

DAYANI GALATO

**CORRELAÇÃO ENTRE OS DADOS ELETROQUÍMICOS, FOTOMÉTRICOS E DE
CÁLCULOS TEÓRICOS OBTIDOS PARA AVALIAR A ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE COMPOSTOS FENÓLICOS**

FLORIANÓPOLIS

2004

DAYANI GALATO

**CORRELAÇÃO ENTRE OS DADOS ELETROQUÍMICOS, FOTOMÉTRICOS E DE
CÁLCULOS TEÓRICOS OBTIDOS PARA AVALIAR A ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE COMPOSTOS FENÓLICOS**

Tese de doutorado apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de
Doutor em Química – Curso de Pós-graduação em Química – Departamento de
Química – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas - Universidade Federal de
Santa Catarina - Grupo de Estudos de Processos Eletroquímicos e Eletroanalíticos

Orientador: Prof. Dr. Almir Spinelli

FLORIANÓPOLIS

2004

Dayani Galato

**CORRELAÇÃO ENTRE OS DADOS ELETROQUÍMICOS, FOTOMÉTRICOS E DE
CÁLCULOS TEÓRICOS OBTIDOS PARA AVALIAR A ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE COMPOSTOS FENÓLICOS**

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Doutor em Química**
no **Programa de Pós-Graduação em Química** da
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 18 de outubro de 2004

Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera
Coordenador do Curso

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Almir Spinelli
Orientador –Depto Química– UFSC

Prof. Dr. Clodoaldo Machado
Relator – Depto de Química - FURB

Prof. Dra. Vilma E. F. Heinzen
Depto de Química - UFSC

Prof. Dr. Reinaldo Simões Gonçalves
Instituto de Química - UFRGS

Prof. Dr. Ricardo José Nunes
Depto de Química -UFSC

Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho
Depto de Ecologia e Zoologia - UFSC

Dedicatória

*Dedico este meu doutorado aos meus pais
que, mesmo não tendo instrução,
apostaram no estudo de todos os filhos,
pois acreditam que a maior riqueza que
podem nos deixar é a dignidade e a
educação.*

*Dedico também ao meu marido, Jair,
que me apoiou em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado no GEPEEA - Grupo de Estudos e Processos Eletroquímicos e Eletroanalíticos, situado no laboratório 310 do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina sob a Orientação do Professor Dr. Almír Spínelli.

Inicialmente, gostaria de agradecer à minha família, em especial ao meu marido Jair, aos meus pais e à minha filha Julia.

A todos os meus amigos que acompanharam esta trajetória, ao Wellington, Eugênio, Luiz, e a todo o pessoal da Unisul, em especial à Jaque e à Lu que, com certeza, devem estar felizes com esta conquista.

Aos meus amigos Eduardo, Maria Elisa (Bilu) e Cleidson, pela força nas análises de determinação do Teor de Oxigênio. Agradeço ao laboratório da Unisul e ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da UFSC pela disposição dos equipamentos.

À Unisul, pela bolsa de doutorado e pelo apoio na aquisição de vários compostos avaliados.

Aos meus alunos, que durante estes anos souberam respeitar a minha situação.

Ao meu orientador, que foi paciente e compreensivo.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação que contribuíram para minha formação. Agradeço em especial ao professor Josefredo e à aluna Gízzelle, pelo apoio na realização dos cálculos.

Ao Professor Clodoaldo Machado da FURB que se prontificou a auxiliar-me nos cálculos semi-empíricos.

Agradeço à professora Karina Ckless, pela contribuição fornecida durante boa parte deste trabalho e à professora Rosa Ribeiro do Valle por ter cedido o laboratório para a realização das análises com o NBT.

A todos esses e muitos outros que me ajudaram, meu muito obrigada.

Dayani Galato

*“A criatividade consiste em ver o que todo
mundo vê e pensar o que ninguém
pensou”*

Szent Gyorgi, Nobel de Química

RESUMO

GALATO, DAYANI. **Correlação entre os dados eletroquímicos, fotométricos e de cálculos teóricos obtidos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de compostos fenólicos.** Florianópolis, 2004. 109p. Tese de Doutorado em Química – Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Almir Spinelli

Defesa: 18 de outubro de 2004

Este trabalho teve como objetivo realizar a correlação entre os resultados obtidos por diferentes técnicas utilizadas para avaliar a atividade antioxidante de compostos fenólicos. As técnicas empregadas para a obtenção dos dados experimentais *in vitro* foram: inibição da redução do azul de tetrazolium (NBT), potenciometria, voltametria e determinação do consumo de oxigênio. Para determinar os parâmetros físico-químicos, foram adotados cálculos teóricos semi-empíricos. Os compostos avaliados neste trabalho foram o ácido benzóico - BEN (e seus derivados: ácido gálico - GAL, ácido gentísico - GEN, ácido protocatéuico - PRO, ácido vanílico - VAN e galato de metila - GALme) e o ácido cinâmico - CIN (e seus derivados: ácido ferúlico - FER, ácido cafeico - CAF, ácido clorogênico - CLO, ácido cumárico - CUM e resveratrol - RES). Entre os compostos avaliados, os que apresentaram maior capacidade de estabilizar o radical ânion superóxido (INI_{NBT}) foram: CAF e CLO entre os derivados do ácido cinâmico; GAL e GALme, entre os derivados do ácido benzóico. Avaliando-se os voltamogramas obtidos, observou-se que os compostos que não possuem hidroxilas fenólicas (BEN e CIN) não apresentaram correntes de oxidação, sendo, portanto, inertes nas condições estudadas. Avaliando-se os valores de potencial de pico anódico, observou-se os menores potenciais para o CAF, CLO, GAL e GALme. Portanto, estes compostos são os que apresentam maior possibilidade de se oxidar. Os maiores saltos potenciométricos e os maiores consumos de oxigênio também foram obtidos para os mesmos compostos (CAF, CLO, GAL e GALme). Comparando a ordem relativa dos valores das técnicas experimentais, observou-se que a melhor correlação foi obtida para os resultados das técnicas eletroquímicas de potenciometria e voltametria ($R^2=0,8993$), seguida da correlação entre os resultados de INI_{NBT} e potenciometria ($R^2=0,7916$) e entre os resultados de INI_{NBT} com voltametria ($R^2=0,6636$). Avaliando-se a estrutura química dos compostos estudados, observou-se que as maiores atividades foram obtidas para os compostos que possuem hidroxilas fenólicas, sendo que, quanto maior o seu número, maior o potencial antioxidante. Comparando os resultados obtidos para os derivados do ácido benzóico e os derivados do ácido cinâmico, observa-se que o grupo propenóico propiciou maior poder antioxidante, por aumentar a possibilidade de estabilização do elétron desemparelhado em sua estrutura química. A partir dos cálculos teóricos, foi possível obter parâmetros que estão correlacionados com a

atividade antioxidante. Entre os parâmetros calculados, os mais adequados foram: o Log P, que se correlacionou significativamente com o número de hidroxilas fenólicas ($R^2=-0,6771$) e podem ser utilizados para prever os resultados de potenciometria e de consumo de oxigênio; e a Energia de Dissociação da ligação O-H calculada para a molécula ionizada para prever os resultados de INI_{NBT} . O Potencial de Ionização e a Energia de Ativação não foram considerados adequados para prever a atividade antioxidante. Este trabalho demonstrou que dados experimentais *in vitro* obtidos através de técnicas eletroquímicas e fotométricas, bem como cálculos teóricos de Log P e de Energia de Dissociação da ligação O-H, podem ser empregados para prever a atividade antioxidante de compostos fenólicos.

Palavras chave: Antioxidantes, compostos fenólicos, eletroquímica, fotometria, cálculos teóricos semi-empíricos.

Áreas de atuação: eletroquímica, química teórica.

ABSTRACT

GALATO, DAYANI. **Correlation of electrochemical and photometric data and theoretical calculation obtained for *in vitro* antioxidant activity assessment of phenolic compounds.** Florianopolis, 2004. 109p. Doctoral thesis in Chemistry – Post-graduation program in Chemistry. Federal University of Santa Catarina.

Tutor: Almir Spinelli, Dr.

Date: October 18 2004

The aim of this work was to correlate the results obtained by different techniques used to evaluate anti-oxidizing activity. The techniques employed to obtain *in vitro* experimental data were: inhibition of reduction of nitro blue tetrazolium (NBT), potentiometry, voltammetry and determination of oxygen consumption. In order to establish physical-chemical parameters, semi-empirical theoretical calculation was adopted. The compounds evaluated in this study were those derived from benzoic acid (gallic acid – GAL, gentisic acid – GEN, protocatechinic acid – PRO, vanillic acid – VAN, benzoic acid – BEN and methyl gallate – GALme), and from cinamic acid (ferulic acid – FER, caffeic acid – CAF, chlorogenic acid – CLO, cumaric acid – CUM, cinamic acid – CIN and resveratrol – RES). Among the compounds assessed the ones most capable of stabilizing the superoxide anion radical (INI_{nbt}) were: CAF and CLO among those derived from cinamic acid; GAL and GALme among benzoic acid derivatives. By assessing voltammograms obtained it was observed that compounds that do not possess phenolic hydroxyls (BEN and CIN) did not present waves of oxidation, being therefore, inert under the conditions of the study. From voltammetry the lowest anodic peak potential values were found for CAF, CLO, GAL and GALme. Thus, such compounds are the most likely to oxidize. The greatest potentiometric steps, as well as the highest oxygen consumption were also obtained for the same compounds. By correlating experimental techniques, it was observed that the best correlation is obtained for results of electrochemical techniques, namely potentiometry and voltammetry ($R^2=0,8993$), followed by correlating of INI_{nbt} and potentiometry results ($R^2=0,7916$) and of INI_{nbt} and voltammetry results ($R^2=0,6636$). By evaluating the chemical structure of the compounds studied, it was observed that the best results are obtained with compounds that possess phenolic hydroxyls, and that the greater their number, the highest the anti-oxidizing potential. Comparing results from benzoic acid and cinamic acid derivatives, it was also observed that the propenoic group enables greater anti-oxidizing power, since it increases the possibility of stabilization of the non-paired electron within its chemical structure. Based on theoretical calculations, it was possible to obtain parameters that correlate with anti-oxidizing activity. The parameters considered most adequate were: Log P, which correlates significantly with the number of phenolic hydroxyls ($R^2=0,6771$) and can be used to predict the results of potentiometry and oxygen consumption; and Bond Dissociation Energy of the O-H calculated for the ionized molecule to predict results of INI_{nbt} . The ionizing Potential and Activation Energy were not considered adequate to predict anti-oxidant activity. This work demonstrated that

in vitro experimental data obtained by means of electrochemical and photometrical techniques, as well as theoretical calculation of Log P and of the Dissociation Energy of the O-H bond can be employed to predict anti-oxidant activity of phenolic compounds.

Keywords: Anti-oxidants, phenolic compounds, electrochemistry, photometry, semi-empirical theoretical calculation

Area of Actuation: electrochemistry, theoretical chemistry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de formação e de eliminação de espécies reativas de oxigênio em sistemas biológicos	23
Figura 3. Estrutura química de alguns antioxidantes naturais	26
Figura 4. Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração	27
Figura 5. Possibilidade de complexação dos flavonóides com metais de transição	27
Figura 6 . Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	28
Figura 7. Variação cíclica de potencial sob a forma de onda triangular	33
Figura 8. Voltamograma cíclico típico de uma reação de oxi-redução (processo reversível).	35
Figura 9. Redução do NBT pelo ânion radical superóxido	40
Figura 10. Estrutura química dos compostos avaliados	50
Figura 11. Efeito dos derivados do ácido cinâmico (A) e benzóico (B) na redução do NBT	60
Figura 12 . Voltamogramas cíclicos dos derivados dos ácidos cinâmico (A) e benzóico (B) em tampão fosfato (pH 7,8) utilizando-se eletrodo de carbono vítreo	62
Figura 13. Variação do potencial (ΔE) em função do tempo após a adição de derivados do ácido cinâmico (A) e derivados do ácido benzóico (B) com concentração final de 1 mol/L.	65
Figura 14. Representação do salto potenciométrico. Legenda: E_i – potencial antes da adição do composto fenólico.....	68

Figura 15. Esquema de oxidação e estabilização de elétrons do ácido ferúlico (fenilpropenóico)	73
Figura 16. Esquema de oxidação e estabilização de elétrons de compostos derivados do ácido benzóico.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reagentes utilizados no preparo das soluções do ensaio de inibição da redução do NBT.	52
Tabela 2. Resultados de E_{pa} , ΔE a 180 s, consumo de O_2 e do percentual de inibição da redução do NBT	69
Tabela 3. Correlações de Spearman realizadas com os dados estruturais e experimentais obtidos para os compostos analisados	70
Tabela 4. Parâmetros teóricos obtidos por cálculos semi-empíricos para os compostos avaliados.....	77
Tabela 5. Intercorrelação entre os parâmetros teóricos calculados pelo método semi- empíricos e com o número de hidroxilas.....	80
Tabela 6. Correlação entre os parâmetros teóricos e os resultados experimentais e estruturais (número de hidroxilas).....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

- λ - Comprimento de onda
- ΔE – Salto potenciométrico – variação de potencial
- ΔE_{OH} – Energia de dissociação da ligação O-H
- $\cdot OArCOO^-$ - Radical ionizado
- $\cdot OArCOOH$ – Radical neutro
- $\cdot OH$ – Radical hidroxila
- [oxi] – Concentração da espécie oxidada
- [red] – Concentração da espécie reduzida
- A – Área
- AM₁ – Modelo Austin 1
- ANOVA – Análise de variância
- a_{oxi} – Atividade da espécie oxidada
- a_{red} – Atividade da espécie reduzida
- Asc⁻ – Radical ânion ascorbato
- AscH – Ácido ascórbico
- BEN – Ácido benzóico
- C – Concentração
- CAF – Ácido cafeico
- CF – Calor de formação
- CG/MS – Cromatografia gasosa com espectrômetro de massa
- CIN – Ácido cinâmico
- CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
- CLO – Ácido clorogênico
- CUM – Ácido cumárico
- D – Coeficiente de difusão
- ddp – Diferença de potencial
- DNA – Ácido desoxi-ribonucleico
- E – Potencial
- E^0 – Potencial formal
- E_a – Energia de ativação
- ECS – Eletrodo de calomelano saturado
- E_f – Potencial final
- E_i – Potencial inicial

E_{ind} – Potencial do eletrodo indicador
 E_p – Potencial de pico
 $E_{1/2}$ – Potencial de meia onda E_{pa} – Potencial de pico anódico
 E_{pc} – Potencial de pico catódico
EPR – Ressonância paramagnética eletrônica
EROs – Espécies reativas de oxigênio
 F – Constante de Faraday
 F – Teste de significância estatística F
Fa-CoA – Acil graxo coenzima A
FER – Ácido ferúlico
FIA – Análise em fluxo
GAL – Ácido gálico
GALme – Galato de metila
GEN – Ácido gentísico
GPX – Glutathione peroxidase
HOArCOO⁻ - Composto fenólico ionizado
HOArCOOH – Composto fenólico neutro
HOMO – Energia do orbital molecular ocupado de maior energia
INI_{NBT} – Percentual de inibição do NBT
 i_p – Corrente de pico
 i_{pa} – Corrente de pico anódico
 i_{pc} - Corrente de pico catódico
Log P – Coeficiente de partição (octanol/água)
LUMO – Energia do Orbital molecular desocupado de menor energia
 N – Número de amostras
 n – Número de elétrons
 n . OH – Número de hidroxilas fenólicas
NADP⁺ - Fosfato de nicotinamida oxidado
NADPH – Fosfato de nicotinamida reduzido
NBT – Azul de tetrazolium (Nitro Blue Tetrazolium)
ND – Não determinado
NE – Não existe
O₂⁻ – Radical ânion superóxido
 p – Nível de significância
PAR – Princeton applied research
PH – GPX – Glutathione peroxidase
PI – Potencial de ionização

PLA₂ – Fosfolipase A₂

PM₃ – Parametric Methods

P_{O₂} – Pressão parcial de oxigênio

PRO – Ácido protocatéuico

QSAR – Correlações quantitativas entre a estrutura química e atividade biológica

R² – Coeficiente de correlação de Spearman

R – Constante universal dos gases

R· – Espécie radicalar formada a partir de uma biomolécula

RES – Resveratrol

RH – Biomolécula

ROH – Produto da redução do ROOH

ROO· – radical peroxil

ROOH – Produto da oxidação de uma biomolécula

SD – Desvio padrão

SOD – Superóxido dismutase

T – Temperatura

t – Tempo

TBA – Ácido tiobarbitúrico

UHF – Método Hartree Fock não restrito

UV/VIS – Espectroscopias nas regiões do ultravioleta e do visível

v – Velocidade de variação de potencial

VAN – Ácido vanílico

X· – Espécie radicalar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
	<i>2.1 Conceitos.....</i>	<i>21</i>
	<i>2.1 Antioxidantes naturais.....</i>	<i>25</i>
	<i>2.3 Técnicas para avaliar a atividade antioxidante <u>in vitro</u>.....</i>	<i>28</i>
	<i>2.4 Fundamentos das técnicas adotadas neste trabalho.....</i>	<i>32</i>
	2.4.1 Técnicas eletroquímicas.....	32
	2.4.1.1 Voltametria cíclica.....	33
	2.4.1.2 Potenciometria.....	37
	2.4.1.3 Determinação de oxigênio – Eletrodo de Clark.....	38
	2.4.2 Inibição da redução do azul de tetrazolium (Nitro Blue Tetrazolium - NBT)	39
	2.4.3 Cálculos teóricos de parâmetros físico-químicos	40
	<i>2.5 Justificativa</i>	<i>42</i>
3	OBJETIVOS.....	46
	<i>3.1 Objetivo geral.....</i>	<i>46</i>
	<i>3.2 Objetivos específicos.....</i>	<i>46</i>
4	METODOLOGIA.....	48
	<i>4.1 Ensaios para determinação das condições eletroquímicas de análise.....</i>	<i>48</i>
	<i>4.2 Compostos químicos</i>	<i>49</i>

<i>4.3 Técnicas utilizadas para determinar a atividade antioxidante</i>	51
4.3.4 Inibição da redução do azul de tetrazolium (NBT).....	51
4.3.2 Determinação do potencial de pico anódico (Epa) por voltametria cíclica	53
4.3.1 Determinação do salto potenciométrico (ΔE)	54
4.3.3 Determinação do consumo de oxigênio	54
4.3.4 Cálculos teóricos de parâmetros físico-químicos	55
4.3.4.1 Parâmetros adotados	55
4.3.4.2 Cálculo do coeficiente e solubilidade (Log P)	56
4.3.4.3 Cálculo da Energia de Dissociação da ligação O-H ($\Delta E_{D_{OH}}$)	56
4.3.4.4 Cálculo do Potencial de Ionização (PI)	57
4.3.4.5 Cálculo da Energia de Ativação (Ea)	57
4.3.5 Tratamento estatístico	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
<i>5.1 Resultados experimentais</i>	59
5.1.1 Análise fotométrica	59
5.1.2 Análises voltamétricas.....	61
5.1.3 Análises potenciométricas.....	64
5.1.4 Análise de consumo de oxigênio.....	68
<i>5.2 Relação entre a estrutura química e a atividade antioxidante</i>	72
<i>5.3 Cálculos teóricos semi-empíricos e regressões</i>	75
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
7 PERSPECTIVAS	89

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
---	-----------

ANEXOS	107
---------------------	------------

Anexo 1. Correlações de Spearman realizadas com os dados estruturais e experimentais obtidos para os compostos derivados do ácido benzóico 108

Anexo 2. Correlações de Spearman realizadas com os dados estruturais e experimentais obtidos para os compostos derivados do ácido cinâmico..... 109

1 INTRODUÇÃO

A atividade antioxidante tem gerado nas últimas duas décadas interesse por parte dos pesquisadores. Descobrir novos compostos com potencial antioxidante, alimentos que podem proporcionar esta atividade e, principalmente, desenvolver técnicas *in vitro* que possuam a capacidade de avaliar com precisão esta atividade, têm sido o objeto de estudo de diversos grupos de pesquisa.

Este trabalho dedica-se à determinação de diversos parâmetros experimentais e teóricos que podem descrever a atividade antioxidante de compostos fenólicos e, na seqüência, ao estudo das correlações entre os dados obtidos pelas diferentes técnicas. As técnicas empregadas para a obtenção dos dados experimentais *in vitro* foram a inibição da redução do NBT (fotometria), potenciometria, voltametria e determinação do consumo de oxigênio. Para determinar os parâmetros físico-químicos, foram adotados cálculos teóricos semi-empíricos.

Inicialmente, no capítulo 2, será apresentada uma rápida revisão sobre as espécies reativas de oxigênio de importância biológica, compostos antioxidantes e sobre as técnicas utilizadas para avaliar a atividade antioxidante. No capítulo 3 serão apresentados os objetivos deste trabalho seguidos da metodologia proposta (capítulo 4).

No quinto capítulo serão apresentados os resultados juntamente com a discussão. É importante salientar que, para facilitar a compreensão, este capítulo está subdividido em três partes, sendo elas: resultados experimentais, relação entre a estrutura química e a atividade antioxidante e cálculos teóricos com as equações de regressão.

Por último, serão apresentadas as considerações finais e as perspectivas para futuros trabalhos, seguidas das referências bibliográficas adotadas neste trabalho e de anexos contendo inclusive duas publicações decorrentes do mesmo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Conceitos

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são representadas por radicais livres como o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila ($\cdot OH$) (SOUTHORN; POWIS, 1988) e por outras espécies não radicalares, tais como, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (HClO) (HALLIWEL, 1995a). Radical livre é uma molécula ou fragmento molecular contendo um ou mais elétrons desemparelhados. Este elétron confere à molécula propriedades especiais. Quimicamente, esta valência livre torna a molécula extremamente reativa e, fisicamente, este elétron desemparelhado torna a molécula paramagnética (momento magnético) (SOUTHORN; POWIS, 1988; HALLIWELL, 1984; HOLMBERG, 1984).

Os metais de transição como o ferro e o cobre, que freqüentemente apresentam elétrons desemparelhados, são excelentes catalisadores da redução do oxigênio (CADENAS, 1989). Desta forma, os metais de transição estão envolvidos em processos oxidativos como a peroxidação lipídica (ARUOMA, 2003; HALLIWELL, 1991).

A formação de EROs em sistemas biológicos está relacionada com processos fisiológicos (como a respiração e outros sistemas enzimáticos extra-mitocondriais) e ao metabolismo de xenobióticos. Oxidantes exógenos como a fumaça de cigarro, pesticidas, drogas, alta pressão de oxigênio e irradiação induzem a formação destas espécies (SCHWEDHELM *et al.*, 2003; GATE *et al.*, 1999; JACOB; BURRI, 1996; RICE-EVANS; DIPLOCK, 1993). Estas EROs geralmente promovem processos

oxidativos danosos em moléculas biológicas. Em sistemas biológicos, os substratos oxidáveis são representados por proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos (ARUOMA, 2003; ALLISON, 1997; JACOB; BURRI, 1996).

Para se contrapor à produção de EROs, os sistemas biológicos desenvolveram sistemas antioxidantes. Os antioxidantes são substâncias que, quando presentes em baixas concentrações comparadas com os substratos oxidáveis, previnem a oxidação destes (ARUOMA, 2003; HALLIWEL, 1995a). Os sistemas antioxidantes são representados por dois grupos distintos: os enzimáticos, como a enzima superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutaciona peroxidase (GPx) (SCHWEDHELM *et al.*, 2003; SHOHAMI *et al.*, 1997); e os antioxidantes de baixo peso molecular, como a glutaciona, o ácido ascórbico e os tocoferóis (SCHWEDHELM *et al.*, 2003; SIMIC; JAVANOVIC, 1989). A Figura 1 apresenta um modelo de formação e eliminação de espécies reativas de oxigênio. Neste modelo estão envolvidos antioxidantes de baixo peso molecular e antioxidantes enzimáticos.

Quando a formação de EROs supera as defesas endógenas (estresse oxidativo) podem ocorrer danos, muitas vezes irreversíveis, ao organismo. Nesta situação muitos processos patológicos poderão ser desenvolvidos, como: processos inflamatórios, danos em órgãos transplantados, câncer, doenças degenerativas do sistema cardiovascular e neurológico e o próprio envelhecimento (AMAROWICZ *et al.*, 2004; ARUOMA, 2003; SCHWEDHELM *et al.*, 2003; ARUOMA, 1999; SAKAGAMI *et al.*, 1999; STAHELIN, 1999; ALLISON, 1997; KONO *et al.*, 1997; RICE–EVANS; MILLER, 1996; SALAH *et al.*, 1995; RICE-EVANS; DUPLOCK, 1993; CADENAS, 1989; SIMIC; JAVANOVIC, 1989; SOUTHORN; POWIS, 1988).

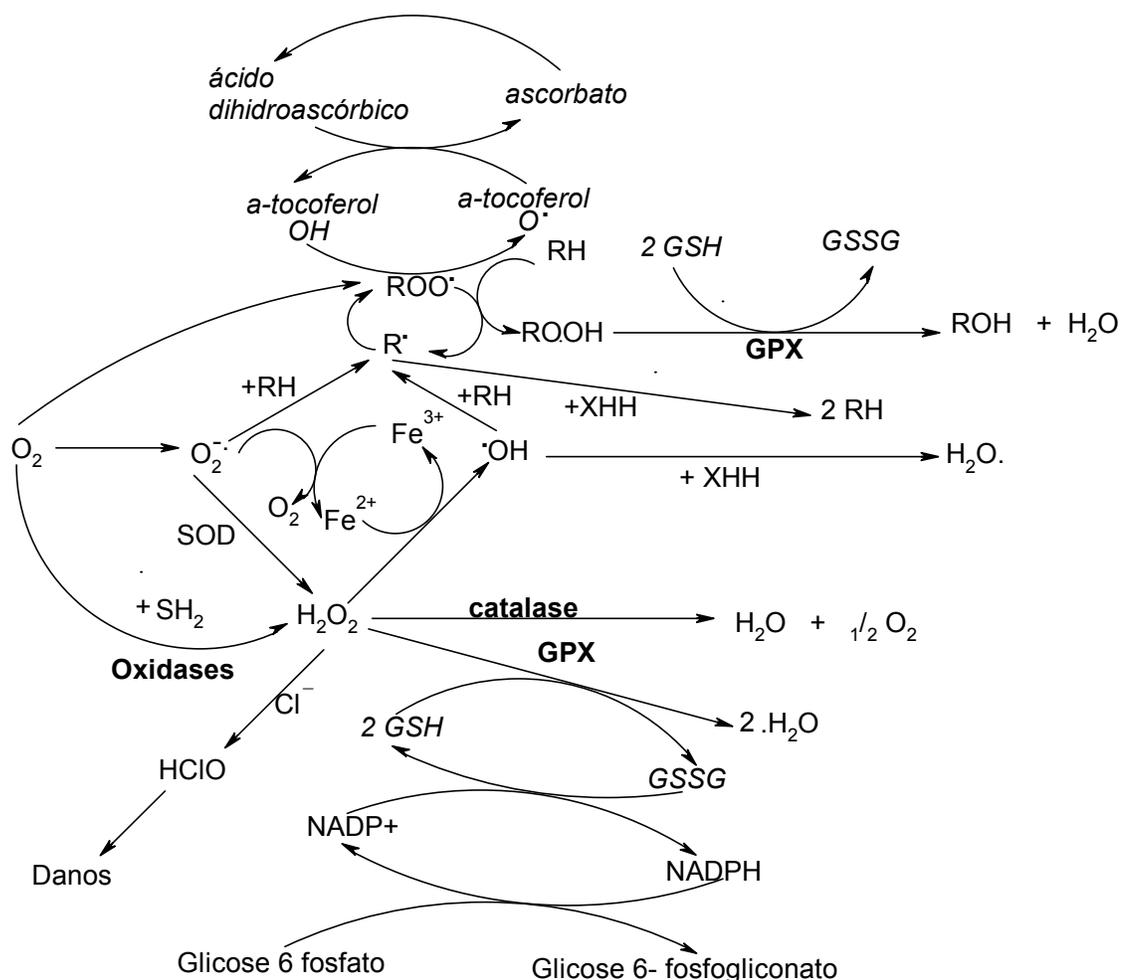


Figura 1. **Modelo de formação e de eliminação de espécies reativas de oxigênio em sistemas biológicos** (adaptado de REMACLE *et al.*, 1992) Legenda: O_2 - Oxigênio; $O_2^{\cdot-}$ - ânion radical superóxido; H_2O_2 - peróxido de hidrogênio; SOD - Superóxido dismutase; GPX - Glutaciona peroxidase; GSH - Glutaciona reduzida; GSSG - Glutaciona oxidada; NADPH - fosfato de nicotina diamina reduzida; NADP⁺ - fosfato de nicotina diamina oxidada; RH - biomolécula; R[•] - espécie radicalar formada a partir de uma biomolécula; ROO[•] - Espécie radicalar formada a partir da oxidação uma biomolécula; ROOH - Produto da oxidação de uma biomolécula; ROH - produto da redução do ROOH.

A associação sinérgica de antioxidantes é muito comum em sistemas biológicos e é responsável pela atividade antioxidante de muitas moléculas endógenas ou exógenas. Um exemplo clássico de associação de antioxidantes é representado pelo ácido ascórbico e pelo α -tocoferol em sistemas biológicos na interrupção da peroxidação lipídica (Figura 2) (ARUOMA, 2003; SCHWEDHELM *et*

al., 2003; BUETTNER, 1993). A peroxidação lipídica é iniciada pelo ataque de uma espécie radicalar ou um metal de transição na insaturação da cadeia hidrofóbica da membrana celular. Uma vez atacada, esta porção aumenta sua polaridade e é deslocada para a porção hidrofílica da membrana, iniciando a peroxidação lipídica. O α -tocoferol (antioxidante lipossolúvel) é responsável pela reparação do radical formado absorvendo o elétron desemparelhado e estabilizando o processo de peroxidação lipídica iniciado. Por sua vez, o radical formado no tocoferol (α -tocoferoxil) é estabilizado pelo ácido ascórbico (antioxidante hidrossolúvel), representando, desta forma, a associação de dois antioxidantes (SCHWEDHELM *et al.*, 2003; BUETTNER, 1993; HALLIWELL; CHIRICO, 1993).

A ocorrência da peroxidação lipídica causa danos muito sérios às membranas celulares podendo, inclusive, levar à lise celular. Geralmente os danos nestas membranas alteram a função, fluidez, permeabilidade e muitas vezes até mesmo a atividade de biorreceptores localizados na sua estrutura (BUETTNER, 1993).

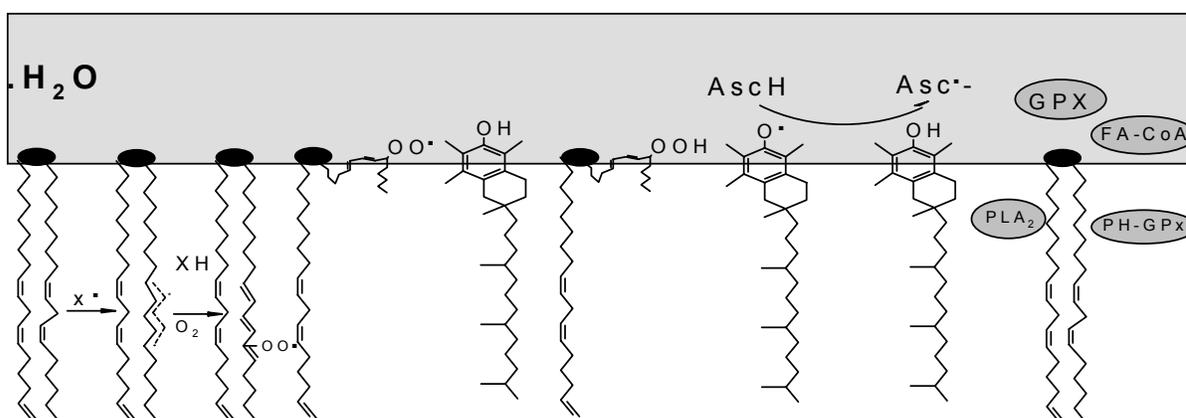


Figura 2. Peroxidação lipídica da membrana celular (**adaptado de Buettner, 1993**) **Legenda:** X[•]- espécie radicalar; AscH – ácido ascórbico; Asc^{•-} - radical ascorbato; GPx – Glutaciona peroxidase; PLA₂ – Fosfolipase A₂; FA-Coa – acil graxo Coenzima A; PH-GPx – Glutaciona Peroxidase hidroperóxido.

Pelo fato de muitas doenças estarem relacionadas à superação das defesas antioxidantes endógenas (estresse oxidativo), torna-se extremamente importante avaliar a atividade antioxidante de compostos exógenos para utilizá-los como profiláticos destas patologias (AMAROWICZ *et al.*, 2004). Entre os exemplos, podemos citar o “Paradoxo Francês”. A França é um país cuja população possui hábitos prejudiciais à saúde como fumo, bebida e alimentação gordurosa em excesso. Por estes hábitos, era de se esperar que a população apresentasse uma alta incidência de doenças cardíacas (relacionadas ao estresse oxidativo), contudo, isto não é observado. Muitos cientistas explicam este paradoxo em virtude da alta ingestão de vinho tinto, rico em compostos fenólicos, os quais são descritos como antioxidantes naturais (JACOB; BURRI, 1996; RENAUD; LORGERIL, 1992).

2.1 Antioxidantes naturais

O poder antioxidante de muitas frutas, verduras, legumes e grãos tem sido atribuído à presença de carotenóides, tocoferóis e ácido ascórbico (SOFFERS *et al.*, 1999). Porém, existe uma série de substâncias, tais como, os flavonóides (grupo mais representativo) com mais de 4000 compostos já descrito (WILHELM FILHO *et al.*, 2001), além dos os fenilpropanóides (derivados do ácido cinâmico), os taninos e os ácidos fenólicos (derivados do ácido benzóico) que apresentam atividade antioxidante comprovada (Figura 3) (BORS; MICHEL, 2002; PIETTA, 2000; COS *et al.*, 1998; HARGERMAN *et al.*, 1998; CATAPANO, 1997; KONO *et al.*, 1997; RICE-EVANS; MILLER, 1996; BORS *et al.*, 1995; CASTELLUCCIO *et al.*, 1995; JAVANOVIC *et al.*, 1994). Estes compostos estão também presentes nos vinhos,

especialmente nos tintos não envelhecidos (ALONSO *et al.*, 2002; FREMONT *et al.*, 1999; KERRY; ABBEY, 1997).

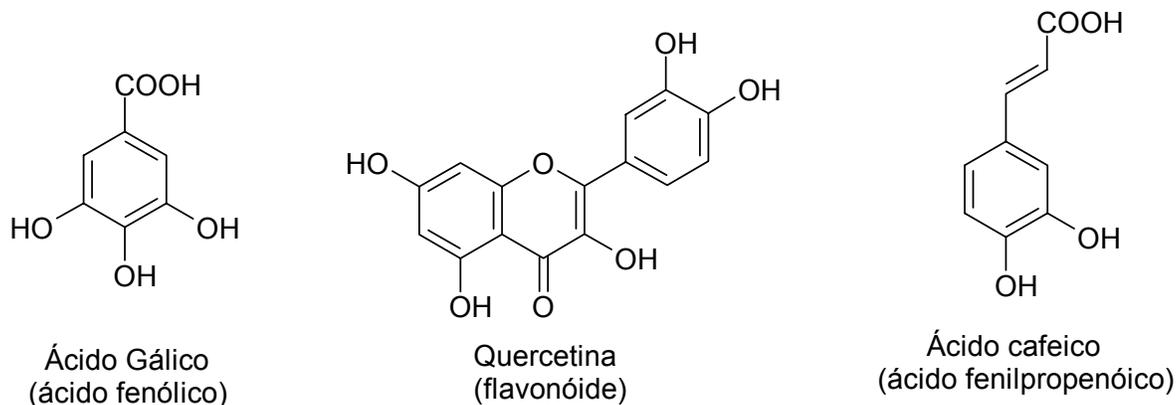


Figura 3. **Estrutura química de alguns antioxidantes naturais**

A atividade antioxidante destas substâncias pode ser justificada pela capacidade de estabilizar elétrons desemparelhados, por doar elétrons ou prótons, por formar quelatos com metais de transição e pela associação com outros antioxidantes (COS *et al.*, 1998; RICE-EVANS; MILLER, 1996).

A Figura 4 mostra a estrutura genérica de um flavonóide. Os substituintes são, na grande maioria das vezes, representados por hidroxilas (OH), hidrogênios (H), açúcares (glicose, xilose raminose e rutinose) e éteres (OCH₃). A atividade antioxidante está diretamente ligada à capacidade destas estruturas de estabilizar elétrons desemparelhados e de complexar metais de transição (Figura 5). Isto é possível principalmente por apresentarem hidroxilas vizinhas, ou seja, presença de orto-hidroxilas (PIETTA, 2000; HAGERMAN *et al.*, 1998; CASTELLUCCIO *et al.*, 1995).

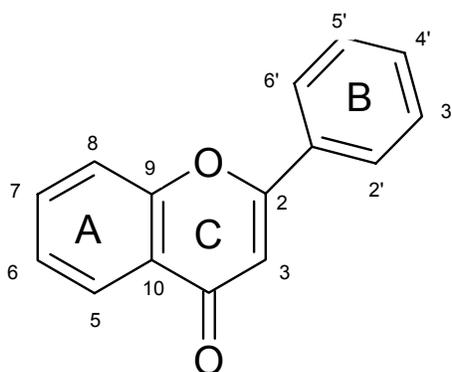


Figura 4. Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração (SIMÕES *et al.*, 1999).

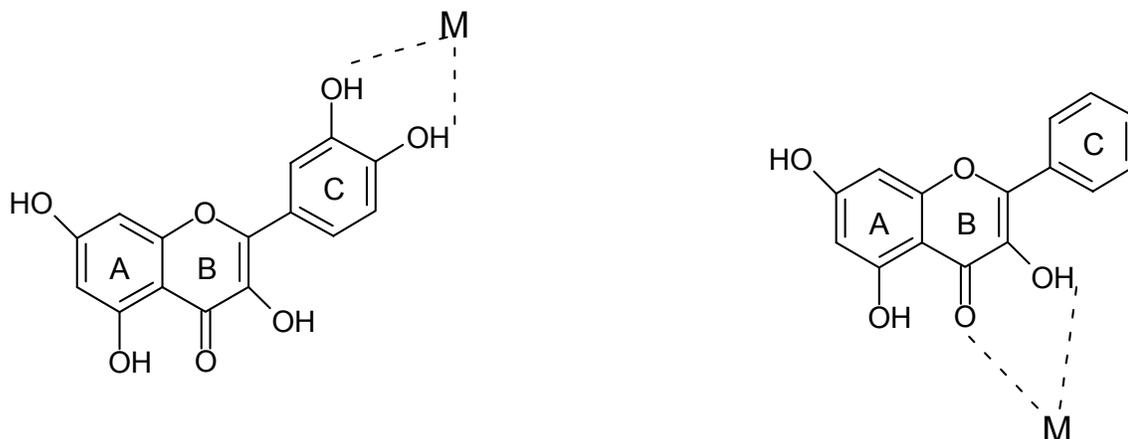


Figura 5. Possibilidade de complexação dos flavonóides com metais de transição (HAGERMAN *et al.*, 1998).

Outros autores como Satoh e Sakagami (1996) sugerem que variáveis como peso molecular, grupos funcionais e presença de polissacarídeos também estão diretamente relacionadas à atividade antioxidante.

2.3 Técnicas para avaliar a atividade antioxidante *in vitro*

Existem muitas maneiras de estudar radicais livres, mas todas apresentam o mesmo problema relacionado com a alta reatividade do analito, representada pelo pequeno tempo de meia vida e pela pouca distância de migração destes radicais. Isto torna a quantificação dos radicais livres muito difícil (PUNCHARD; KELLY, 1996). A Figura 6 apresenta as formas pelas quais pode-se avaliar as EROs e os compostos com potencial atividade antioxidante *in vitro*.

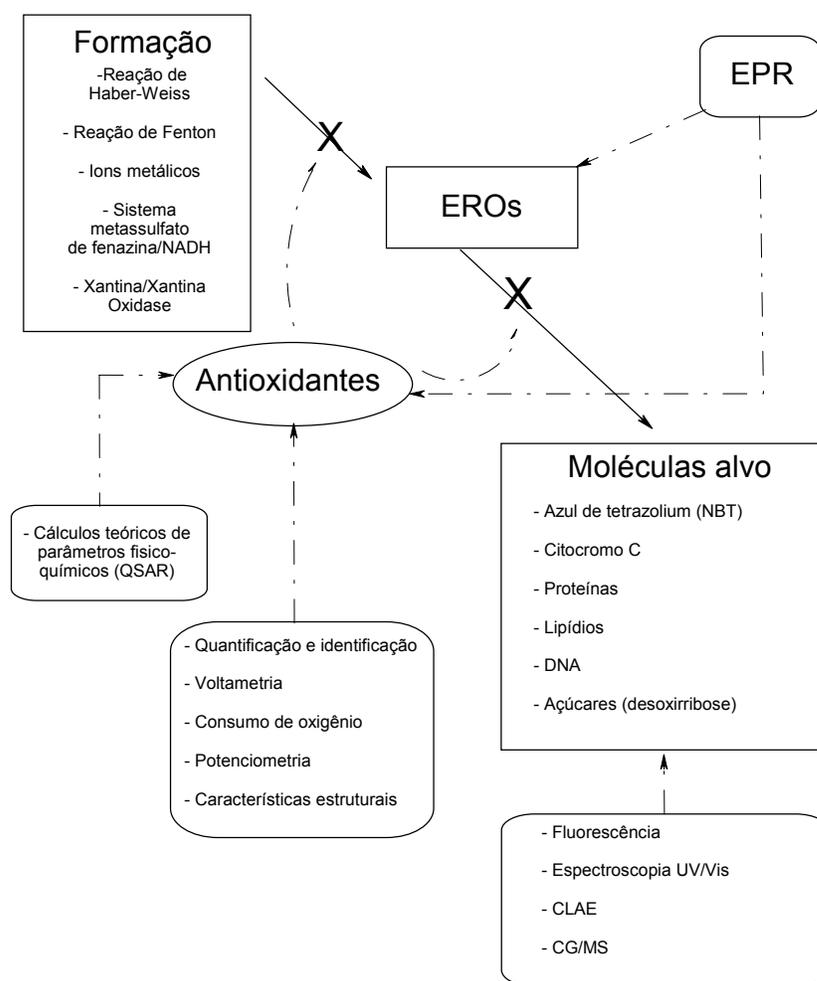


Figura 6 . **Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*.** Legenda: → Seqüência de eventos oxidantes; - - - - formas de avaliação da atividade; X formas de interromper o processo oxidante.

As EROs podem ser formadas na cadeia respiratória mitocondrial e ainda *in vivo* ou *in vitro* através da oxidação da xantina catalisada pela enzima xantina oxidase. Nesta reação, o oxigênio atua como acceptor de elétrons formando o ânion radical superóxido (RICE-EVANS *et al.*, 1991; HALLIWELL, 1995b). Outra forma de obter EROs, é através de metais de transição, principalmente cobre e ferro. Como exemplos clássicos tem-se a inicialização da peroxidação lipídica e a reação de Fenton (ARUOMA, 1994; HALLIWELL, 1995b; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1991) e a reação de Haber-Weiss (FERREIRA; FERREIRA, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1991).

As EROs podem ser avaliadas direta ou indiretamente. Diretamente os radicais podem ser avaliados através da avaliação da estrutura radicalar por Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR), e indiretamente as Eros podem ser avaliadas através da ação enzimática específica e pela medida dos efeitos causados sobre as moléculas alvo (Figura 6).

Como apresentado na Figura 6, os antioxidantes podem ser avaliados através de suas características estruturais, eletroquímicas e através de seus parâmetros físico-químicos (obtidos experimentalmente ou por cálculos teóricos). A atividade antioxidante de uma amostra pode, também, ser avaliada pela identificação e quantificação dos compostos antioxidantes presentes, como, por exemplo, compostos fenólicos (ALONSO *et al.*, 2002). Nestas situações a produção de EROs no sistema não é necessária.

A EPR é uma técnica espectroscópica utilizada para estudar moléculas que apresentem elétrons desemparelhados. Portanto, pode ser empregada para se estudar EROs e compostos orgânicos radicalares (antioxidantes que estabilizaram elétrons desemparelhados) (MANSON, 1996; RICE-EVANS *et al.*, 1991; BUNCE,

1987). Espectros obtidos por EPR permitem identificar radicais formados *in vitro* (ACKER *et al.*, 1996) e *in vivo* (MASON, 1996).

Através de medidas de EPR, Metodiewa e colaboradores (1999) determinaram a atividade citotóxica da quercetina, comprovando que a espécie radicalar formada é estável e pode causar danos aos sistemas biológicos. Outro trabalho aplicando esta técnica foi apresentado por Gardner e colaboradores (1999), que avaliaram a capacidade antioxidante de vinhos tintos através da determinação da sua composição química, com posterior avaliação das espécies radicalares formadas pelos componentes fenólicos isolados. Este trabalho demonstrou a aplicação desta técnica na distinção de amostras complexas com potencial antioxidante.

Outras técnicas também têm sido aplicadas na avaliação da atividade antioxidante. Uma delas foi desenvolvida recentemente, e consiste em um sensor contendo a enzima superóxido dismutase para quantificar o ânion radical superóxido produzido pela reação da xantina-xantina oxidase na presença de compostos com potencial antioxidante. Este método tem sido utilizado para avaliar a atividade antioxidante de amostras vegetais (CAMPANELLA *et al.*, 2003).

Por outro lado, algumas técnicas adotam a quantificação de danos causados em moléculas-alvo pelas EROs para avaliar o potencial antioxidante. Geralmente estas moléculas alvo são representadas por biomoléculas, no entanto, em estudos *in vitro*, têm sido adotado outros compostos sintéticos como o azul de tetrazolium (NBT) e do Citocromo c (HALLIWELL, 1995b; RICE-EVANS *et al.*, 1991).

Um exemplo de biomolécula utilizada na avaliação da atividade antioxidante é a desoxirribose. Trata-se de um açúcar bastante abundante no organismo, podendo ser encontrado na forma isolada ou ligada às bases nitrogenadas do ácido desoxi-

ribonucleico (DNA). Quando atacadas por EROs, as bases nitrogenadas formam como produto de decomposição o malondialdeído, que complexado com o ácido tiobarbitúrico (TBA), forma um aducto colorido quantificado por fluorescência no comprimento de onda de 553 nm, ou por espectroscopia, na região do visível (fotometria) em 532 nm (HALLIWELL, 1995b; ARUOMA, 1994; HALLIWELL, 1991).

O malondialdeído também é um dos produtos majoritários da degradação de lipídios, podendo, portanto, ser também avaliado através da complexação com o ácido tiobarbitúrico (PUNCHARD; KELLY, 1996; HALLIWELL, 1995b; HALLIWELL; CHIRICO, 1993; RICE-EVANS *et al.*, 1991). A peroxidação lipídica pode ainda ser avaliada pela formação de dienos conjugados por espectroscopia na região do ultravioleta (230-235 nm) (HALLIWELL, 1995b; HALLIWELL; CHIRICO, 1993; RICE-EVANS *et al.*, 1991), por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por ultravioleta e por cromatografia gasosa com detecção por espectroscopia de massa (CG/MS) (PUNCHARD; KELLY, 1996).

Durante a peroxidação lipídica são formados produtos que podem emitir fluorescência, portanto, a técnica de fluorescência pode ser aplicada para monitorar este processo oxidativo. Este monitoramento pode ser realizado de forma direta sobre os lipídios ou, como é mais usual, de forma indireta utilizando-se o luminol, que, por ser oxidado por espécies radicalares (formadas durante a peroxidação) emite fluorescência (IULIANO *et al.*, 2000; FREMONT *et al.*, 1999; PRIOR; CAO, 1999; FANTOZZI *et al.*, 1998; NAGUIB, 1998), ou com o ácido tiobarbitúrico, como citado anteriormente.

Muitas outras técnicas são citadas na literatura para estudar EROs e avaliar a atividade antioxidante. Podem ser destacadas as reações que envolvem enzimas como a superóxido dismutase, a catalase, a glutathiona peroxidase, como também

outras técnicas instrumentais como a de radiólise de pulso (PUNCHARD; KELLY, 1996; HALLIWELL, 1995; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1991) e muitas outras que não coube aqui citar.

É importante salientar que as técnicas *in vitro* são extremamente importantes para a avaliação da atividade antioxidante, porém apresentam limitações quando é necessário extrapolar os resultados para ensaios *in vivo*. Isto ocorre devido à complexidade dos sistemas biológicos e pela falta de padronização das condições de análise adotadas *in vitro* com as obtidas *in vivo*, como por exemplo, a temperatura e o pH dos ensaios (ARUOMA, 2003).

2.4 Fundamentos das técnicas adotadas neste trabalho

2.4.1 Técnicas eletroquímicas

Pelo fato dos processos envolvendo formação e eliminação de radicais livres estarem relacionados a reações de oxi-redução, trabalhos recentes têm caracterizado a atividade antioxidante de certas substâncias por métodos eletroquímicos. Um bom antioxidante deve oxidar-se facilmente, prevenindo a oxidação de outras moléculas. Baseando-se nisso, o potencial de meia onda ($E_{1/2}$) ou o potencial de pico anódico (E_{pa}) podem ser utilizados como um parâmetro para medir a atividade antioxidante. Para tanto, técnicas como voltametria cíclica, voltametria hidrodinâmica e voltametria de pulso diferencial têm sido utilizadas (GALATO *et al.*, 2001; GUNCKEL *et al.*, 1998; RICE-EVANS *et al.*, 1997; RAPTA *et al.*, 1995).

2.4.1.1 Voltametria cíclica

Normalmente, os estudos de mecanismos de reações de oxi-redução são realizados através de métodos voltamétricos, em especial a voltametria cíclica. Neste caso, os processos anódicos são considerados os mais importantes, pois são similares aos processos transcorridos em meio fisiológico (RICE-EVANS *et al.*, 1991; HALLIWELL, 1995b).

A técnica de voltametria cíclica baseia-se em registrar a corrente que surge num eletrodo (eletrodo de trabalho) imerso na solução de interesse, quando este é submetido a uma variação contínua e cíclica de potencial (BARD; FAULKNER, 1980).

O potencial aplicado no eletrodo de trabalho é monitorado pelo eletrodo de referência e a reação complementar ocorre no contra-eletrodo. Na Figura 7 é apresentado o programa de potencial empregado para a obtenção de voltamogramas cíclicos.

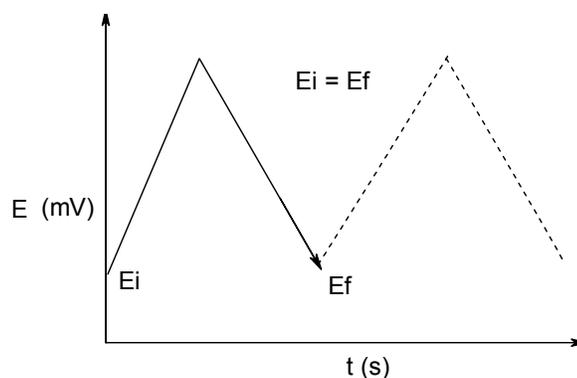


Figura 7: **Varição cíclica de potencial sob a forma de onda triangular.** Legenda:

E – potencial; E_i – Potencial inicial; E_f – Potencial final; t – Tempo.

A inclinação da curva potencial (E) contra tempo (t) fornece a velocidade de variação de potencial em mV/s (SKOOG; LEARY, 1998). Esta variação de potencial

gera, assim, o voltamograma cíclico que consiste em um diagrama do tipo corrente versus potencial (Figura 8).

O sinal que interessa para a identificação da amostra é o valor de potencial de pico (E_p); já o valor de corrente de pico (i_p) é proporcional à concentração (C) do composto no meio, sendo esta relação descrita pela equação de *Randles-Sevcik* (SKOOG; LEARY, 1998; OLDHAN; MYLAND, 1994).

$$i_p = 0,4463 n F A C (n F v D / R T)^{1/2} \quad (1)$$

Onde, n é o número de elétrons envolvidos na reação, v a velocidade de variação de potencial (V / s), F a constante de Faraday ($96485 C / mol$), A é a área do eletrodo (cm^2), R a constante universal dos gases ($8,314 J / mol K$), T a temperatura absoluta (K), e D o coeficiente de difusão do analito (cm^2 / s). Quando a temperatura adotada é $25 ^\circ C$ ($298,15 K$), a equação de *Randles-Sevcik* pode ser escrita de forma mais concisa.

$$i_p = (2,687 \times 10^5) n^{3/2} v^{1/2} D^{1/2} A C \quad (2)$$

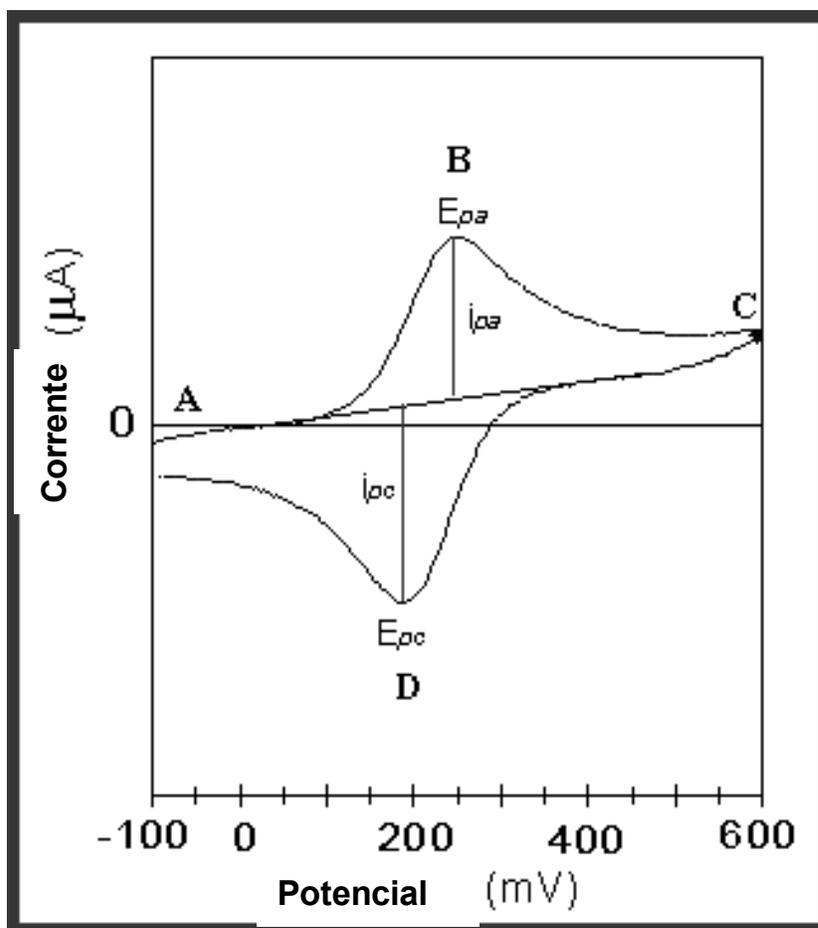


Figura 8. **Voltamograma cíclico típico de uma reação de oxi-redução (processo reversível)** Legenda: E_{pa} – Potencial de pico anódico, E_{pc} – Potencial de pico catódico, i_{pa} – Corrente de pico anódica e i_{pc} – Corrente de pico catódica.

A corrente de interesse é conhecida como corrente de difusão ou faradaica. É interessante notar que na voltametria cíclica, o único mecanismo de transporte deve ser a difusão. Existem, no entanto, outras correntes que devem ser evitadas, como é o caso das correntes não faradaicas. A primeira é causada pelo movimento de partículas carregadas, íons, sob ação de um campo elétrico (amenizada na presença de um eletrólito de suporte). A corrente de convecção, no entanto, é gerada pelo movimento de camadas de material em uma solução sob agitação

mecânica. Para eliminar o transporte por convecção, simplesmente mantém-se a solução em repouso, sem agitação mecânica (SKOOG; LEARY, 1998; OLDHAN; MYLAND, 1994).

O processo de oxidação (ou de redução) da espécie eletroativa na superfície do eletrodo pode ainda ser influenciado pelo fenômeno da adsorção. Este geralmente torna as reações eletroquímicas mais complexas. Tanto a espécie inicial quanto o produto podem ser adsorvidos em diversos graus de intensidade de acordo com a isoterma de adsorção. Em alguns casos, o eletrodo é recoberto por adsorção com algum material que, tanto pode facilitar o processo de transferência de carga, como impedi-lo completamente (SKOOG; LEARY, 1998).

A corrente resultante da variação de potencial depende, além do transporte de massa, da velocidade com que os elétrons são transferidos do eletrodo para a solução ou vice-versa. Este processo é chamado de transferência de carga. Podemos distinguir três processos de transferência de carga no eletrodo (SKOOG; LEARY, 1998; OLDHAN; MYLAND, 1994):

- *Processos reversíveis*: são processos que ocorrem com uma velocidade suficientemente rápida em ambos os sentidos, de modo a estabelecer um equilíbrio entre a espécie oxidada e reduzida na superfície do eletrodo;
- *Processos irreversíveis*: são processos cuja velocidade de transferência de carga é lenta. A reação ocorre em um potencial muito afastado do potencial padrão.
- *Processos quase reversíveis*: são aqueles que ocorrem em sistemas onde a velocidade de reação depende tanto da transferência de carga como do mecanismo de difusão.

A voltametria tem sido aplicada na avaliação da atividade antioxidante, principalmente na aplicação do potencial de meia onda e do potencial de pico anódico, ambos parâmetros obtidos através da análise do voltamograma cíclico contendo correntes de oxidação do composto avaliado. Além da aplicação na avaliação do potencial relacionado ao poder antioxidante, outros estudos utilizaram a voltametria para determinar a identidade e quantidade de compostos com atividade antioxidante: em óleos (CEBALLOS; FERNÁNDEZ, 1995), em alimentos (FUENTE *et al.*, 1997; AGUÍ *et al.*, 1995), no sangue (CHEVION *et al.*, 2000; SHAPOVAL *et al.*, 1998; CHEVION *et al.*, 1997) e no cérebro (SHOHAMI *et al.*, 1997).

2.4.1.2 Potenciometria

A potenciometria está fundamentada na medida da diferença de potencial (ddp) entre os eletrodos de uma célula eletroquímica (SKOOG; LEARY, 1998). Esta ddp indica o comportamento redox de determinada substância, implicando na avaliação da sua atividade antioxidante (SAKAGAMI; SATOH, 1997).

Para se determinar o comportamento redox utilizam-se eletrodos indicadores de reações de oxi-redução que geralmente são formados de metais inertes como a platina, o ouro e o paládio (SKOOG; LEARY, 1998). A equação de Nernst apresentada abaixo relaciona o potencial do eletrodo com a concentração das espécies oxidadas e reduzidas presentes na interface eletrodo/solução:

$$E_{ind} = E^0 - (RT / nF) \cdot \ln ([red] / [oxi]) \quad (3)$$

Onde, E_{ind} é o potencial do eletrodo indicador, E^0 o potencial formal da semi-reação, R a constante universal dos gases, T a temperatura absoluta, n o número de elétrons envolvidos, F a constante de Faraday, $[red]$ a concentração da espécie reduzida, e $[oxi]$ a concentração da espécie oxidada. Substituindo-se as constantes pelos seus valores numéricos (citados na seção 2.4.1.1) e levando-se em consideração a força iônica do sistema, a equação toma a forma:

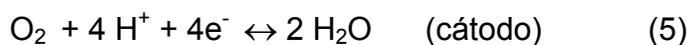
$$E_{ind} = E^0 - (0,0592/n) \cdot \text{Log} (a_{red} / a_{oxi}) \quad (4)$$

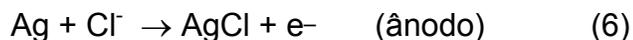
2.4.1.3 Determinação de oxigênio – Eletrodo de Clark

Existem várias maneiras de se determinar o oxigênio dissolvido em solução. Uma das mais comuns é aquela realizada pelo eletrodo de Clark (SKOOG *et al.*, 1998). A célula eletroquímica consiste de um eletrodo de trabalho (cátodo) de platina (SKOOG *et al.*, 1998; SAWYER *et al.*, 1995) ou ouro (SAWYER *et al.*, 1995) e um eletrodo de referência (ânodo) de Ag/AgCl (SKOOG *et al.*, 1998; SAWYER *et al.*, 1995).

Para determinar o teor de oxigênio do meio, é necessário que este gás permeie a membrana de polietileno ou teflon e difunda-se na fina camada de eletrólito subjacente ao cátodo (SKOOG *et al.*, 1998; SAWYER *et al.*, 1995). A membrana semipermeável previne a interferência de íons eletroativos de outros compostos presentes em amostras complexas (SAWYER *et al.*, 1995).

O oxigênio difundido no eletrólito sofre redução formando como produto a água. A seguir estão representadas as reações que ocorrem no cátodo (5) e no ânodo (6) (SKOOG *et al.*, 1998).





O eletrodo de Clark tem encontrado aplicações principalmente no monitoramento da pressão parcial de oxigênio no sangue, na atmosfera, em extratos de plantas (SAWYER *et al.*, 1995) e no consumo tecidual de oxigênio.

2.4.2 Inibição da redução do azul de tetrazolium (Nitro Blue Tetrazolium - NBT)

Nesta técnica são gerados radicais ânion superóxido através de diferentes sistemas. Entre eles podemos citar o enzimático xantina/xantina oxidase e o não enzimático metassulfato de fenazina/NADPH. O sistema xantina/xantina oxidase, por apresentar inconvenientes relacionados à atividade da própria enzima, não será abordado neste contexto.

No sistema metassulfato de fenazina/NADPH, o radical ânion superóxido é formado quando o NADPH reduz o metassulfato de fenazina e este é reoxidado pelo oxigênio molecular (ROBAK; GRYGLEWSKI, 1988).

O revelador utilizado para avaliar esta reação é o azul de tetrazolium (NBT). A sua redução se dá pelo ataque do radical ânion superóxido (Figura 9). Nesta reação o radical formado ataca o NBT causando a sua redução (quantificada pela absorção em 560 nm). Quando estão presentes compostos com atividade antioxidante no meio, eles reagem com o radical formado, impedindo a redução do NBT (PUNCHARD; KELLY, 1996; ROBAK; GRYGLEWSKI, 1988). Segundo Halliwell (1995b), a reação entre o NBT e o radical ânion superóxido tem uma constante de velocidade de $6 \cdot 10^4 \text{ (mol/L)}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

O controle das reações que envolvem a produção do radical ânion superóxido é realizado pela enzima superóxido dismutase (SOD). Este radical é o único que apresenta no sistema biológico uma enzima responsável pela sua dismutação (HALLIWEL, 1995b).

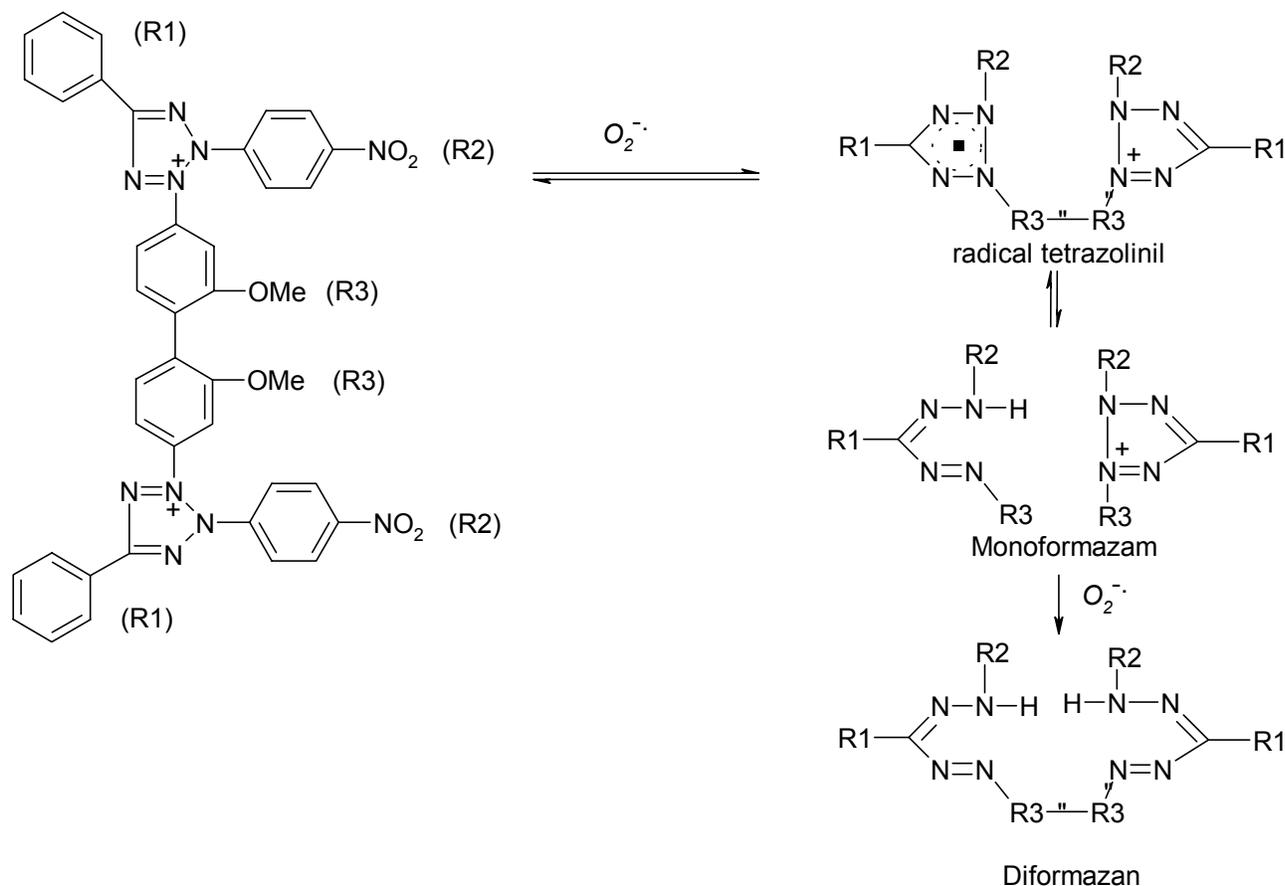


Figura 9. **Redução do NBT pelo ânion radical superóxido** (Adaptado de PUNCHARD; KELLY, 1996).

2.4.3 Cálculos teóricos de parâmetros físico-químicos

O desenvolvimento da computação vem permitindo, de forma cada vez mais precisa, o cálculo teórico de parâmetros físico-químicos. Os resultados de cálculos teóricos geralmente caracterizam e predizem a estrutura e a estabilidade de

sistemas químicos (MORGON, 2001; DELGADO; REMERES, 1998). Estes cálculos fazem parte da química teórica, basicamente compreendida em quântica (cálculos *ab initio*, semi-empíricos) e clássica (mecânica dinâmica – determinístico e Monte Carlo – estocástico), as quais têm-se tornado bastante populares nas últimas décadas (MORGON, 2001).

Os métodos semi-empíricos são cálculos de energia de orbital molecular que usam vários graus de aproximação (SANT'ANNA, 2002). Entre os cálculos semi-empíricos destacam-se aqueles desenvolvidos na Universidade de Austin, de cálculos mecânicos-quânticos, o *Austin Model 1*, Modelo Austin 1 (AM1), e os cálculos Parametric Methods (PM3).

Segundo Foye *et al.* (1995), a correlação quantitativa entre a estrutura química e a atividade biológica (QSAR) pode ser expressa de modo geral pela equação a seguir (7).

$$\text{Atividade biológica} = f(\text{parâmetros físico-químicos ou estruturais}) \quad (7)$$

Desta forma, os cálculos teóricos têm como um dos objetivos a construção de modelos matemáticos que relacionem a estrutura química e a atividade biológica de uma série de compostos análogos. Em geral, estes compostos diferem entre si pela presença de um ou mais grupos substituintes em posições definidas da estrutura química comum à série (FERREIRA *et al.*, 2002).

O objetivo é encontrar parâmetros experimentais ou teóricos que possam ser substituídos na equação e que apresentem correlação estatística significativa com a atividade biológica de uma série de moléculas. Um bom modelo é obtido quando pode ser utilizado para predizer, dentro de um limite aceitável, a atividade biológica

de substâncias diferentes daquelas empregadas para a sua construção (FOYE *et al.*, 1995).

As propriedades físico-químicas são extremamente importantes para determinar a farmacodinâmica e a farmacocinética de moléculas bioativas (BARREIRO; FRAGA, 2001).

Cálculos teóricos têm sido adotados para determinar vários parâmetros físico-químicos tais como: coeficiente de partição (Log P), calor de formação (HF), Energia do Orbital Ocupado de Maior Energia (HOMO, do inglês *Highest Occupied Molecular Orbital*), Energia do Orbital Molecular Desocupado de Menor Energia (LUMO, do inglês *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), entre outros, relacionando-os com a atividade antioxidante. As correlações entre estrutura química e a atividade antioxidante devem ser feitas através de métodos de regressão não paramétrica (CONSTANS; HIRST, 2000).

Considerando que a maioria dos compostos que atuam no organismo é levada ao local de ação por transporte passivo, um dos parâmetros mais importantes a ser avaliado é o coeficiente de partição octanol/água (Log *P*), sendo este normalmente correlacionado à atividade biológica (BARREIRO; FRAGA, 2001; DELGADO; REMERS, 1998; HANSCH; LEO, 1995).

2.5 Justificativa

A busca do homem pela maior longevidade faz com que este procure o elixir da longa vida. Segundo alguns pesquisadores, quando for possível controlar a oxidação da mitocôndria através do processo de respiração celular, será possível

evitar o envelhecimento celular. Sem envelhecimento celular não haverá morte celular. Será este o segredo da longevidade?

Fenômenos como o “Paradoxo Francês” permitem avaliar a capacidade bioativa de compostos naturais no organismo humano. Desta forma, é importante quantificar a capacidade antioxidante de substâncias, principalmente aquelas de origem natural. O objetivo desta pesquisa foi o de correlacionar os resultados obtidos por diferentes técnicas, cujo propósito foi determinar a atividade antioxidante, e relacionar os melhores parâmetros teóricos para prever esta atividade. Para que isto fosse possível, foram selecionados compostos derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico.

As técnicas adotadas foram a voltametria cíclica, a potenciometria, o consumo de oxigênio, a avaliação da inibição da redução do NBT (fotométrica) e os cálculos teóricos de parâmetros físico-químicos.

As técnicas eletroquímicas (voltametria e potenciometria) avaliam o comportamento redox do analito, levando-se em consideração que um bom antioxidante é aquele que mesmo em concentração relativamente baixa (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998) se oxida prevenindo a oxidação de moléculas orgânicas importantes como DNA, lipídios e proteínas. Estas técnicas são adequadas para prever e mensurar a atividade antioxidante de diferentes compostos. Além disso, apresentam um baixo custo de realização, rapidez e simplicidade na aquisição dos dados. Torna-se imprescindível comentar neste contexto que a técnica de voltametria tem sido utilizada de forma isolada para determinar a atividade antioxidante e que na literatura foi encontrado apenas um trabalho sobre a aplicação da potenciometria para determinar a atividade antioxidante (SAKAGAMI, SATOH, 1997).

A técnica adotada para determinar o consumo de oxigênio, por ser realizada com um eletrodo seletivo a este gás, também foi considerada eletroquímica. A redução do teor de oxigênio dissolvido no meio está sendo correlacionada com a presença de compostos com atividade antioxidante no meio.

A avaliação da proteção de compostos antioxidantes às moléculas biológicas é uma ferramenta fundamentada na capacidade destes compostos de impedirem a formação de EROs, estabilizarem as espécies formadas, ou de repararem os danos causados. O azul de tetrazolium (NBT) não é uma biomolécula, porém por ser facilmente reduzido pelo ânion radical superóxido (radical de extrema importância biológica), é um bom indicador da capacidade seqüestradora deste radical pelos compostos fenólicos. Desta forma, os compostos que apresentam capacidade de inibir a redução do NBT no sistema gerador de radicais metassulfato de fenazina/NADPH, o fazem pela capacidade de seqüestrar o ânion radical superóxido (ROBAK; GRYGLEWSKI, 1988).

Os cálculos teóricos de parâmetros físico-químicos e as características estruturais têm sido empregados recentemente para explicar a capacidade antioxidante (ZHANG, CHEN, 2000a; ZHANG, CHEN, 2000b; ZHANG, 1999), pois representam a capacidade de doar prótons, elétrons e de estabilizar elétrons desemparelhados. Estes parâmetros ainda permitem prever se a molécula apresenta condições mínimas de transpor barreiras biológicas, pré-requisito para a atividade biológica *in vivo*.

A correlação dos resultados obtidos por estas diferentes técnicas eletroquímicas, de inibição da redução do NBT, das características estruturais e dos parâmetros físico-químicos teóricos representa a relação entre estes métodos. Estas informações a respeito de substâncias com potencial antioxidante poderão

auxiliar na escolha do melhor antioxidante para testes *in vivo*, bem como, fornecer informações sobre as características estruturais importantes para a atividade antioxidante.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Correlacionar resultados obtidos por métodos eletroquímicos (voltametria cíclica, potenciometria e consumo de oxigênio), fotométrico (inibição da redução do azul de tetrazolium - NBT) e por cálculos teóricos de parâmetros físico-químicos, empregados na avaliação da atividade antioxidante de compostos derivados do ácido cinâmico e do ácido benzóico.

3.2 Objetivos específicos

- ↪ Determinar o potencial de pico anódico (E_{pa}) dos compostos derivados do ácido cinâmico e do ácido benzóico em eletrólito de suporte que mimetize as condições fisiológicas;
- ↪ Determinar o salto potenciométrico obtido pela adição dos compostos derivados do ácido cinâmico e do ácido benzóico em eletrólito de suporte que mimetize as condições fisiológicas;
- ↪ Determinar o consumo de oxigênio no meio após a adição dos compostos com potencial antioxidante;

- ↪ Determinar a capacidade dos compostos derivados do ácido cinâmico e do ácido benzóico de seqüestrar o ânion radical superóxido através da inibição da redução do azul de tetrazolium (NBT);

- ↪ Determinar parâmetros físico-químicos (Log P, energia de dissociação da ligação OH, HOMO, energia de ativação, etc.) dos compostos derivados do ácido cinâmico e do ácido benzóico através de cálculos teóricos;

- ↪ Utilizar um programa de estatística para correlacionar os resultados de potencial de pico anódico (E_{pa}), salto potenciométrico (ΔE), consumo de oxigênio, percentual de inibição da redução do NBT (INI_{NBT}), parâmetros físico-químicos teóricos, bem como o número de hidroxilas fenólicas presentes nos compostos derivados do ácido cinâmico e do ácido benzóico.

4 METODOLOGIA

4.1 Ensaios para determinação das condições eletroquímicas de análise

Para determinar as melhores condições para os experimentos eletroquímicos, foram realizados ensaios testando-se diversos parâmetros. Como o ensaio de inibição da redução do NBT foi protocolado para ser realizado em pH próximo ao fisiológico (7,8), os ensaios eletroquímicos foram padronizados no mesmo pH, utilizando o tampão fosfato como eletrólito de suporte.

Condições de velocidade de variação de potencial e regiões de estudo de potencial foram determinadas a partir de uma série de ensaios realizados por voltametria cíclica. Dentre as diversas velocidades de variação de potencial testadas, as correlações de Spearman entre os dados experimentais demonstraram que 25 mV/s era a velocidade mais adequada. A região de potencial observada foi determinada com base nas características eletroquímicas dos compostos avaliados preliminarmente, ficando entre -500 e + 900 mV, adotando-se como eletrodo de referência o calomelano saturado (ECS).

Nestes ensaios também foi estudado o comportamento eletroquímico dos compostos nas concentrações de 1 a 5 mmol/L, sendo selecionada a concentração de 1 mmol/L para realizar as correlações pelo fato de ser o valor mais próximo daquele avaliado no estudo de inibição da redução do NBT (0,8 mmol/L).

Para a construção dos potenciogramas foram selecionados o mesmo eletrólito de suporte (tampão fosfato) e a concentração dos compostos em análise (1 mmol/L). Padronizou-se avaliar o comportamento eletroquímico por trinta minutos após a

adição do composto fenólico ao meio, sendo que o valor de ΔE adotado para as correlações foi o observado em 180 s (três minutos após a adição do composto).

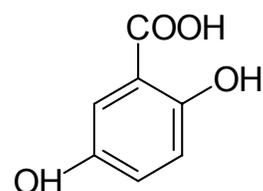
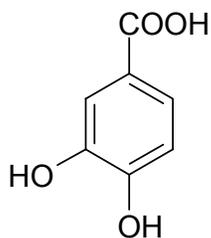
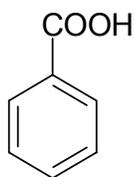
Para realizar a determinação do teor de oxigênio testaram-se inicialmente eletrodos de Clark para medidas de campo, porém devido à pequena sensibilidade destes não foi possível avaliar as alterações de concentração deste gás uma vez adicionado o composto teste no meio. Como alternativa optou-se por utilizar um aparelho de gasometria indicado para avaliação de teores de oxigênio e gás carbônico em fluidos biológicos.

4.2 Compostos químicos

Os compostos analisados neste estudo estão apresentados na Figura 10 sendo estes derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico (em algumas literaturas também descritos como derivados do ácido fenilpropenóico).

Todos os compostos avaliados apresentaram grau analítico (Merck e Sigma-Aldrich), com exceção do galato de metila que foi sintetizado no laboratório tendo como precursor o ácido gálico, e caracterizado por espectroscopia no infravermelho e ultravioleta.

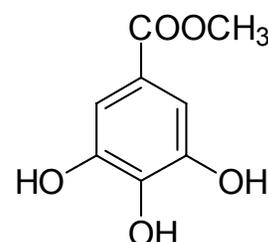
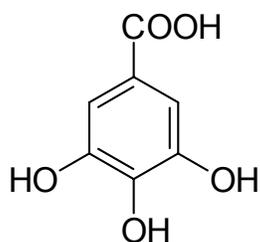
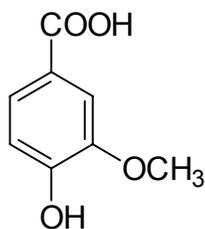
Ácido benzóico e seus derivados



Ácido benzóico - BEN

Ácido protocatéuico - PRO

Ácido gentísico - GEN

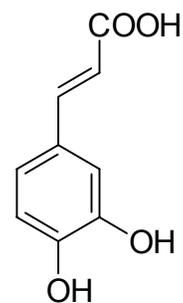
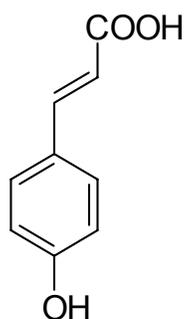
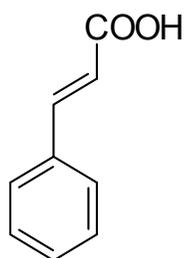


Ácido vanílico - VAN

Ácido gálico - GAL

Galato de metila - GALme

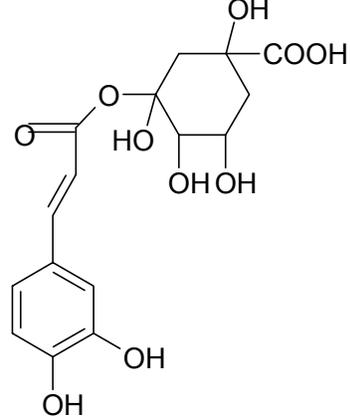
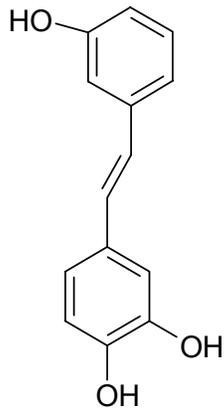
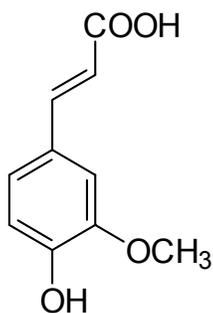
Ácido cinâmico e seus derivados



Ácido cinâmico - CIN

Ácido cumárico - CUM

Ácido cafeico - CAF



Ácido ferúlico - FER

Resveratrol - RES

Ácido clorogênico - CLO

Figura 10. Estrutura química dos compostos avaliados

4.3 Técnicas utilizadas para determinar a atividade antioxidante

4.3.4 Inibição da redução do azul de tetrazolium (NBT)

A geração do ânion radical superóxido foi realizada utilizando o sistema metassulfato de fenazina-NADPH (ROBAK; GRYGLEWSKI, 1988). Para a realização deste ensaio preconizou-se preparar três soluções diferentes, sendo elas a solução zero que representa 100% de redução do NBT (ausência do analito), as soluções branco (usadas para corrigir as absorbância na presença dos compostos testados) e as soluções testes (na concentração final de 0,1 a 0,8 mmol/L). Todas as soluções foram previamente homogeneizadas, sendo que as análises realizadas em triplicata.

Solução Zero – foi formada a partir da adição de 50 μ L de difosfato de nicotinamina nucleotídeo na forma reduzida (NADPH) (1,0 mmol/L), 50 μ L de azul de tetrazolium (NBT) (6,0 mmol/L), 10 μ L de metassulfato de fenazina (1,0 mmol/L) e 390 μ L de tampão fosfato (0,1 mol/L, pH 7,8), completando o volume total de 500 μ L. Depois de dois minutos de incubação à temperatura ambiente, a reação foi interrompida adicionando-se 100 μ L de HCl (0,1 mol/L). Em seguida foi realizada a medida de absorbância da solução no comprimento de onda (λ) de 560 nm, utilizando um espectrofotômetro UV/VIS modelo HITACHI U 2010.

Solução Branco - foi formada a partir da adição de 50 μ L de difosfato de nicotinamina nucleotídeo na forma reduzida (NADPH) (1,0 mmol/ L), 50 μ L de azul de tetrazolium (NBT) (6,0 mmol/L), 50 μ L da solução concentrada da substância teste (8 mmol/L) e 350 μ L de tampão fosfato (0,1 mol/L, pH 7,8), completando-se o volume para 500 μ L. Ao final, adicionaram-se 100 μ L de HCl (0,1 mol/L) e, em seguida, foi realizada a medida de absorbância da solução em 560 nm.

Solução Teste – foi formada a partir da adição de 50 μL de difosfato de nicotinamina nucleotídeo na forma reduzida (NADPH) (1,0 mmol/L), 50 μL de azul de tetrazolium (NBT) (6,0 mmol/L), 50 μL da solução concentrada da substância em análise (8 mmol/L) e 340 μL de tampão fosfato (0,1 mol/L, pH 7,8). Por último, acrescentou-se 10 μL de metassulfato de fenazina (1,0 mmol/L), completando o volume total para 500 μL . Depois de dois minutos de incubação à temperatura ambiente, a reação foi interrompida adicionando-se 100 μL de HCl (0,1 mol/L) e, em seguida, foi realizada a medida de absorbância da solução em 560 nm com um espectrofotômetro UV/VIS.

A Tabela a seguir esquematiza os reagentes utilizados no preparo de cada uma das soluções apresentadas anteriormente.

Tabela 1. Reagentes utilizados no preparo das soluções do ensaio de inibição da redução do NBT.

Tipo de solução	Solução zero	Solução Branco	
Composição	50 μL NADPH 50 μL NBT 10 μL de Fenazina 300 μL de TF Água qsp 500 μL	50 μL de NADPH 50 μL de NBT 50 μL de ST 350 μL TF Água qsp 500 μL	50 μL NADPH 50 μL NBT 10 μL de Fenazina 50 μL de ST 340 μL TF Água qsp 500 μL
Observações	Solução com geração do ânion radical superóxido e sem a substância teste	Solução sem geração do ânion radical superóxido e com a substância teste	Solução com geração do ânion radical superóxido e com a substância teste
Leitura	A_{zero}	A_{branco}	A_{teste}

TF – Tampão fosfato; ST – Substância teste

Os resultados desta análise são apresentados em percentual de inibição da redução do NBT, sendo obtidos a partir das equações a seguir:

$$\{ 1 - ([A_{\text{branco}} - A_{\text{zero}}] - A_{\text{teste}}) / [A_{\text{branco}} - A_{\text{zero}}] \} \times 100 = \text{INI}_{\text{NBT}} \quad (8)$$

Se considerarmos que a absorvância inicial (A_{inicial}) é dada pela diferença entre a absorvância da solução branco pela absorvância da solução zero.

$$A_{\text{branco}} - A_{\text{zero}} = A_{\text{inicial}} \quad (9)$$

Tem-se

$$\{ 1 - [(A_{\text{inicial}} - A_{\text{teste}}) / A_{\text{inicial}}] \} \times 100 = \text{INI}_{\text{NBT}} \quad (10)$$

O controle para verificar a geração do ânion radical superóxido é realizado adicionando-se ao meio a enzima superóxido dismutase (SOD).

4.3.2 Determinação do potencial de pico anódico (Epa) por voltametria cíclica

Os voltamogramas cíclicos foram obtidos em atmosfera isenta de oxigênio (purga de cinco minutos com nitrogênio) utilizando-se um sistema eletroquímico PAR 263 A. A célula era composta por três eletrodos: disco de carbono vítreo (eletrodo de trabalho), cilindro de grafite (contra eletrodo) e calomelano saturado (eletrodo de referência). Todos os resultados estão expressos em relação ao potencial do eletrodo de referência. O eletrodo de trabalho foi cuidadosamente polido com alumina, lavado com água desionizada e posteriormente mergulhado em banho de ultra-som. Os voltamogramas foram obtidos na região de potencial entre -500 a +900 mV, com velocidade de variação de potencial de 25 mV/s. Os compostos foram

analisados em triplicata na concentração de 1 mmol/L utilizando tampão fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0,1 mol/L em pH 7,8 como eletrólito de suporte (branco), numa célula com capacidade para 15 mL.

4.3.1 Determinação do salto potenciométrico (ΔE)

Todos os experimentos potenciométricos foram realizados em um potenciostato EG&G Princeton Applied Research (PAR) modelo 263^a, gerenciado por um software eletroquímico da mesma empresa. O eletrodo de trabalho foi o de disco de platina e o de referência o de calomelano saturado (ECS). As análises foram realizadas em tampão fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0,1 mol/L com pH corrigido para 7,8. O volume final da solução de análise foi de 15 mL, sendo que a solução mantida em agitação durante as análises. Os compostos fenólicos foram analisados em triplicata na concentração de 1 mmol/L. Os dados apresentados referem-se à média aritmética obtida nas três leituras.

O potencial foi expresso como a diferença de potencial (ΔE / mV). Esta diferença foi calculada subtraindo-se o potencial inicial (E_i) que representa o valor do branco (eletrólito de suporte) do potencial (E_t), em qualquer tempo t , após a adição da substância antioxidante, através da equação: $\Delta E = E_i - E_t$. Para a realização das correlações adotou-se a medida realizada em 180s.

4.3.3 Determinação do consumo de oxigênio

Para a determinação do consumo de oxigênio foi utilizado um aparelho da AVL 993 (*Automatic Blood Gasometric*) que apresenta um sistema em fluxo (FIA, do inglês *Flow Injection Analysis*), com atmosfera isenta de oxigênio (purga com nitrogênio). As medidas foram realizadas através da passagem da solução em

análise por um eletrodo de oxigênio sob pressão de 765,6 mmHg e temperatura de 37 °C.

Todas as análises foram realizadas na concentração de 1 mmol/L do composto preparado em tampão fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ - 0,1 mol/L com pH corrigido para 7,8) em triplicata. As leituras foram realizadas após 10 minutos do preparo da solução. Os valores são expressos em pressão de oxigênio (PO_2) em mmHg, sendo obtida através da razão da concentração de oxigênio (volume de oxigênio por volume de solução) pelo coeficiente de solubilidade do oxigênio em água ($3 \cdot 10^{-5}$ mL/ mmHg a 37 °C).

O resultado de pressão de oxigênio (PO_2) é calculado diminuindo-se a pressão de oxigênio do eletrólito de suporte (PO_{2i}) da pressão de oxigênio obtida após dez minutos da adição da substância teste ao meio (PO_{2t}), segundo a equação a seguir: $\text{PO}_2 = \text{PO}_{2i} - \text{PO}_{2t}$.

4.3.4 Cálculos teóricos de parâmetros físico-químicos

4.3.4.1 Parâmetros adotados

Os parâmetros físico-químicos foram calculados através do programa HYPERCHEM™ 5.0 (Hipercoibe, Inc.) (*HYPERCHEM 5.0, 1992*) após a otimização da geometria e minimização da energia utilizando o método semi-empírico PM3 (NAKAO et al, 1998). O gradiente conjugado Polak-Ribeire com o método Hartree Fock não restrito (UHF- unrestricted Hartree Fock), 0,01 de limite de convergência no vácuo e Gradiente de RMS no valor de 0,1 kcal/(A° mol), foram utilizados durante o processo de modelagem.

4.3.4.2 Cálculo do coeficiente e solubilidade (Log P)

O cálculo de log P foi realizado apenas para a molécula protonada. Inicialmente a molécula foi desenhada e salva no programa utilizando a extensão hin. Em seguida adotaram-se os parâmetros para os cálculos semi-empíricos e a otimização das moléculas foi realizada por convergência. Uma vez otimizada solicitou-se o cálculo deste coeficiente.

4.3.4.3 Cálculo da Energia de Dissociação da ligação O-H (ΔED_{OH})

O cálculo da ΔED_{OH} foi realizado através da abstração do átomo de hidrogênio do grupo hidroxila dos compostos avaliados. Adotando-se as equações apresentadas a seguir para o composto protonado (equação 11) e deprotonado (equação 12).



Este cálculo foi realizado partindo-se sempre da molécula salva no programa, sendo portanto, realizado apenas uma vez o desenho da estrutura. Desta forma, apenas foram realizadas as alterações necessárias como perda do próton ou do átomo de hidrogênio.

É importante salientar que a energia de dissociação foi calculada adotando-se a fórmula a seguir:

$$\Delta ED_{OH} = (CF_r + CF_{H\cdot} - CF_m) \quad (13)$$

Onde, $\Delta E_{\text{D}_{\text{OH}}}$ é a energia de dissociação, CF_r o calor de formação obtido para a espécie radicalar, $CF_{\text{H}\cdot}$ o calor de formação obtido para o átomo de hidrogênio (52,1 Kcal/mol) e CF_m o calor de formação obtido para a molécula de partida, que no caso poderia ser o composto protonado ou desprotonado. Para as moléculas que não possuem grupo fenólico não foi calculado o $\Delta E_{\text{D}_{\text{OH}}}$.

É importante salientar que para as moléculas que apresentam mais de uma hidroxila fenólica foi realizado o cálculo para todos estes substituintes sendo apresentado apenas aquele de menor energia.

4.3.4.4 Cálculo do Potencial de Ionização (PI)

O PI foi calculado através do cálculo da Energia do Orbital Molecular Ocupado de Maior Energia (HOMO), sendo portanto apresentada por $PI = (-\text{HOMO})$. Este parâmetro foi calculado apenas para as moléculas protonadas e desprotonadas, sendo adotadas as estruturas salvas no programa. O resultado deste parâmetro é dado em eV e para que houvesse homogeneização dos resultado em kcal/mol adotou-se o fator de conversão onde 1 eV equivale a 23,1064 kcal/mol.

4.3.4.5 Cálculo da Energia de Ativação (Ea)

A Ea foi calculada adotando-se as equações apresentadas a seguir, sendo também apresentados os resultados levando-se em consideração a molécula neutra e a molécula desprotonada.



Neste caso a E_a é dada pela diferença entre o calor de formação do radical formado pelo calor de formação da molécula inicial, resultado apresentado em kcal/mol. Não foi possível calcular a E_a para o ácido clorogênico ionizado por problemas encontrados na otimização da molécula causados pela complexidade da estrutura espacial do grupamento éster.

4.3.5 Tratamento estatístico

Todos os ensaios para a quantificação dos valores experimentais foram realizados em triplicata. Os resultados experimentais foram expressos pela média acompanhada do desvio padrão (SD). A diferença (significância estatística) entre os compostos foi calculada utilizando-se ANOVA (de uma via), através do teste de Tukey. Nas análises experimentais o nível de significância utilizado foi $p < 0,01$.

Nas análises de correlação dos resultados experimentais, por tratar-se de dados não paramétricos, foi determinado o coeficiente de Spearman¹ (R^2), considerando-se significativo aquele com coeficiente superior a $|0,5000|^2$ e com $p < 0,10$. As correlações foram realizadas entre os resultados experimentais, físico-químicos e estruturais de todos os compostos, e também separadamente dos grupos contendo derivados do ácido cinâmico e derivados do ácido benzóico.

As equações de QSAR foram obtidas por regressão múltipla, sendo consideradas estatisticamente significativas as equações com coeficiente de correlação (R^2) superior a $|0,5000|$ e com $p < 0,05$.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Statistica 6.0 (StatSoft, 1995).

¹ O coeficiente de correlação de Spearman deve ser utilizado quando as variáveis permitem organizar os compostos em uma ordem, ou seja, em uma escala.

² Neste caso este coeficiente explica o resultado de atividade de 50% dos compostos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas últimas duas décadas, o estudo dos radicais livres e dos compostos com atividade antioxidante tem atraído a atenção da comunidade científica. Muitas técnicas têm sido desenvolvidas no sentido de mensurar e compreender a atividade antioxidante. Neste trabalho foram utilizadas técnicas que envolvem a formação de espécies radicalares, processos eletroquímicos e cálculos teóricos. A compreensão destes resultados e a sua correlação poderão contribuir para o desenvolvimento de novos compostos com potencial antioxidante.

A seguir serão apresentados os resultados experimentais; as relações entre a estrutura química e a atividade antioxidante e os cálculos teóricos semi-empíricos e regressões obtidas neste trabalho para os ácidos derivados do ácido cinâmico (fenilpropenóicos): cafeico (CAF), ferúlico (FER), cumárico (CUM), cinâmico (CIN), clorogênico (CLO) e resveratrol (RES); e para os compostos derivados do ácido benzóico: ácido gálico (GAL), galato de metila (GALme), ácido gentísico (GEN), ácido vanílico (VAN), ácido protocatéquico (PRO) e ácido benzóico (BEN).

5.1 Resultados experimentais

5.1.1 Análise fotométrica

A Figura 11 apresenta o percentual de inibição da redução do NBT. O sistema metassulfato de fenazina – NADPH é capaz de gerar o ânion radical superóxido que reage prontamente com o NBT, reduzindo-o. Na presença de compostos com poder antioxidante, os radicais formados são capturados, retardando a redução do NBT.

Desta forma, quanto maior a capacidade de seqüestrar o radical ânion superóxido, maior a atividade antioxidante do composto avaliado (KOROKOVA *et al.*, 2002).

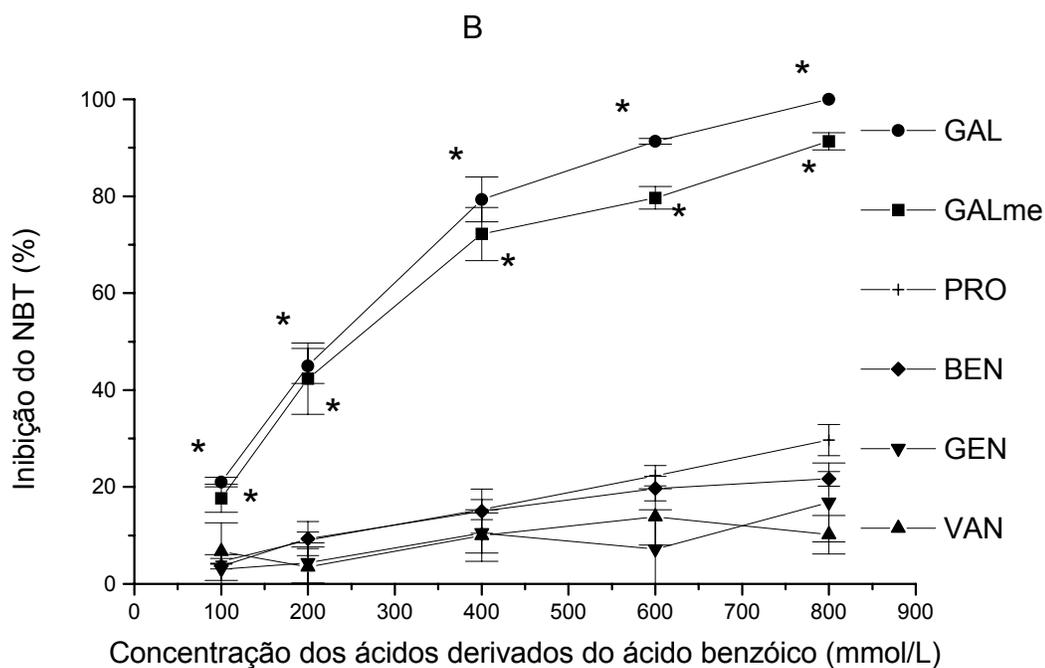
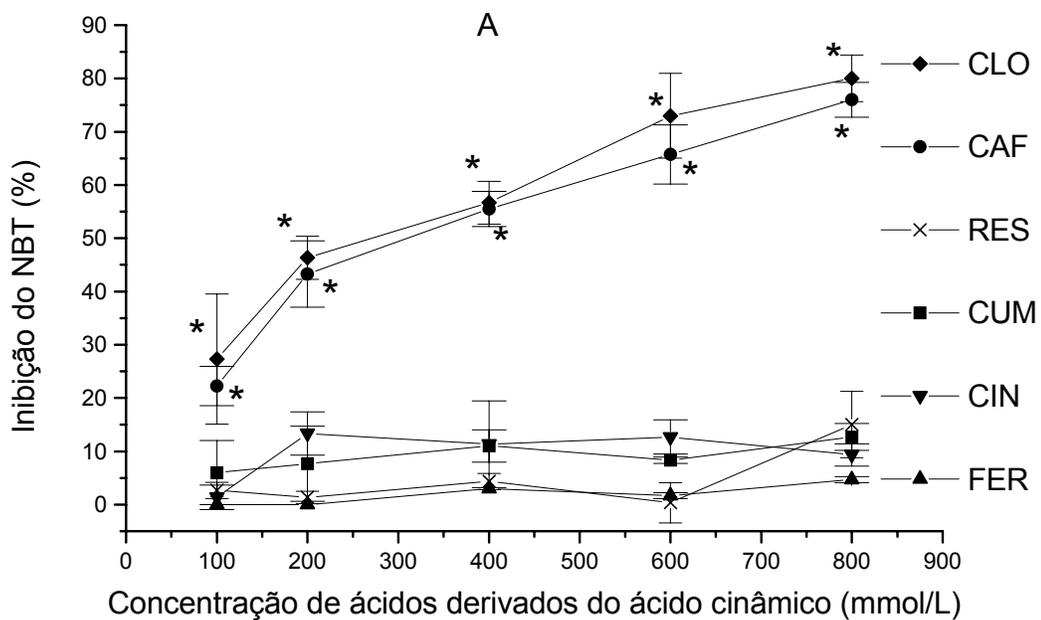


Figura 11. Efeito dos derivados do ácido cinâmico (A) e benzóico (B) na redução do NBT * $p < 0,01$ (ANOVA/Tukey).

Observando os resultados apresentados na Figura 11, constata-se que os compostos que proporcionam maior inibição deste processo são: CAF, CLO (derivados do ácido cinâmico) e GAL e GALme (derivados do ácido benzóico). Desta forma, entre os compostos estudados, esses são os que possuem maior capacidade de inibição da redução do NBT, por apresentarem maior capacidade de estabilizar o ânion radical superóxido. Isto provavelmente devido às características estruturais apresentadas pelo CAF, CLO, GAL e GALme, tais como, a presença de hidroxilas fenólicas.

Horan e colaboradores (2003) e Parejo e colaboradores (2003) demonstraram que o resultado do ensaio de inibição da redução do NBT pode ser utilizado para avaliar a atividade antioxidante de uma série de compostos. Segundo estes autores, a INI_{NBT} está relacionada à prevenção de danos oxidativos causados pelo ânion radical superóxido, que, no organismo humano, podem estar relacionados principalmente a processos inflamatórios, em danos causados por reperfusão, entre outros processos patológicos. Esfandiari e colaboradores (2003) demonstraram que o ensaio com NBT, além de apresentar aplicações na avaliação da atividade antioxidante, pode ser empregado para avaliar a formação de espécies radicalares por leucócitos em fluidos orgânicos.

5.1.2 Análises voltamétricas

Na Figura 12 estão apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos para os ácidos derivados do ácido cinâmico (A) e compostos derivados do ácido benzóico (B). O E_{pa} foi determinado através do software que gerencia o potenciostato utilizado.

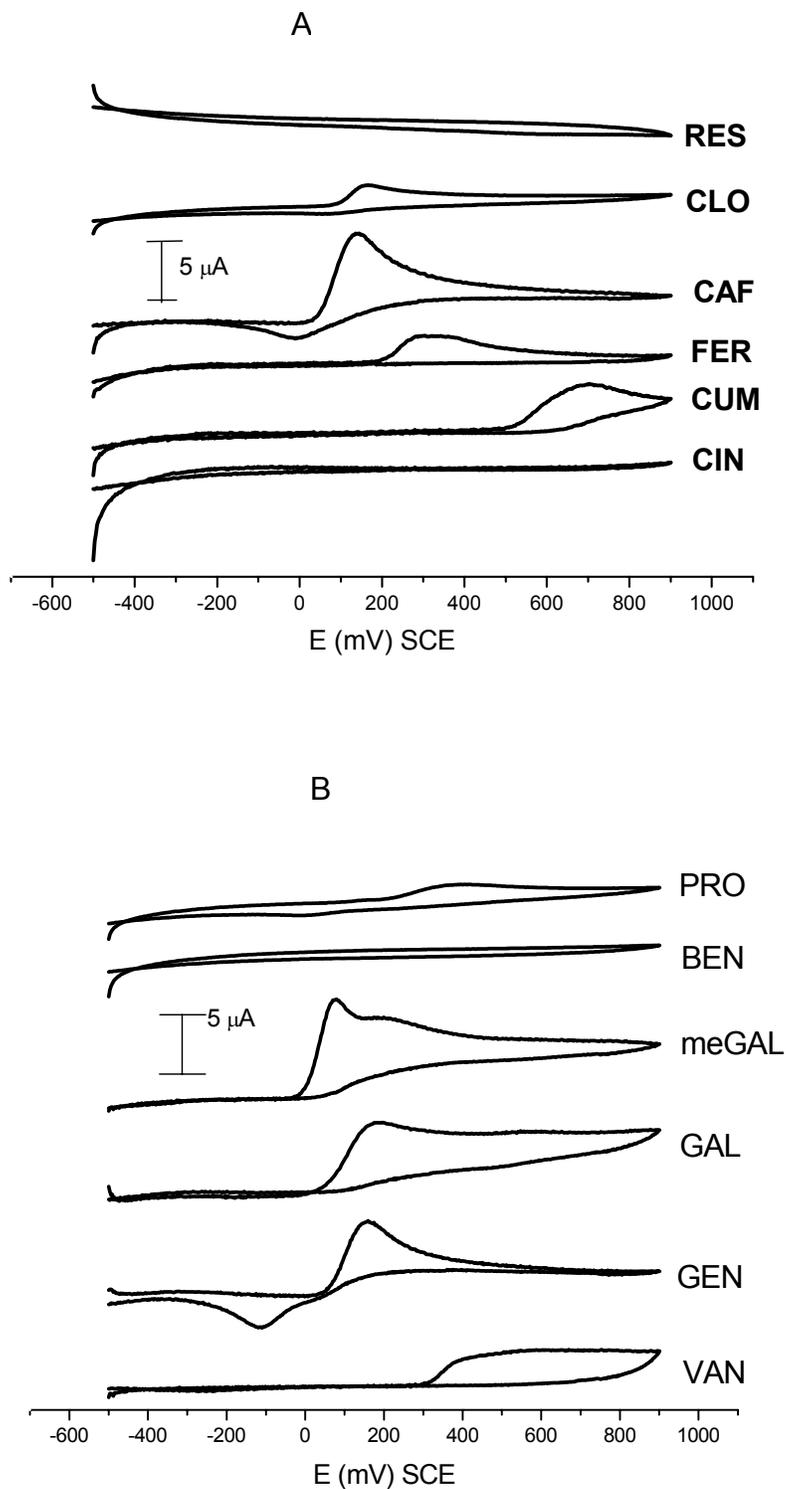


Figura 12 . Voltamogramas cíclicos dos derivados dos ácidos cinâmico (A) e benzóico (B) em tampão fosfato (pH 7,8) utilizando-se eletrodo de carbono vítreo

Como é possível observar, todos os voltamogramas são característicos de processos irreversíveis (nas condições em que os mesmos foram obtidos),

apresentando apenas correntes de oxidação, com exceção dos voltamogramas do BEN e do CIN, que se apresentam inertes nas condições estudadas. Levando em consideração estes resultados, e embasados pela literatura vigente (GIACOMELLI *et al.*, 2002) pode-se atribuir às correntes anódicas a oxidação das hidroxilas fenólicas para correspondentes às quinonas.

Um outro parâmetro muito importante que deve ser avaliado através dos voltamogramas, é o valor de E_{pa} . Segundo Rice-Evans e colaboradores (1997), quanto menor o potencial de meia onda ($E_{1/2}$), maior a capacidade de uma molécula se oxidar. Sendo assim, o melhor antioxidante é aquela substância que se oxida prevenindo a oxidação de moléculas biológicas. Da mesma forma, podemos interpretar os valores de E_{pa} .

Para os compostos avaliados, os menores valores de E_{pa} (vide Tabela 2) foram os do CAF e do CLO e do GAL e GALme. Estes são concordantes com aqueles obtidos para o ensaio do NBT. De forma semelhante, porém com compostos fenólicos derivados de taninos, Hagerman e colaboradores (1998) compararam o potencial de oxidação eletroquímica (E_{pa}) com o resultado do teste da desoxirribose. O trabalho demonstrou que, igualmente, quanto menor o potencial (E_{pa}) maior a proteção conferida a este açúcar.

Outro grupo de pesquisadores (YAMASAKI *et al.*, 1994) correlacionaram os resultados de voltametria cíclica de extratos metanólicos brutos obtidos de plantas com a proteção antioxidante durante a peroxidação lipídica. Por voltametria foi identificada a presença de correntes ou picos de oxidação (E_{pa} e i_{pa}), sendo que para a maioria dos casos, quanto maior a intensidade (i_{pa}) e menor o potencial (E_{pa}) observados, maior era a proteção antioxidante. Confirmando os resultados deste último trabalho, Kilmartin (2001), apresentou em sua revisão sobre detecção

eletroquímica de antioxidantes naturais, a aplicação da técnica de voltametria cíclica como uma ferramenta muito importante para a detecção da atividade antioxidante de misturas complexas como vinhos ou mesmo sangue.

Alguns pesquisadores ainda compararam os valores de E_{pa} obtidos por voltametria cíclica com parâmetros obtidos por outros métodos, inclusive cálculos teóricos para a avaliação da atividade antioxidante das substâncias. Um destes trabalhos foi desenvolvido por Acker e colaboradores (1996), que avaliaram a atividade antioxidante de flavonóides. Estes autores compararam o E_{pa} com a estabilidade dos radicais formados medida experimentalmente por EPR e com a energia de dissociação da ligação O-H (cálculos teóricos), apresentando uma boa correlação entre os valores obtidos. Outro trabalho foi apresentado por Vedernikova e colaboradores (1999), que relacionaram o E_{pa} de compostos fenólicos com os parâmetros obtidos através de cálculos teóricos (potencial de ionização e eletronegatividade absoluta para o fenol; energia de ativação, potencial de ionização e deslocamento de spin para a espécie intermediária radicalar – radical cátion fenoxil e, finalmente, calor de formação para a radical fenoxil). Neste último trabalho foi considerado que os cálculos teóricos representam importantes parâmetros para prever o comportamento eletroquímico e, portanto, a atividade antioxidante, aspectos também explorados neste trabalho (ver secção 5.3).

5.1.3 Análises potenciométricas

A potenciometria foi adotada em nosso trabalho para avaliar o comportamento eletroquímico dos compostos. A Figura 13 apresenta os potenciogramas obtidos após a adição dos compostos ao eletrólito de suporte.

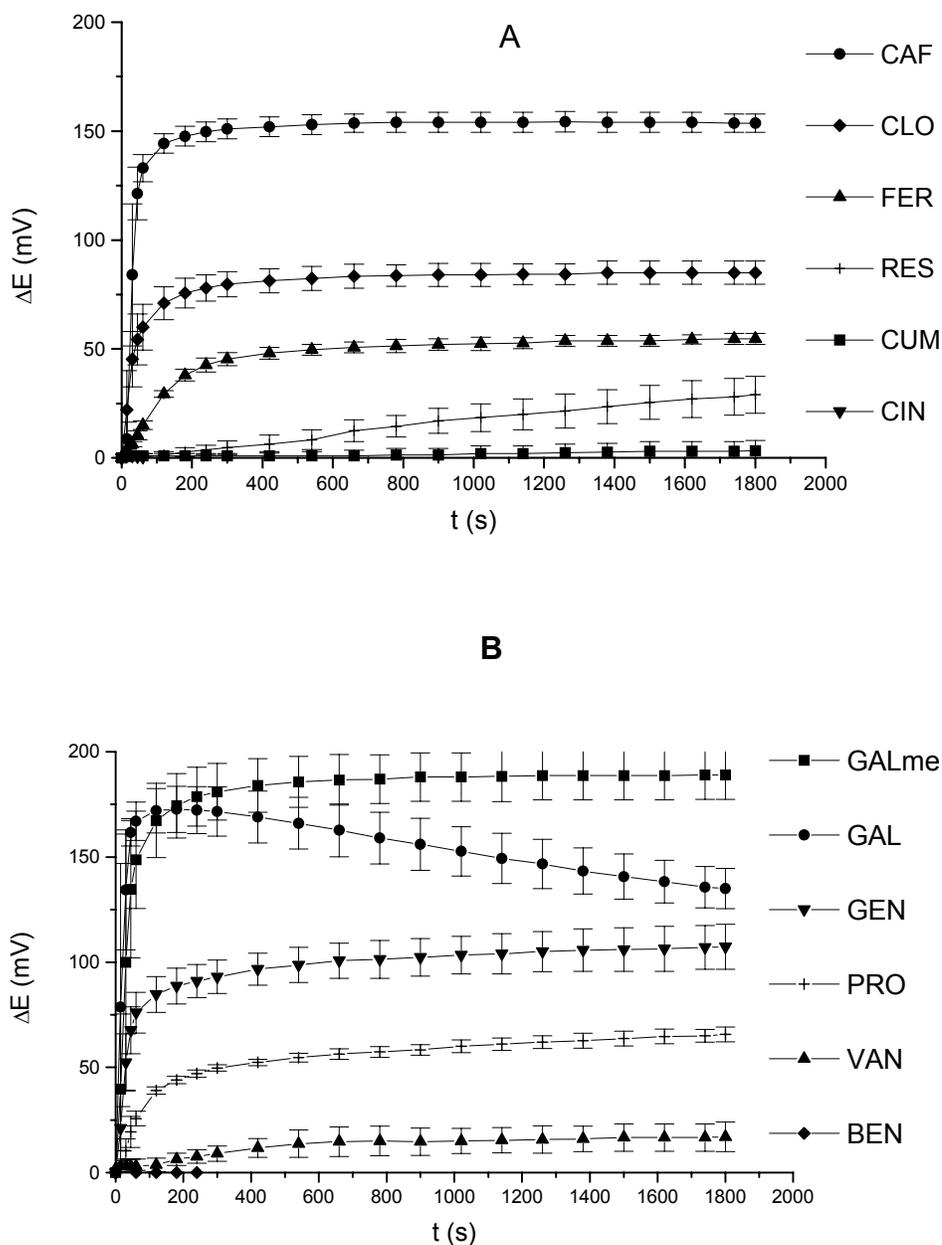


Figura 13. Variação do potencial (ΔE) em função do tempo após a adição de derivados do ácido cinâmico (A) e derivados do ácido benzóico (B) com concentração final de 1 mol/L, onde $\Delta E = E_i - E_t$, sendo: ΔE = variação de potencial; E_i = potencial inicial (branco); E_t = potencial em qualquer tempo.

Revisando os métodos eletroquímicos aplicados na avaliação da atividade antioxidante, observa-se que a voltametria tem sido freqüentemente utilizada. No entanto, localizou-se apenas um trabalho desenvolvido por Sakagami e Satoh

(1997), que relacionaram a atividade antioxidante do GAL e ácido ascórbico com o salto potenciométrico observado após a adição destes compostos em meios de cultura. Para estes autores, quanto maior o salto potenciométrico, maior a atividade antioxidante. Avaliando-se da mesma forma o salto potenciométrico dos compostos derivados do ácido cinâmico e do ácido benzóico em tampão fosfato (Figura 13), observa-se que os maiores valores foram do CAF e CLO entre os derivados do ácido cinâmico e do GALme e GAL entre os derivados do ácido benzóico.

É importante salientar que nas condições de pH avaliadas (7,8) o ácido gálico não apresenta muita estabilidade, fato este que é observado pela diminuição de ΔE com o passar do tempo (Figura 13), acompanhada pela alteração da coloração do meio (de incolor para azul). Isto provavelmente é causado pela oxidação sofrida na molécula, levando à alteração dos grupamentos cromóforos que, sabidamente, se oxidam e passam a absorver em regiões de comprimentos de onda maiores. Este mesmo comportamento foi observado por Friedman e Jurgens (2000), onde foi avaliado o efeito do pH na estabilidade de compostos fenólicos. Segundo estes autores, o ácido gálico é oxidado à quinona correspondente de forma irreversível, quando submetido a valores de pH alcalinos, sendo esta reação dependente do pH e do tempo. Uma outra hipótese que pode ser levantada é de que as hidroxilas vicinais deste composto adsorvam na superfície do eletrodo e que em um dado momento desprende-se causando a alteração no potencial.

A potenciometria tem sido bastante empregada em determinações analíticas como o doseamento de substâncias a partir de titulações com eletrodos metálicos ou por eletrodos seletivos. Contudo, no presente trabalho, adotou-se esta técnica na determinação do salto potenciométrico obtido após a adição dos compostos analisados em tampão fosfato. O que se pretendeu avaliar foi a alteração do

potencial do meio desencadeado por um novo equilíbrio eletroquímico. A explicação para este fenômeno tem encontrado sustentação na teoria do potencial misto, muito empregada em processos de corrosão, e que atualmente também tem sido adotada por alguns autores para caracterizar outras reações eletroquímicas irreversíveis (SHANHROKHIAN; YAZDANI, 2003).

Segundo a teoria do potencial misto, o potencial detectado no eletrodo de trabalho é formado a partir do equilíbrio de duas reações: uma de oxidação e outra de redução de substâncias diferentes. No presente trabalho, a proposta consiste em que o composto fenólico (HOArCOOH) sofra oxidação e que o oxigênio dissolvido no eletrólito de suporte sofra redução. Esta hipótese está baseada nos resultados voltamétricos que apontam a oxidação dos compostos fenólicos como um processo irreversível, bem como nos estudos realizados por Madsen e colaboradores (1996) e por Korokova e colaboradores (2002), que verificaram que, quanto maior a quantidade de compostos fenólicos em solução, maior o consumo de oxigênio. Na Figura 14 construiu-se uma representação do salto potenciométrico observado durante a análise potenciométrica dos compostos avaliados.

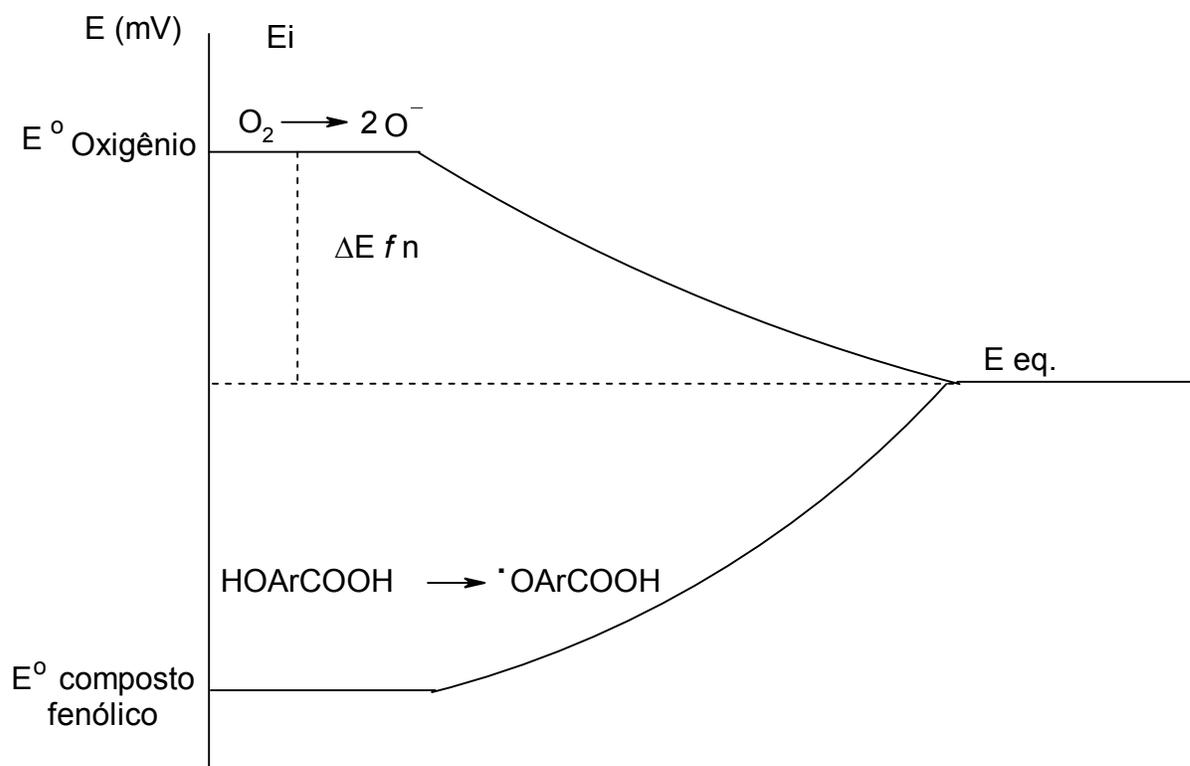


Figura 14. **Representação do salto potenciométrico.** Legenda: E_i – potencial antes da adição do composto fenólico. E_{eq} – Potencial de equilíbrio obtido após a adição dos compostos fenólicos.

Conhecendo-se o comportamento da solução após a adição do composto antioxidante no meio, propõe-se que o salto potenciométrico seja proporcional ao deslocamento do potencial do equilíbrio anterior à adição do composto antioxidante em relação ao novo potencial de equilíbrio (após 180 s). Este deslocamento é proporcional ao número de elétrons envolvidos.

5.1.4 Análise de consumo de oxigênio

Para reforçar a hipótese do salto potenciométrico, foi determinado o consumo de oxigênio da solução em análise, após a adição dos compostos. Este dado está apresentado na Tabela 2, juntamente com os outros resultados experimentais.

Tabela 2. Resultados de E_{pa} , ΔE a 180 s, consumo de O_2 e do percentual de inibição da redução do NBT

	Número de hidroxilas fenólicas	E_{pa} (mV) 1 mmol/L	ΔE em 180 s (mV) 1 mmol/L	Consumo O_2 (PO_2) (mmHg) 1 mmol/L	Inibição da redução do NBT (%) 800 μ mol/L
Ácido cafeico (CAF)	2	142 ± 11,0	148 ± 4,5	15,8 ± 0,52	76 ± 4,0
Ácido clorogênico (CLO)	2	173 ± 6,7	111 ± 0,0	2,6 ± 1,13	80 ± 4,4
Ácido ferúlico (FER)	1	410 ± 18,9	34 ± 2,1	4,6 ± 0,43	5 ± 0,6
Resveratrol (RES)	2	630 ± 6,7	3 ± 2,0	-0,9 ± 0,95	15 ± 6,4
Ácido cumárico (CUM)	1	736 ± 241	1 ± 0,9	-2,7 ± 0,16	13 ± 2,5
Ácido cinâmico (CIN)	0	NA	-1 ± 1,5	6,8 ± 0,66	9 ± 1,6
Galato de metila (GALme)	3	62 ± 9,3	171 ± 16,1	12,5 ± 0,37	92 ± 1,5
Ácido gálico (GAL)	3	113 ± 14,5	177 ± 11,0	11,5 ± 1,73	100 ± 0,5
Ácido gentísico (GEN)	2	154 ± 2,7	93 ± 7,9	6,0 ± 0,40	19 ± 8,1
Ácido protocatequico (PRO)	2	410 ± 7,6	44 ± 1,7	6,6 ± 1,40	30 ± 3,2
Ácido vanílico (VAN)	1	494 ± 23,0	5 ± 2,9	-2,9 ± 0,68	12 ± 2,1
Ácido Benzoico (BEN)	0	NA	0 ± 0,0	-2,0 ± 0,22	21,6 ± 1,5

NA – não apresenta; E_{pa} – Potencial de pico anódico; ΔE – Salto potenciométrico; n. OH – Número de hidroxilas; INI_{NBT} -

Percentual de inibição do NBT; PO_2 – Pressão de oxigênio.

A Tabela 3 apresenta as correlações de Spearman obtidas entre os resultados experimentais e entre esses e o número de hidroxilas fenólicas presentes nos compostos avaliados.

Tabela 3. Correlações de Spearman realizadas com os dados estruturais e experimentais obtidos para os compostos analisados

Intercorrelações	n	R ²	p
E_{pa} vs ΔE	10	0,8993	0,0000
E _{pa} vs n. OH	10	0,3450	0,0742
E_{pa} vs INI_{NBT}	10	0,6636	0,0041
E _{pa} vs PO ₂	10	0,4887	0,0245
ΔE vs n. OH	12	0,5980	0,0032
ΔE vs INI_{NBT}	12	0,7916	0,0001
ΔE vs PO ₂	12	0,4020	0,0268
n. OH Vs INI_{NBT}	12	0,7175	0,0005
n. OH vs PO ₂	12	0,1689	0,1848
INI _{NBT} vs PO ₂	12	0,3874	0,0307

n – Número de amostras válidas; R² – Coeficiente de correlação de Spearman; p – Nível de significância estatística; E_{pa} – Potencial de pico anódico; ΔE – Salto potenciométrico; n. OH – Número de hidroxilas; INI_{NBT} - Percentual de inibição do NBT; PO₂ – Pressão de oxigênio.

Os resultados de consumo de oxigênio dados em pressão de oxigênio (PO₂) no meio são diferentes dependendo do composto que é adicionado. Como pode-se observar, os compostos com maiores saltos potenciométricos apresentam também

os maiores consumos de oxigênio. A exceção a estes resultados foi obtida para o ácido clorogênico, isto provavelmente é devido à contribuição estérica do grupamento ester. Realizando-se a correlação entre o salto potenciométrico e o consumo de oxigênio de todos os compostos obteve-se um coeficiente de 0,4020 (Tabela 3), sendo este elevado para 0,7845 quando se correlaciona os resultados obtidos para os derivados do ácido benzóico separadamente (Anexo 1). Estes dados reforçam a hipótese de que a reação de oxidação ocorra com o composto orgânico e a de redução com o oxigênio dissolvido no meio.

O consumo de oxigênio, portanto, pode ser utilizado como indicador da atividade antioxidante, pois, além de correlacionar-se com os resultados de potenciometria, também apresenta correlações significativas com os resultados de E_{pa} (-0,4887 para todos os compostos avaliados e 0,6400 para os derivados do ácido benzóico – Anexo 1), e com os resultados do percentual de inibição do NBT (0,0,3874 para todos os compostos avaliados e 0,8891 para os derivados do ácido benzóico (Anexo 2)).

Observou-se uma maior correlação entre as técnicas que envolvem processos de oxido-redução, pois como pode-se observar, o valor do coeficiente de correlação obtido entre as técnicas eletroquímicas de potenciometria e voltametria foi de -0,8993, enquanto que para o ensaio de seqüestro do radical superóxido a correlação foi de 0,7916 e -0,6636, com os resultados potenciométricos e voltamétricos, respectivamente.

É importante salientar que as correlações devem ser realizadas com uma série de compostos homólogos, que diferem entre si apenas pela presença de um ou mais grupos substituintes. Este fato explica porque são obtidas melhores correlações quando apenas os resultados dos compostos derivados do ácido

benzóico ou do ácido cinâmico são considerados separadamente (estes resultados de correlação estão apresentados no anexo 1 e 2, respectivamente).

5.2 Relação entre a estrutura química e a atividade antioxidante

Nos resultados experimentais com os compostos derivados do ácido cinâmico foi observado que os compostos com maior capacidade antioxidante foram o CAF e o CLO e com os derivados do ácido benzóico o GAL e GALme. Em ambos os grupos foi observado que a atividade vai diminuindo conforme a estrutura vai sendo alterada, no sentido de reduzir o número de hidroxilas fenólicas. Estes resultados são concordantes com aqueles apresentados por Kikuzaki e colaboradores (2002).

Segundo Kerry e Rice-Evans (1999) a atividade antioxidante de ácidos como o cafeico, o cumárico e o ferúlico está relacionada à capacidade de doarem elétrons, resultando na sua oxidação às quinonas correspondentes. Portanto, o número de hidroxilas fenólicas pode ser relacionado à atividade antioxidante (GIACOMELLI *et al.*, 2002; LIEN *et al.*, 1999; WILHEH FILHO *et al.*, 2001). Resultados semelhantes foram obtidos por Natella e colaboradores (1999) que compararam a atividade antioxidante sobre a peroxidação lipídica com a estrutura de compostos derivados dos ácidos cinâmico e benzóico. Neste trabalho foi obtida uma ordem crescente de atividade dependendo dos substituintes do anel (*p*-hidroxi < *p*- hidroxi-metoxi < *p*- dihidroxi < *p*- hidroxi-dimetoxi). Outra orientação a respeito da atividade antioxidante, segundo Castelluccio *et al.* (1995), é que a atividade antioxidante dos compostos fenilpropenóicos derivados do metabolismo das plantas é definida principalmente pela presença de substituintes *o*-dihidroxi, proporcionando máxima estabilização do radical ou formação de quelatos com metais de transição.

Com relação ao número de hidroxilas, foi observado que, para os compostos derivados do ácido benzóico, a presença de duas hidroxilas (GEN e PRO) não é o suficiente para que o composto apresente atividade antioxidante significativa. Já nos derivados do ácido cinâmico, compostos com este número de hidroxilas apresentam atividades bem expressivas. Isto se deve ao grupamento propenóico presente nestes últimos, o qual aumenta a possibilidade de estabilização de elétrons desemparelhados por ressonância (CASTELLUCCIO *et al.*, 1995). Ou seja, uma dupla entre as posições 2,3 do substituinte em combinação com a função 4-oxo proporciona uma maior estabilização do radical formado (Figura 15). Os compostos hidroxilados derivados do ácido benzóico são menos ativos (Figura 16), pelo fato de apresentarem menor possibilidade de estabilização por ressonância, bem como, o tamanho molecular o que torna a distribuição espacial do elétron desemparelhado menor.

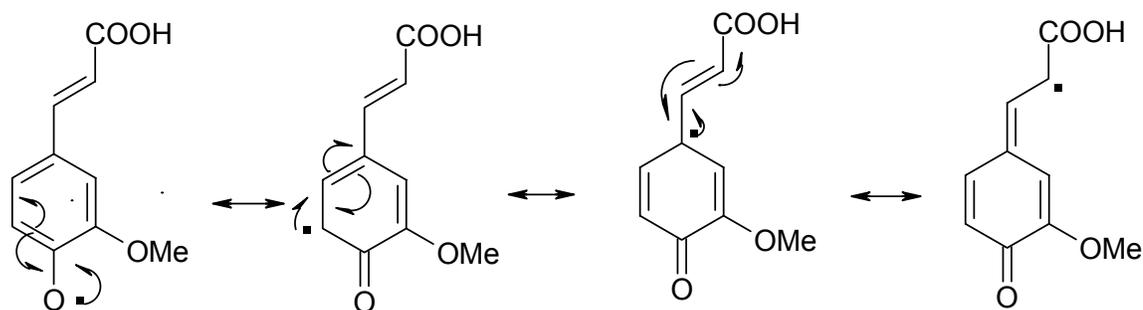
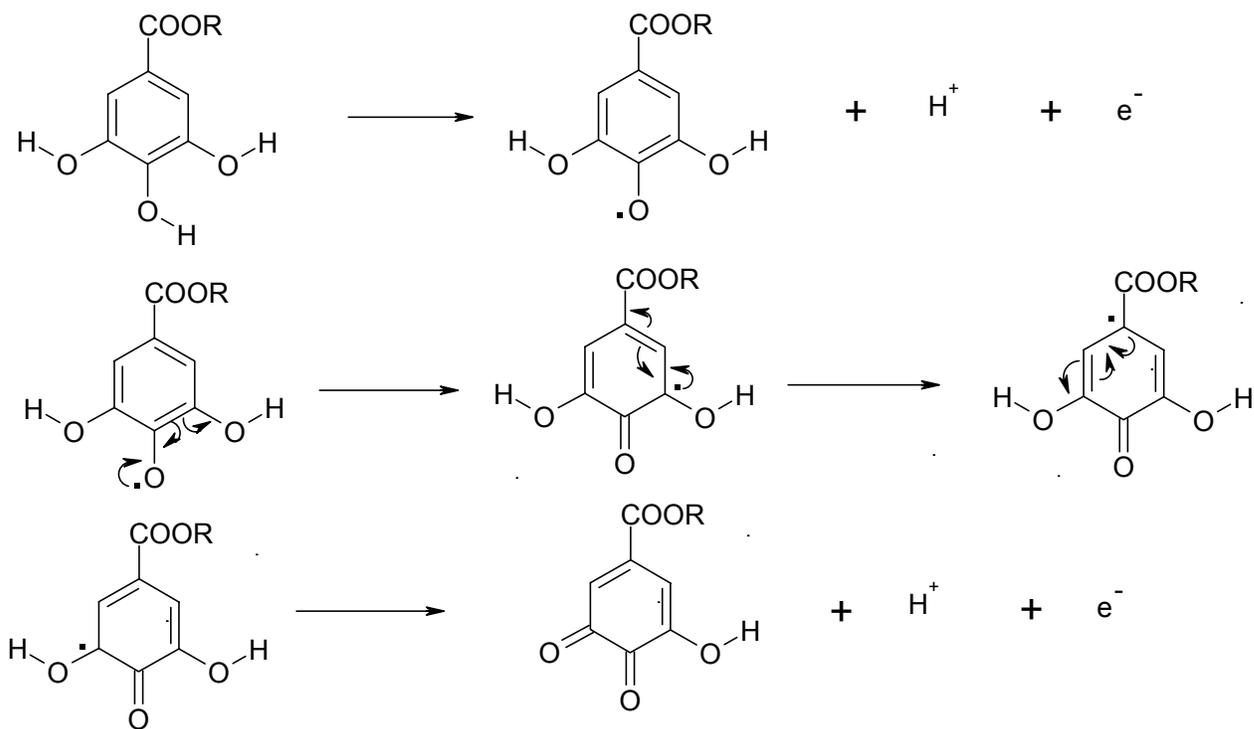


Figura 15. **Esquema de oxidação e estabilização de elétrons do ácido ferúlico (fenilpropenóico)** (adaptado de GRAFF, 1992).

Figura 16. Esquema de oxidação e estabilização de elétrons de compostos



derivados do ácido benzóico (Gunckel *et al.*, 1998).

Avaliando-se a estrutura química, observou-se que o número de hidroxilas apresenta-se correlação significativa (Tabela 2) com os resultados da potenciometria (0,5980) e com a análise de INI_{NBT} (0,7175). Com os demais resultados experimentais não foi obtida correlação significativa ($R^2 > 0,5000$).

5.3 Cálculos teóricos semi-empíricos e regressões

Os parâmetros teóricos foram calculados adotando-se a perda de um hidrogênio para a molécula neutra (equação 11) e ionizada (equação 12), recebendo desta forma, o algarismo 1 ou 2 quando se trata de parâmetros calculados para as equações 1 ou 2, respectivamente.



Nas equações adotadas para o cálculo da energia de dissociação da ligação O-H ($\Delta\text{ED}_{\text{OH}}$), estão representadas a transferência de um átomo de hidrogênio. Segundo Nakao e colaboradores (1998), as características desta ligação estão relacionadas à capacidade de doar elétrons e de estabilizar os radicais formados.

O potencial de ionização (PI) também foi calculado para o reagente fenólico neutro (equação 11) e ionizado (equação 12).

Além da $\Delta\text{ED}_{\text{OH}}$ e do potencial de ionização (PI=-HOMO), foi calculada também a energia de ativação (E_a). A E_a está relacionada com a formação do intermediário cátion radical, formado pela perda do elétron (equação 14) da molécula neutra ou seu radical neutro formado a partir da molécula ionizada (equação 15)



Este parâmetro foi calculado através de métodos semi-empíricos por Ruiz e colaboradores (1996) para determinar a estabilidade do radical fenoxil e correlacionar com a atividade antioxidante de compostos fenólicos.

O parâmetro de lipossolubilidade, Log P, foi calculado para a molécula neutra HOArCOOH e está apresentado juntamente com os outros resultados dos cálculos

semi-empíricos de PI, $\Delta E_{D_{OH}}$ e E_a para os compostos neutros (HOArCOOH) e ionizados (HOArCOO⁻) na Tabela 4.

Comparando os resultados de $\Delta E_{D_{OH}}$ e PI calculados para a molécula neutra e ionizada, observa-se que esta segunda apresenta maior possibilidade de atuar como antioxidante por possuir uma menor energia de ligação e um menor PI. Em outras palavras, apresenta maior possibilidade, segundo os cálculos, de perder o hidrogênio e o elétron, respectivamente.

Tabela 4. Parâmetros teóricos obtidos por cálculos semi-empíricos para os compostos avaliados

Compostos	Cálculos obtidos para a molécula neutra (HOArCOOH)							Cálculos obtidos para a molécula ionizada (HOArCOO ⁻)					
	Log P	CF _{m1} *	CF _{r1} *	CF _{cr1} *	Δ ED _{OH1} *	Ea ₁ *	PI ₁ *	CF _{m2} *	CF _{r2} *	CF _{cr2} *	Δ ED _{OH2} *	Ea ₂ *	PI ₂ *
CAF	-0,660	-142,7	-121,3	48,6	73,5	191,3	211,6	-165,8	-149,3	-90,6	68,6	75,2	104,9
CLO	-1,631	-400,4	-380,1	-211,0	72,4	189,4	209,4	-443,7	-423,9	ND	71,8	ND	122,3
FER	-0,628	-134,6	-113,4	55,1	73,3	189,7	214,1	-158,9	-142,3	-82,5	68,7	76,4	105,0
RES	-0,338	-75,1	-58,2	103,8	69,0	178,9	200,3	NE	NE	NE	NE	NE	NE
CUM	0,365	-99,2	-75,9	95,2	75,4	174,6	210,6	-121,4	-104,3	-47,1	69,1	74,3	102,0
CIN	1,390	-53,6	NE	150,5	NE	204,1	220,2	-75,8	NE	-1,5	NE	74,3	103,2
GALme	-2,061	-190,1	-170,7	5,9	71,5	196,0	216,6	NE	NE	NE	NE	NE	NE
GAL	-2,903	-198,0	-178,8	-0,3	71,3	197,7	215,3	-223,9	-209,8	-146,3	66,2	77,6	106,4
GEN	-1,068	-153,6	-130,1	41,1	75,6	194,7	211,4	-176,7	-157,7	-102,2	71,1	74,5	103,6
PRO	-1,068	-155,1	-131,2	43,5	76,0	198,6	215,3	-180,6	-163,2	-103,1	69,5	77,5	106,3
VAN	-1,037	-146,3	-123,4	49,3	75,0	195,6	220,6	-171,2	-153,8	-94,4	69,5	76,8	105,3
BEN	0,982	-66,4	NE	153,8	NE	220,2	234,1	-89,9	NE	-14,4	NE	75,5	102,8

Log P – Coeficiente de partição; CF_m – Calor de formação da molécula; CF_r – Calor de formação do radical; CF_{cr} – Calor de formação do cátion radical; Δ ED_{OH} – Energia de Dissociação da ligação O-H; Ea – Energia de Ativação; PI – Potencial de Ionização * - todas as unidades em kcal/mol; NE – Não existe; ND- Não determinado por não apresentar convergência na minimização; Δ ED_{OH} = (CF_r + CF_H – CF_m) ; CF_H = 52,1 Kcal/mol

De acordo com o teorema de Koopman, a energia do orbital HOMO está relacionada ao potencial de ionização, que por sua vez tem sido associado com a habilidade dos compostos fenólicos de doarem elétrons (LIU *et al.* 1998; MIGLIAVACCA *et al.* 1997). Desta forma, quanto menor o potencial de ionização, maior a facilidade de doar elétrons. Por outro lado, alguns pesquisadores como Cheng e colaboradores (2003), sugerem que este parâmetro não seja adequado para prever a atividade antioxidante, pois é duvidoso, e talvez represente somente um fenômeno superficial.

Segundo Haandel e colaboradores (1996), o cálculo da energia de ativação, através da diferença do calor de formação do reagente e o calor de formação do radical formado a partir da abstração de um elétron, é um modelo mais realístico para calcular o potencial de ionização, pelo fato da geometria e os orbitais serem modificados em resposta à remoção do elétron. No entanto, é imprescindível que estes parâmetros estejam correlacionados entre si (PI e Ea), como pôde ser demonstrado pela correlação de Spearman (Tabela 5) de 0,6438 para molécula neutra (HOArCOOH), e de 0,6777 para molécula ionizada (HOArCOO⁻). De forma semelhante ao PI é possível interpretar os resultados de Ea, ou seja, quanto menor a Energia de Ativação, mais facilmente ocorre a transferência eletrônica.

A medida da Energia de Dissociação da ligação O-H ($\Delta E_{D_{OH}}$) determina a facilidade da transferência do hidrogênio do composto fenólico para o radical. Quanto menor o valor de $\Delta E_{D_{OH}}$, mais fraca é a ligação O-H (CHENG *et al.* 2003) e mais estável é o radical formado após a abstração do hidrogênio (CHENG *et al.*, 2002), ou seja, enquanto o valor de $\Delta E_{D_{OH}}$ aumenta, a transferência do hidrogênio torna-se menos favorável, conferindo, desta forma, menor poder antioxidante ao composto fenólico (BOSQUE; SALES, 2003; WRIGHT *et al.*, 2001).

O parâmetro de lipossolubilidade, Log P, está relacionado a polaridade da molécula. Moléculas com maior número de hidroxilas terão um menor Log P e, desta forma, quanto menor o valor de Log P, maior a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos estudados neste trabalho.

As intercorrelações entre os parâmetros teóricos obtidos para a molécula neutra (1) e ionizada (2) estão apresentadas na Tabela 5.

Os parâmetros físico-químicos obtidos pelos cálculos semi-empíricos que apresentam baixas correlações (abaixo de $|0,5000|$) entre si poderão ser utilizados nas regressões múltiplas. Aqueles que apresentam correlação significativa entre si deverão ser evitados em uma mesma equação.

Segundo Selassie e colaboradores (1998), devem ser evitadas as colinearidades entre os parâmetros para que as correlações sejam reais, representando a relação quantitativa entre a estrutura química e a atividade farmacológica investigada.

Segundo Cheng e colaboradores (2003), a correlação entre E_a e ΔED_{OH} sugere o mecanismo de transferência eletrônica e a abstração do hidrogênio, ou que estes dois processos coexistam e um influencie o outro. Entretanto, não foi observada uma correlação significativa para os compostos fenólicos estudados entre PI e ΔED_{OH} , tanto para a molécula neutra ($R^2=0,0269$), como para a molécula ionizada ($R^2=0,0142$). Estes resultados foram confirmados pela correlação entre ΔED_{OH1} e E_{a1} (0,0309) e de ΔED_{OH2} e E_{a2} (0,0001). Contrariando o que Cheng e colaboradores (2003) afirmam, essas baixas correlações não significam necessariamente a inexistência de um desses processos, pois tanto o PI quanto a ΔED_{OH} são características da molécula e podem correlacionar-se ou não entre si.

Tabela 5. Intercorrelação entre os parâmetros teóricos calculados pelo método semi-empíricos e com o número de hidroxilas

Intercorrelações	n	R ²	p
Ea₁ vs PI₁	10	0,6438	0,0052
Ea₁ vs Log P	10	0,5233	0,0180
Ea ₁ vs ΔED _{OH1}	10	0,0309	0,6272
Ea ₁ vs n.OH	10	0,3201	0,0882
PI ₁ vs Log P	12	0,0130	0,7242
PI ₁ vs ΔED _{OH1}	10	0,0269	0,6505
PI ₁ vs n.OH	12	0,0221	0,6444
Log P vs ΔED _{OH1}	10	0,0378	0,5902
Log P vs n.OH	12	0,6772	0,0010
ΔED _{OH1} vs n.OH	10	0,3201	0,0882
Ea₂ vs PI₂	10	0,6777	0,0034
Ea ₂ vs Log P	10	0,3448	0,0743
Ea ₂ vs ΔED _{OH2}	8	0,0001	0,9776
Ea ₂ vs n.OH	10	0,2886	0,1093
PI₂ vs Log P	10	0,6936	0,0028
PI ₂ vs ΔED _{OH2}	8	0,0142	0,7789
PI₂ vs n.OH	10	0,6619	0,0042
ΔED _{OH2} vs n.OH	8	0,0750	0,5116
Log P vs ΔED _{OH2}	8	0,0367	0,6494

n – Número de amostras válidas; R – coeficiente de Spearman; p- nível de significância; Ea₁- Energia de ativação calculada para molécula neutra; PI₁- Potencial de ionização calculado para molécula neutra; Log P – Coeficiente de partição octanol/água; ΔED_{OH1} – Energia de dissociação da ligação O-H calculada para molécula neutra; n.OH –Número de hidroxilas do composto analisado; Ea₂ –Energia de ativação calculada para molécula ionizada; PI₂- Potencial de ionização calculado para molécula ionizada; ΔED_{OH2} – Energia de dissociação da ligação O-H calculada para molécula ionizada.

A Tabela 6 apresenta a correlação entre os parâmetros teóricos e os resultados experimentais como também com o número de hidroxilas.

Tabela 6. Correlação entre os parâmetros teóricos e os resultados experimentais e estruturais (número de hidroxilas)

Intercorrelações	n	R ²	p
Epa vs Ea ₁	10	0.19693	0.1989
Epa vs PI ₁	10	0.06098	0.4916
Epa vs Ea ₂	8	0.25000	0.2070
Epa vs PI ₂	8	0.35858	0.1168
Epa vs Log P	10	0.71320	0.0021
Epa vs ΔED _{OH1}	10	0.09993	0.3736
Epa vs ΔED _{OH2}	8	0.00000	1,0000
ΔE vs Ea ₁	10	0.25304	0.1383
ΔE vs PI ₁	12	0.06382	0.4282
ΔE vs Ea ₂	10	0.26395	0.1288
ΔE vs PI₂	10	0.59605	0.0089
ΔE vs Log P	12	0.85157	0,0001
ΔE vs ΔED _{OH1}	10	0.09554	0.3848
ΔE vs ΔED _{OH2}	8	0.02041	0.7358
n. OH vs Ea ₁	10	0.32017	0.0882
n. OH vs PI ₁	12	0.02214	0.6444
n. OH vs Ea ₂	10	0.28859	0.1093
n. OH vs PI₂	10	0.66198	0.0042
n. OH vs Log P	12	0.67714	0.0010
n. OH vs ΔED _{OH1}	10	0.32017	0.0882
n. OH vs ΔED _{OH2}	8	0.07500	0.5116
INI _{NBT} vs Ea ₁	10	0.20661	0.1869
INI _{NBT} vs PI ₁	12	0.10384	0.3070
INI _{NBT} vs Ea ₂	10	0.07198	0.4536
INI _{NBT} vs PI ₂	10	0.42053	0.0425
INI_{NBT} vs Log P	12	0.72444	0.0004
INI _{NBT} vs ΔED _{OH1}	10	0.12786	0.3104
INI _{NBT} vs ΔED _{OH2}	8	0.02041	0.7358
P _{O2} vs Ea ₁	10	0.36000	0.0667
P _{O2} vs PI ₁	12	0.00397	0.8457
P _{O2} vs Ea ₂	10	0.00059	0.9467
P _{O2} vs PI ₂	10	0.06792	0.4671
P _{O2T} vs Log P	12	0.20416	0.1403
P _{O2} vs ΔED _{OH1}	10	0.02678	0.6515
P _{O2} vs ΔED _{OH2}	8	0.35431	0.1195

n – Número de amostras válidas; R – coeficiente de Spearman; p- nível de significância; Ea₁- Energia de Ativação calculada para molécula neutra; PI₁- Potencial de Ionização calculado para molécula neutra; Log P – Coeficiente de partição octanol/água; ΔED_{OH1} –Energia de Dissociação da ligação O-H calculada para molécula neutra; n.OH –Número de hidroxilas do composto analisado; Ea₂ –Energia de Ativação calculada para molécula ionizada; PI₂- Potencial de Ionização calculado para molécula ionizada; ΔED_{OH2} – Energia de Dissociação da ligação O-H calculada para molécula ionizada.

Lien *et al.* (1999) apresentaram um trabalho no qual foi avaliada a relação estrutura química e a atividade antioxidante de compostos fenólicos derivados do tocoferol e de flavonóides. No trabalho apresentado por estes autores, foram calculados os parâmetros de energia de formação, LUMO, HOMO e o número de hidroxilas. Com base nestes resultados, foram construídos modelos que podem ser utilizados para estimar o potencial de oxidação ou mesmo a atividade antioxidante de outros derivados do tocoferol e de flavonóides. Da mesma forma, utilizamos os dados teóricos calculados (Tabela 4) para avaliar a atividade antioxidante dos compostos estudados.

Os parâmetros estatísticos que descrevem as regressões são: N – Número de pontos em que a equação está baseada; R – coeficiente de correlação, F – o resultado do teste F e p - o nível de significância obtido para a equação. O número entre parênteses representa o desvio obtido para cada valor da equação.

Recentemente, trabalhos envolvendo cálculos teóricos de parâmetros físico-químicos têm relacionado a estrutura química com a atividade antioxidante determinada por técnicas geralmente *in vitro*. Sergediene *et al.* (1999) avaliaram a capacidade tóxica (concentração inibitória de crescimento celular) de compostos fenólicos (flavonóides e derivados dos ácidos gálico e cafeico) sobre células leucêmicas, relacionando-os ao Log P e ao valor de potencial de meia onda obtido por voltametria. No trabalho destes autores foi comprovado que a atividade genotóxica estava diretamente relacionada ao valor de $E_{1/2}$ e de Log P ($R^2=0,7590$).

A mesma relação pode ser observada para os compostos fenólicos avaliados no presente trabalho, realizando-se a regressão múltipla dos resultados de INI_{NBT} com os dados de E_{pa} e Log P , conforme apresentado na equação 16.

$$\text{INI}_{\text{NBT}} = -16,21(\pm 13,77). \text{Log P} - 0,08 (\pm 0,05). E_{\text{pa}} + 51,16 (\pm 31,32) \quad (16)$$

$$N=10; R^2=0,6869; F= 7,6802; p < 0,0172$$

Desta forma pode-se concluir que a atividade antioxidante (INI_{NBT}) aumenta com a diminuição do valor de Log P e de E_{pa} . É importante salientar que a equação representada anteriormente não obedece aos requisitos de uma equação de QSAR, pois se adotou um parâmetro experimental (E_{pa}) para prever outro parâmetro (INI_{NBT}) conforme apresentado anteriormente na equação 7.

A seguir serão apresentadas outras equações (17-19) de regressão múltipla com capacidade de prever a atividade em termos de ΔE e PO_2 .

$$\Delta E = -49,09 (\pm 12,2). \text{Log P} + 35,57 (\pm 16,8) \quad (17)$$

$$N= 12; R^2=0,6180; F= 16,184; p < 0,0024$$

$$\text{P}_{\text{O}_2} = -12,98(\pm 3,1). \Delta E_{\text{D}_{\text{OH}_2}} - 26,64(\pm 5,7). \log P + 889,38 (\pm 219,2) \quad (18)$$

$$N= 8; R^2 = 0,9181; F=28,044; p < 0,0019$$

$$\text{P}_{\text{O}_2} = -12,04(\pm 6,1). \Delta E_{\text{D}_{\text{OH}_2}} + 27,09(\pm 14,5). n.\text{OH} + 805,44 (\pm 432,5) \quad (19)$$

$$N= 8; R^2 = 0,7408; F=7,140; p < 0,0342$$

Nas equações 17 a 19 observamos que os melhores parâmetros para prever a atividade antioxidante são aqueles relacionados à presença de hidroxilas fenólicas. Estes resultados são concordantes com a análise dos dados frente à estrutura química. Os melhores parâmetros têm sido, portanto, o número de hidroxilas fenólicas, a energia de dissociação da ligação OH e o Log P. Este último, parâmetro de lipossolubilidade, sofre influência da natureza dos substituintes. Neste caso, diminui na presença de hidroxilas fenólicas.

Zhang e Chen (2000b) determinaram que a energia de dissociação da ligação OH de flavonóides apresenta correlação de $r = -0,7523$ com a eficiência antioxidante, sendo, portanto, um bom parâmetro para elucidar as diferenças de atividade antioxidante. Resultados semelhantes foram obtidos para compostos fenólicos derivados do ácido cinâmico e de flavonóides (ZHANG, 1999), e, portanto, confirmados neste trabalho, quando relacionados com o consumo de oxigênio.

Nas equações de 20 a 22 são propostas expressões matemáticas para prever a capacidade dos compostos fenólicos de estabilizar o radical ânion superóxido.

$$\text{INI}_{\text{NBT}} = -42,17(\pm 13,8) \cdot \log P - 1,17(\pm 1,6)Ea_1 + 306,2 (\pm 289,4) \quad (20)$$

$$N=10; R^2=0,6456; F=6,3769; p<0,0265$$

$$\text{INI}_{\text{NBT}} = -15,87(\pm 6,8) \cdot \Delta E_{\text{D}_{\text{OH}_2}} + 5,06 (\pm 1,8)Pi_2 + 600,40(\pm 409,7) \quad (21)$$

$$N=8; R^2=0,6421; F=4,4800; p<0,0760$$

$$\text{INI}_{\text{NBT}} = -7,30(\pm 9,7) \cdot \Delta E_{\text{D}_{\text{OH}_2}} + 0,65 (\pm 1,9)Ea_2 + 495,69(\pm 645,3) \quad (22)$$

$$N=8; R^2=0,1053; F=0,2900; p<0,7572$$

Segundo Cheng e colaboradores (2003) estes parâmetros (Ea e Pi) não são adequados para avaliar a atividade antioxidante, o que também foi observado neste trabalho. Eles mostram-se contraditórios, ou seja, quanto maior o Pi menor a capacidade de um composto apresentar atividade antioxidante. Desta forma seria de se esperar que Pi contribui-se negativamente para INI_{NBT} na equação 21.

A energia do HOMO (orbital ocupado de maior energia) pode ser utilizada para determinar o potencial de ionização, a geometria molecular e a reatividade

química. No entanto, Zhang e Chen (2000a) apontaram o valor de HOMO como um parâmetro inadequado de correlação com a atividade antioxidante de diferentes compostos ($r=0,5602$).

A mesma interpretação serve para a E_a na equação 22. A contradição deste parâmetro é ainda mais evidente comparando-se as equações 20 e 22, onde E_a contribui negativamente para a atividade na primeira e positivamente na segunda. Um dos motivos que pode ter levado a estes resultados é o baixo número de compostos avaliados nesta etapa do trabalho ($N=8$).

Desta forma, podemos concluir (segundo a equação 20) que a atividade antioxidante de compostos fenólicos frente ao ânion radical superóxido aumenta quando diminui o valor de $\log P$ e da energia de ativação (E_a).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os compostos que proporcionaram maior inibição da redução do NBT são o CAF e o CLO (derivados do ácido cinâmico) e o GAL e GALme (derivados do ácido benzóico). Estes são, portanto, os compostos com maior capacidade de estabilizar o ânion radical superóxido;
- A oxidação dos compostos fenólicos avaliados dá-se através de um processo irreversível, apresentando apenas correntes de oxidação como verificado nos voltamogramas cíclicos. Propõe-se que esta corrente corresponda à oxidação de hidroxilas fenólicas as quinonas correspondentes. A exceção é verificada para o BEN e o CIN que não possuem hidroxilas e, portanto, são inertes nas condições estudadas;
- Os menores valores de E_{pa} foram obtidos para o CAF e CLO (derivados do ácido cinâmico) e para o GAL e GALme (derivados do ácido benzóico). Quanto menor este valor, mais facilmente o composto oxida-se, prevenindo a oxidação de outras moléculas e apresentando, desta forma, maior proteção antioxidante.
- O salto potenciométrico (ΔE) representa a alteração proporcionada ao equilíbrio da solução de eletrólito após a adição dos compostos. Quanto maior o salto potenciométrico, maior a capacidade da molécula ser oxidada. Neste ensaio, os maiores valores de ΔE foram obtidos para o CAF e CLO e para o GAL e GALme;
- No ensaio potenciométrico pôde-se verificar que o ácido gálico não é estável em meio alcalino. Nestas condições, observa-se a alteração da coloração da

solução (de incolor para azul), apontando para a oxidação de grupamentos cromóforos;

- A teoria do potencial misto foi adotada para explicar o salto potenciométrico resultante da alteração do equilíbrio eletroquímico do meio, formado a partir da oxidação irreversível do composto fenólico e da redução do oxigênio dissolvido no eletrólito de suporte;
- Os resultados de consumo de oxigênio em PO_2 (mmHg) reforçam a teoria do potencial misto, pois os maiores consumos foram obtidos para o CAF, GAL e GALme. É importante ressaltar que estes são compostos que se oxidam em menores valores de potencial eletroquímico;
- Entre os resultados experimentais, o E_{pa} e ΔE correlacionam-se apresentando um coeficiente $R^2 = 0,8993$. Isto, provavelmente, é devido ao fato de ambos estarem relacionados com a facilidade das moléculas se oxidarem;
- As correlações entre o INI_{NBT} com as técnicas eletroquímicas também foram bem significantes, ficando na ordem de 0,7916 com os valores potenciométricos e 0,6636 com os resultados de voltametria;
- Quanto à relação entre a estrutura química e a atividade antioxidante, os resultados obtidos apontam a presença das hidroxilas fenólicas como sendo essencial para a atividade antioxidante. Compostos como o BEN e o CIN, que não possuem este substituinte, apresentaram resultados menores nos ensaios realizados. O aumento no número de hidroxilas contribui para o aumento da atividade antioxidante;

- Comparando os derivados do ácido benzóico com os derivados do ácido cinâmico, pode-se verificar ainda a influência do substituinte propenóico que possibilita maior estabilidade do radical formado por ressonância. Esta afirmação pode ser verificada comparando os resultados do PRO com os resultados do CAF, ambos com duas hidroxilas fenólicas nas posições 2 e 3;
- Entre os parâmetros físico-químicos, o Log P, que está relacionado à hidrossolubilidade da molécula, calculado para a molécula neutra (HOArCOOH), correlaciona-se significativamente com o número de hidroxilas (0,6772). Este parâmetro, juntamente com o número de hidroxilas, apresentaram-se adequados para prever os resultados de atividade antioxidante em termos de ΔE e PO_2 . A diminuição do valor de Log P e o aumento de hidroxilas contribuem positivamente para estes resultados;
- A energia de dissociação da ligação OH foi calculada para a molécula neutra (HOArCOOH) e para a molécula ionizada (HOArCOO⁻). Os resultados obtidos para esta última correlacionam-se melhor com a atividade antioxidante. Quanto menor o valor deste parâmetro, mais facilmente a molécula é capaz de doar o átomo de hidrogênio, portanto, melhor antioxidante será o composto. Este fato é confirmado pela contribuição positiva deste fator nas equações de QSAR;
- O PI e a Ea estão relacionados à perda de um elétron. Quanto menor o valor destes parâmetros, mais facilmente os compostos se oxidam (perda de um elétron). Contudo, é previsto que este parâmetro contribui com sinal negativo com a atividade antioxidante (INI_{NBT}) nas equações, fato este não observado em algumas equações, considerando-se, portanto, um parâmetro inadequado para prever a atividade antioxidante.

7 PERSPECTIVAS

- Realizar cálculos teóricos *ab initio* a fim de correlacionar os descritores moleculares com a atividade antioxidante destes compostos obtidas através dos ensaios experimentais.
- Realizar estudos eletroquímicos para determinar o mecanismo de oxidação dos compostos que apresentaram melhores resultados nas análises experimentais testadas neste trabalho;
- Sintetizar novos compostos que respeitem as características estruturais e que possuam características físico-químicas que potencializem a atividade antioxidante;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACKER, S. A . B. E.; GROOT, M. J.; BERG, D. J.; TROMP, M. N. J. L.; KELDER, G. D. O.; VIJGH, W. J. F. and BAST, A. A quantum Chemical Explanation of the antioxidant activity of flavonoids, ***Chemical Research in Toxicology***, v. 09, p. 1305-1312, 1996.
2. AGUÍ, M. L.; REVIEJO, A.J.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P. and PINGARRÓN, J. M. Analytical Applications of cylindrical carbon fiber microelectrodes. Simultaneous voltammetric determination of phenolic antioxidants in food, ***Analytical Chemistry***, v. 67, p. 2195-2200, 1995.
3. ALLISON, A. C. Antioxidant drug targeting, ***Advances in Pharmacology***, v. 38, p. 273-291, 1997.
4. ALONSO, A. M.; DOMINGUEZ, C.; GUILLEN, D. A.; BARROSO, C. G. Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolics content. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 50, n. 11, p. 3112-3115, 2002.
5. AMAROWICZ, R.; PEGG, R.B.; RAHIMI-MOGHADADAM, P. ; BARL, B. and WEIL, J. A. Free radical scavenging capacity and antioxidant capacity of selected plant species from the Canadian prairies, ***Food Chemistry***, v. 84, p. 551-562, 2004.

6. ARUOMA, O. I. Antioxidant actions of plant foods: use of oxidative DNA damage as a tool for studying antioxidant efficacy, *Free Radical Research*, v. 30, n. 3, p. 419-427, 1999.
7. ARUOMA, O. I. Deoxyribose assay for detecting hydroxyl radicals, *Methods in Enzimology*, v. 233, p. 57-66, 1994.
8. ARUOMA, O. I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods, *Mutation Research*, v. 523-524, p. 9-20, 2003.
9. BARD, A. J. and FAULKNER, L. R. *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications*. New York: J. Wiley, 1980.
10. BARREIRO, E. J. e FRAGA, C. A . M. *Química Medicinal – As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos*. Porto Alegre: ArtMed, 2001.
11. BORS, W. , MICHEL, C. and SCHIKORA, S. Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: a pulse radiolysis study, *Free Radical Biology and Medicine*, v. 19, n. 01, p. 45-52, 1995.
12. BORS, W. and MICHEL, C. Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols, *Annals of the New York Academy of Sciences.*, v. 957, p. 57-69, 2002.
13. BOSQUE, R. and SALES, J. A QSPR study of O-H bond dissociation energy in phenols, *Journal of Chemical Information and Computer Science*, v. 43, p. 637-642, 2003.

14. BUETTNER, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate, ***Archives of Biochemistry and Biophysics***, v. 300, n. 2, p. 535-543, 1993.
15. BUNCE, N. J. Introduction to the interpretation of electron spin resonance spectra of organic radicals, ***Journal of Chemical Education***, v. 64, n.11, 1987.
16. CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity, ***Annual Review of Biochemistry.***, v. 58, p. 79-110, 1989.
17. CAMPANELLA, L. BONANNI, A. and TOMASSETTI, M. Determination of the antioxidant capacity of samples of different types of tea, or of beverages based on tea or other herbal products, using a superoxide dismutase biosensor, ***Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis***, v. 32, p. 725-736, 2003.
18. CASTELLUCCIO, C.; PAGANGA, G.; MELIKIAN, N.; BROLWELL, PRIDHAM, J. SAMPSON, J. and RICE-EVANS, C. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants, ***FEBS Letters***, v. 368, p.188-192, 1995.
19. CATAPANO, A. L. Antioxidant effect of flavonoids, ***Angiology - The Journal of Vascular Diseases***, v. 48, n. 01, 1997.
20. CEBALLOS, C. and FERNÁNDEZ, H. The electroanalytical determination of antioxidants in corn oil using ultramicroelectrodes, ***Journal of the Brazilian Chemical Society***, v. 6, n. 1, p. 1-5, 1995.

21. CHENG, Z., REN, J., LI, Y., CHANG, W. and CHEN, Z. Study on the multiple mechanisms underlying the reaction between hydroxyl structure and activity relationship, ***Bioorganic and Medical Chemistry***, v. 10, p. 4067-4073, 2002.
22. CHENG, Z., REN, J., YAN, G., LI, Y., CHANG, W. and CHEN, Z. Quantitative elucidation of the molecular mechanisms of hydroxyl radical quenching reactivity of phenolic compounds, ***Bioorganic Chemistry***, v. 31, n. 2, p. 149-162, 2003.
23. CHEVION, S.; BERRY, E. M.; KITROSSKY, N. and KOHEN, R. Evaluation of plasma low molecular weight antioxidant capacity by cyclic voltammetry, ***Free Radical Biology and Medicine***, v. 22, n. 3, p. 411-421, 1997.
24. CHEVION, S.; ROBERTS, M. A. and CHEVION, M. The use of cyclic voltammetry for evaluation of antioxidant capacity, ***Free Radical Biology and Medicine***, v. 28, n. 6, p. 860-870, 2000.
25. CONSTANS, P. and HIRST, J. D. Nonparametric regression applied to quantitative structure –activity relationships, ***Journal of Chemical Information and Computer Sciences***, v. 40, n. 2, p. 452-459, 2000.
26. COS, P.; YING, L.; CALOMME, M.; HU, J. P.; CIMANGA, K.; POEL, B.V.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. and BERGHE, D.V. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers, ***Journal of Natural Products***, v. 61, p. 71-76, 1998.

27. DELGADO, J.N. and REMERS, W. A. (Ed.) **Wilson and Gisvold's – Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry**, 10. ed., New York: Lippincott – Raven, 1998.
28. ESFANDIARI, N.; SHARMA, R.K.; SALEH, R.A.; THOMAS, A. J. Jr. and AGARWAL, A. Utility of the nitroblue tetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leukocytes and spermatozoa, **Journal of Andrology**, v. 24, n. 6, p. 862-870, 2003.
29. FANTOZZI, P.; MONTANARI, L.; MANCINI, F.; GASBARRINI, A.; ADDOLORATO, G.SIMONCINI, M.; NARDINI, M.; GHISELLI, A. and SCACCINI, C. In vitro antioxidant capacity from wort to beer, **Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 31, n. 3, p. 221-227, 1998.
30. FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceito, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica do Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
31. FERREIRA, M. M. C.; MONTANARI, C. A. e GAUDIO, A. C. Seleção de variáveis de QSAR. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 439-448, 2002.
32. FOYE, W. O.; LEMKE, T. L. and WILLIAMS, D.A. **Principles of Medicinal Chemistry**, 4. ed., London: Williams & Wilkins, 1995.
33. FREMONT, L.; BELGUENDOZ, L. and DEPAL, S. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids, **Life Sciences**, v. 64, n. 26, p. 2511-2521, 1999.

34. FRIEDMAN, M.; JURGENS, HS. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, n. 6, p. 2101-2110, 2000.
35. FUENTE, C.; ACUÑA, J. A.; VÁZQUEZ, M. D.; TASCÓN, M. L.; GÓMEZ, M. I. and SÁNCHEZ BATANERO, P. Preparation of a polypyrrole electrode modified with a nickel phthalocyanine complex. Application to the determination of an antioxidant (propylgallate) in foods, *Talanta*, v. 44, p, 685-695, 1997.
36. GALATO, D.; CKLESS, K.; SUSIN, M. F.; GIACOMELLI, C. RIBEIRO-DO-VALE, R. M; and SPINELLI, A. Antioxidant capacity of phenolic and related compounds: Correlation among electrochemical, visible spectroscopy methods and structure-antioxidant activity. *Redox Report*, v.6, n. 4, p. 243-250, 2001.
37. GARDNER, P. T.; McPHAIL, D. B.; CROZIER, A. and DUTHIR, G. G. Electron spin resonance (ESR) spectroscopic assessment of the contribution of quercetin and other flavonols to the antioxidant capacity of red wines. *Journal of the Sciences of Food and Agriculture*, v. 79, p. 1011-1014, 1999.
38. GATE, L.; PAUL, J. BA, G. N.; TEW, K. D. and TAPIERO, H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants, *Biomed Pharmacotherapy*, v. 53, n. 4, p. 169-180, 1999.
39. GIACOMELLI, C.,CKLESS, K.; GALATO, D.; MIRANDA, F. and SPINELLI, A. Electrochemistry of Caffeic Acid Aqueous Solutions with pH 2.0 to 8.5, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.13, n.3, p. 332 - 338, 2002.

40. GRAFF, E. Antioxidant potential of ferulic acid. ***Free Radical Biology and Medicine***, v. 13, p. 435-448, 1992.
41. GUNCKEL, S.; SANTANDER, P.; CORDANO, G.; FERREIRA, J.; MUNOZ, S.; NUNEZ-VERGARA, L. J. and SQUELLA, J. A. Antioxidant activity of gallates: an electrochemical study in aqueous media, ***Chemico-Biological Interactions***, v. 114, p. 45-59, 1998.
42. HAANDEL, M.J.H., RIETJENS, I. M. C. M., SOFFERS, A. E. M. F., VEEGER, C., VERVOORT, J., MODI, S., MONDAL, M.S., PATEL, P.K. and BEHERE, D.V. Computer calculation-based quantitative structure-activity relationships for the oxidation of phenol derivatives horseradish peroxidase compound II, ***Journal of Biological Inorganic Chemistry***, v. 1, p. 460-467, 1996.
43. HAGERMAN, A. E. ; RIEDI, K. M.; JONES, G. A.; SOVIK, K. N.; RITCHARD, N. T.; HARTZFELD, P. W. and RIECHEL, T. L. High Molecular Weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants, ***Journal Agricultural and Food Chemistry***, v. 46, n. 05, p. 1887-1892, 1998.
44. HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease, ***The American Journal of Medicine***, v. 91, s. 3 C, p. 14 - 22S, 1991.
45. HALLIWELL, B. and CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance, ***American Journal of Clinical Nutrition***, v. 57, p. 715-725S, 1993.
46. HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J. M. C. ***Free Radicals in Biology and Medicine***, 2. ed., London: Clarendon Press Oxford, 1991.

47. HALLIWELL, B. How to characterize an antioxidant: an update, **Biochemical Society of Symposium.**, v. 61, p. 73-101, 1995a.
48. HALLIWELL, B. Antioxidant characterization – methodology and mechanism, **Biochemical Pharmacology**, v. 49, n. 10, p.1341-1348, 1995b.
49. HALLIWELL, B. Oxygen radicals: a commonsense look at their nature and medical importance, **Medical Biology**, v. 62, p. 71-77, 1984.
50. HANSCH, C and LEO, A. **Exploring Qsar – Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology**, Washington: American Chemical Society, 1995.
51. **HYPERCHEM 5.0**, Molecular visualization and simulation; Hypercube: Ontário, 1992.
52. HOLMBERG, P. The physics and chemistry of free radicals, **Medical Biology**, v. 62, p. 68-70, 1984.
53. HORAN, I.; CLOTWORTHY, M.; FOKUNANG, C. N.; TOMKINS, P. T. The development of an *in vitro* screening strategy for topically applied products, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 81-90, 2003.
54. IULIANO, L.; PICCHERI, C.; COPPOLA, I.; PRATICO, D.; MICHELETTA, F. and VIOLI, F. Fluorescence quenching of dipyridamole associated to peroxy radical scavenging: a versatile probe to measure the chain breaking antioxidant to biomolecules, **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1474, n. 2, p. 177-182, 2000.

55. JACOB, R. A. and BURRI, B. J. Oxidative damage and defense, ***American Journal of Clinical Nutrition***, v. 63, p. 985-990S, 1996.
56. JAVANOVIC, S. V. ; STEENKEN, S.; TOSIC, M.; MARJANOVIC and SIMIC, M. G. Flavanoids as antioxidants, ***Journal of the American Chemical Society***, v. 116, p. 4846-4851, 1994.
57. KERRY, N. and RICE-EVANS, C. Inhibition of peroxynitrite-mediated oxidation of dopamine by flavonoid and phenolic antioxidants and their structural relationships, ***Journal of Neurochemistry***, v. 73, n. 1, p. 247-254, 1999.
58. KERRY, N. L. and ABBEY, M. Red wine and fractionated phenolic prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro, ***Arteriosclerosis***, v. 135, n. 1, p. 93-102, 1997.
59. KIKUZAKI, H.; HISAMOTO, M.; HIROSE, K.; AKIYAMA, K.; TANIGUCHI, H. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds, ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 50, n. 7, p. 2161-2168, 2002.
60. KILMARTIN, P.A. Electrochemical detection of natural antioxidants: principles and protocols. ***Antioxidant Redox Signal***, v. 3, n. 6, p. 941-955, 2001.
61. KONO, Y.; KOBAYASHI, K.; TAGAWA, S.; ADACHI, K.; UEDA, A. .; SAWA, Y. and SHIBATA, H. Antioxidant activity of polyphenolics in diets rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen, ***Biochimica and Biophysica Acta***, v. 1335, p. 335-342, 1997.

62. KOROKOVA, E.I.; KARBAINOV, Y.A. and SHEVCHUK, A. V. Study of antioxidant properties by voltammetry. ***Journal of Electroanalytical Chemistry***, v. 518, p.56-60, 2002.
63. LIEN, E. J.; REN, S. J., BUI, H. Y. H. and WANG, R. B. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants, ***Free Radical Biology and Medicine***, v. 26, n. 3-4, p. 285-294, 1999.
64. LIU, S.L.; PAN, J. H.; SHI, D.Y.; CHEN, K.X.; WANG, Q.M.; CHEN, S.M. and YAN, X.M. Relationship between structure and anti-oxidation of tocopherol with molecular orbital theory, ***Acta Pharmacologica Sinica***, v. 19, p. 513-518, 1998.
65. MADSEN, H. L.; NIELSEN, B. R.; BERTELSEN, G. and SKIBSTED, L. H., Screening of antioxidant activity of spices. A comparison between assays based on ESR spin trapping and electrochemical measurement of oxygen consumption, ***Food Chemistry***, v. 57, n. 2, p. 331-337, 1996.
66. MASON, R. P. In vitro and in vivo detection of free radical metabolites with electron spin resonance *in* PUNCHARD, N. A. and KELLY, F. J. (Eds), ***Free Radicals – A Practical Approach***, New York: Oxford University Press, 1996.
67. METODIEWA, D.; JAISWAL, A. K.; CENAS, N.; DICKANCAITÉ, E. and SEGURA-AGUIAR, J. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product, ***Free Radical Biology and Medicine***, v. 26, n. ½, p. 107-116, 1999.

68. MIGLIAVACCA, E.; CARRUPT, P.A. and TESTA, B. Theoretical parameters to characterize antioxidants. Part I. The case of vitamin E and analogs, ***Helvetica Chimica Acta***, v. 80, p.1613-1626, 1997.
69. MORGON, N. H. Computação em química teórica: informações técnicas, ***Química Nova***, v. 24, n. 5 , p. 676-682, 2001.
70. NAGUIB, Y. M. A. A fluorometric method for measurement of peroxy radical scavenging activities of lipophilic antioxidants, ***Analytical Biochemistry***, v. 265, n. 2, p. 290-298, 1998.
71. NAKAO, K.; SHIMIZU, R.; KOBOTA, H.; YASUHARA, M.; HASHIMURA, Y.; SUZUKI, T.; FUJITA, T. and OHMIZU, H. Quantitative structure-activity analyses of novel hydroxyphenylurea derivatives as antioxidants, ***Bioorganic & Medicinal Chemistry***, v. 6, n. 6, p. 849-869, 1998.
72. NATELLA, F.; NARDINI, M.; DI FELICE, M. and SCACCINI, C. Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: Structure-activity relation, ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 47, n. 4, p. 1453-1459, 1999.
73. OLDHAN, K. B. and MYLAND, J. C. ***Fundamentals of Electrochemical Science***. London: Academic Press, 1994.
74. PAREJO, I.; VILADOMAT, F.; BATISTA, J.; ROSAS –ROMERO, A.; SAAVEDRA, G.; MURCIA, M. A.; JIMENEZ, A. and CODINA, C. Investigation of Bolivian plant extracts for the radical scavenging activity and antioxidant action, ***Life Science***, v. 73, n. 13, p. 1667-1681, 2003.

75. PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants, ***Journal of Natural Products***, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.
76. PRIOR, R. L. and CAO, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods, ***Free Radical Biology and Medicine***, v. 27, n. 11/12, p. 1173-1181, 1999.
77. PUNCHARD, N. A. and KELLY, F. J. (Eds) ***Free Radicals – A practical Approach***, New York: Oxford University Press, 1996.
78. RAPTA, P.; MISIK, V.; STASKO, A. and VRABEL, I. Redox intermediates of flavonoids and caffeic acid esters from propolis: an EPR spectroscopy and cyclic voltammetry study, ***Free Radical Biology and Medicine***, v. 18, n. 05, p. 901-908, 1995.
79. REMACLE, J.; LAMBERT, D.; RAES, M.; PIGEOLET, E.; MICHIELS, C. and TOUSSAINT, O. Importance of various antioxidant enzymes for cell stability – Confrontation between theoretical and experimental data, ***Biochemical Journal***, n. 286, p. 41-46, 1992.
80. RENAUD, S. and LORGERIL, M., Wine, alcohol, platelets, and French Paradox for coronary heart disease, ***Lancet***, v. 339, p. 1523-1526, 1992.
81. RICE-EVANS, C. A. and MILLER, N. J. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food, ***Biochemical Society Transactions***, p. 790-795, 1996.

82. RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J. and PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in Plant Science – Reviews*, v. 2, n. 4, 1997.
83. RICE-EVANS, C. and DIPLOCK, A. T. Current status of antioxidant therapy, *Free Radical Biology and Medicine*, v. 15, p. 77-96, 1993.
84. RICE-EVANS, C.; DIPLOCK, A. T. and SYMONS, M. C. R. *Techniques in Free Radical Research*, London: Elsevier, 1991.
85. ROBAK, J. And GRYGLEWSKI, M. Flavonoids are scavengers of superoxide anions, *Biochemical Pharmacology*, v. 37, n. 5, p. 837-841, 1988.
86. RUIZ, J. PEREZ, A. and POUPLANA, R. QSAR study of phenols: relation between the phenoxil radical formation and the anti-inflammatory activity via an antioxidant mechanism, *Quantitative Structure-Activity Relationships*, v. 15, n. 3, p.219-223, 1996
87. SAKAGAMI, H. and SATOH, K. Prooxidant action of two antioxidants: Ascorbic acid and gallic acid, *Anticancer Research*, v. 17, p. 221-224, 1997.
88. SAKAGAMI; H.; OI, T. and SATOH, K. Prevention of oral diseases by polyphenols, *In Vivo*, v. 13, n. 2, p. 155-171, 1999.
89. SALAH, N.; MILLER, N.J.; PAGANDA, G.; TIJBURG, L.; BOLWELL, P. and RICE-EVANS, C. Polyphenolic flavonols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 322, n. 02, p. 339-346, 1995.

90. SANT'ANNA, C. M. R. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações da IUPAC para 1997). **Química Nova**, v. 25, n. 3 p. 505-512, 2002.
91. SATOH, K. and SAKAGAMI, H. Ascorbyl radical scavenging activity of polyphenols, **Anticancer Research**, v. 16, n. 5A, p. 2885-2890, 1996.
92. SAWYER, D. T.; SOBROWIAK, A. and ROBERTS, J. L. **Electrochemical for Chemists**, 2. ed., New York: John Wiley & Sons, 1995.
93. SCHWEDHELM, E.; MAAS, R.; TROOST, R. and BÖGER, RH. Clinical pharmacokinetics of antioxidants and their impact on systemic oxidative stress, **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, n. 5, p. 437-469, 2003.
94. SELASSIE, C.D., DeSOYSA, T. V., ROSARIO, M., GAO, H. and HANSCH, C. Phenol toxicity in leukemia cells: a radical process?, **Chemico-Biological Interactions**, v. 113, p. 175-190, 1998.
95. SERGEDIENE, E.; JONSSON, K.; SZYMUSIAK, H.; TYRAKOWSKA, B., RIETJENS, I. M. C. M. and CENAS, N. Prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidants to HL-60 cells: description of quantitative structure-activity relationships, **FEBS Letters**, v. 462, n. 3, p. 392-396, 1999.
96. SHANHROKHIAN, S. and YAZDANI, J. Electrocatalytic oxidation of thioglycolic acid at carbon paste electrode modified with cobalt phthalocyanine: application as a potentiometric sensor, **Electrochimica Acta**, v. 48, p. 4143-4148, 2003.

97. SHAPOVAL, G. S.; GROMAVOYA, V. F. and MYRONYUK, I. Y. E. The new approaches to electrochemical investigation of blood components, ***Bioelectrochemistry and Bioenergetics***, v. 44, p. 289-293, 1998.
98. SHOHAMI, E. ; BEIT-YANNAI, E.; HOROWITZ, M. and KOHEN, R. Oxidative Stress in closed-head injury: brain antioxidant capacity as an indicator of functional outcome, ***Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism***, v. 17, p. 1007-1019, 1997.
99. SIMIC, M. G. and JOVANOVIC, S. V. Antioxidant mechanisms of uric acid, ***Journal of American Chemical Society***, v. 111, p. 5778-5782, 1989.
100. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. e PETROVICK, P. R. (Ed.) **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**, Porto Alegre: Editora Universidade / UFRGS, 1999.
101. SKOOG, D. A. and LEARY, J. J. ***Analytical Chemical***, 6. ed., Orlando: Saunders College Publishing, 1998.
102. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. and NIEMAN, T. A. ***Principles of Instrumental Analysis***, 5. ed., London: Saunders College Publishing, 1998.
103. SOFFERS, A.E.; VAN HAANDEL, M.J.; BOERSMA, M.G.; TYRAKOWSKA, B.; LAANE, C. and RIETEJENS, I. M. Antioxidant activities of carotenoids: quantitative relationships between theoretical calculations and experimental literature data, ***Free Radical Research***, v. 30, n. 3, p. 233-240, 1999.

104. SOUTHORN, P. A . and POWIS, G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biological reactions, ***Mayo Clinic Proceedings***, v. 63, p. 381-389, 1988.
105. STAHELIN, H. B. The impact of antioxidant on chronic disease in aging and in old age, Int. ***Journal of Nutrition Research***, v. 69, n. 3, p. 146-149, 1999.
106. STATSOFT, Inc. ***Statistica 6.0 for Windows***, Tulsa, 1995.
107. VEDERNIKOVA, I.; TOLLENAERE, J. P. and HAEMERS, A. Quantum mechanical evaluation of the anodic oxidation of phenolic compounds, ***Journal of Physical Organic Chemistry***, v. 12, p. 144-150, 1999.
108. WILHELM FILHO, D.; SILVA, E.L.; BOVERIS, A. Flavonoides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas in YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (ed) ***Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna***, Chapecó: Argos, 2001.
109. WRIGHT, J.S., JOHNSON, E.R. and DILABIO, G. A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants, ***Journal American Chemical Society***, v. 123, p. 1173-1183, 2001.
110. YAMASAKI, K. ; HASHIMOTO, A.; KOKUSENYA, Y.; MIYAMOTO, T. and SATO, T. Electrochemical method for estimating the antioxidative effects of methanol extracts of crude drugs. ***Chemical & Pharmaceutical Bulletin***, v. 42, n. 8, p. 1663-1665, 1994.

111. ZHANG, H. Y. and CHEN, D. Z. Is HOMO energy level a good parameter to characterize antioxidant activity? ***Chinese Chemical Letters***, v. 11, n. 8, p. 727-730, 2000a .
112. ZHANG, H. Y. and CHEN, D. Z. Theoretical elucidation on activity differences of ten flavonoid antioxidants, ***Acta Biochimica et Biophysica Sinica***, v. 32, n. 4, p. 317-321, 2000b.
113. ZHANG, H. Y., GE, N. and ZANG, Z. Y. Theoretical elucidation of activity differences of five phenolic antioxidants, ***Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao***, v. 20, n. 4, p. 363-366, 1999.
114. ZHANG, H.Y. Theoretical methods used in elucidating activity differences of phenolic antioxidants. ***Journal of the American Oil Chemistry Society***, v. 76, n. 6, p. 745-748, 1999.

ANEXOS

Anexo 1. Correlações de Spearman realizadas com os dados estruturais e experimentais obtidos para os compostos derivados do ácido benzóico

Intercorrelações	n	R ²	p
E_{pa} vs ΔE	5	0,8100	0,0374
E _{pa} vs n. OH	5	0,4001	0,2522
E_{pa} vs INI_{NBT}	5	0,6400	0,1041
E_{pa} vs PO₂	5	0,6400	0,1041
ΔE vs n. OH	6	0,6312	0,0590
ΔE vs INI_{NBT}	6	0,8891	0,0048
ΔE vs PO₂	6	0,7845	0,0188
n. OH vs INI_{NBT}	6	0,7792	0,0198
n. OH vs PO₂	6	0,5411	0,0956
INI_{NBT} vs PO₂	6	0,8891	0,0048

n – número de amostras válidas; R² – Coeficiente de correlação de Spearman; p –

Nível de significância estatística; E_{pa} – Potencial de pico anódico; ΔE- Salto

potenciométrico; n. OH – Número de hidroxilas; INI_{NBT}- Percentual de Inibição do

NBT; PO₂ – Pressão parcial de Oxigênio.

Anexo 2. Correlações de Spearman realizadas com os dados estruturais e experimentais obtidos para os compostos derivados do ácido cinâmico

Intercorrelações	n	R ²	p
E_{pa} vs ΔE	5	0,9998	0,0001
E _{pa} vs n. OH	5	0,3334	0,3081
E _{pa} vs INI _{NBT}	5	0,4900	0,1881
E _{pa} vs PO ₂	5	0,4900	0,1881
ΔE vs n. OH	6	0,5414	0,0955
ΔE vs INI _{NBT}	6	0,4067	0,1731
ΔE vs PO ₂	6	0,1017	0,5379
n. OH vs INI_{NBT}	6	0,6942	0,0394
n. OH vs PO ₂	6	0,0038	0,9075
INI _{NBT} vs PO ₂	6	0,0008	0,9572

n – número de amostras válidas; R² – Coeficiente de correlação de Spearman; p –

Nível de significância estatística; E_{pa} – Potencial de pico anódico; ΔE- Salto potenciométrico; n. OH – Número de hidroxilas; INI_{NBT}- Percentual de Inibição do NBT; PO₂ – Pressão parcial de Oxigênio.