

104. ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 27(1), p. 53-60, 2007.

105. SILVA, A. H. M. **Estudo da dinâmica molecular de membrana modelo e de eritrócito sob ação de agentes oxidantes e antioxidantes por Ressonância Paramagnética Eletrônica.** Dissertação (mestrado em Física) - Instituto de Física, Universidade Federal de Góias, Goiânia, 2011.

106. BRUCH, R. C.; THAYER, W. S. Differential effect of lipid peroxidation on membrane fluidity as determined by electron spin resonance probes. **Biochimica et**

**Biophysica Acta**, 733, 216-222, 1983.

107. CHOE, M. et al. Lipid peroxidation contributes to age-related membrane rigidity. **Free Radical Biology and Medicine**, 18, 977-984, 1995.

108. Eichenberger, K. et al. Microsomal lipid peroxidation causes an increase in the order of the membrane lipid domain. **FEBS Lett.**, 142, 59-62, 1982.

109. RICE-EVANS, C.; BURDON, R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. **Prog. Lipid Res.**, 32, 71–110, 1993.

110. ALONSO, A. et al. Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (Coffea arabica L.) seedlings. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1323, 75–84, 1997.

111. NEPOMUCENO, M.F. et al. Inhibitory effect of dipyridamole and its derivatives on lipid peroxidation in mitochondria. **Free Radical Biology & Medicine**, 23, No. 7, 1046–1054, 1997.

112. BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH• Free Radical Method. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v. 30, p. 609–615 , 1997.

113. VILLÃNO, D. et al. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. **Talanta**, v. 71, p. 230–235, 2007.