



## ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIRRADICALAR DE ESPÉCIES ANTIOXIDANTES EMPREGANDO REATORES FOTOQUÍMICOS

**Fernanda Oliveira Lima**

[química.fernandalima@gmail.com](mailto:química.fernandalima@gmail.com)

Doutoranda em Química Analítica na Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS – Brasil,

**Simoní Da Ros**

[simonidaros@yahoo.com.br](mailto:simonidaros@yahoo.com.br)

Mestranda em Engenharia de Processos na Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS – Brasil,

**Leandro M. de Carvalho**

[lemacarvalho@gmail.com](mailto:lemacarvalho@gmail.com)

Professor Doutor do Departamento de Química na Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS – Brasil,

### RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento e aplicação de dois reatores fotoquímicos para o estudo da atividade antirradicalar dos antioxidantes rutina, quercetina e fisetina. O método é baseado na reação entre os compostos polifenólicos e o radical hidroxil, o qual foi artificialmente gerado pela decomposição fotoquímica do peróxido de hidrogênio. O sistema demonstrou ser útil para o estudo da cinética reacional do radical hidroxila com compostos antioxidantes, bem como o cálculo das suas constantes cinéticas.

**Palavras-chaves:** atividade antioxidante, reator fotoquímico, radical hidroxil

### ABSTRACT

This work describes the development and application of two photochemical reactors for the study of the radical scavenging activity of the antioxidants rutin, quercetin and fisetin. The method is based on the reaction between the polyphenolic compounds and the hydroxyl radical, which was artificially generated by photochemical decomposition of hydrogen peroxide. The system was shown to be useful for the study of the reaction kinetic of hydroxyl radical with antioxidant compounds as well as the calculation of its kinetic constants.

**Keywords:** antioxidant activity, photochemical reactor, hydroxyl radicals

## 1- INTRODUÇÃO

O interesse pela ação de compostos antioxidantes tem aumentado nos últimos anos, principalmente pela preocupação na prevenção ao envelhecimento e as doenças degenerativas relacionadas aos danos causados pelos radicais livres ao organismo, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, diminuição do sistema imunológico e disfunções cerebrais (Sousa et al).

Os radicais livres, por definição, são espécies que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em sua estrutura e, portanto, são altamente reativos. No organismo, *in vivo*, os radicais livres são formados via ação catalítica de enzimas, no decorrer dos processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular, na tentativa dos radicais livres de se estabilizarem quimicamente. Além disso, eles podem ser gerados no organismo por fatores externos, como por exemplo, a exposição à radiação solar (Bianchi e Antunes). Conseqüentemente, os radicais livres propiciam reações em cadeia que terminam alterando a conformação, a estrutura ou as funções de proteínas, fosfolípidios das membranas, proteoglicanos, ácidos nucleicos e alguns componentes celulares (Valko et al).

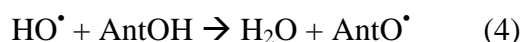
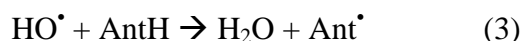
Nos seres vivos, a maioria dos radicais livres é gerada por espécies ativas de oxigênio. Dentre eles, o radical hidroxil é o mais reativo, visto que o organismo não possui sistema enzimático para combatê-lo (Valko et al).

O excesso de radicais livres nocivos ao organismo é combatido por compostos antioxidantes, que estabilizam ou desativam os mesmos, evitando lesões oxidativas de caráter cumulativo. Estes compostos antioxidantes podem ser de origem endógena, como a enzima superóxido dismutase (SOD), e exógena, como tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenoides (Sousa et al).

O radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ) pode ser gerado por reações fotoquímicas do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e na água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) por ação de radiação UV (reações 1 e 2) (Carvalho et al):



O radical  $\bullet\text{OH}$  pode reagir por meio de três mecanismos distintos: abstração de hidrogênio, transferência de elétrons e adição radicalar. Nas reações de abstração de hidrogênio do antioxidante (Ant), ocorre a inativação do mesmo e a supressão do radical  $\bullet\text{OH}$  (reações 3 e 4). (Valko et al; Carvalho et al) Os radicais secundários formados durante estas reações podem novamente reagir com outros compostos (Carvalho et al):



As reações radicalares podem ser desenvolvidas em reatores fotoquímicos, os quais têm sido desenvolvidos principalmente para a decomposição de amostras e o tratamento de resíduos industriais, visto que promovem a degradação da matéria orgânica (Carvalho et al). Campos e colaboradores (2001) construíram um reator fotoquímico que permite a irradiação simultânea de 5 amostras, as quais são mantidas a 70 °C durante o processo de mineralização sob circulação de ar (Carvalho et al). O sistema é provido de uma lâmpada de mercúrio de alta pressão (125 W) utilizada em iluminação pública, cujo bulbo externo foi removido para total exposição das amostras à radiação UV (Carvalho et al). Carvalho e colaboradores (2008) desenvolveram um reator fotoquímico que possibilita a irradiação simultânea de 12 amostras, as quais são mantidas à temperatura controlada por um termo-regulador durante o processo de mineralização sob circulação de ar (Carvalho et al). O sistema é provido de uma lâmpada de mercúrio de alta pressão (400 W) utilizada em iluminação pública, cujo bulbo externo foi removido para total exposição das amostras à radiação UV (Carvalho et al).

As lâmpadas de tungstênio e mercúrio são as mais utilizadas em reatores fotoquímicos. A lâmpada de tungstênio emite praticamente em toda a região do espectro visível e ultravioleta, ( $250 \text{ nm} < \lambda < 800 \text{ nm}$ ), enquanto que a lâmpada de mercúrio emite, nesta mesma região, na forma de linhas espectrais. O emprego da lâmpada de tungstênio proporciona um maior número de comprimentos de onda para a excitação da amostra. Por outro lado, a lâmpada de mercúrio oferece maior intensidade nos



comprimentos de onda em que emite radiação (Golimowski e Golimowska; Gaudin et al; Sansonetti et al).

Considerando a grande variedade de compostos com propriedades antioxidantes, alguns métodos *in vitro* foram desenvolvidos para a avaliação da atividade anti-radicalar de diversos compostos. Estes métodos empregam espécies radicalares estáveis em que a detecção do ponto final da reação se realiza, geralmente, por medida da absorvância no UV. Entre as metodologias mais conhecidas para determinação da atividade antioxidante de alimentos, bebidas e de plasma sanguíneo, estão os ensaios de captura de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina) e o ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico] (Soares et al). Métodos alternativos têm sido descritos na literatura, como o método recentemente proposto por Scholz e colaboradores (2007). Este método voltamétrico emprega um eletrodo modificado com monocamadas auto-organizadas (SAMs) a base de alquiltióis, a qual interage com os radicais  $\bullet\text{OH}$  gerados pela reação de Fenton e possibilita a determinação da cinética de reação de antioxidantes com os radicais livres.

Este trabalho descreve o estudo da fotoestabilidade e da atividade anti-radicalar (antioxidante) dos compostos ácido ascórbico, rutina, quercitina e fisetina, através da reação entre as espécies, a radiação UV e o radical OH gerado artificialmente pela fotodecomposição do peróxido de hidrogênio.

## **PARTE EXPERIMENTAL**

### **Instrumentação**

Os espectros de absorção molecular no UV-VIS foram obtidos entre 200 e 800 nm em um espectrofotômetro com arranjo de diodos HP 8453 (Hewlett Packard), utilizando uma célula de quartzo de 10 mm de espessura do caminho óptico.

Neste trabalho, foram construídos dois sistemas de irradiação, denominados reatores fotoquímicos, diferenciados pela fonte de radiação empregada: lâmpadas comerciais de mercúrio e de tungstênio. Os sistemas consistem dos seguintes componentes básicos: uma fonte de radiação; um sistema de resfriamento por circulação

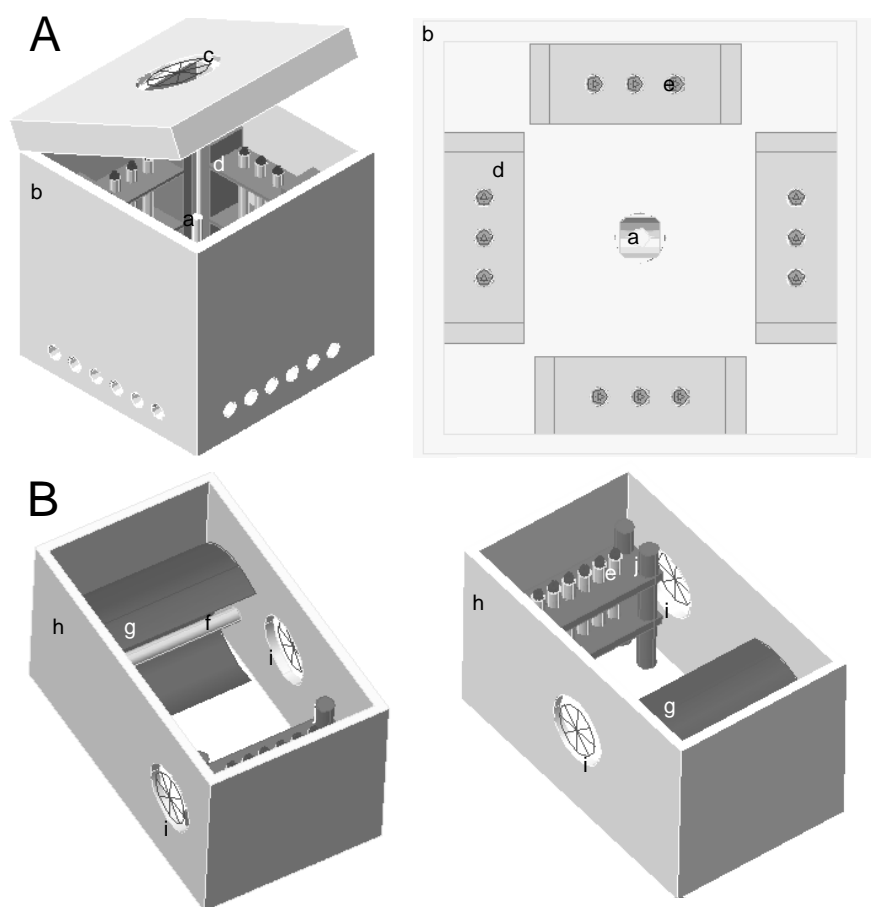


forçada de ar; um termômetro para controle de temperatura; um suporte para tubos de quartzo e uma caixa de madeira forrada com papel alumínio. A Figura 1 ilustra a composição dos dois sistemas de irradiação construídos em laboratório, onde se emprega fonte de irradiação de mercúrio (A) e de tungstênio (B).

No reator fotoquímico (A), uma lâmpada de mercúrio de alta pressão com potência nominal de 80 W foi empregada como fonte de radiação (a) (marca GE). A lâmpada com o bulbo exposto foi afixada na parte central do sistema onde está posicionado o soquete da lâmpada. A caixa de madeira forrada com papel alumínio (b) que envolve o sistema é na forma de cubo e apresenta 21,5 cm de aresta. O sistema de resfriamento é constituído de um *cooler* (c) (marca RUILIAN SCIENCE TECHNOLOGY), igual à ventiladores usados em computadores, posicionado na parte superior do sistema, o qual é acionado, durante todo o funcionamento da lâmpada. A temperatura máxima de operação do sistema foi de 30 °C com variação de  $\pm 5$  °C. O suporte para 12 tubos de quartzo (d) foi construído e moldado em madeira, com dimensões precisas, de modo que os tubos permaneçam dentro do sistema circundando o bulbo da lâmpada.

Já no reator fotoquímico (B), uma lâmpada de tungstênio com potência nominal de 150 W foi empregada como fonte de irradiação (f) (marca Xelux). A lâmpada foi afixada em um refletor retangular (marca XELUX) (g), onde está posicionado o soquete da lâmpada, e este posicionado na parte lateral o sistema. A caixa de madeira forrada com papel alumínio (h) que envolve o sistema é na forma retangular e apresenta 35 cm de comprimento e 18,6 cm de largura e altura. O sistema de resfriamento foi constituído de dois *coolers* (i) posicionados um em cada lado do reator, e são acionados automaticamente, durante todo o funcionamento da lâmpada. A temperatura máxima de operação do sistema foi de 60 °C com variação de  $\pm 5$  °C. O suporte para 6 tubos de quartzo (j) foi construído e moldado em madeira, com dimensões precisas, de modo que os tubos permaneçam dentro do sistema a uma distância de 25 cm da lâmpada contida no refletor.

Os tubos de quartzo (e), utilizados nos dois reatores fotoquímicos, foram obtidos comercialmente (Metrohm) e possuem dimensões de 12,5 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro interno, com capacidade máxima para 10 mL de amostra. Os dois sistemas operam em 220 V.



**Figura 1:** Representação esquemática dos sistemas de irradiação UV desenvolvidos: (A) reator com fonte de radiação lâmpada de Hg; (a) lâmpada de Hg (80 W); (b) caixa de madeira revestida com papel alumínio; (c) cooler; (d) suporte para os tubos de quartzo; (e) tubos de quartzo; (B) reator com fonte de irradiação lâmpada de Xe; (f) lâmpada de Xe (150W); (g) projetor; (h) caixa de madeira revestida com papel alumínio; (i) cooler; (j) suporte para os tubos de quartzo.

### Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura, destilada e deionizada em sistema Milli Q (Millipore) e todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. As soluções padrão 16 a 75  $\mu\text{mol L}^{-1}$  dos antioxidantes ácido ascórbico, rutina, quercitina e fisetina (Sigma-Aldrich) foram preparadas em solvente hidroetanólico 50 % (v/v). O peróxido de hidrogênio 30 % (v/v) foi obtido da Vetec. As soluções foram armazenadas a 4 °C e ao abrigo da luz.



## PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

O estudo desenvolvido utilizou 60 mL de solução de cada antioxidante, distribuídos em 6 tubos de quartzo (10 mL) em ensaios com duração total de 1 hora, sendo que a cada 10 minutos uma solução foi analisada no espectrofotômetro, após 10 minutos da retirada do reator, para não haver influência da temperatura na medida analítica.

Neste trabalho, foram estudadas as espécies antioxidantes rutina, quercitina e fisetina. Os espectros de absorção molecular no UV-VIS destas espécies foram obtidos em duas bandas de absorção de cada composto. entre 200 e 800 nm, onde 360, 374, 364 nm foram os comprimentos de onda utilizados para a análise dos decaimentos da rutina, quercitina e fisetina, respectivamente.

Os primeiros ensaios foram realizados somente com a solução de cada antioxidante para a investigação da influência da ação da fotólise direta sobre os compostos polifenólicos. Da mesma forma, foi investigada a ação do peróxido de hidrogênio frente a solução de cada antioxidante, sem a incidência de irradiação UV. Os ensaios subsequentes foram realizados com adição de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio nas soluções padrão (0,29 a 2,90 mmol L<sup>-1</sup>), totalizando 7 ensaios para cada antioxidante polifenólico.

A contribuição da fotólise direta ( $A_{UV}$ ) das espécies antioxidantes foi descontada das absorvâncias medidas nos ensaios de fotólise com adições de peróxido de hidrogênio ( $A_{UV+H_2O_2}$ ), para a análise percentual do decaimento do sinal de absorvância para cada antioxidante conforme a equação:

$$\text{Decaimento do sinal (\%)} = [1 - (A_{UV} - A_{UV+H_2O_2})] \times 100$$

onde,  $A_{UV}$  é a absorvância medida após a fotólise direta do antioxidante e  $A_{UV+H_2O_2}$  é a absorvância medida após a fotólise do peróxido de hidrogênio na presença do antioxidante em estudo.

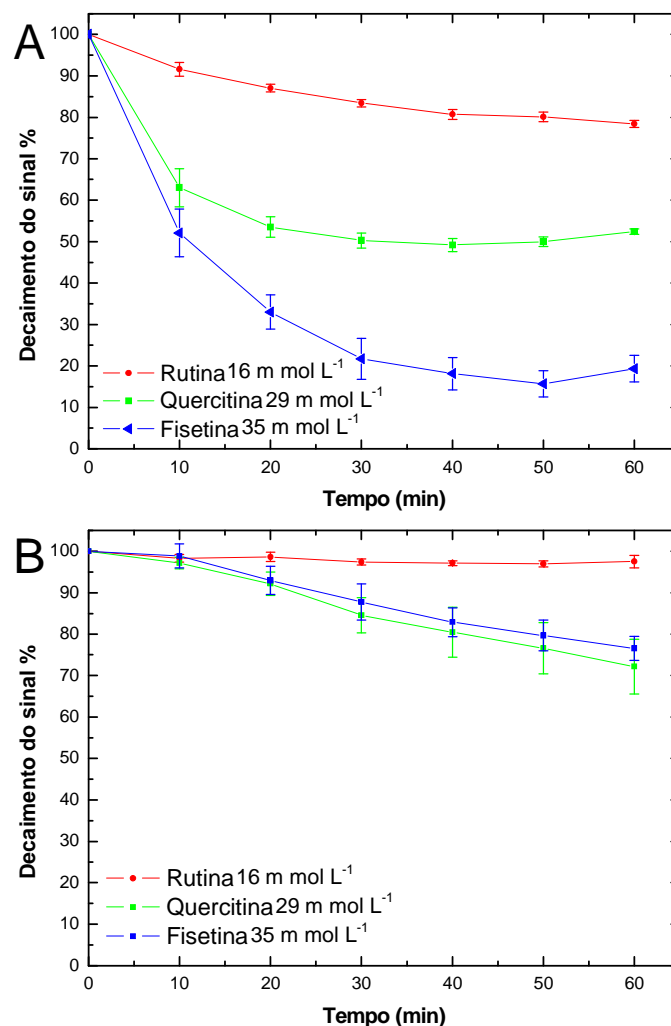
O princípio do método proposto baseia-se, portanto, na reação pura entre o radical  $\bullet OH$ , gerado artificialmente pela fotólise do peróxido de hidrogênio, e o composto antioxidante em estudo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios realizados para investigação da fotodegradação por ação da fotólise direta, ou seja, sem adição de  $H_2O_2$  como precursor radicalar sobre os compostos polifenólicos, demonstraram que as espécies antioxidantes são relativamente fotoestáveis, nas condições empregadas. Isso pode ser explicado por dois fatores: a baixa potência das lâmpadas utilizadas e a comparação dos espectros das lâmpadas de Hg e Xe com os espectros dos compostos polifenólicos estudados. Esta comparação evidencia a não coincidência das bandas de absorção dos antioxidantes com as raiais majoritárias de emissão da lâmpada de Hg, de emissão policromática, e as bandas de emissão da lâmpada de xenônio (Golimowski e Golimowska; Gaudin et al; Sansonetti et al). A tabela 1 mostra as regiões de máxima emissão das lâmpadas de Hg e Xe empregadas neste trabalho. Já no estudo da interação direta do antioxidante com o  $H_2O_2$  sem incidência da radiação de Hg e Xe, não foi observado o decaimento de absorvância para os antioxidantes em estudo, uma vez que sem a influência da radiação não ocorre a fotólise do  $H_2O_2$  para a formação do radical  $\bullet OH$ .

O estudo da ação anti-radicalar dos antioxidantes com adições de diferentes concentrações de  $H_2O_2$  na faixa de 0,29 a 2,90 mmol L<sup>-1</sup> demonstrou que a concentração de  $H_2O_2$  não altera o decaimento observado para os compostos polifenólicos durante 1 hora de irradiação. Os pequenos desvios observados nos decaimentos da figura 2 comprovam este efeito. Tal resultado pode ser explicado pelo fato de que a potência da lâmpada é o limitante na geração de radical  $\bullet OH$ . Ou seja, a baixa radiação emitida pelas lâmpadas de Hg (80W) e Xe (150W) não fotolisa todo o  $H_2O_2$  adicionado ao meio. Como pode ser observado na Figura 2, no reator fotoquímico com a fonte de radiação lâmpada de Hg o percentual de decaimento do sinal de absorvância foi mais acentuado do que no reator com fonte de radiação lâmpada de Xe.





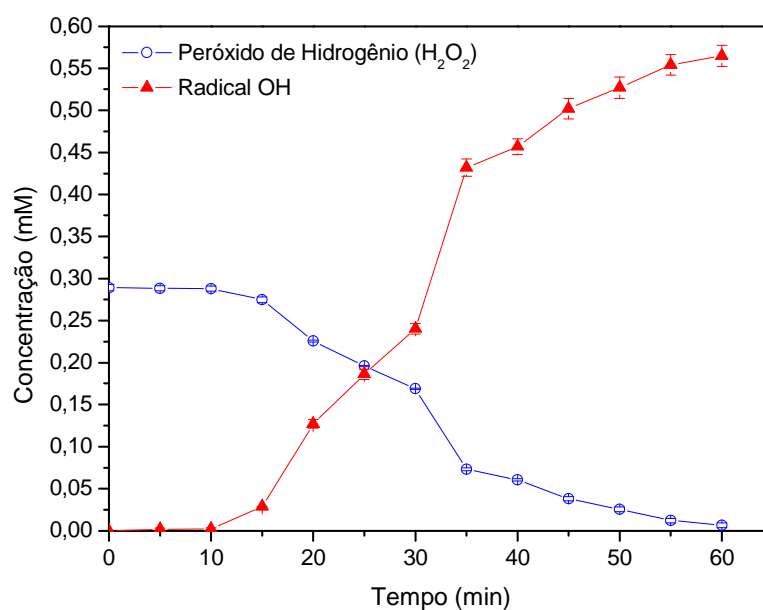
**Figura 2:** Estudo do decaimento do sinal de absorvância das espécies antioxidantes rutina, quercitina e fisetina: (A) reator com fonte de lâmpada de Hg; (B) reator com fonte de radiação lâmpada de Xe; [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] entre 0,29 e 2,90 mmol L<sup>-1</sup>.

Este fato pode ser explicado pelas linhas espectrais de emissão de alta intensidade da lâmpada de Hg (Tabela 1) que coincidem com os comprimentos de onda de máxima absorção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (190 a 225 nm). Já a lâmpada de Xe apresenta uma banda espectral de emissão (Tabela 1) que difere do comprimento de onda de máxima absorção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Portanto, o rendimento quântico da lâmpada de Hg é maior do que o da lâmpada de Xe na geração de radicais •OH. (Golimowski e Golimowska; Gaudin et al; Sansonetti et al; Klöpffer e Kohl).

**Tabela 1:** Comprimentos de onda (nm) de maior intensidade de emissão das fontes de radiação de lâmpada de Hg e Xe.<sup>6,7,8</sup>

Fonte de radiação	Comprimento de onda (nm) de emissão com maior intensidade
Hg	190, 254, 365, 546, 579
Xe	400-550, 750-1100

A Figura 3 mostra o aumento da concentração de radical HO•, calculada a partir da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disponível, no reator de Hg com o aumento do tempo de irradiação da solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,29 mmol.L<sup>-1</sup>.



**Figura 3:** Quantificação da geração do radical HO• e fotodecomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> frente à fotólise no reator fotoquímico com fonte radiação de Hg (80 W); [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sub>inicial</sub> de 0,29 mmol L<sup>-1</sup>.

De acordo com os resultados observados na figura 2, a construção dos reatores fotoquímicos com lâmpadas de baixa potência possibilita um estudo quantitativo da atividade anti-radicalar dos compostos polifenólicos rutina, quercitina e fisetina, onde a rutina demonstrou uma maior eficiência no combate ao radical •OH, seguida da quercitina e da fisetina. A maior ação anti-radicalar da rutina pode ser observada na figura 2, devido ao seu menor decaimento do sinal de absorvância frente às mesmas



concentrações de radical  $\bullet\text{OH}$  (0,29 a 2,90 mmol L<sup>-1</sup>) e tempo de irradiação, em comparação aos outros compostos antioxidantes estudados.

## CONCLUSÕES

Os reatores desenvolvidos possibilitam o estudo da atividade anti-radicalar de espécies antioxidantes na medida em que proporciona o acompanhamento cinético da reação entre o radical  $\bullet\text{OH}$  gerado pela fotodecomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  e os compostos antioxidantes.

O sistema pode ser empregado para o estudo da cinética de reação do radical  $\bullet\text{OH}$  com compostos antioxidantes e o cálculo das constantes de reação para cada composto. Da mesma forma, o estudo “*in vitro*” da interação entre radicais  $\bullet\text{OH}$  e extratos de plantas com caráter antioxidante pode ser realizado pelo método proposto. Estudos quantitativos envolvendo a cinética de reação de radicais  $\bullet\text{OH}$  e compostos polifenólicos e extratos de plantas medicinais estão em andamento em nosso grupo de pesquisa e serão publicados posteriormente.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (processo 478215/2007-0) e à CAPES (PROCAD 098/2007) pelos auxílios e bolsas concedidas.

## REFERÊNCIAS

Sousa, C. M. M.; Silva, H. R., Vieira-Jr, G. M.; Ayres, M. C. C.; Costa, C. L. S.; Araújo, D. S.; Cavalcante, L. C. D.; Barros, E. D. S., Araújo, P. B. M.; Brandão, M. S.; Chaves, M. H.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 351.

Bianchi, M. L. P.; Antunes, L. M. G.; *Rev. Nutr.* **1999**, *12*, 123.



Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T D.; Mazur, M.; Telser, J. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 44.

Carvalho, L. M.; Spengler, C.; Garmatz, J. C.; Nascimento, P. C.; Bohrer, D.; Del-Fabro, L.; Radis, G.; Bolli, A. A.; Garcia, S. C.; Moro, A. M.; Rosa, M. B.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1336.

Campos, M. L. A. M.; Mello, L. C.; Zanette, D. R.; Sierra, M. M. S.; Bendo A.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 257

Golimowski, J.; Golimowska, K. *Anal. Chim. Acta* **1996**, *325*, 111.

Gaudin, K.; Baillet, A., Chaminade, P. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *384*, 1302.

Sansonetti, C. J.; Salit, M. L.; Reader, J. *Appl. Opt.* **1996**, *35*, 74.

Soares, M.; Welter, L.; Gonzaga, L.; Lima, A.; Mancini-Filho, J.; Fett, R.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2008**, *28*, 727.

Scholz, F.; González, G. L. L.; Carvalho, L. M.; Hilgemann, M.; Brainina, K. Z.; Kahlert, H.; Jack, R. S.; Minh, D. T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8079.

Klöpffer, W.; Kohl, E. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1991**, *22*, 67.