

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Programa de Pós-Graduação em Química**

**CERIZE DA SILVA SANTOS**

**Oxidação Quimiluminescente do Luminol em Meios  
Micelares: Desenvolvimento de um Ensaio para  
Determinação da Capacidade Anti-radicalar**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:  
05/08/2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CERIZE DA SILVA SANTOS

**Oxidação Quimiluminescente do Luminol em Meios Micelares:  
Desenvolvimento de um Ensaio para Determinação da  
Capacidade Anti-radicalar**

*Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade de São Paulo para  
obtenção do Título de Mestre em Química  
(Química Orgânica)*

***Orientador: Prof. Dr. Josef Wilhelm Baader***

São Paulo

2008

Cerize da Silva Santos

Oxidação Quimiluminescente do Luminol em Meios Micelares:  
Desenvolvimento de um Ensaio para Determinação da Capacidade Anti-  
radicalar

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química  
da Universidade de São Paulo para obtenção do  
Título de Mestre em Química (Química Orgânica)*

Aprovado em: \_\_\_\_\_

**Banca Examinadora:**

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

Ao Willi, pelos ensinamentos de química e principalmente pelo exemplo de ética, paixão pela ciência e compromisso com o ensino,

À minha família, pelo apoio e incentivo sem iguais,

Ao André, pelo amor, paciência, companheirismo e por acreditar nos meus sonhos,

Ao Erick, pela ajuda com importantes discussões,

Aos colegas do laboratório - Ana, Aninha, André, Camila, Frances, Joey, Letícia, Lolo, Marcelo, Mônica, Panda e Sandro - pela ajuda, força e amizade,

À Luciana, pela ajuda com os experimentos e pela amizade,

Ao Luiz, ao pessoal da SPG e à Sílvia, por serem sempre prestativos,

Aos amigos que de longe ou de perto sempre estiveram na torcida, especialmente Júlio, Ivana, Paula, Michele, Márcio, Antonio Carlos, Evelize e Cristiane,

Aos professores Lique e Maurício por cederem os equipamentos em seus laboratórios,

Aos professores Maurício e Ana Campa por participarem da banca de minha qualificação,

Ao CNPq pela bolsa concedida.

**“É lá que quero ir; e de agora em diante**

**Creio em mim e nos meus talentos de piloto.”**

**Friedrich Nietzsche**

(trecho do poema “*Singrando para mares novos*”, em “*A Gaia Ciência*”)

## RESUMO

Santos, C. S. **Oxidação Quimiluminescente do Luminol em Meios Micelares: Desenvolvimento de um Ensaio para Determinação da Capacidade Anti-radicalar.** 2008. 113p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Química (Química Orgânica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo

Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia para a determinação da capacidade anti-radicalar de substâncias hidrofílicas e lipofílicas baseada na quimiluminescência do luminol em meio micelar. A reação de luminol, hemina e peróxido de hidrogênio foi estudada na presença de tensoativos carregados (CTAB/CTAC e SDS). Variou-se independentemente a concentração de cada reagente de forma a avaliar seu papel sobre a intensidade inicial de emissão ( $I_0$ ), que é proporcional à velocidade inicial da reação. Em solução aquosa de SDS, a  $I_0$  apresentou correlação linear com a concentração de  $H_2O_2$  entre  $5,0 \cdot 10^{-6}$  e  $6,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L e com a concentração de hemina no intervalo de  $8,0 \cdot 10^{-9}$  a  $4,0 \cdot 10^{-7}$  mol/L. O aumento da concentração de luminol no intervalo de  $5,0 \cdot 10^{-7}$  a  $1,0 \cdot 10^{-3}$  provocou aumento na  $I_0$  até  $5,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L, permanecendo constante para concentrações maiores. Na presença de CTAB, o valor de  $I_0$  variou linearmente com a concentração de  $H_2O_2$  no intervalo estudado ( $2,0 \cdot 10^{-5}$  a  $6,7 \cdot 10^{-4}$  mol/L). A  $I_0$  aumentou com o aumento da concentração da hemina entre  $8,0 \cdot 10^{-8}$  e  $8,0 \cdot 10^{-6}$  mol/L. A variação da concentração de luminol de  $5,0 \cdot 10^{-7}$  a  $5,0 \cdot 10^{-5}$  também provocou aumento na  $I_0$ , a qual ficou constante para concentrações maiores. Para este tensoativo foram realizadas também medidas de cmc nas condições de reação (tampão fosfato pH 11,6 e  $\mu = 0,1$ ), obtendo-se um valor de  $2 \cdot 10^{-4}$  mol/L, cinco vezes menor do que a cmc em água. As mudanças espectrais de hemina e luminol em diferentes concentrações de CTAB foram avaliadas, obtendo-se evidências da interação destes reagentes com o tensoativo.

Destes estudos, foi possível compreender melhor o comportamento do sistema e foram encontradas condições nas quais se obtêm decaimento lento da intensidade de emissão e  $I_0$  alto. Estas condições são ideais para a realização de um ensaio de determinação da capacidade anti-radicalar. O efeito do antioxidante trolox, utilizado como padrão, foi avaliado nestas condições nos sistemas baseados nos três tensoativos. Em todos os casos, observou-se correlação linear entre a concentração de trolox e a área suprimida na cinética de emissão, a qual é proporcional ao número de radicais seqüestrados pelo antioxidante. Os limites de detecção para trolox ficaram abaixo de  $1,0 \cdot 10^{-7}$  mol/L, e a faixa de linearidade é de no mínimo uma ordem de grandeza (não foram testadas concentrações superiores a  $2,0 \cdot 10^{-6}$  mol/L). No meio de reação com CTAB foram determinadas as capacidades anti-radicalares ( $n$ ) dos seguintes antioxidantes: vitamina E ( $n=3,5 \pm 0,1$ ), rutina ( $n=4,0 \pm 0,2$ ), quercetina ( $n=3,8 \pm 0,4$ ) e ácido úrico ( $n=1,3 \pm 0,1$ ). Os valores de  $n$  determinados com este método foram muito similares com aqueles medidos utilizando-se o ensaio com o radical estável DPPH $\cdot$ . Portanto, o ensaio desenvolvido com luminol em meio micelar se mostrou adequado para testar tanto substâncias hidrossolúveis como lipossolúveis.

Foram testadas condições para a realização de ensaios consecutivos com injeções repetidas de várias alíquotas de antioxidante na presença de CTAB. Os valores encontrados com o ensaio realizado desta forma foram iguais aos obtidos com o ensaio onde as injeções são feitas individualmente. Este método permite automação e resulta na economia de reagentes e redução do tempo de ensaio.

Palavras-chave: quimiluminescência, luminol, antioxidantes, tensoativo, micela, ensaio anti-radicalar.



## ABSTRACT

Santos, C. S. **Chemiluminescent Oxidation of Luminol in Micellar Media: Development of an Anti-radical Capacity Assay**. 2008. 113p. Masters Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In this work, a methodology to evaluate the anti-radical capacity of hydrophilic and lipophilic compounds based on luminol chemiluminescence in micellar media was developed. The reaction of luminol, hemin and hydrogen peroxide was studied in the presence of charged surfactants (CTAB/CTAC and SDS). The concentration of each reagent was independently varied in order to evaluate its influence on the initial emission intensity ( $I_0$ ), which is proportional to the initial reaction rate. In aqueous SDS solution,  $I_0$  showed a linear correlation with the  $H_2O_2$  concentration between  $5,0 \cdot 10^{-6}$  and  $6,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L, and with the hemin concentration between  $8,0 \cdot 10^{-9}$  and  $4,0 \cdot 10^{-7}$  mol/L. An increase in the luminol concentration between  $5,0 \cdot 10^{-7}$  and  $1,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L led to an increase in  $I_0$  up to  $5,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L, higher luminol concentrations do not further increased  $I_0$ . In the presence of CTAB,  $I_0$  increased linearly with the  $H_2O_2$  concentration in the interval studied ( $2,0 \cdot 10^{-5}$  to  $6,7 \cdot 10^{-4}$  mol/L). An increase in  $I_0$  was also observed on increasing the hemin concentration from  $8,0 \cdot 10^{-8}$  to  $8,0 \cdot 10^{-6}$  mol/L. An increase of the luminol concentration from  $5,0 \cdot 10^{-7}$  to  $5,0 \cdot 10^{-5}$  increased the observed  $I_0$ , which did not change for higher luminol concentrations. The cmc of CTAB was measured in the reaction conditions (phosphate buffer pH 11,6 and  $\mu = 0,1$ ), and the value determined,  $2 \cdot 10^{-4}$  mol/L, was five times lower than the cmc in water. The absorption spectra of hemin and luminol in different CTAB concentrations showed significant variation with the surfactant concentration, indicating an interaction between these reagents and the surfactant.

With these studies it was possible to understand well the behavior of the system and to establish experimental conditions which lead to kinetic curves with a slow emission intensity decay and relatively high  $I_0$ , ideal conditions for the performance of the anti-radical capacity assay. The effect of trolox, the antioxidant used as reference, was evaluated in this conditions in the systems based on the three surfactants. In all the cases a linear correlation between the trolox concentration and the suppressed area in the emission kinetics was observed. This area is proportional to the number of radicals trapped by the antioxidant. Detection limits for trolox were below  $1,0 \cdot 10^{-7}$  mol/L, and the linear range was at least one order of magnitude (concentrations higher than  $2,0 \cdot 10^{-6}$  mol/L were not evaluated). The antioxidant capacity ( $n$ ) was determined in the reaction medium containing CTAB for vitamin E ( $n= 3,5 \pm 0,1$ ), rutin ( $n=4,0 \pm 0,2$ ), quercetin ( $n=3,8 \pm 0,4$ ) and uric acid ( $n=1,3 \pm 0,1$ ). The  $n$  values determined by this method were very similar to those measured with the DPPH assay. Hence, the assay developed with luminol in micellar media was adequate to evaluate the anti-radical capacity of hidrosoluble as well as liposoluble compounds.

The assay conditions established in the presence of CTAB allowed the consecutive injection of antioxidant samples during the same kinetic run. The values determined in this consecutive injection assay proved to be very similar to those obtained in the assay where injections were made individually. This method allows automation, economy of reagents and reduction of assay time.

Keywords: Chemiluminescence, luminol, antioxidants, surfactant, micelle, anti-radical assay.

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\Phi_{QL}$	rendimento quântico de quimiluminescência
ABAP	2,2'-azo-bis(2-amidinopropano)
ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
cmc	concentração micelar crítica
CPC	cloreto de cetilpiridinium
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio
CTAC	cloreto de cetiltrimetilamônio
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazil
ERO	espécies reativas de oxigênio
HRP	peroxidase de raiz forte
$I_0$	intensidade inicial de emissão
IAE	intermediário de alta energia
$n$	número de radicais seqüestrados por molécula de antioxidante / capacidade anti-radicalar em relação ao trolox ( $n = 2$ )
NMA	N-metilacridona
ORAC	<i>oxygen radical absorbance capacity</i> (capacidade antioxidante frente a radicais de oxigênio)
QL	quimiluminescência ou quimiluminescente
SDS	dodecil sulfato de sódio
TEAC	<i>trolox equivalent antioxidant capacity assay</i> (capacidade antioxidante em equivalentes de trolox)
TRAP	<i>total radical-trapping potencial</i> (Potencial antioxidante total)

# SUMÁRIO

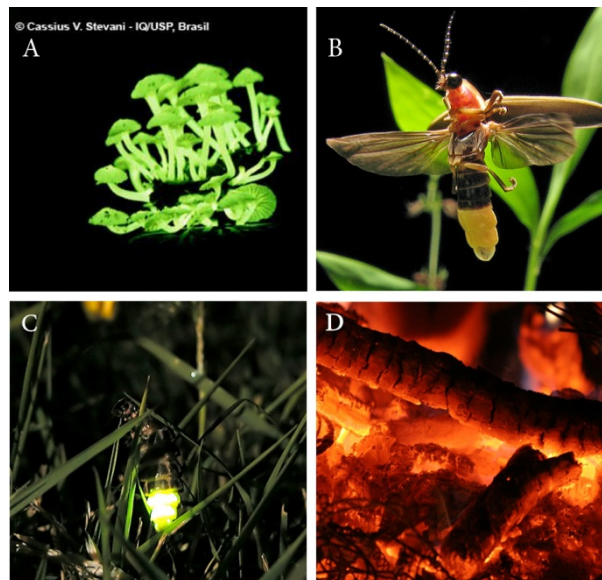
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
1.1	PRINCÍPIOS DA QUIMILUMINESCÊNCIA .....	12
1.2	A QUIMILUMINESCÊNCIA DO LUMINOL E SUA APLICAÇÃO ANALÍTICA .....	15
1.3	RADICAIS LIVRES E DEFESAS ANTIOXIDANTES .....	21
1.4	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTI-RADICALAR.....	25
1.5	SISTEMAS MICELARES E QUIMILUMINESCÊNCIA .....	30
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>35</b>
3.1	REAGENTES E SOLVENTES.....	35
3.2	INSTRUMENTAÇÃO .....	36
3.3	CINÉTICAS DE EMISSÃO.....	36
3.3.1	SOLUÇÕES UTILIZADAS.....	36
3.3.2	PROCEDIMENTO DAS MEDIDAS CINÉTICAS.....	37
3.4	DETERMINAÇÃO DA CMC DO CTAB.....	37
3.5	DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO QUÂNTICO DA OXIDAÇÃO DO LUMINOL EM CTAB .....	38
3.5.1	CALIBRAÇÃO DA FOTOMULTIPLICADORA .....	38
3.5.2	DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO QUÂNTICO .....	39
3.6	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTI-RADICALAR UTILIZANDO-SE O ENSAIO QUIMILUMINESCENTE COM LUMINOL EM MEIO MICELAR.....	40
3.6.1	SOLUÇÕES UTILIZADAS.....	40
3.6.2	PROCEDIMENTO DO ENSAIO EM CTAB E CTAC .....	40

3.6.3	PROCEDIMENTO DO ENSAIO EM SDS .....	41
3.6.4	QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTI-RADICALAR .....	41
<b>3.7</b>	<b>DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTI-RADICALAR UTILIZANDO-SE O ENSAIO COM DPPH.....</b>	<b>43</b>
3.7.1	SOLUÇÕES UTILIZADAS.....	43
3.7.2	PROCEDIMENTO DO ENSAIO .....	43
3.7.3	QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTI-RADICALAR .....	43
<b>4</b>	<b><u>RESULTADOS .....</u></b>	<b><u>45</u></b>
<b>4.1</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS QUIMILUMINESCENTES COM LUMINOL EM MEIO MICELAR.....</b>	<b>45</b>
4.1.1	CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA QUIMILUMINESCENTE DO LUMINOL EM CTAB E CTAC.....	46
4.1.2	CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA QUIMILUMINESCENTE DO LUMINOL EM SDS.....	65
<b>4.2</b>	<b>DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTI-RADICALAR.....</b>	<b>72</b>
4.2.1	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTI-RADICALAR UTILIZANDO-SE O ENSAIO QUIMILUMINESCENTE COM LUMINOL EM MEIO MICELAR .....	72
4.2.2	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTI-RADICAL UTILIZANDO-SE O ENSAIO COM DPPH .....	87
<b>5</b>	<b><u>DISCUSSÃO.....</u></b>	<b><u>91</u></b>
5.1.1	OXIDAÇÃO DO LUMINOL EM MEIOS MICELARES CATIÔNICOS DE CTAB E CTAC E ANIÔNICOS DE SDS.....	94
5.1.2	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTI-RADICALAR.....	99
<b>6</b>	<b><u>CONCLUSÕES.....</u></b>	<b><u>104</u></b>
<b>7</b>	<b><u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</u></b>	<b><u>105</u></b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Princípios da quimiluminescência

Os primeiros escritos das civilizações contém referências e mitologias sobre animais, plantas e substâncias que emitem luz (Figura 1). No entanto, foram os gregos que primeiro relataram a existência da luz “fria” (Aristóteles, 384-322 a.C.). Apesar de inúmeras descrições, foi apenas no final do século XVII que se iniciaram investigações científicas sérias sobre esse fenômeno.<sup>1</sup>



**Figura 1:** A) Bioluminescência do fungo *Mycena lucentipes*;<sup>2</sup> B) Bioluminescência do vagalume *Photinus Pyralis*; C) Bioluminescência da fêmea do vagalume *lampyrus noctiluca*; D) Incandescência em uma fogueira.<sup>3</sup>

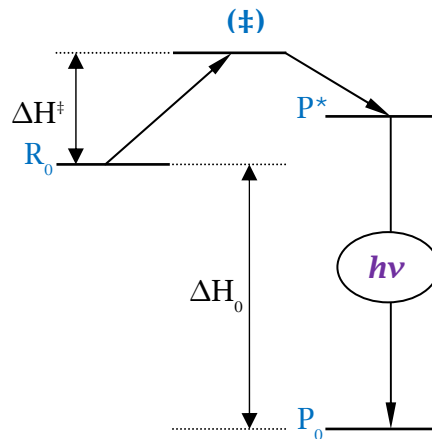
Boyle, em 1668, fez as primeiras observações sobre as diferenças entre incandescência e luminescência.<sup>1</sup> A incandescência (do latim *incandare* - tornar-se branco) é resultado do aquecimento de um corpo, e só teve seu espectro de emissão completamente explicado por Planck em 1900. Esse espectro mostra que apenas uma pequena parcela da emissão se encontra no visível, a maioria da radiação é da região do infravermelho.<sup>4</sup> Wiedemann, em 1888, propôs que uma “substância

luminescente” era a que se tornava luminosa pela ação de um agente externo, o qual não envolve um aumento apropriado de temperatura.<sup>1</sup> Ele foi o primeiro a usar o termo quimiluminescência para descrever a emissão observada durante processos químicos, e baseou-se nos experimentos conduzidos em 1877 por Radziszewski. Após sintetizar o primeiro composto orgânico quimiluminescente, a lofina (2,4,5-trifenilimidazol), Radziszewski observou que esta não emitia luz quando aquecida na ausência de oxigênio, mas produzia intensa emissão de luz quando oxidada.<sup>5</sup>

Uma reação quimiluminescente (QL) ocorre quando o produto é formado no estado excitado ( $P^*$ ) e este, ao retornar ao estado fundamental, emite radiação visível. Essa descrição refere-se à quimiluminescência chamada de direta. Pode ocorrer também de  $P^*$  não ser emissivo, mas transferir energia para uma molécula aceptora adequada que, após ser excitada, irá retornar ao estado fundamental emitindo luz. Neste caso tem-se a quimiluminescência indireta.

Não se sabe exatamente por que algumas reações levam à formação do produto em estado excitado em vez de formá-lo no estado fundamental. Entretanto, existem alguns requisitos necessários para que isso aconteça. Um deles, é que  $P^*$  seja energeticamente acessível para que possa receber a energia de quimiexcitação. Compostos carbonílicos e hidrocarbonetos aromáticos parecem ser produtos adequados a reações quimiluminescentes de compostos orgânicos em solução. Além dos produtos da reação possuírem um nível energético adequado, também é fundamental que a reação libere energia suficiente para popular esse estado.<sup>5</sup> Esse segundo critério refere-se à exotermicidade da reação, que deve estar num intervalo de 50 a 100 kcal mol<sup>-1</sup> por essa ser a energia de excitação dos cromóforos orgânicos comuns. Tal energia abrange, dentro do visível, as radiações com comprimento de onda entre 600 e 400 nm. A Figura 2 ilustra os níveis energéticos em uma reação QL.  $R_0$  é o reagente no estado fundamental, que adquire energia térmica suficiente para

originar o complexo ativado ( $\ddagger$ ), o qual se transforma no produto eletronicamente excitado ( $P^*$ ).<sup>6</sup>



**Figura 2:** Diagrama de níveis energéticos para uma reação quimiluminescente.

A intensidade da radiação emitida numa reação QL ( $I$ ) depende da velocidade dessa reação ( $dP/dt$ ) e do seu rendimento quântico ( $\Phi_{QL}$ ). Sendo o rendimento quântico igual ao produto do rendimento quântico de excitação ( $\Phi_{EX}$ ) pelo rendimento quântico de emissão do estado excitado ( $\Phi_{EM}$ ), pode-se expressar essas relações pela Equação 1.

$$I = \Phi_{QL} \frac{dP}{dt} = \Phi_{EX} \Phi_{EM} \frac{dP}{dt}$$

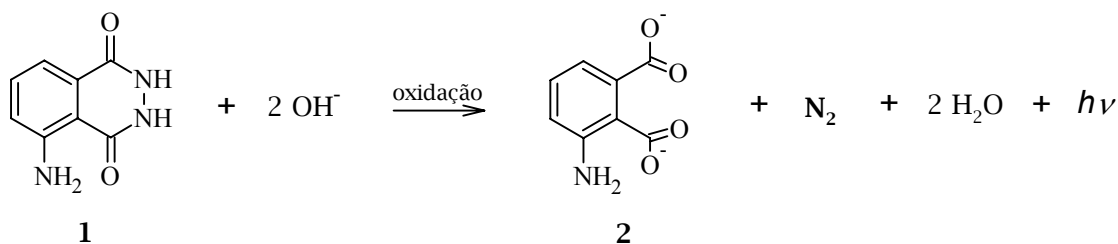
**Equação 1**



## 1.2 A quimiluminescência do luminol e sua aplicação analítica

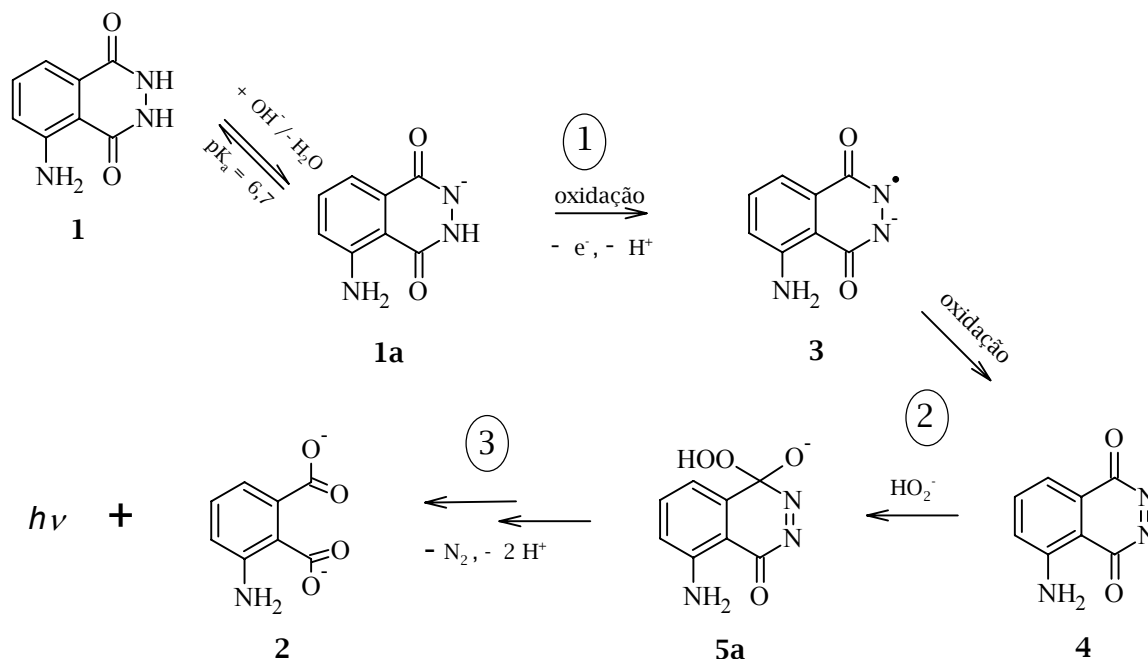
A oxidação QL do luminol tem sido alvo de inúmeros estudos desde que foi reportada pela primeira vez por Albrecht em 1928.<sup>7</sup> Os sistemas QL propostos desde então utilizam uma grande variedade de oxidantes e catalisadores, sendo dessa forma aplicados na determinação de diversas espécies orgânicas e inorgânicas. Peroxidases, em particular a extraída de raiz forte, são comumente consideradas como os catalisadores mais efetivos, trabalhando em um pH relativamente próximo do neutro (pH = 8 - 10) e tendo uma alta especificidade para um co-oxidante particular, o peróxido de hidrogênio. Essa reação é a base de imunoenaios e biosensores, pois é capaz de quantificar peroxidase ligada a qualquer entidade (proteínas, peptídios e outras biomoléculas). Além disso, é capaz de quantificar o peróxido de hidrogênio assim que é produzido por uma reação específica, por exemplo, produzido pela oxidação de glicose catalisada pela glicose oxidase.<sup>8</sup> Outro tipo comum de aplicação da quimiluminescência do luminol é na determinação de metais de transição, uma vez que esses cátions apresentam efeitos catalíticos ou inibidores (caso de algumas misturas dessas espécies) na reação de oxidação do luminol.<sup>9</sup> A determinação do potencial anti-radicalar através dessa reação também é possível, uma vez que há supressão da emissão devido ao consumo dos radicais envolvidos na reação.<sup>10</sup>

Apesar da intensa aplicação analítica, o mecanismo da oxidação do luminol não está totalmente elucidado. Sabe-se que apenas quando o luminol é oxidado sob condições alcalinas é que se observa emissão QL eficiente, e sob qualquer condição, 3- aminoftalato (2) e nitrogênio molecular são os produtos principais da reação<sup>5</sup> (Esquema 1).



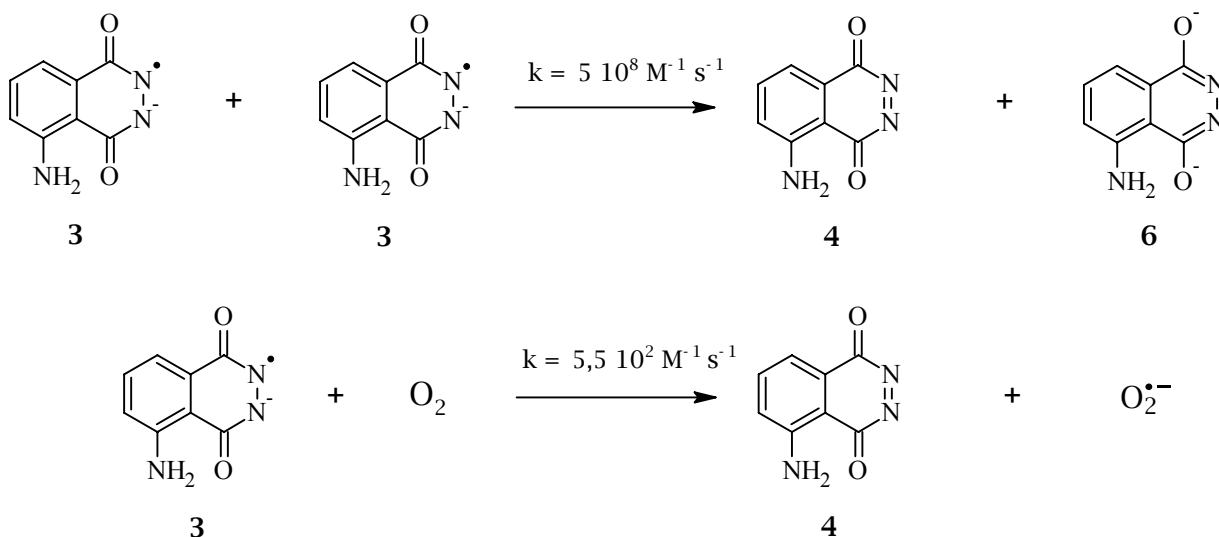
**Esquema 1:** Oxidação quimiluminescente do luminol em meio aquoso alcalino

Em meio aquoso, pode-se esquematizar o mecanismo de quimiluminescência do luminol em três etapas (Esquema 2).<sup>11</sup> Inicialmente ocorre a oxidação do ânion luminol (**1a**) a um íon radical (**3**). A retirada desse elétron pode ser feita por vários oxidantes fortes, e muitos deles desempenham papéis importantes em sistemas biológicos. Isso explica o grande número de sistemas nos quais se observa quimiluminescência do luminol e, conseqüentemente, o grande número de ensaios analíticos que utilizam essa reação. Dentre esses oxidantes estão a peroxidase de raiz forte, metais de transição como cobalto, cobre, cromo, manganês, ferro e seus complexos, e muitos radicais livres como  $N_3^\bullet$ ,  $CO_3^{\bullet-}$ ,  $Br_2^{\bullet-}$ ,  $N_3^\bullet$ ,  $ClO_2^\bullet$  e  $HO^\bullet$ .<sup>5</sup>



**Esquema 2:** Mecanismo geral da oxidação do luminol<sup>5,11</sup>

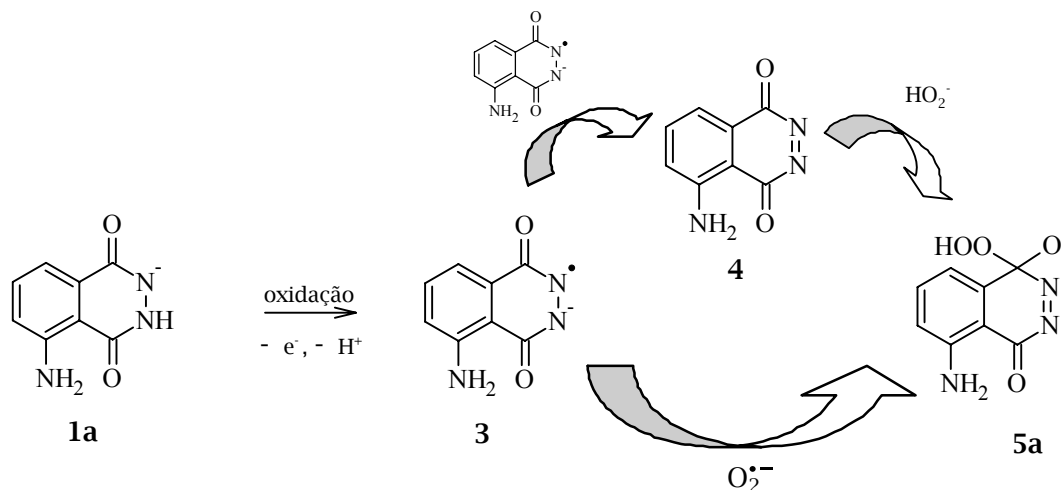
O segundo passo envolve a formação da diazoquinona (4), com posterior ataque nucleofílico do peróxido de hidrogênio mono dissociado. A diazoquinona pode ser formada de duas formas, pela rápida recombinação e disproporcionamento de dois radicais de luminol ou pela reação desse radical com oxigênio molecular. Essa segunda reação é mais lenta, tendo uma velocidade de 100 a 1000 vezes menor que a primeira se considerarmos que a concentração de radical varia de  $1 \cdot 10^{-8}$  a  $1 \cdot 10^{-7}$  mol/L (Esquema 3).<sup>5</sup> O ataque do peróxido de hidrogênio à diazoquinona leva à formação do  $\alpha$ -hidroxi-hidroperóxido (5a, Esquema 2).



**Esquema 3:** Formação de diazoquinona no mecanismo de oxidação do luminol<sup>5</sup>

O passo 2 pode também ocorrer numa única etapa, através da reação entre o radical ânion luminol (3) e superóxido.<sup>12</sup> No início da reação,  $\text{O}_2^{\bullet -}$  é normalmente ausente, e a espécie 3 será oxidada a diazoquinona. Mas através da lenta reação entre  $\text{O}_2$  e 3 (Esquema 3),  $\text{O}_2^{\bullet -}$  será gerado.<sup>12, 13</sup> Essa reação com superóxido compete com o caminho via formação de diazoquinona, e é responsável pela quimiluminescência observada quando a concentração de peróxido de hidrogênio é baixa comparada a outros nucleófilos (Esquema 4). Diazoquinonas são muito suscetíveis a ataque nucleofílico, e, dependendo da concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  poderá ocorrer principalmente adição de  $\text{OH}^-$ , caminho que não leva à emissão de luz.<sup>13, 14</sup> A

geração do  $\alpha$ -hidroxi-hidroperóxido é, portanto, fortemente dependente da exata composição do sistema, como concentrações, natureza do oxidante, aditivos, tampão e pH. Por outro lado, a decomposição desse intermediário depende apenas do pH do meio.<sup>13, 14</sup>



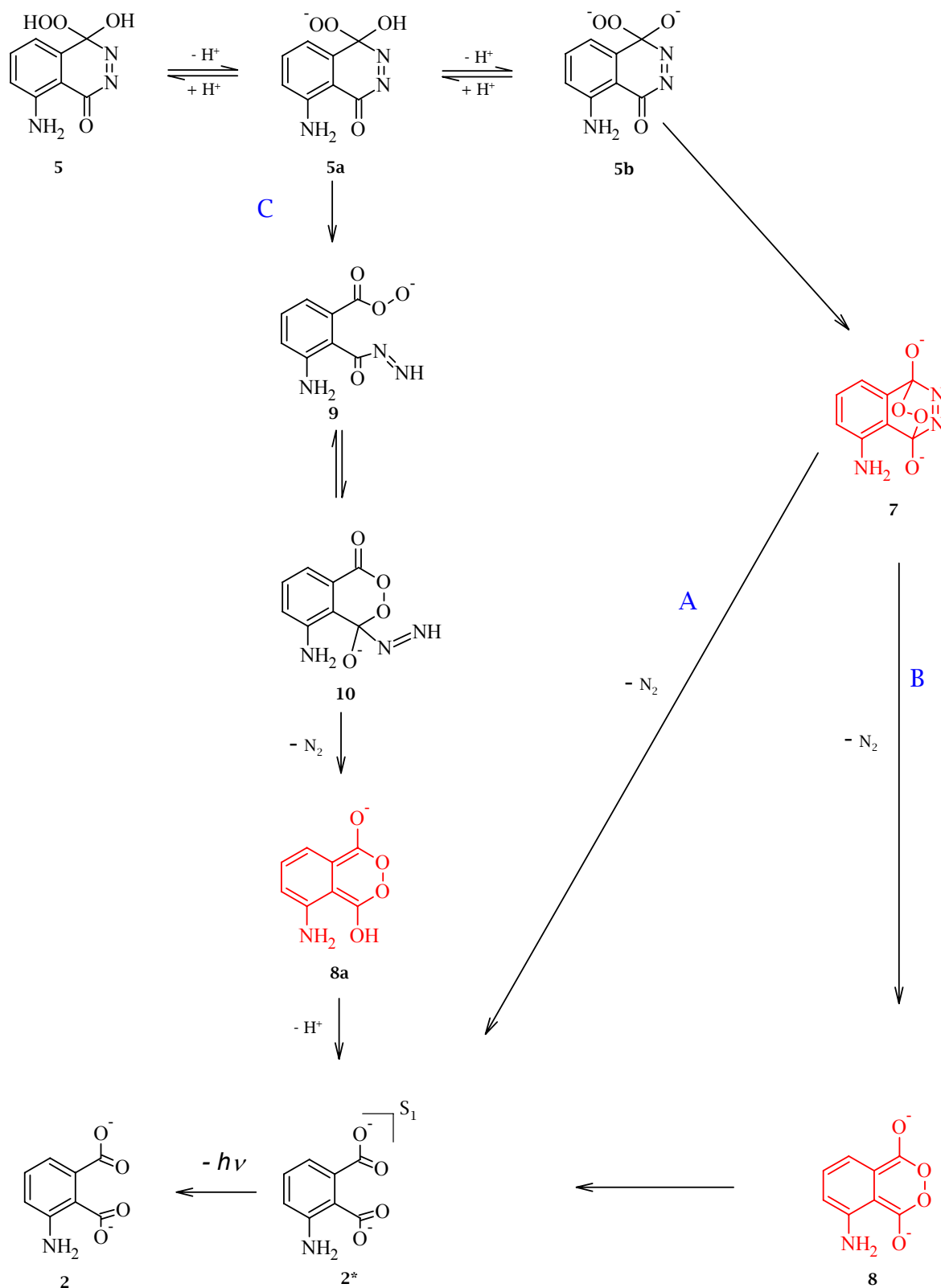
**Esquema 4:** Formação do  $\alpha$ -hidroxi-hidroperóxido no mecanismo de oxidação do luminol

As maiores dúvidas relacionadas ao mecanismo de oxidação do luminol residem na estrutura do intermediário de alta energia (IAE), que ocorre a partir da decomposição do  $\alpha$ -hidroxi-hidroperóxido (Esquema 5). Albrecht postulou que o IAE seria um endoperóxido bicíclico, e apesar de nenhuma evidência experimental ter sido encontrada para a sua existência, o endoperóxido 7 é um dos IAE mais aceitos (caminho A, Esquema 5).

No mecanismo proposto por Michl<sup>15</sup> (caminho B, Esquema 5) o endoperóxido 7 não gera 2\* num único passo, mas forma o endoperóxido antiaromático 8 através de uma reação análoga a uma reação retro-Diels-Alder. A proposta de Merényi *et al.*<sup>13, 14, 16</sup> para a etapa de quimiexcitação também envolve a formação do endoperóxido antiaromático como IAE, mas difere do mecanismo de Michl pela seqüência de reações que leva à formação deste IAE (caminho C, Esquema 5). Seguinte ao ataque do peróxido à diazoquinona, ocorre a abertura do anel. O perácido 9 formado é um excelente nucleófilo intramolecular, formando o composto cíclico 10. O

endoperóxido antiaromático **8a**, formado a partir de **10**, possui alto conteúdo energético e sua formação é possibilitada pela liberação de nitrogênio ( $N_2$ ), uma molécula extremamente estável. O resultado mais importante que corrobora com a hipótese de **8a** ser o IAE na quimiluminescência do luminol é a correlação de estado entre o estado fundamental de **8a** e o estado excitado  $2^*$ .<sup>16</sup> A identificação do  $2^*$  como a espécie emissora é baseada na equivalência entre os espectros de quimiluminescência do luminol e de fluorescência do íon **2**.<sup>5</sup>

Como visto, a reação de oxidação do luminol envolve a formação de radicais livres. As condições dessa reação podem ser modificadas de forma a se poder utilizá-la como fonte de radicais em ensaios de determinação da capacidade antioxidante, pois uma vez que a produção desses radicais for suprimida ocorre a supressão da emissão de luz.<sup>10</sup>



Esquema 5: Etapa de quimiexcitação na quimiluminescência do luminol

### 1.3 Radicais livres e defesas antioxidantes

Radicaís livres podem ser definidos, de forma abrangente, como qualquer espécie que tem um ou mais elétrons desemparelhados. Assim, a molécula de  $O_2$  pode, por essa definição, ser considerada como um radical livre, pois apresenta 2 elétrons desemparelhados em orbitais  $\pi^*$ . Esses elétrons apresentam o mesmo número quântico de spin, e por isso  $O_2$  no seu estado fundamental apenas oxidará um átomo ou molécula por recebimento de um par de elétron se estes elétrons também possuírem spins paralelos.<sup>17</sup>

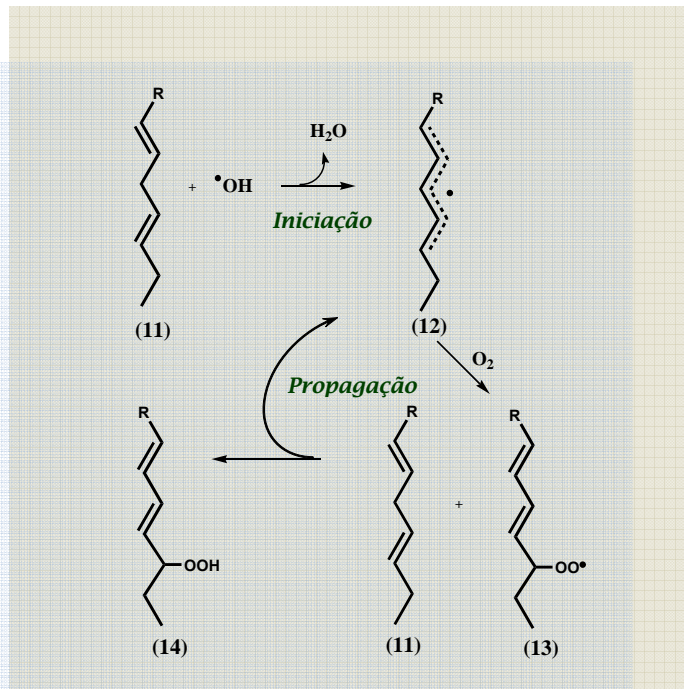
Essa restrição de spin limita a reatividade do  $O_2$  com biomoléculas, e permite que a vida se desenvolva sob uma atmosfera composta por 21% de oxigênio. Apesar de pouco reativo no estado fundamental, o oxigênio molecular pode gerar espécies mais reativas, chamadas de espécies reativas de oxigênio (ERO), como oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e os radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroperoxila ( $HO_2^{\bullet}$ ) e hidroxila ( $^{\bullet}OH$ ). Destes,  $^{\bullet}OH$  é o mais reativo, atacando a maioria dos compostos orgânicos com velocidade limitada apenas pela difusão.

Muitas estimativas sugerem que a produção de ERO no meio intracelular é principalmente proveniente da mitocôndria<sup>18</sup>, fazendo parte normal do metabolismo aeróbico. Além de atuarem nos processos de produção de energia, as ERO também estão envolvidas nos processos de fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes.<sup>19</sup> A produção de ERO pode ainda ser induzida por fatores ambientais, como os raios solares (gama e ultravioleta), raios-X, fumaça do cigarro, medicamentos e poluentes ambientais.<sup>18</sup>

Independentemente de como ou onde são geradas, se a geração das ERO não é controlada adequadamente ocorrem danos nas estruturas biológicas. Os danos mais graves são aqueles causados ao DNA e RNA. Se a cadeia do DNA é quebrada,

pode ser reconectada em outra posição alterando, assim, a ordem de suas bases. Esse é um dos processos básicos da mutação e o acúmulo de bases danificadas pode desencadear a oncogênese. Uma enzima que tenha seus aminoácidos alterados pode perder sua atividade ou, ainda, assumir atividade diferente. A oxidação de lipídios no sangue agride as paredes das artérias e veias, facilitando o acúmulo desses lipídios, com conseqüente aterosclerose, podendo causar trombose, infarto ou acidente vascular cerebral.<sup>19</sup>

Apesar de todos os componentes celulares serem suscetíveis à ação das ERO, a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica (Esquema 6). A lipoperoxidação é uma reação em cadeia que se inicia com o ataque aos lipídios da membrana (11) por qualquer espécie que tenha reatividade suficiente para abstrair um hidrogênio de um grupo metileno. Apesar de o radical lipídico formado (12) poder reagir diretamente com outras estruturas da membrana, a reação mais provável é com  $O_2$ , levando a um radical peroxil (13). A etapa de propagação refere-se à reação de 13 com outro lipídio, levando a um novo radical lipídico e um hidroperóxido (14). O término da lipoperoxidação ocorre pela aniquilação dos radicais formados originando produtos não radicalares.<sup>17</sup> A peroxidação lipídica acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos

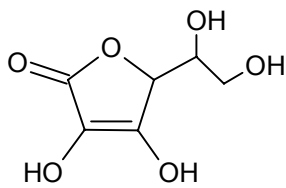


Esquema 6: Peroxidação lipídica

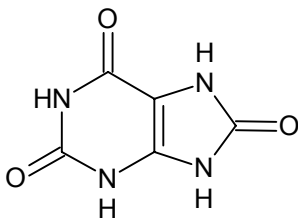


citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular. Assim como na formação das ERO, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido aracdônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória.<sup>20</sup>

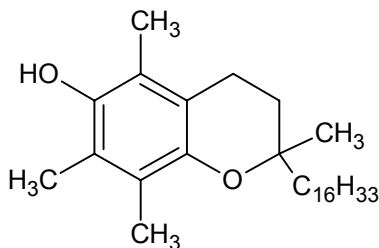
Para evitar ou reparar os danos causados por ERO o organismo possui um complexo sistema de defesa antioxidante que inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase. A SOD catalisa a conversão de superóxido em peróxido de hidrogênio, enquanto a catalase e a glutathione peroxidase convertem peróxido de hidrogênio em água. Além dessas enzimas, já bem caracterizadas, recentemente foram isolados pelo menos cinco membros de



Ácido Ascórbico



Ácido Úrico



α-Tocoferol

uma nova família de seqüestradores de peróxido, chamados peroxiredoxinas. Uma variedade de outros seqüestradores, não enzimáticos e de baixa massa molecular, são importantes na inativação de ERO.<sup>18</sup> Entre eles estão ácido ascórbico, ácido úrico, polifenóis, carotenóides, α-tocoferol (vitamina E) e glutathione, talvez o mais importante por estar presente em concentrações da ordem de milimolar dentro das células.<sup>18, 21</sup>

Dos antioxidantes não enzimáticos citados, vitamina E, ácido ascórbico, carotenóides e polifenóis não são endógenos, sendo adquiridos através da dieta. Os benefícios observados com o consumo de certos alimentos são freqüentemente associados à presença dessas substâncias e ao seu reconhecido potencial antioxidante *in vitro*. Um exemplo são as crescentes evidências de que o chá verde possui propriedades antitumorais, provavelmente por conter polifenóis. Evidências

*in vitro* sugerem fortemente que as propriedades antioxidantes são as responsáveis por tais propriedades, e numerosos estudos em animais suportam essa proposta.<sup>22</sup>

Há fortes evidências epidemiológicas de que o consumo regular de alimentos ricos em antioxidantes esteja associado a um envelhecimento saudável e à longevidade funcional. Entretanto a suplementação com vitamina E, ascorbato e  $\beta$ -caroteno não apresentou efeito semelhante na maioria dos ensaios de intervenção.<sup>23</sup> Outra controvérsia é se em grandes quantidades esses antioxidantes apresentam o mesmo efeito pró-oxidante observado *in vitro*.<sup>21</sup>

As evidências de que antioxidantes absorvidos pela dieta desempenham papel importante para prevenir o estresse oxidativo motivaram a avaliação do potencial antioxidante de várias substâncias e extratos de plantas.<sup>24-27</sup> Para isso, várias metodologias foram desenvolvidas, as quais diferem na fonte de produção de radicais, nos radicais formados e nos substratos utilizados. Rigorosamente, esses métodos medem a capacidade anti-radicalar de compostos, pois o termo antioxidante se refere a uma possível ação *in vivo*. No entanto, esses termos são comumente utilizados na literatura como sinônimos. Assim, para a conformidade, utilizamos neste texto também o termo capacidade antioxidante em casos onde ele se refere na verdade à capacidade anti-radicalar.

## 1.4 Determinação da capacidade anti-radicalar

Segundo Halliwell e Gutteridge,<sup>28</sup> um antioxidante é “uma substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas à de um substrato oxidável, retarda ou previne a oxidação desse substrato”. Por essa definição pode-se inferir que a capacidade de um antioxidante não é um valor absoluto, mas depende do meio, da fonte de estresse e do alvo (substrato oxidável). Esse é o motivo por que diferentes métodos originam diferentes valores relativos de capacidade antioxidante.

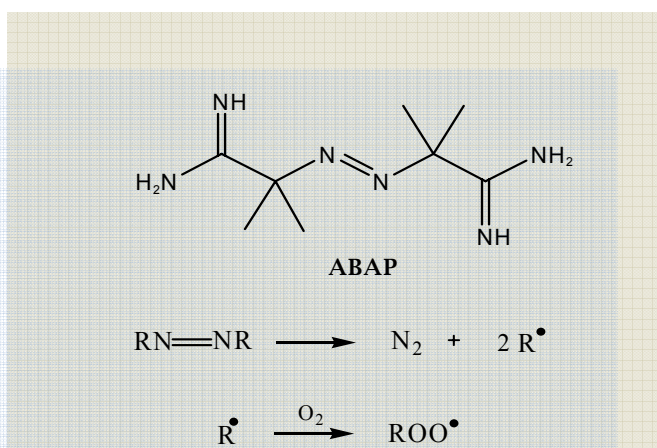
Uma grande variedade de testes tem sido utilizada na investigação e caracterização de antioxidantes.<sup>29, 30, 31</sup> Haja vista a necessidade de se ter resultados comparáveis e mais confiáveis, foi realizado em 2004 o primeiro encontro com o propósito de estabelecer procedimentos padrões para a determinação da capacidade antioxidante. Nesse congresso - *First International Congress on Antioxidant Methods*, Orlando, Junho de 2004 - foram propostos métodos que poderiam ser padronizados para a avaliação rotineira da capacidade antioxidante em alimentos, extratos botânicos, cosméticos e suplementos alimentares<sup>32,33</sup>. Apesar de não chegar a um consenso sobre qual ou quais os melhores métodos a serem adotados, foi um ponto de partida importante para a discussão de um assunto cada vez mais pertinente.

A importância dos resultados obtidos com um ensaio depende da aplicação a que se procura extendê-lo. De acordo com Prior *et al.*<sup>33, 34</sup> existem dois principais mecanismos segundo os quais ocorrem as reações envolvidas nos principais métodos de determinação de capacidade antioxidante. Um envolve transferência de hidrogênio (HAT, *hydrogen atom transfer*) e o outro transferência de elétron (ET, *electron transfer*). Apesar de muitas vezes ser difícil distinguir entre esses dois mecanismos, é importante ter em mente que o melhor antioxidante de acordo com

um método que mede capacidade de redução de íons  $\text{Fe}^{3+}$  pode não apresentar alta capacidade antioxidante num método que mede a eficiência em proteger da oxidação uma sonda fluorescente. Outros fatores que devem ser considerados ao escolher ou desenvolver um ensaio de capacidade antioxidante são: 1) utilização de uma fonte de radicais biologicamente relevante; 2) simplicidade; 3) ter o mecanismo e o ponto final definidos; 4) instrumentação facilmente disponível; 5) boa reprodutibilidade; 6) ser adaptável para antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos; 7) ser adaptável à automação para análises rotineiras de controle de qualidade.<sup>33</sup>

Apesar de nenhum ensaio poder sozinho refletir verdadeiramente a capacidade antioxidante total de uma amostra, Prior *et al.*<sup>33</sup> sugerem que dentre os muitos métodos existentes os que deveriam ser padronizados para uso extensivo são o ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*), o TEAC (*trolox equivalent antioxidant capacity assay*) e o método Folin-Ciocalteu para análise total de fenóis.

ORAC é um ensaio desenvolvido por Cao *et al.*<sup>35</sup> que tem como princípio de medida reações de oxidação induzidas por radical peroxil. No ensaio básico, radicais  $\text{ROO}^\bullet$  são produzidos pela decomposição de 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) (ABAP) e reagem com uma sonda fluorescente para formar produtos não-fluorescentes. A medida

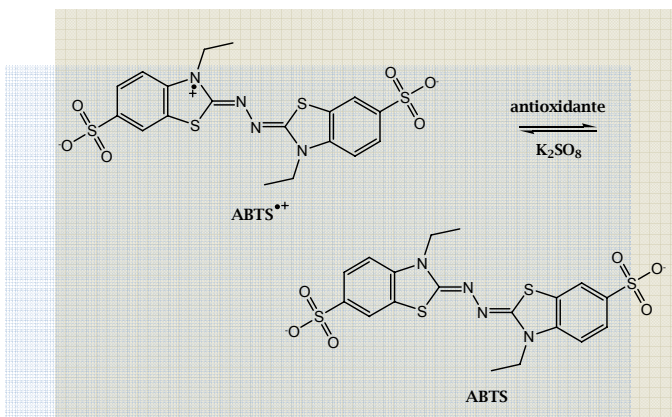


Esquema 7: Geração de radicais  $\text{ROO}^\bullet$  no ensaio ORAC

empregada para avaliar a capacidade antioxidante da amostra, definida como a concentração equivalente de trolox ( $\mu\text{mol/L}$ ), é a intensidade de fluorescência da sonda, integrada desde a adição do antioxidante até seu consumo total. As sondas utilizadas atualmente são a fluoresceína e a diclorofluoresceína. O princípio pode

ser adaptado para utilizar outras fontes de radicais e solventes, de forma a testar substâncias lipofílicas e hidrofílicas.<sup>33</sup>

O cátion radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS<sup>•+</sup>) tem um espectro de absorção característico com máximos em 415, 645, 734 e 815 nm, o qual sofre modificações (a solução inicialmente de cor azul é descorada) quando o radical é reduzido. É nessa reação que se baseia o ensaio TEAC,



Esquema 8: Reação de ABTS<sup>•+</sup> com antioxidante

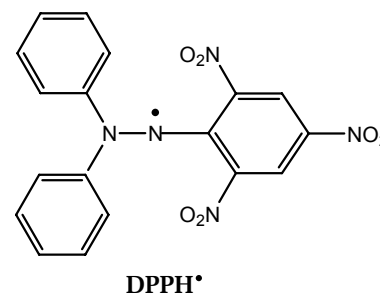
primeiramente reportado por Miller e Rice-Evans.<sup>36</sup> Originalmente, ABTS<sup>•+</sup> é gerado pela interação entre ABTS e o radical ferrilmioglobina, e a capacidade antioxidante, expressa em relação ao valor obtido com trolox, é uma medida da habilidade de um composto em reduzir o radical ABTS, embora o composto sob análise possa também reduzir os radicais ferrilmioglobina. Por isso alguns autores sugerem o uso de oxidação química de ABTS, com utilização de reagentes como dióxido de manganês ou persulfato de potássio. Por ser operacionalmente simples, esse ensaio tem sido muito utilizado. Outra vantagem desse método é que o radical é solúvel tanto em meio aquoso quanto em solventes orgânicos e não é afetado pela força iônica, podendo então ser usado em muitos meios para determinar a capacidade antioxidante de substâncias hidrofílicas e lipofílicas de extratos e fluidos corporais.<sup>33</sup>

O método de Folin-Ciocalteu tem sido utilizado há muitos anos para medir o conteúdo total de fenóis em produtos naturais. Desenvolvido em 1927,<sup>37</sup> nesse método os fenóis reagem com reagentes de oxi-redução específicos, formando um complexo de coloração azul, passível de ser quantificado por espectrofotometria no visível. O método é simples, sensível e preciso, e o composto de referência é o ácido

gálico. A desvantagem desse método é que muitas substâncias podem interferir na análise, como açúcares e aminas aromáticas, e portanto é necessário fazer a correção em relação aos interferentes.<sup>33</sup>

Talvez o ensaio mais simples, rápido e que necessita menos equipamentos seja o que utiliza o radical estável 2,2-difenil-1-pecrilidrazil (DPPH<sup>•</sup>). Ele é disponível comercialmente, e não precisa ser gerado como o ABTS<sup>•+</sup>.

A solução apresenta coloração roxa, e uma intensa banda de absorção centrada em 515 nm é observada. Esse método foi proposto por Blois<sup>38</sup> em 1958 e baseia-se na extinção dessa banda quando DPPH<sup>•</sup> é reduzido. A reação



entre um antioxidante e DPPH<sup>•</sup> é acompanhada espectrofotometricamente e um parâmetro bastante utilizado é o EC<sub>50</sub>, que corresponde à concentração da amostra que leva a uma redução da concentração de DPPH<sup>•</sup> a 50% da inicial. A principal desvantagem do método é que a reatividade do radical empregado difere fortemente da reatividade dos radicais de importância biológica, e muitos antioxidantes são praticamente inertes frente a DPPH<sup>•</sup> devido a impedimento estérico.<sup>33</sup>

A avaliação de capacidade antioxidante de extratos naturais e fluidos como o plasma sanguíneo é intrincada devido à complexidade da matriz. Para determinar o potencial antioxidante total de amostras de plasma, Wayner *et al.*<sup>39</sup> desenvolveram o método TRAP (*total peroxy radical-trapping potencial*), que avalia o tempo necessário para que todos os antioxidantes da amostra sejam consumidos. O procedimento original é baseado em medidas de tempo de indução em um sistema de oxidação de lipídeos onde radicais livres são produzidos a uma taxa constante com o emprego de ABAP como fonte de radicais livres. Para monitorar a velocidade do processo, é utilizado o consumo de oxigênio. Trolox é utilizado, também neste ensaio, como antioxidante de referência. Muitos estudos mostraram que os valores esperados de TRAP no plasma, calculados pela adição das capacidades dos

componentes individuais, são consideravelmente menores que os determinados experimentalmente. Isso pode ser explicado em termos de sinergismo entre os antioxidantes presentes ou pela contribuição de antioxidantes não conhecidos.<sup>40</sup> Por poder detectar esse tipo de fenômeno, o ensaio TRAP é sensível a mudanças no estresse oxidativo *in vivo*, o que não pode ser detectado através da medida de antioxidantes específicos. O método pode ser usado para avaliar o efeito de diferentes tratamentos na capacidade antioxidante do plasma em diferentes condições de saúde, quando então o resultado é expresso em relação a um valor basal.<sup>41</sup>

Uma modificação do ensaio TRAP original baseia-se na supressão da luz emitida em uma reação quimiluminescente pelo consumo de radicais envolvidos nessa reação. Lissi *et al.*<sup>42</sup> propuseram um método TRAP quimiluminescente baseado na oxidação do luminol usando ABAP como fonte de radicais livres. Antioxidantes na amostra inibem a quimiluminescência desse sistema por um tempo diretamente proporcional à concentração total de aditivo (tempo de indução), e a capacidade antioxidante é reportada em relação ao antioxidante padrão, trolox.<sup>43</sup>

A quimiluminescência proveniente do sistema luminol/hemina/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi anteriormente estudada por este grupo de pesquisa, e com isso foi desenvolvido um método TRAP de avaliação de capacidade anti-radicalar<sup>10</sup> que hoje está muito bem estabelecido, sendo utilizado na determinação da capacidade antioxidante de flavonóides, extratos de espécies de *Baccharis* e na relação estrutura/capacidade anti-radicalar de compostos fenólicos modelo.<sup>25</sup> Esse método baseia-se na supressão da emissão do sistema QL pela adição de substâncias com capacidade anti-radicalar, e uma de suas limitações é que é realizado em meio aquoso, onde alguns flavonóides não são solúveis.

## 1.5 Sistemas micelares e quimiluminescência

Surfactantes são compostos anfifílicos que se associam espontaneamente acima de uma concentração denominada concentração micelar crítica (cmc). Essas associações moleculares são chamadas de micelas, estruturas que contém de 30 a 200 moléculas de surfactante<sup>44</sup> e que são dinâmicas, apresentando um complexo processo de formação-colapso em que o tempo de meia-vida é da ordem de milisegundos.<sup>45</sup>

Soluções aquosas de surfactantes apresentam um alto grau de organização molecular, e isso causa mudanças marcantes nas propriedades físico-químicas e de reatividade das substâncias nela dissolvidas. Podem ser observadas mudanças espectrais, alterações em constantes de equilíbrio e de velocidade, deslocamentos de potenciais de redução, etc.<sup>46</sup> Desde que se iniciaram os estudos desses sistemas, muitas aplicações analíticas surgiram ou foram melhoradas, obtendo-se maiores sensibilidade e/ou seletividade, menores limites de detecção e solução de problemas como os relacionados à solubilidade de alguma espécie. Encontram-se aplicações em medidas eletroquímicas, espectrofotometria UV-VIS, extração líquido-líquido, espectrometria atômica de chama e plasma, pré-concentração pela técnica “cloud point”, técnicas quimiluminescentes, etc.<sup>44, 47</sup> Além de proporcionar características únicas, o uso de sistemas micelares é especialmente importante porque pode possibilitar a substituição dos solventes orgânicos tradicionais, podendo assim ser considerado parte da chamada “Química Verde”.

Os primeiros trabalhos envolvendo o emprego de ambientes micelares em reações quimiluminescentes foram reportados no começo da década de 80. Em 1982, Paleos *et al.* descreveram a influência do surfactante CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) na reação QL da lucigenina.<sup>48</sup> Os principais objetivos deste trabalho foram determinar a partição dos reagentes e intermediários no meio e



determinar se o microambiente gerado pelas micelas afetava o rendimento quântico e o espectro de emissão de quimiluminescência. A lucigenina foi oxidada por  $H_2O_2$  em meio fortemente básico, e a cinética de emissão foi acompanhada na presença e ausência de CTAB. Os principais resultados foram o aumento do rendimento quântico acima de uma concentração de CTAB aproximadamente igual à cmc e, mais importante, pela primeira vez foi registrado o espectro de emissão da N-metilacridona (NMA), que é o emissor primário nesse sistema.

Klopf *et al.*<sup>49</sup>, em 1984, demonstraram que com o uso de surfactantes poderia ser resolvido um problema comum nas análises com lucigenina, especialmente as por injeção em fluxo, relacionado à formação de produto insolúvel (NMA) e conseqüentes depósitos em cubetas e sistemas de injeção. Foram testados os surfactantes dodecil sulfato de sódio (SDS), cloreto de cetilpiridinium (CPC) e Triton X-100 em duas concentrações, uma 10 vezes maior e outra 16 vezes menor que as respectivas cmc's. Embora as soluções contendo CPC ou Triton X-100 em concentrações abaixo da cmc tenham produzido intensidades de emissão um pouco maiores que aquelas produzidas na ausência de qualquer surfactante, ainda foi observado NMA precipitado dentro de 15 min após o início da reação. Por outro lado, soluções contendo SDS ou CPC acima da cmc mantiveram NMA em solução por um longo tempo, mas a intensidade de emissão foi reduzida consideravelmente. As outras duas soluções, SDS abaixo da cmc e Triton X-100 acima da cmc, apresentaram emissão comparável ao sistema sem adição de tensoativo. Dentre elas a solução de SDS se mostrou mais adequada a essa aplicação por manter o produto em solução por 12 vezes mais tempo que na ausência de tensoativo, enquanto a solução de Triton X-100 manteve por um tempo apenas 3 vezes maior.

Muitas aplicações de sistemas micelares em quimiluminescência estão relacionadas a melhorias em sensibilidade e/ou seletividade das técnicas analíticas relacionadas. Ainda em 1984, Yamada *et al.*<sup>50</sup> mostraram que a adição de diversos

surfactantes catiônicos, especialmente sais de alquilamônio, leva a melhor sensibilidade e seletividade na determinação de cobre através da quimiluminescência da 1,10-fenantrolina. O limite de detecção obtido foi inferior a  $10^{-12}$  mol/L, e a seletividade alcançada foi tal que o sinal obtido com  $\text{Pb}^{2+}$  ( $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L) foi apenas 25% do obtido com  $\text{Cu}^{2+}$  ( $1 \cdot 10^{-8}$  mol/L). Nas aplicações envolvendo luminol, os tensoativos catiônicos são os mais utilizados. Utilizando CTAB, Abdel-Latif *et al.*<sup>51</sup> desenvolveram um método para determinação de glicose e peróxido de hidrogênio que é eficiente em um pH próximo do neutro (7,5 - 8,5), condição em que a reação QL é muito pouco eficiente em meio aquoso normal. A glicose foi quantificada em soluções padrões e em soro sanguíneo num intervalo de  $3 \cdot 10^{-7}$  a  $3 \cdot 10^{-4}$  mol/L, e o peróxido de hidrogênio num intervalo de  $2,4 \cdot 10^{-8}$  a  $1,2 \cdot 10^{-4}$  mol/L.

Hadjianestis *et al.*<sup>52</sup> investigaram a oxidação do luminol com hipoclorito na presença de CTAC (cloreto de cetiltrimetilamônio). Foram feitas medidas do rendimento quântico da reação ( $\Phi_{QL}$ ) e do rendimento quântico de fluorescência do íon 3-aminofalato ( $\Phi_F$ ) em diferentes concentrações de CTAC. O aumento da concentração de CTAC causou diminuição no  $\Phi_F$  até a concentração correspondente à cmc. As concentrações maiores testadas (até  $2,5 \cdot 10^{-2}$  mol/L) apresentaram  $\Phi_F$  constante, e todas as medidas foram conduzidas na presença de NaOCl. A diminuição no valor de  $\Phi_F$  foi atribuída a um efeito de supressão causado tanto pelo NaOCl quanto pelo surfactante. O  $\Phi_{QL}$  tem uma relação um pouco mais complexa com a concentração de CTAC, reflexo da soma de fatores como supressão física do estado excitado formado e aumento da concentração local de reagentes devido à formação das micelas. O rendimento de quimiexcitação foi calculado e apresentou valores maiores que em meio aquoso sem a presença de CTAC.

Existe também a possibilidade de usar a quimiluminescência do luminol para detectar a presença de surfactantes num dado meio. Safavi *et al.*<sup>53</sup> descreveram que a reação de luminol com N-bromosuccinimida e N-clorosuccinimida, sem a presença

---

de qualquer catalisador, emite luz com máxima intensidade num comprimento de onda igual a 425 nm. Essa reação foi então utilizada para determinar surfactantes catiônicos em análise por injeção em fluxo. O método tem as vantagens de não utilizar solvente orgânico, ser mais rápido que os métodos de extração de corantes aniônicos e apresenta ampla região linear (6 - 200  $\mu\text{mol/L}$ ). Foram testadas amostras de shampoo contendo CTAB, e os resultados foram similares aos obtidos pelo método padrão de extração pelo corante Orange II em clorofórmio.

## 2 OBJETIVOS

Os objetivos gerais desse trabalho são **a)** estudar a reação de oxidação quimiluminescente do luminol em meios micelares aquosos; **b)** definir condições experimentais que permitam a realização de ensaios de determinação da capacidade antioxidante nestes meios reacionais, a fim de se obter um ensaio que possa ser utilizado com substâncias hidro e lipossolúveis; **c)** definidas essas condições, aferir o ensaio testando compostos de reconhecida capacidade antioxidante.

## 3 PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 Reagentes e solventes

Os reagentes a seguir foram utilizados sem prévia purificação: luminol (5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona, Sigma, 97%); hemina (cloreto de ferriprotoporfirina IX, Sigma); peróxido de hidrogênio (Peróxidos do Brasil, 60% m/m); trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, Aldrich, 97%), ácido úrico (2,6,8-trihidroxipurina, Sigma, 99%); vitamina E ( $\alpha$ -tocopherol, Aldrich, 97%); rutina (trihidrato de rutina, Aldrich, 95%), quercetina (dihidrato de quercetina, Aldrich, 98%); pireno (Aldrich, 99%); DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil, Sigma).

CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio, Aldrich, 99%) e SDS (dodecil sulfato de sódio, BDH laboratory reagents, 99%) foram recristalizados de etanol em ebulição, deixando cristalizar a 25°C. CTAB foi filtrado a vácuo e seco a 40°C sob pressão reduzida (3 mmHg) e SDS foi recristalizado duas vezes, filtrado a vácuo e seco a temperatura ambiente sob pressão reduzida (3 mmHg). CTAC (cloreto de cetiltrimetilamônio, Aldrich), recristalizado de acetona, foi doado pelo professor Omar Abou El Seoud (IQUSP).

Etanol (Synth, 99,5%) foi tratado com  $Mg^0$  e  $I_2$  e destilado. Foi empregada água desmineralizada no preparo das soluções (18 M $\Omega$ , Milli-Q, Millipore) e os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e usados sem purificação adicional.

## 3.2 Instrumentação

As cinéticas de emissão foram acompanhadas utilizando-se um espectrofluorímetro Hitachi F-4500 com a tensão da fotomultiplicadora de 900 V, fenda de 20 nm e grade na posição de espelho (nesta condição, não há separação espectral da luz incidente e todos os comprimentos de onda de emissão são registrados pela foto-multiplicadora). Os espectros de fluorescência foram obtidos no espectrofluorímetro Hitachi F-4500 e em um espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse. Os espectros de absorção foram obtidos usando um espectrofotômetro UV-visível Shimadzu Multispect 1500. As cinéticas do ensaio com DPPH foram realizadas em um espectrofotômetro Varian Cary 50 Probe, com *cell holder* com espaço para 18 cubetas.

## 3.3 Cinéticas de emissão

### 3.3.1 Soluções utilizadas

A solução estoque de luminol ( $1,0 \cdot 10^{-2}$  mol/L) foi preparada dissolvendo-se 45 mg de luminol em 25 mL de solução de  $\text{NaOH}_{(aq)}$  1,0 mol/L, e sua concentração exata determinada espectrofotometricamente em 347 nm ( $\epsilon = 7,60 \cdot 10^3$  L/mol cm).

Hemina ( $8,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L) foi preparada dissolvendo-se 2,5 mg de hemina em 5 mL de  $\text{NaOH}_{(aq)}$  1,0 mol/L, e sua concentração final foi determinada espectrofotometricamente em 385 nm ( $\epsilon = 5,84 \cdot 10^4$  L/mol cm)<sup>54</sup>. Essa solução foi guardada sob abrigo da luz e utilizada por no máximo sete dias.

A solução estoque de peróxido de hidrogênio (cerca de 1,0 mol/L) foi preparada a partir de uma solução 60% (21,2 mol/L), diluindo-se 1 mL dessa solução em 20 mL de água. A concentração exata foi determinada espectrofotometricamente conforme procedimento descrito por Cotton e Dunford<sup>55</sup>: numa cubeta de quartzo

foram adicionados 3 mL de uma solução de iodeto de potássio 0,05 mol/L em tampão acetato (pH 3,8, 0,1 mol/L), 6  $\mu$ L de uma solução de peroxidase HRP VI (Sigma, 1 mg/mL) e 6  $\mu$ L da amostra de peróxido de hidrogênio diluída 100 vezes. Nesse método, a quantidade de iodeto oxidado é proporcional à concentração de peróxido, cuja concentração se obtém diretamente pela absorvância em 353 nm ( $\epsilon = 2,55 \cdot 10^4$  L/mol cm) da espécie  $I_3^-$  formada.

As soluções de CTAB, CTAC e SDS foram preparadas em tampão fosfato ( $Na_3PO_4/Na_2HPO_4$  0,01 mol/L) pH 11,6, com pelo menos 2 horas de antecedência.

Todas as soluções estoques foram estocadas a 4°C por no máximo dez dias, e as soluções preparadas a partir delas foram utilizadas somente no dia de sua diluição.

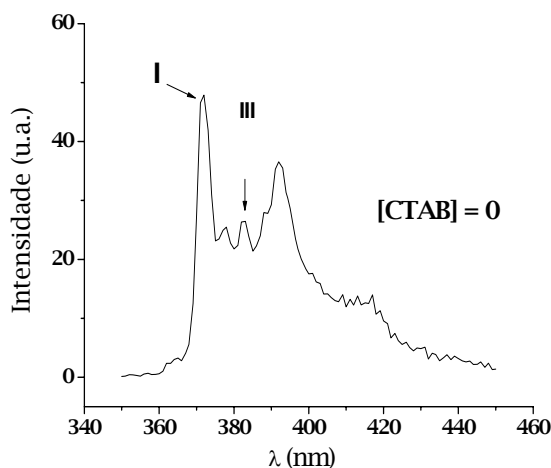
### 3.3.2 Procedimento das medidas cinéticas

Em uma cubeta de quartzo de 10 mm com agitação magnética e termostatizada a 25,0 °C foram adicionados 1940  $\mu$ L de solução de tensoativo, 20  $\mu$ L de solução de luminol e 20  $\mu$ L de solução de hemina. A reação foi iniciada com 20  $\mu$ L da solução de peróxido de hidrogênio. Esses experimentos foram conduzidos com diferentes concentrações de tensoativo, luminol, hemina e peróxido de hidrogênio.

## 3.4 Determinação da cmc do CTAB

Uma solução saturada de pireno foi preparada em água ou tampão fosfato. Com essa solução foram preparadas soluções de CTAB em diversas concentrações, as quais foram mantidas no escuro por pelo menos 2 horas para estabilizar. Os espectros de fluorescência foram obtidos excitando essas amostras em 332 nm e varrendo a emissão de 350 a 450 nm.

O método para determinar a cmc consiste em relacionar a concentração do tensoativo utilizado com as mudanças no espectro de fluorescência do pireno, em particular a razão entre as intensidades das bandas I, em 373 nm, e III, em 384 nm (Figura 3).



**Figura 3:** Espectro de fluorescência de pireno em água. [pireno] < 10<sup>-6</sup> mol/L (saturação em água); λ<sub>excit</sub> = 332 nm

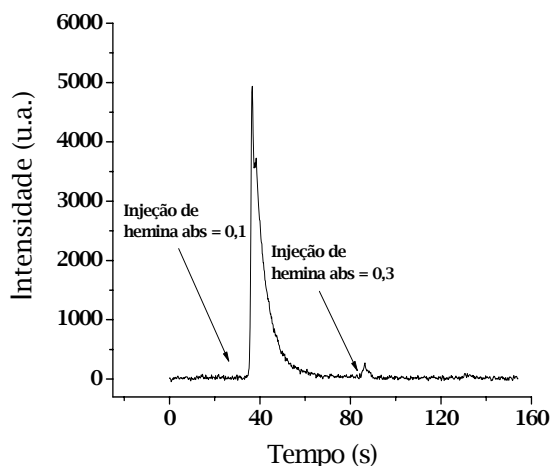
### 3.5 Determinação do rendimento quântico da oxidação do luminol em CTAB

#### 3.5.1 Calibração da fotomultiplicadora

Para a determinação do rendimento quântico utilizou-se o método descrito por Lee *et al.*<sup>56</sup>: numa cubeta adicionou-se 1750 μL de tampão fosfato pH 11,6, 100 μL de solução de luminol (preparado em NaOH 0,01 mol/L e diluído até concentração conveniente em tampão fosfato) e 150 μL de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1%. A reação foi disparada com 100 μL de solução de hemina de absorvância igual a 0,1 em 414 nm (preparada em NaOH 1 mol/L). Após o final da emissão foram adicionadas alíquotas de 100 μL de hemina de absorvância igual a 0,3 até não se observar mais emissão. Esse ensaio foi realizado no mínimo 5 vezes para cada



condição do fluorímetro e em dias diferentes ao longo do trabalho. Na Figura 4 tem-se uma curva obtida utilizando-se esse procedimento.



**Figura 4:** Cinética de oxidação do luminol utilizada no ensaio de calibração.  $n_{lum} = 2 \cdot 10^{-11}$  mol,. Condições do fluorímetro: 20 nm/950V.

A área total sob a curva ( $\int Idt$ ) foi utilizada para calcular o fator de correção da fotomultiplicadora ( $Fcf$ ). Esse cálculo foi realizado utilizando-se a Equação 2, onde  $n_{lum}$  é o número de mols de luminol utilizado e  $\phi_{lum}$  o rendimento quântico da oxidação do luminol sob as condições do ensaio, e é igual a 0,0124.<sup>57</sup>

$$Fcf = \frac{\phi_{lum} \cdot n_{lum}}{\int Idt}$$

**Equação 2**

### 3.5.2 Determinação do rendimento quântico

Para calcular o rendimento quântico da reação do luminol em CTAB foram usadas as mesmas soluções e procedimento empregados na calibração, apenas substituindo o tampão fosfato por CTAB  $1,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L (preparada em tampão fosfato) e ajustando-se o número de mols de luminol e o tempo de aquisição dos dados. Com o fator de correção da fotomultiplicadora já determinado, o rendimento

quântico foi determinado pela Equação 2, onde  $\int Idt$  é a área sob a curva obtida nesse experimento.

## 3.6 Determinação da capacidade anti-radicalar utilizando-se o ensaio quimiluminescente com luminol em meio micelar

### 3.6.1 Soluções utilizadas

As soluções de trolox, quercetina, rutina e ácido úrico foram preparadas em solução de NaOH 0,01 mol/L saturada com nitrogênio (borbulhando  $N_2$  nas soluções por cerca de 10 min). A solução de vitamina E foi preparada em etanol e sua concentração exata determinada espectrofotometricamente em 292 nm ( $\epsilon = 3,174$  L/mol cm)<sup>58</sup>. Essas soluções foram preparadas no mesmo dia em que foram utilizadas e conservadas a 0°C sob abrigo da luz.

### 3.6.2 Procedimento do ensaio em CTAB e CTAC

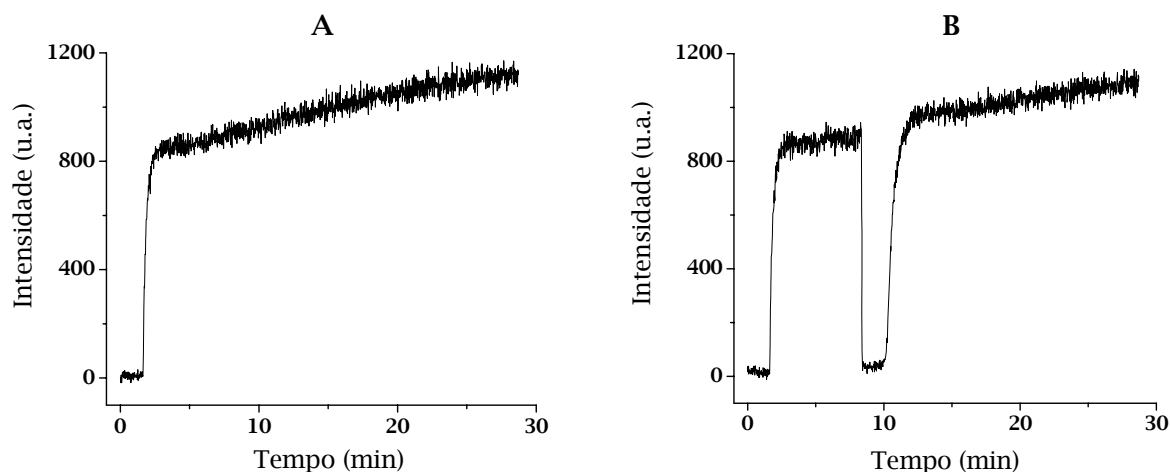
Após o estabelecimento de um sistema padrão, os ensaios para determinação da capacidade anti-radicalar foram executados com solução de concentração  $1,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L de CTAB e  $1,0 \cdot 10^{-2}$  mol/L de CTAC. Na cubeta contendo 1920  $\mu$ L de surfactante foram adicionados 20  $\mu$ L de luminol  $1,0 \cdot 10^{-2}$  mol/L e 20  $\mu$ L de hemina  $8,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L. Após termostatização, a reação foi iniciada pela adição de 20  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio  $1,0 \cdot 10^{-2}$  mol/L. A solução de peróxido foi injetada aproximadamente 100 s após o começo da aquisição de dados, pois estando o fluorímetro operando em condições de máxima sensibilidade, foi necessário corrigir a intensidade em relação à linha base em todos os experimentos. A solução de antioxidante (20  $\mu$ L) foi injetada em  $t = 500$  s, e a emissão monitorada por até 40 minutos.

### 3.6.3 Procedimento do ensaio em SDS

O ensaio anti-radicalar nesse meio foi realizado em SDS  $1,2 \cdot 10^{-2}$  mol/L. Na cubeta contendo 1920  $\mu$ L de surfactante foram adicionados 20  $\mu$ L de luminol  $1,0 \cdot 10^{-2}$  mol/L e 20  $\mu$ L de hemina  $8,0 \cdot 10^{-6}$  mol/L. Após termostatização, a reação foi iniciada pela adição de 20  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio  $1,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L, 100 s após o começo da aquisição de dados. A solução de antioxidante (20 $\mu$ L) foi injetada em  $t = 200$  s, e a emissão monitorada por até 40 minutos.

### 3.6.4 Quantificação da capacidade anti-radicalar

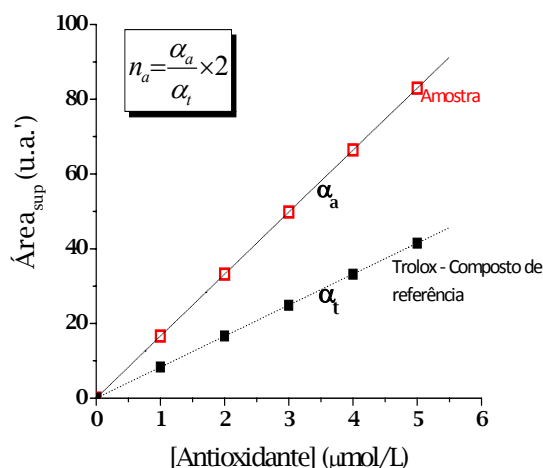
Quando substâncias com capacidade anti-radicalar são adicionadas ao sistema luminol/hemina/ $H_2O_2$ /tensoativo, observa-se uma supressão na emissão. A Figura 5 mostra a cinética de emissão desse sistema na presença de CTAB e o efeito da adição de trolox.



**Figura 5:** Ensaio anti-radicalar baseado no sistema luminol/hemina/ $H_2O_2$ /CTAB. A): Cinética de emissão sem adição de antioxidante; B): Efeito da adição de trolox  $1,0 \cdot 10^{-7}$  mol/L.

A área suprimida é proporcional à concentração do antioxidante e de sua capacidade anti-radicalar. A integração foi feita com o tempo da cinética em segundos e a área obtida foi multiplicada por um fator de  $10^4$  e expressa em

unidade arbitrárias linha (u.a.'), para diferenciar da unidade de intensidade de emissão expressa em unidade arbitrárias (u.a.). Essa área deve apresentar correlação linear com a concentração do antioxidante utilizado. Na Figura 6 é mostrada essa relação para o trolox e uma amostra genérica.



**Figura 6:** Relação entre concentração de antioxidante e área de supressão; cálculo do parâmetro  $n$ .

O coeficiente angular obtido do ajuste da correlação entre a área de supressão e a concentração de trolox ( $\alpha_t$ ) é proporcional, por definição, a 2,<sup>59</sup> ou seja, uma molécula de trolox pode seqüestrar dois radicais. O coeficiente angular obtido da amostra ( $\alpha_a$ ) é utilizado para calcular o parâmetro  $n$ , que é o número de radicais seqüestrados por molécula de antioxidante.

## 3.7 Determinação da capacidade anti-radicalar utilizando-se o ensaio com DPPH

### 3.7.1 Soluções utilizadas

Uma solução estoque de DPPH ( $\sim 1,6 \cdot 10^{-3}$  mol/L ) foi preparada em etanol e filtrada com filtro Milli Q. A concentração exata foi determinada espectrofotometricamente utilizando-se  $\epsilon = 1,09 \cdot 10^4$  em 515 nm. A solução de trabalho ( $8,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L) foi preparada por diluição direta na cubeta.

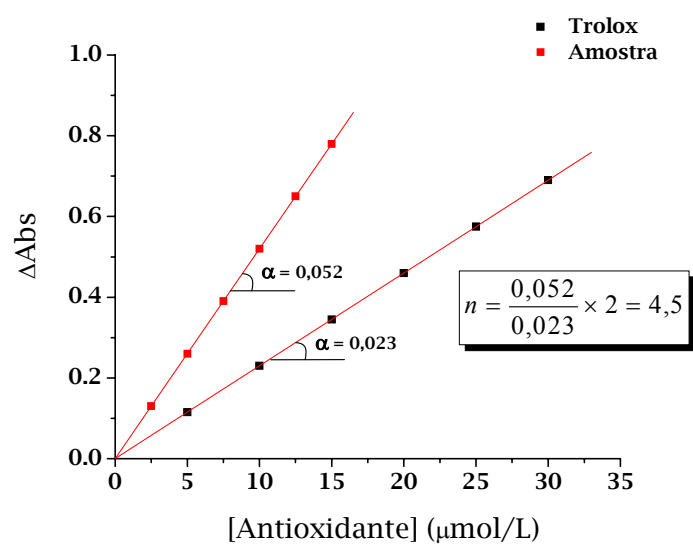
As soluções dos antioxidantes foram preparadas em etanol no dia do experimento e mantidas a 0 °C sob abrigo da luz.

### 3.7.2 Procedimento do ensaio

Numa cubeta contendo 2900  $\mu$ L de DPPH em etanol foram adicionados 100  $\mu$ L de solução de antioxidante. O decréscimo na absorvância foi acompanhado monitorando-se a absorvância em 515 nm até esta ficar constante ( $A_r$ ), usualmente por 30 minutos. A concentração exata de DPPH foi determinada adicionando-se nessa cubeta, em vez de antioxidante, 100  $\mu$ L de etanol e medindo a absorvância em 515 nm ( $A_i$ ).

### 3.7.3 Quantificação da capacidade anti-radicalar

Os valores de  $n$ , número de radicais de DPPH seqüestrados por molécula de antioxidante, foram obtidos considerando  $n$  igual a 2 para o trolox e comparando as inclinações das retas obtidas quando se plotou  $\Delta$ Abs ( $A_i - A_r$ ) em função da concentração de antioxidante. Na figura abaixo é apresentado o exemplo do cálculo de  $n$  para uma amostra genérica.



**Figura 7:** Correlação entre a variação na absorvância ( $\Delta Abs$ ) e a concentração de antioxidante no ensaio com DPPH.

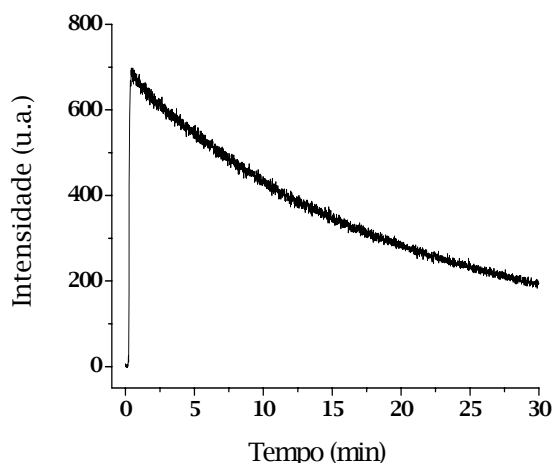
## 4 RESULTADOS

A reação do luminol com peróxido de hidrogênio e hemina foi realizada em meios micelares de CTAB, CTAC e SDS. A cinética de emissão foi acompanhada e foram fixadas condições experimentais para a realização de um ensaio de determinação da capacidade anti-radicalar.

Foram realizados experimentos sistemáticos para a caracterização dos sistemas, mais detalhadamente para a reação em CTAB, e os valores de capacidade antioxidante encontrados com o ensaio desenvolvido foram comparados com a capacidade antioxidante determinada pelo ensaio com DPPH, amplamente utilizado atualmente.

### 4.1 Caracterização dos sistemas quimiluminescentes com luminol em meio micelar

Utilizou-se como meio reacional soluções de tensoativo em tampão fosfato pH 11,6, pois apenas quando o luminol é oxidado sob condições alcalinas é que se observa emissão quimiluminescente eficiente.<sup>5</sup> A influência dos reagentes na cinética de emissão foi verificada com o objetivo de se encontrar as condições experimentais que produzam uma concentração de radicais constante. Utilizou-se como modelo a cinética de emissão do ensaio quimiluminescente em meio aquoso desenvolvido anteriormente por esse laboratório (Figura 8).<sup>10, 60</sup>



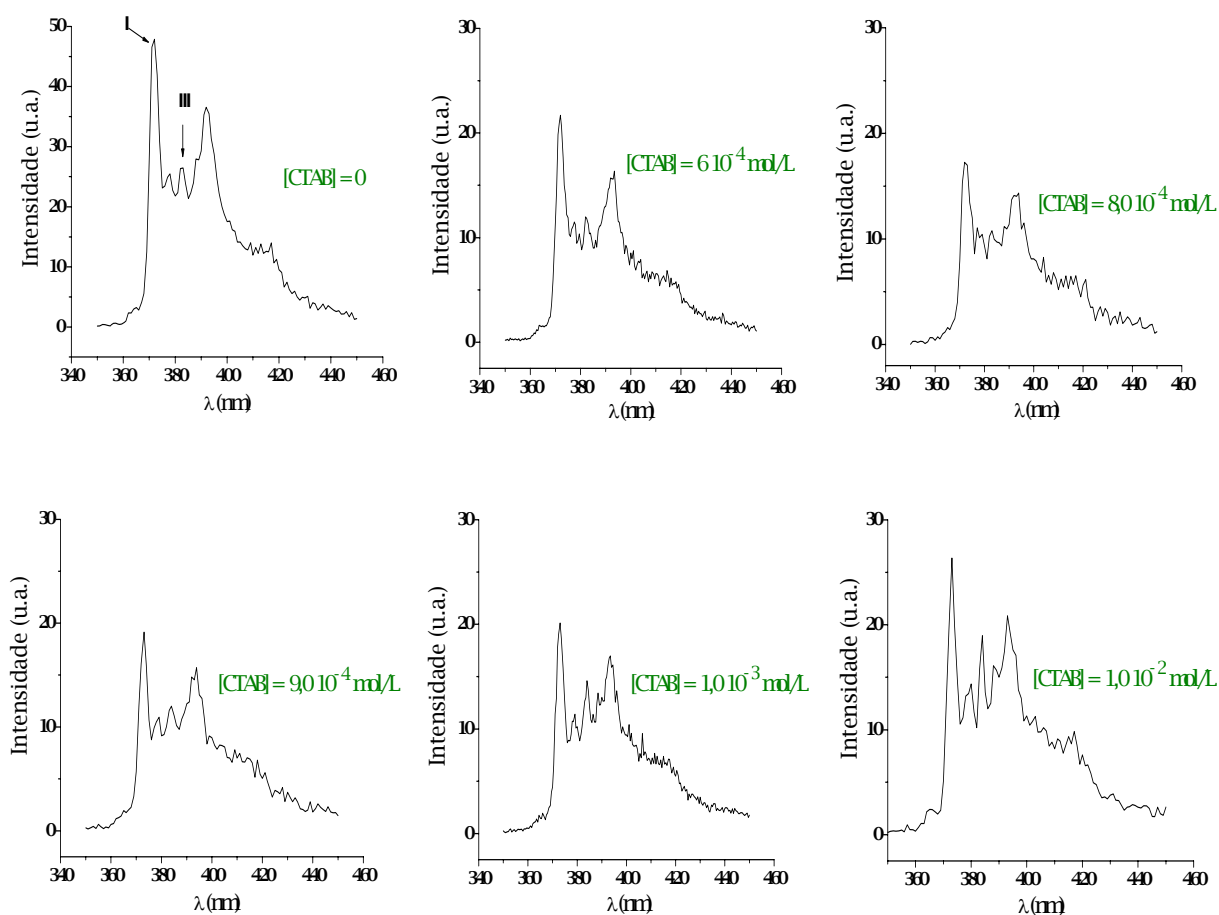
**Figura 8:** Cinética de emissão do ensaio anti-radicalar baseado no sistema luminol/hemina/ $H_2O_2$ .  $[luminol] = 1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L,  $[hemina] = 8,0 \cdot 10^{-8}$  mol/L;  $[H_2O_2] = 1,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L, em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ) pH 11,6.

#### 4.1.1 Caracterização do sistema quimiluminescente do luminol em CTAB e CTAC

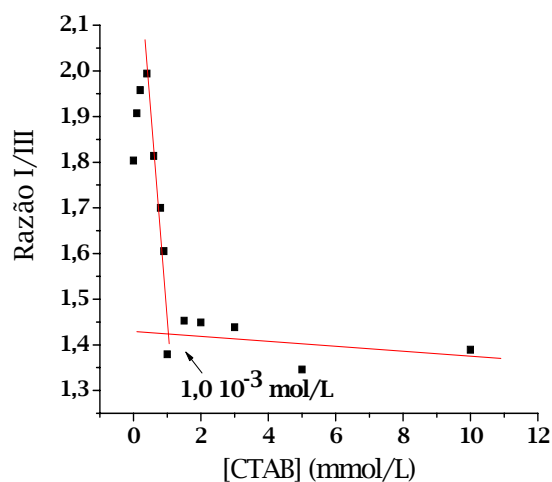
##### *Determinação da cmc do CTAB em água e tampão fosfato*

O estudo em CTAB foi iniciado com a determinação da cmc desse tensoativo no meio reacional (tampão fosfato pH 11,6). Sabe-se que a presença de sais diminui a cmc, e esse efeito foi mensurado através da fluorescência do pireno. Primeiramente determinou-se a cmc em água, a fim de comparar com os resultados já reportados. Foram registrados espectros de pireno em solução de CTAB em água (alguns são mostrados na Figura 9) e medidas as intensidades dos picos I e III (Figura 9A). A razão entre esses picos depende da polaridade do meio, e fica aproximadamente constante em concentrações de CTAB maiores que a cmc (Figura 10).



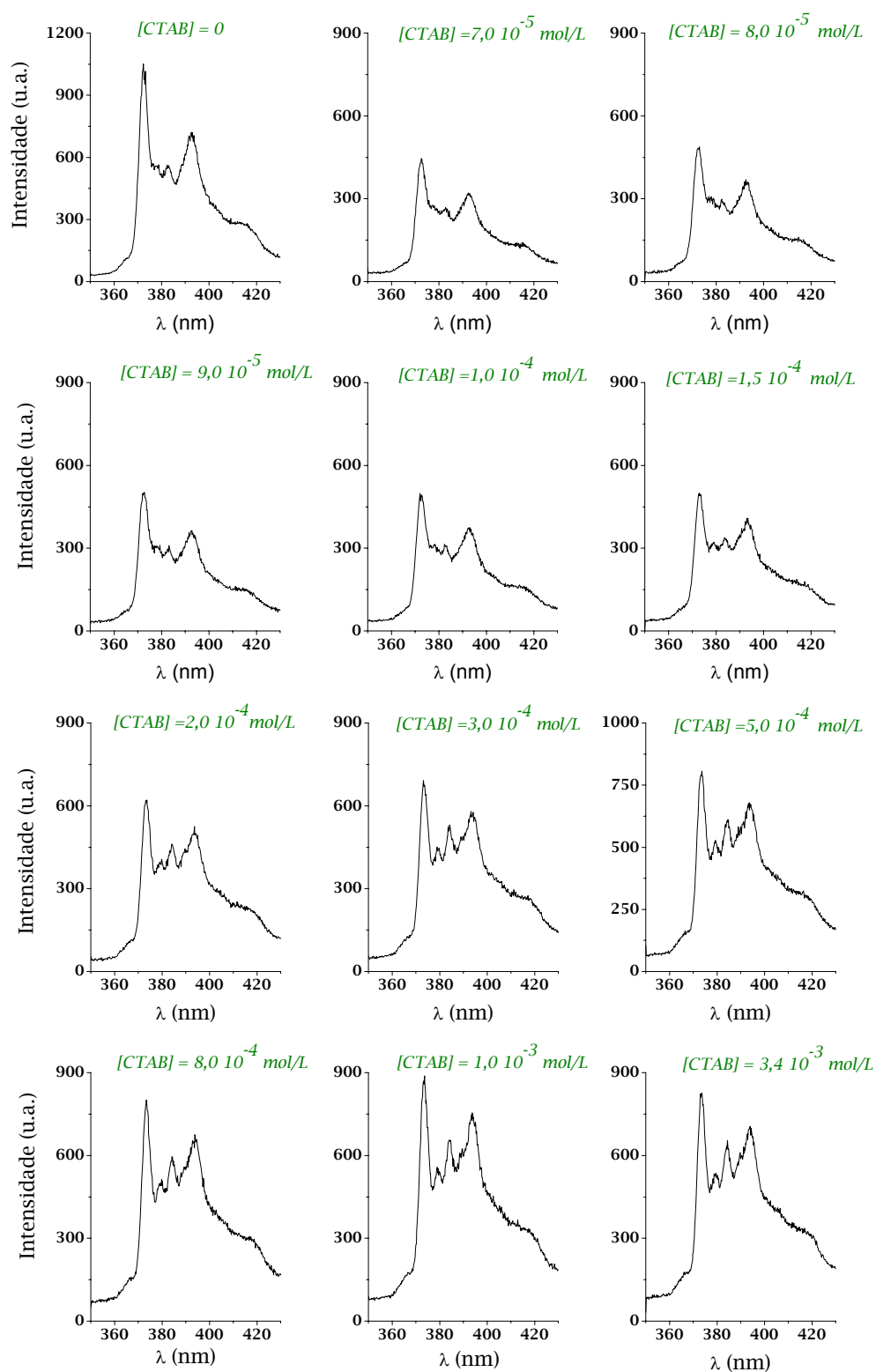


**Figura 9:** Espectros de fluorescência de pireno em água na presença de CTAB.  $[\text{pireno}] < 10^{-6}$  mol/L (saturação em água);  $\lambda_{\text{excit}} = 332$  nm.

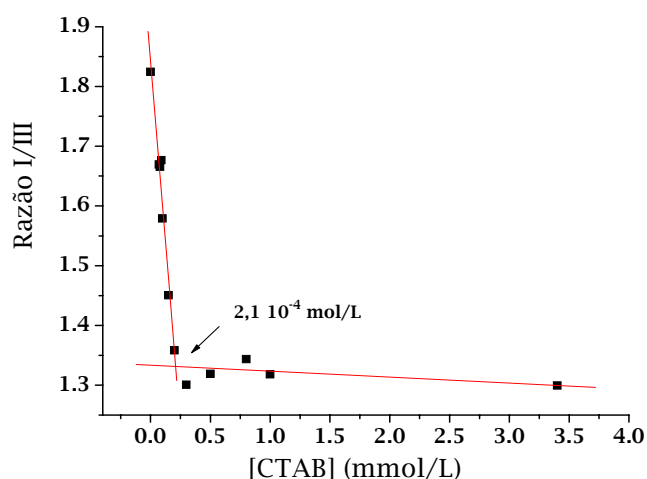


**Figura 10:** Razão entre os picos I e III do espectro de fluorescência do pireno em função da concentração de CTAB em água.

Os resultados obtidos para a determinação da cmc em água mostraram concordância com os resultados obtidos com o mesmo método e reportados na literatura.<sup>61,62</sup> Assim, utilizando-se o mesmo procedimento determinou-se a cmc em tampão fosfato. A Figura 11 mostra os espectros de fluorescência de pireno em tampão fosfato na presença de diferentes concentrações de CTAB. A relação entre a intensidade dos picos I e III mostra variação considerável com a concentração de CTAB até cerca de  $2 \cdot 10^{-4}$  mol/L e mantém-se constante para concentrações maiores (Figura 12). Do intercepto entre as retas obtidas por ajuste linear das duas regiões obtém-se o valor de cerca de  $2 \cdot 10^{-4}$  mol/L para a cmc do CTAB no tampão utilizado.



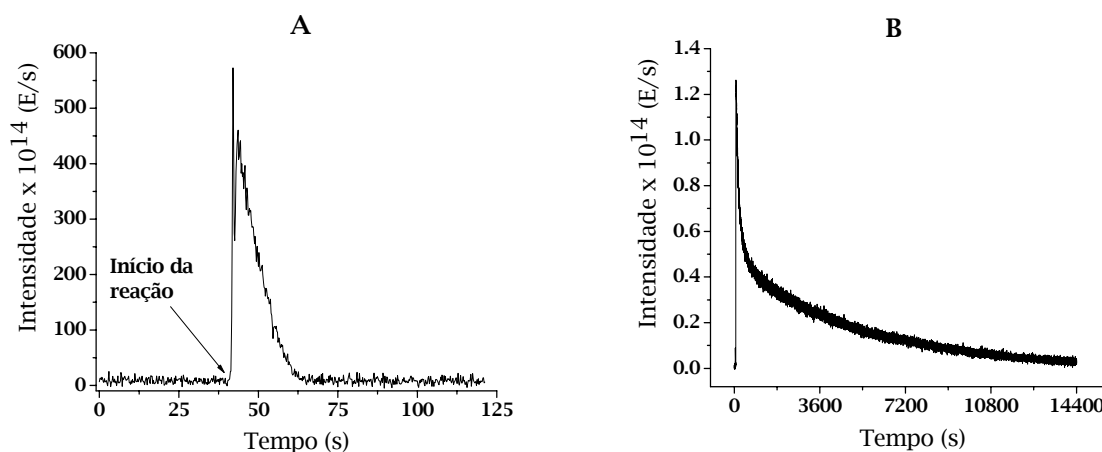
**Figura 11:** Espectros de fluorescência de pireno em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ; pH 11,6) na presença de CTAB.  $[\text{pireno}] < 10^{-6} \text{ mol/L}$  (saturação em água);  $\lambda_{\text{excit}} = 332 \text{ nm}$ .



**Figura 12:** Razão entre os picos I e III do espectro de fluorescência do pireno em função da concentração de CTAB em tampão fosfato.

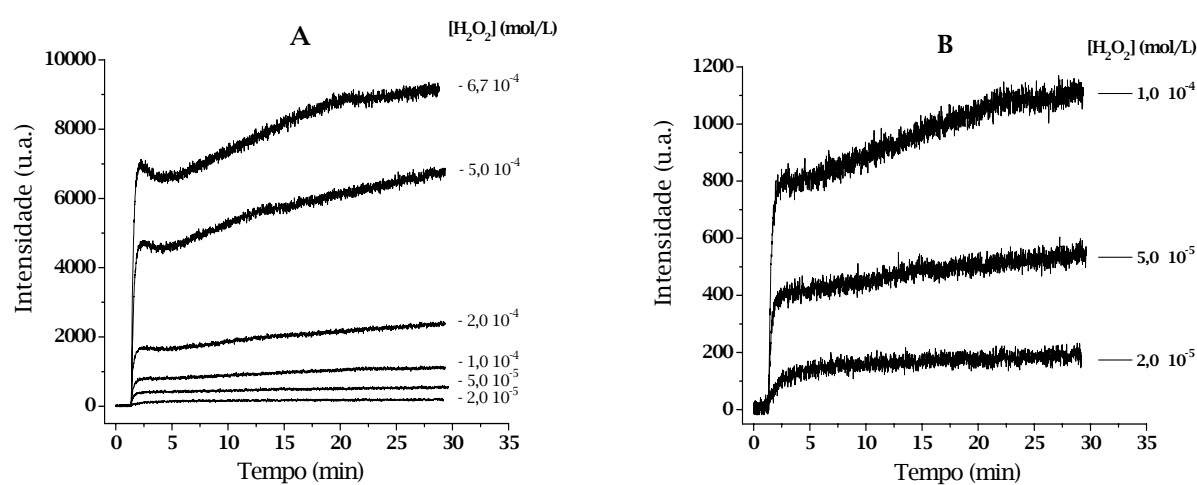
### *Estudos cinéticos da oxidação do luminol em CTAB*

A concentração de CTAB escolhida para a realização dos experimentos foi  $1,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L. Acompanhando-se a cinética de emissão na ausência e presença de CTAB (Figura 13A e Figura 13B, respectivamente) observou-se que a intensidade de emissão e a velocidade da reação diminuem na presença desse tensoativo.

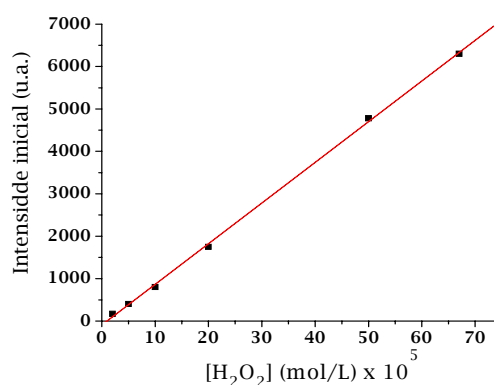


**Figura 13:** Cinética de emissão da reação do luminol com  $H_2O_2$  e hemina na A) ausência e B) presença de CTAB  $1,0$  mmol/L. [luminol] =  $2,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L, [hemina] =  $8,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L;  $[H_2O_2]$  =  $5,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ) pH 11,6.

O estudo cinético foi realizado variando a concentração de cada reagente enquanto se mantinha fixa a dos demais. Iniciou-se esse estudo variando-se a concentração de peróxido de hidrogênio. Foram utilizadas concentrações na faixa de  $2,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L a  $6,7 \cdot 10^{-4}$  mol/L (Figura 14), e a partir das curvas obtidas relacionou-se a concentração de peróxido de hidrogênio com a intensidade inicial de emissão, o que mostrou a existência de uma correlação linear (Figura 15).

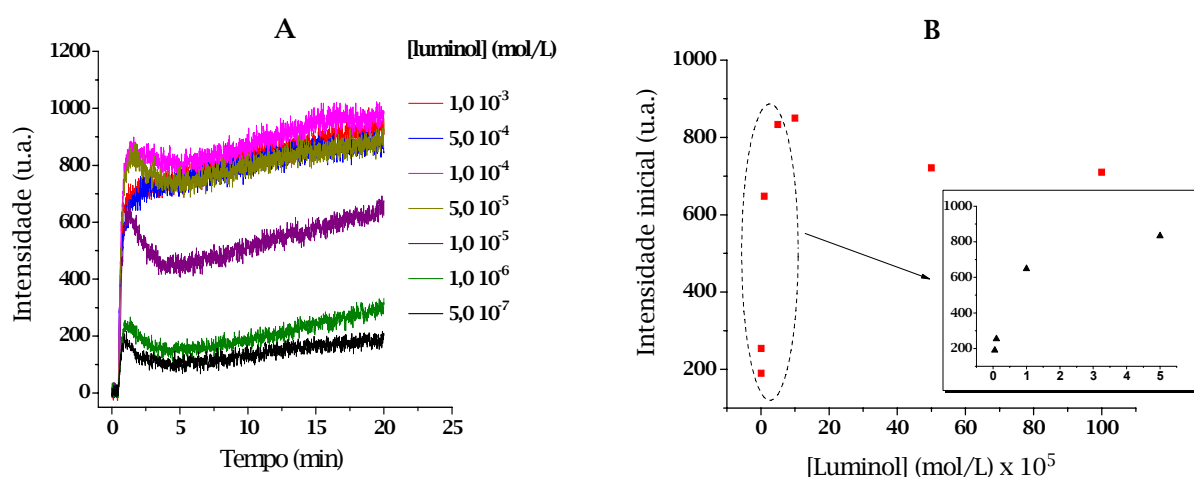


**Figura 14:** A) Cinética de emissão do sistema luminol/hemina/ $H_2O_2$ /CTAB com diferentes concentrações de  $H_2O_2$ . [luminol] =  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L, [hemina] =  $8,0 \cdot 10^{-7}$  mol/L e [CTAB] =  $1,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L, em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ) pH 11,6. B) Ampliação do gráfico A para as concentrações  $1,0 \cdot 10^{-4}$ ,  $5,0 \cdot 10^{-5}$  e  $2,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L.



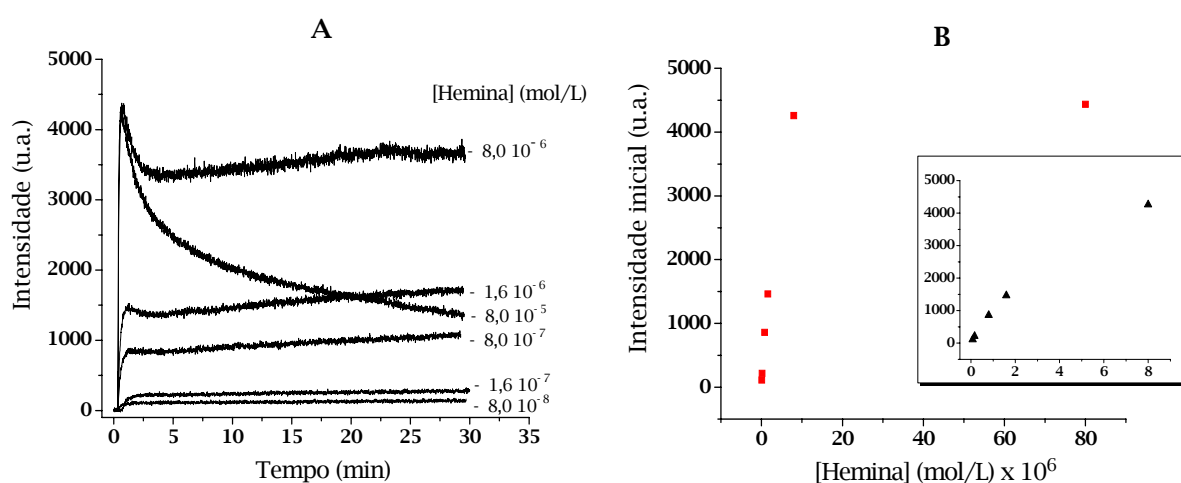
**Figura 15:** Relação entre a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a intensidade inicial de emissão. [luminol] = 1,0 10<sup>-4</sup> mol/L, [hemina] = 8,0 10<sup>-7</sup> mol/L e [CTAB] = 1,0 10<sup>-3</sup> mol/L, em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ) pH 11,6.

Investigou-se o efeito da concentração de luminol na cinética de emissão no intervalo de concentrações de 5,0 10<sup>-7</sup> a 1,0 10<sup>-3</sup> mol/L (Figura 16A). O gráfico que relaciona I<sub>0</sub> com a concentração de luminol mostra duas regiões. A primeira corresponde ao intervalo de 5,0 10<sup>-7</sup> a 5,0 10<sup>-5</sup> mol/L, onde I<sub>0</sub> aumenta, não linearmente, com a concentração de luminol. A segunda região corresponde às concentrações a partir de 5,0 10<sup>-5</sup> mol/L, e nesse caso não ocorre aumento da intensidade de emissão com o aumento da concentração (Figura 16B).



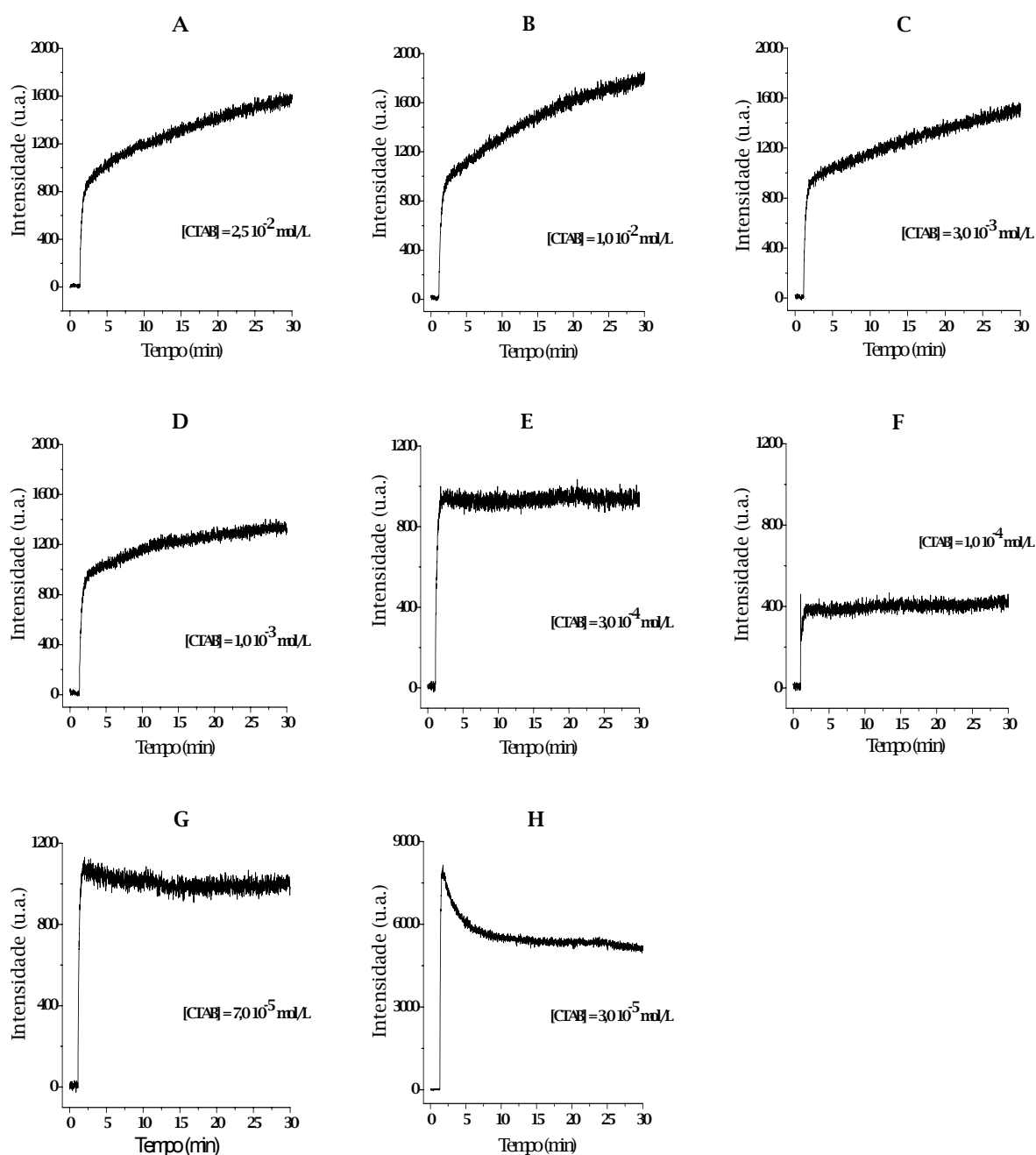
**Figura 16:** A) Cinética de emissão do sistema luminol/hemina/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/CTAB com diferentes concentrações de luminol. B) Relação entre a concentração de luminol e a intensidade inicial de emissão. *Insert:* Ampliação para os 4 primeiros pontos. [hemina] = 8,0 10<sup>-7</sup> mol/L; [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 1,0 10<sup>-4</sup> mol/L e [CTAB] = 1,0 10<sup>-3</sup> mol/L, em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ) pH 11,6.

O efeito da concentração de hemina sobre a cinética de emissão foi estudado entre  $8,0 \cdot 10^{-8}$  e  $8,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L (Figura 17A). Semelhante ao comportamento observado quando se alteraram as concentrações de luminol e peróxido, existe um intervalo onde  $I_0$  aumenta com a concentração de hemina (Figura 17B). A curva correspondente à concentração mais alta utilizada,  $8,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L, apresenta a mesma intensidade inicial observada quando se utilizou  $8,0 \cdot 10^{-6}$  mol/L, porém o perfil dessa curva é bem diferente dos demais e um decaimento rápido é observado.



**Figura 17:** A) Cinética de emissão do sistema luminol/hemina/ $H_2O_2$ /CTAB com diferentes concentrações de hemina. B) Relação entre a concentração de hemina e a intensidade inicial de emissão. *Insert:* Ampliação para os 5 primeiros pontos. [luminol] =  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L; [ $H_2O_2$ ] =  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L e [CTAB] =  $1,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L, em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ) pH 11,6.

Fixando as concentrações de luminol, hemina e peróxido de hidrogênio em  $1,0 \cdot 10^{-4}$ ,  $8,0 \cdot 10^{-7}$  e  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L, respectivamente, a reação foi realizada com diferentes concentrações de tensoativo (Figura 18). Foram utilizadas concentrações de CTAB acima e abaixo da cmc, que no tampão utilizado é  $2,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L. No intervalo estudado -  $3,0 \cdot 10^{-5}$  a  $2,5 \cdot 10^{-2}$  mol/L - observou-se que a intensidade inicial de emissão ficou em torno de 1000 u.a. para quase todas as concentrações de CTAB testadas. São exceções as concentrações  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L, que apresenta uma intensidade inicial de 400 u.a., e a concentração mais baixa,  $3,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L, cuja intensidade inicial é igual a 8000.

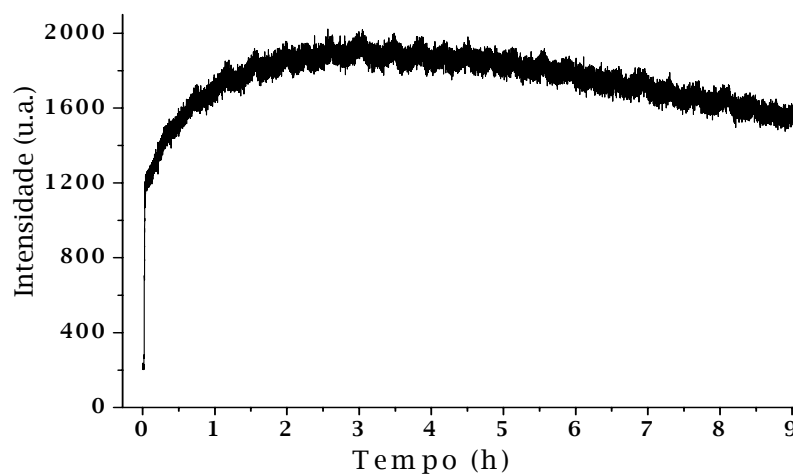


**Figura 18:** Cinética de emissão do sistema luminol/hemina/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/CTAB com diferentes concentrações de CTAB. [luminol] =  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L, [hemina] =  $8,0 \cdot 10^{-7}$  mol/L e [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] =  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L, em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ) pH 11,6. [CTAB]: A)  $2,5 \cdot 10^{-2}$  mol/L, B)  $1,0 \cdot 10^{-2}$  mol/L, C)  $3,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L, D)  $1,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L, E)  $3,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L, F)  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L, G)  $7,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L, H)  $3,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L.

Os experimentos mostrados anteriormente possibilitaram o estabelecimento de um sistema padrão para realizar o ensaio anti-radicalar, que deve ter uma cinética lenta o suficiente para garantir uma concentração aproximadamente

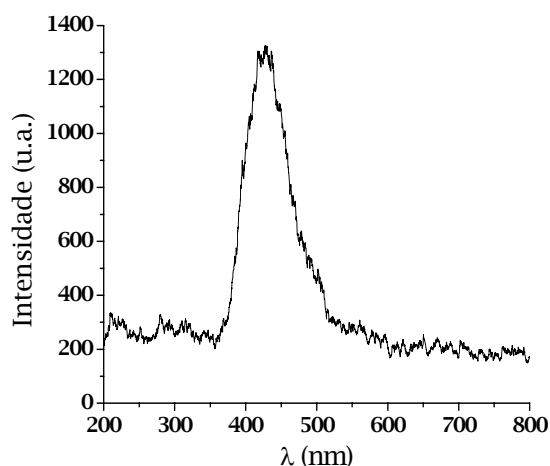


constante de radicais e uma emissão de intensidade alta comparada ao ruído (linha base do instrumento). Esse sistema ficou definido como: luminol  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L,  $H_2O_2$   $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L, hemina  $8,0 \cdot 10^{-7}$  mol/L e CTAB  $1,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L, em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ) pH 11,6 (Figura 18D). Acompanhou-se a emissão desse sistema por nove horas, e após esse período a intensidade ainda era aproximadamente 80% da intensidade máxima alcançada. (Figura 19).



**Figura 19:** Cinética de emissão do sistema luminol/hemina/ $H_2O_2$ /CTAB padrão acompanhada por 9 horas.

A cinética lenta observada permite obter com facilidade o espectro de emissão da quimiluminescência. O espectro abaixo foi obtido 5 min após o início da reação (Figura 20). O  $\lambda_{\text{máx}}$  é igual a 427 nm, valor semelhante ao reportado em meio aquoso.<sup>63</sup>



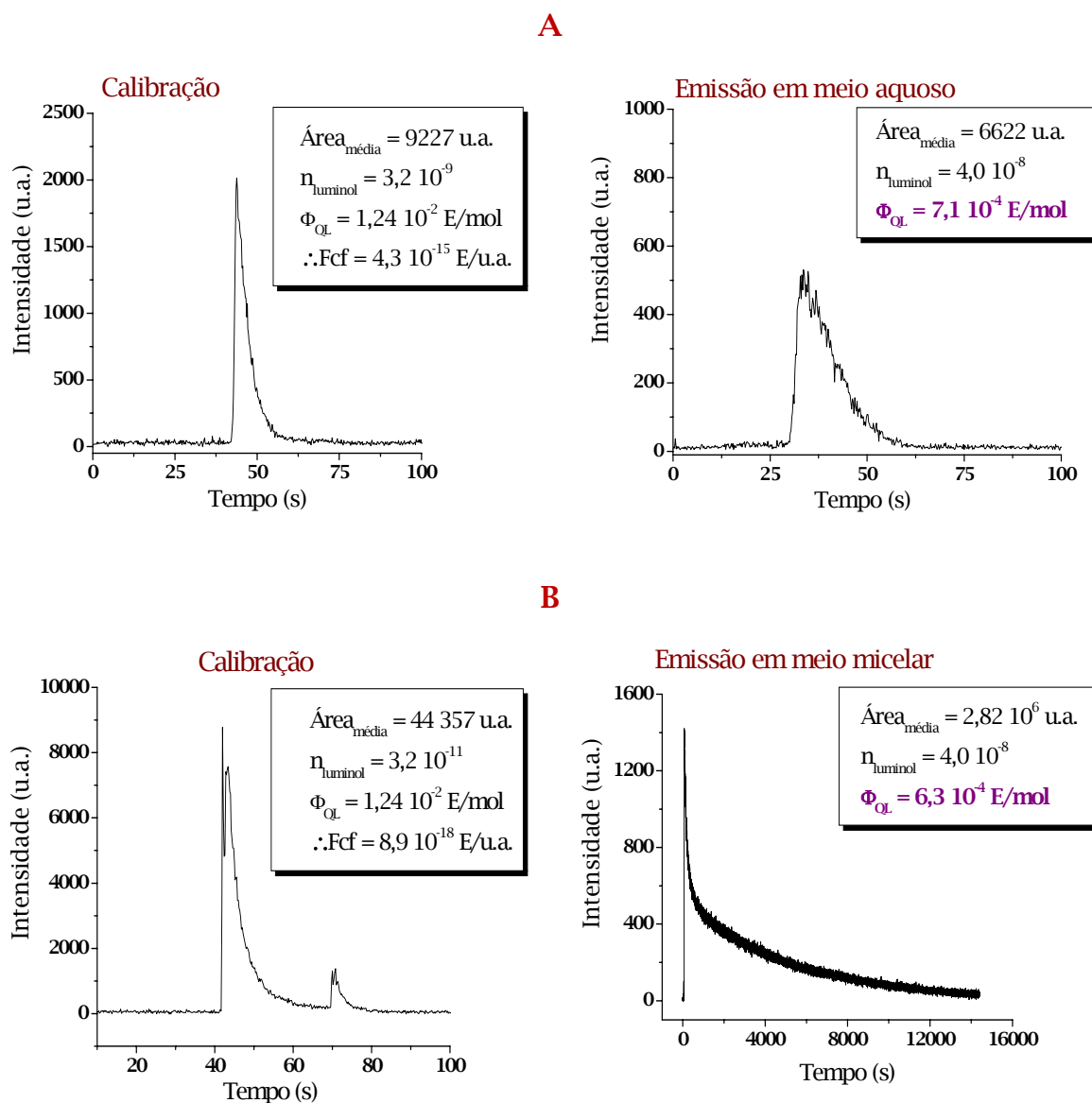
**Figura 20:** Espectro de emissão da quimiluminescência do sistema luminol/hemina/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/CTAB. [luminol] = 1,0 10<sup>-4</sup> mol/L, [hemina] = 8,0 10<sup>-7</sup> mol/L e [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 1,0 10<sup>-4</sup> mol/L, em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ) pH 11,6.

#### *Determinação do rendimento quântico da reação em CTAB*

A presença de CTAB no meio reacional provocou uma diminuição da intensidade de emissão e também na velocidade da reação. Os experimentos a seguir tiveram por objetivo verificar se o rendimento quântico também é afetado pela presença de tensoativo.

Para determinar a influência de CTAB sobre o rendimento quântico, a reação foi realizada em dois meios, os quais diferiam apenas pela presença de CTAB 1,0 10<sup>-3</sup> mol/L. Em ambos os sistemas as concentrações dos demais reagentes foram luminol 2,0 10<sup>-5</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2,0 10<sup>-5</sup> e hemina 8,0 10<sup>-5</sup> mol/L. Para garantir que todo o luminol foi consumido sob essas condições, após o final da emissão foi adicionado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hemina na cubeta, mas nenhuma emissão adicional foi observada após esse procedimento. Devido à diferença entre a intensidade de emissão dos dois sistemas, a cinética da reação em CTAB foi acompanhada com o fluorímetro operando em uma condição de maior sensibilidade, e por isso a calibração foi feita nas duas condições utilizadas. Os rendimentos quânticos obtidos para os dois sistemas

foram similares,  $6,3 \cdot 10^{-4}$  E/mol para o meio contendo CTAB e  $7,1 \cdot 10^{-4}$  E/mol para o meio sem tensoativo (Figura 21).

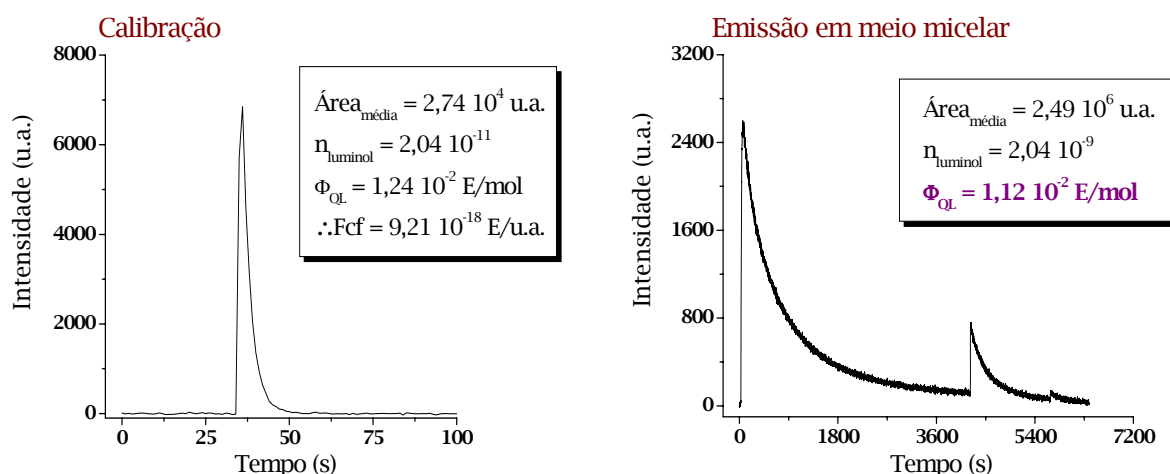


**Figura 21:** Determinação do rendimento quântico do sistema luminol/ $\text{H}_2\text{O}_2$ /hemina em tampão fostato ( $\mu = 0,1$ , pH 11,6) na **A)** ausência e **B)** presença de CTAB  $1,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L. Condições do fluorímetro: **A)** 1 nm/950 V **B)** 20 nm/950 V.

Apesar de os rendimentos obtidos serem similares ( $\Phi_{\text{QL-CTAB}} = 0,89 \Phi_{\text{QL-AQUOSO}}$ ), esses valores diferem muito do rendimento quântico da reação utilizada para calibrar o fluorímetro. Coincidentemente essa reação é também de oxidação do luminol por  $\text{H}_2\text{O}_2$  e hemina, mas nas condições em que é conduzida apresenta um rendimento quântico igual a  $1,24 \cdot 10^{-2}$  E/mol. Experimentos posteriores (não

mostrados) indicam que a diminuição no rendimento quântico foi devido à alta concentração de hemina utilizada. Esse efeito poderia ser quantitativamente diferente nos meios com e sem CTAB, e diferente do proposto essas reações terem  $\Phi_{QL}$  bastante diferentes.

Para esclarecer essa questão, realizou-se a reação na presença de CTgrAB e em condições análogas às utilizadas para a calibração. Apenas a concentração de luminol foi adaptada para que as duas reações fossem conduzidas nas mesmas condições do equipamento (Figura 22). O rendimento quântico obtido dessa forma para a reação em CTAB foi igual a  $1,12 \cdot 10^{-2}$ , ou seja,  $\Phi_{QL-CTAB} = 0,91 \Phi_{QL-AQUOSO}$ , valor semelhante ao obtido anteriormente.

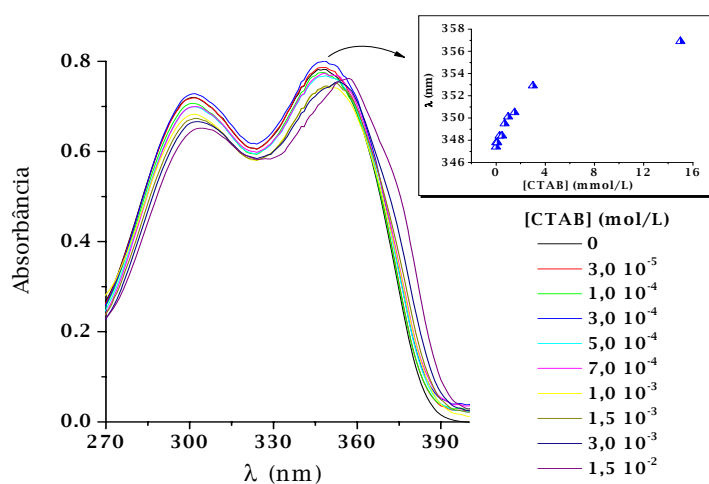


**Figura 22:** Determinação do rendimento quântico do sistema luminol/ $H_2O_2$ /hemina em tampão fostato ( $\mu = 0,1$ , pH 11,6) na presença de CTAB 1,0 mmol/L. Condições do fluorímetro: 1 nm/950 V.

### *Tentativas de verificar a partição dos reagentes no meio micelar de CTAB*

A presença de um tensoativo pode provocar mudanças na cinética de uma reação pela partição dos reagentes no ambiente micro heterogêneo criado.<sup>45</sup> Devido às intensas bandas na região do UV-visível e facilidade da técnica, verificou-se o efeito de CTAB nas bandas de absorção do luminol e da hemina com o objetivo de poder estimar a distribuição destes reagentes entre as fases aquosa e micelar.

O espectro de luminol em tampão fosfato na presença de diferentes concentrações de CTAB apresenta um deslocamento da banda em 347 nm com o aumento da concentração de CTAB (Figura 23). Os espectros exibidos foram registrados logo após o preparo das soluções, e não houve alteração nos espectros dessas mesmas soluções registrados após 30 min e 1 h após o preparo (dados não mostrados).

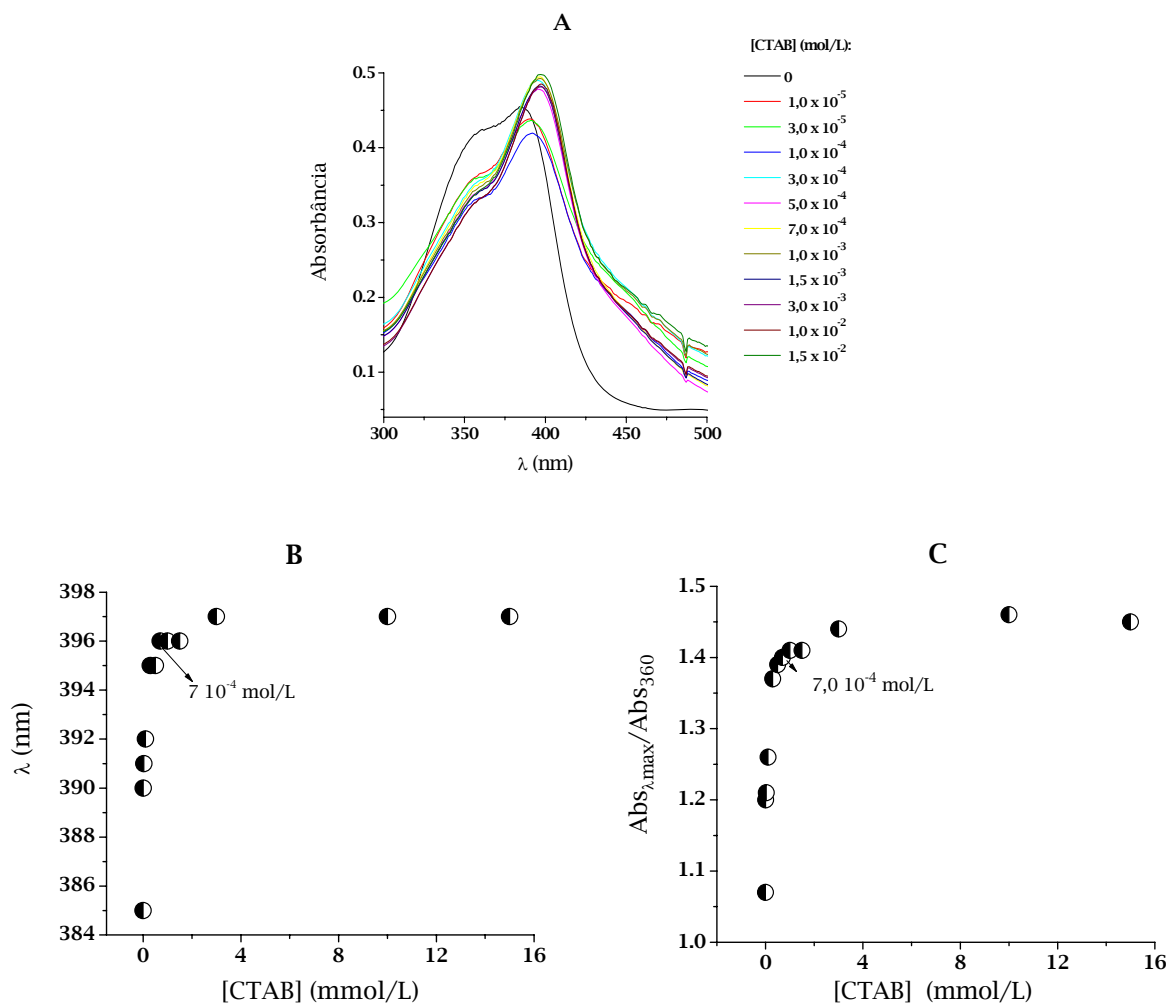


**Figura 23:** Espectro de absorção de luminol  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ) pH 11,6 na presença de diferentes concentrações de CTAB.

A mudança no espectro da hemina, dependendo da concentração de CTAB no meio, é mais pronunciada que a do luminol (Figura 24). Porém, assim como observado com o luminol, essa mudança ocorre rapidamente após o preparo da solução. Observam-se principalmente duas mudanças, o deslocamento batocrômico da banda em 385 nm e o valor relativo entre as intensidades das bandas em 385 e 360 nm (Figura 24A).

Para melhor visualizar a tendência do deslocamento em 385 nm, plotou-se o comprimento de onda do máximo de absorção em função da concentração de CTAB. O que se observa é que acima da concentração de  $7,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L, o comprimento de onda se torna aproximadamente constante (Figura 24B). Resultado similar foi

observado quando se plotou a razão (*absorbância máxima*)/(*absorbância em 360 nm*) em função da concentração de CTAB. Essa razão varia muito pouco acima de  $7 \cdot 10^{-4}$  mol/L (Figura 24C).



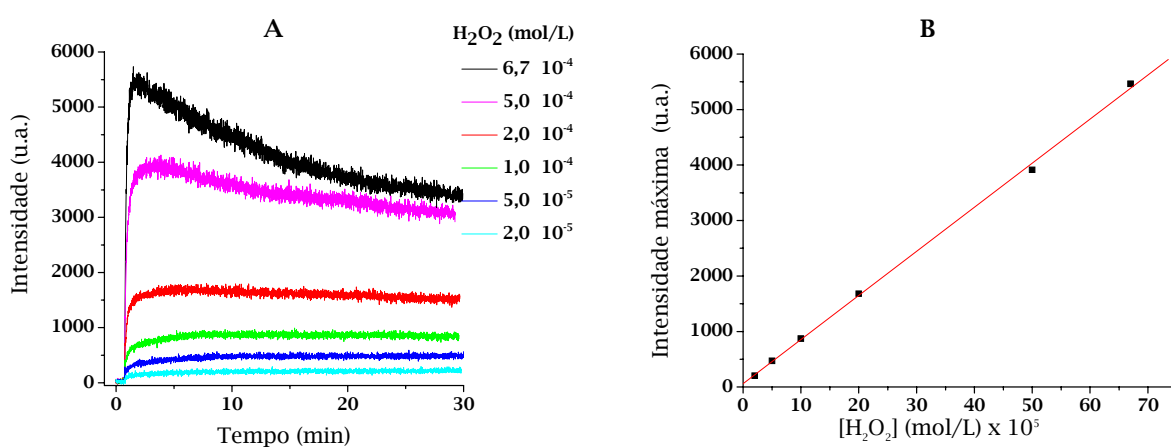
**Figura 24:** A) Espectros de absorção de hemina  $8,0 \cdot 10^{-6}$  mol/L em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ , pH 11,6) na presença de diferentes concentrações de CTAB B) Dependência entre o comprimento de onda de máxima absorção e a concentração de CTAB C) Razão absorbância máxima/absorbância em 360 nm em função da concentração de CTAB.

### *Estudos cinéticos da oxidação do luminol em CTAC*

A reação do luminol com peróxido de hidrogênio e hemina foi realizada em meio micelar de CTAC  $5,0 \cdot 10^{-2}$  mol/L. Foi avaliado o efeito dos reagentes na cinética de emissão, e quando a concentração de cada reagente foi variada, a dos demais foi

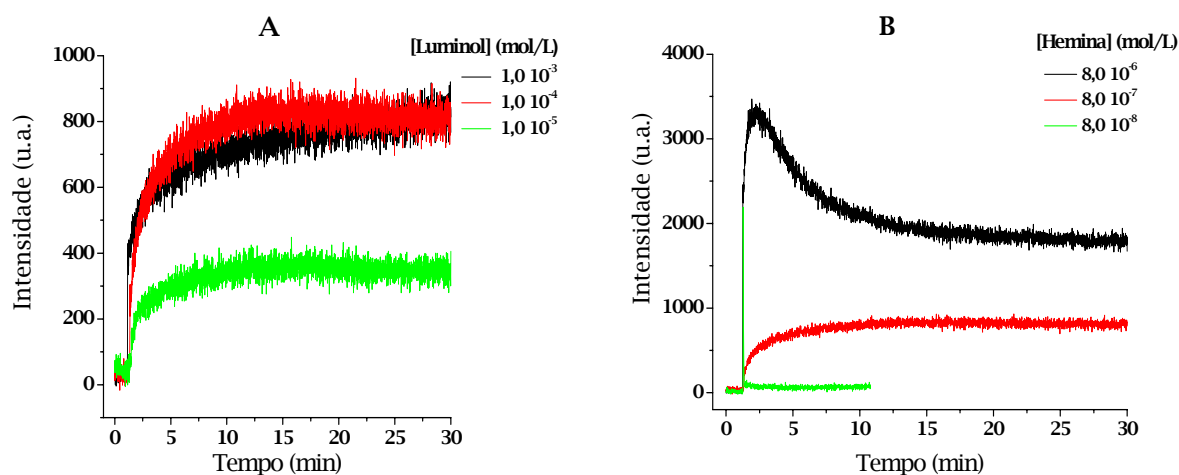
mantida a mesma do sistema padrão com CTAB, devido à semelhança entre esses tensoativos.

A concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi variada de  $2,0 \cdot 10^{-5}$  a  $6,7 \cdot 10^{-4}$  mol/L (Figura 25A). Aumentando-se a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  há aumento na intensidade de emissão, e a correlação entre a intensidade inicial e a concentração de peróxido é linear (Figura 25B).



**Figura 25:** A) Cinética de emissão do sistema luminol/hemina/ $\text{H}_2\text{O}_2$ /CTAC em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ), pH 11,6 com diferentes concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . B) Relação entre a intensidade máxima de emissão e a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .  $[\text{luminol}] = 1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L,  $[\text{hemina}] = 8,0 \cdot 10^{-7}$  mol/L e  $[\text{CTAC}] = 5,0 \cdot 10^{-2}$  mol/L.

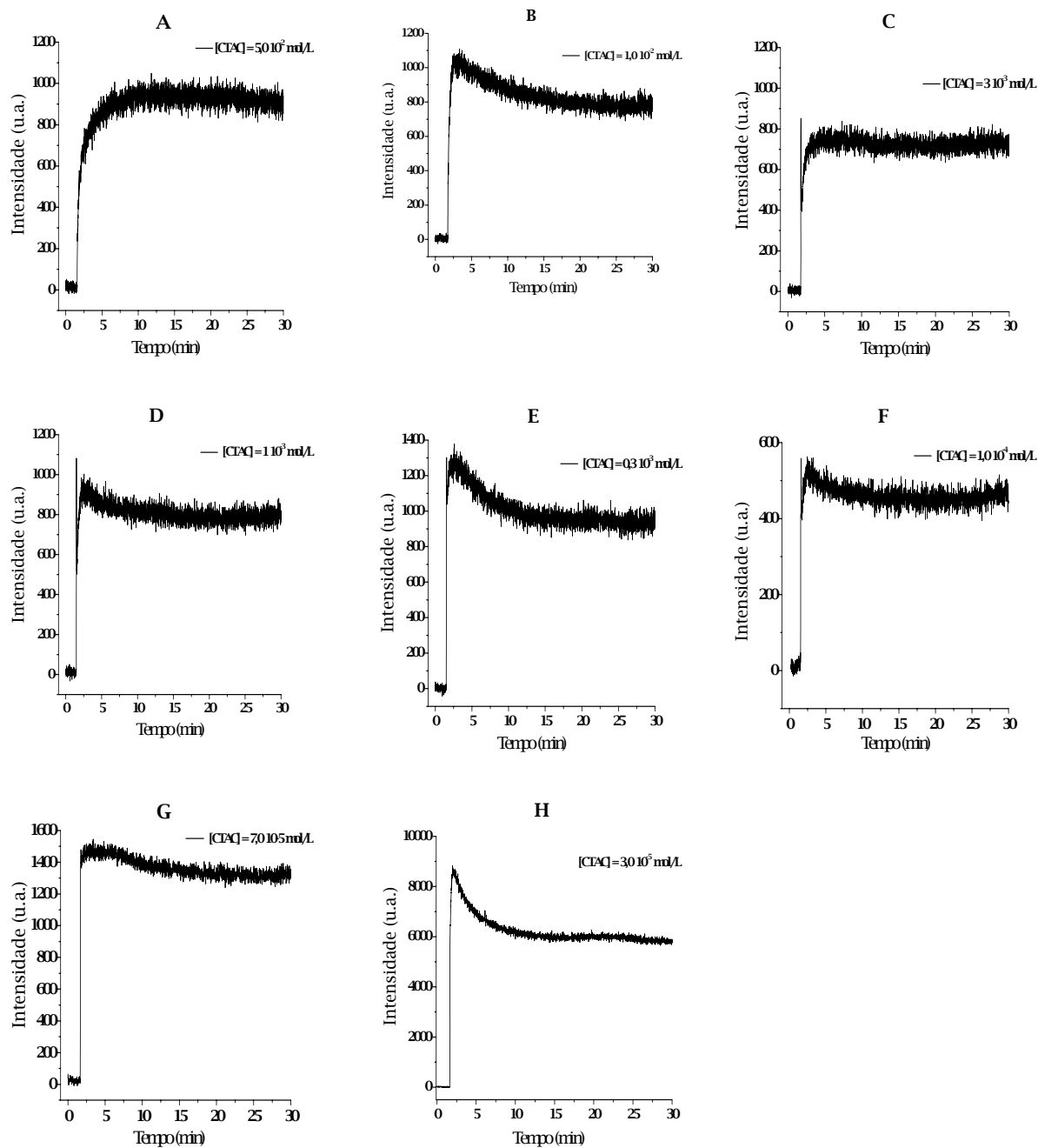
Para verificar qualitativamente o efeito das concentrações de luminol e hemina, realizou-se a reação em três concentrações diferentes desses reagentes (Figura 26). As intensidades de emissão observadas são semelhantes às obtidas em CTAB. A reação com  $1,0 \cdot 10^{-4}$  e  $1,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L de luminol apresentou intensidades de emissão iguais e a cinética na presença de hemina  $8,0 \cdot 10^{-6}$  mol/L mostra um decaimento nos primeiros 10 min de reação.



**Figura 26:** Cinética de emissão do sistema luminol/hemina/ $\text{H}_2\text{O}_2$ /CTAC em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ; pH 11,6) na presença de diferentes concentrações de **A)** luminol, com  $[\text{hemina}] = 8,0 \cdot 10^{-7}$  mol/L e **B)** hemina, com  $[\text{luminol}] = 1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L.  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L e  $[\text{CTAC}] = 5,0 \cdot 10^{-2}$  mol/L.

Verificou-se o efeito da concentração de CTAC sobre a cinética de emissão (Figura 27). Observa-se que o perfil das curvas sofre alteração dependendo da concentração do tensoativo, e assim como observado para o CTAB, na concentração  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L a intensidade inicial é consideravelmente mais baixa que nas demais condições (Figura 27F).





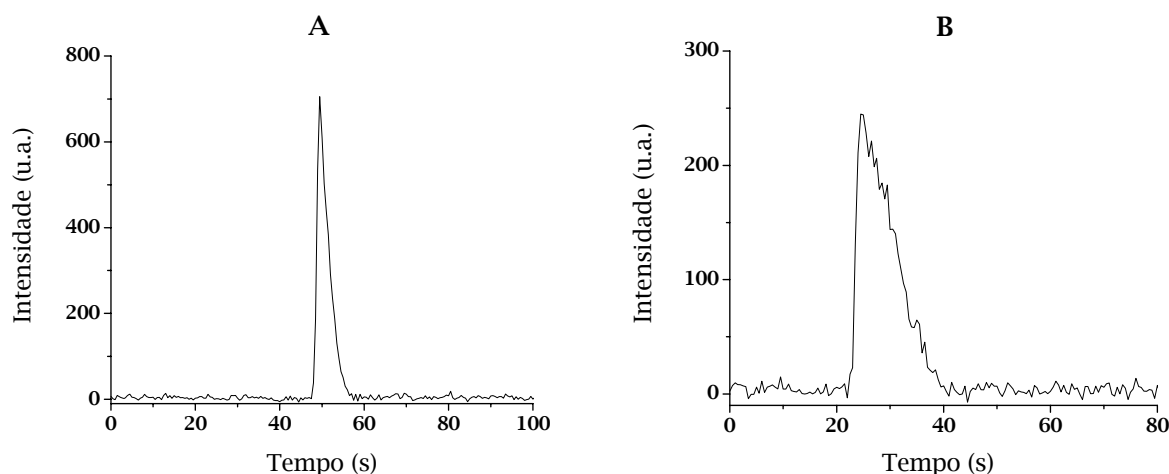
**Figura 27:** Cinética de emissão do sistema luminol/hemina/ $H_2O_2$ /CTAC em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ; pH 11,6) na presença de diferentes concentrações de CTAC.  $[luminol] = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ ,  $[hemina] = 8,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L}$  e  $[H_2O_2] = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ .  $[CTAC]$ : A)  $5,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol/L}$ , B)  $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol/L}$ , C)  $3,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$ , D)  $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$ , E)  $3,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ , F)  $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ , G)  $7,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$ , H)  $3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$ .

Outra semelhança com o CTAB é que mesmo quando a reação é realizada com concentrações de tensoativo bem abaixo da cmc há uma diminuição significativa na intensidade de emissão. Quando a reação é realizada nessas condições e sem adição de tensoativo, a intensidade é superior ao máximo detectado pelo fluorímetro, podendo ser vista a olho nu.

A princípio, para a realização de um ensaio anti-radicalar qualquer sistema entre as curvas A e D poderia ser utilizado. Para o caso de teste de substâncias lipofílicas, pode ser interessante utilizar uma concentração de tensoativo consideravelmente maior que a cmc, de concentração igual à concentração de tensoativo utilizada no preparo da solução de antioxidante a ser testada. Isso porque quando se prepara essa solução com concentrações relativamente baixas de tensoativo (pouco maior que a cmc) a dissolução é muito lenta, o que representa um problema no caso de amostras pouco estáveis. O sistema escolhido como padrão foi, por isso, definido como: [luminol] =  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L;  $[H_2O_2]$  =  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L; [hemina] =  $8,0 \cdot 10^{-7}$  mol/L e [CTAC] =  $5,0 \cdot 10^{-2}$  mol/L, em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ) pH = 11,6, cuja cinética de emissão é representada na Figura 27A.

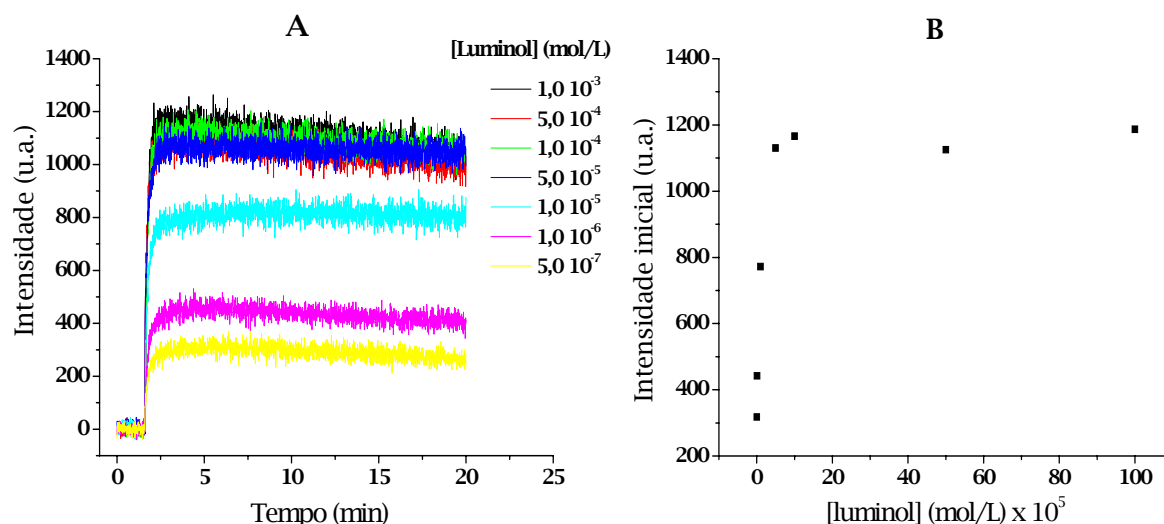
#### 4.1.2 Caracterização do sistema quimiluminescente do luminol em SDS

Para verificar os efeitos de um tensoativo aniônico no sistema luminol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/hemina e a possibilidade de se desenvolver um ensaio de avaliação da capacidade anti-radicalar nesse meio, utilizou-se como meio reacional uma solução de SDS 1,2 10<sup>-2</sup> mol/L em tampão fosfato (pH 11,6). A presença desse tensoativo provocou diminuição na intensidade de emissão, porém essa redução foi menos pronunciada que a observada com CTAB e CTAC (Figura 28).



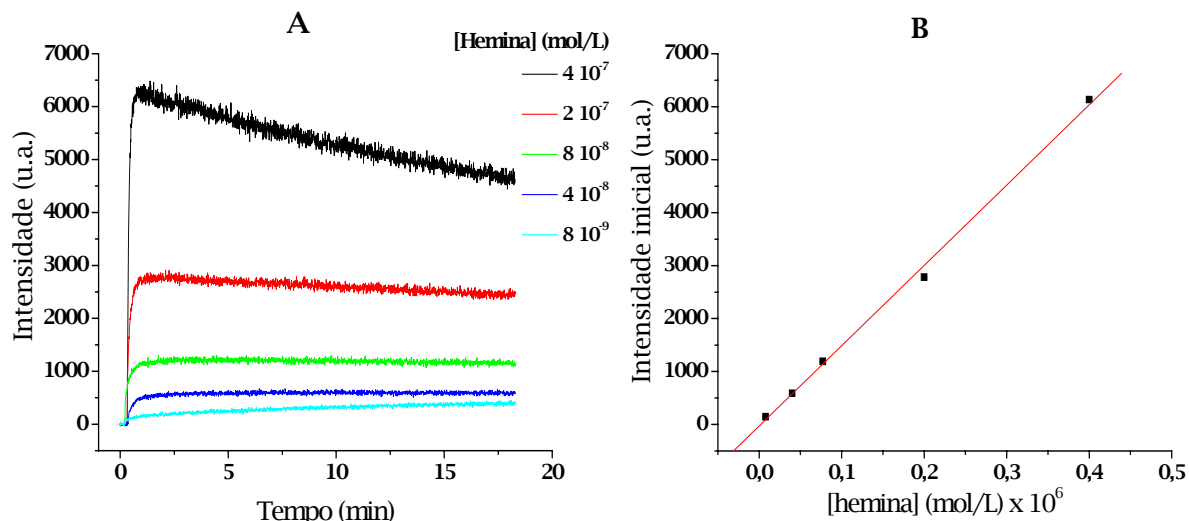
**Figura 28:** Cinética de emissão da reação do luminol com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hemina em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ; pH 11,6) na **A)** ausência e **B)** presença de SDS 1,2 10<sup>-2</sup> mol/L. [luminol] = 2,0 10<sup>-5</sup> mol/L, [hemina] = 8,0 10<sup>-5</sup> mol/L; [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 5,0 10<sup>-5</sup> mol/L.

Os resultados obtidos das cinéticas de emissão com a variação da concentração do luminol entre 5,0 10<sup>-7</sup> e 1,0 10<sup>-4</sup> mol/L mostram um aumento da I<sub>0</sub> com a concentração de luminol até 5,0 10<sup>-5</sup> mol/L e uma intensidade constante acima desta concentração (Figura 29). Uma característica interessante da reação que é mostrada na Figura 29A é o decaimento ser bastante lento com todas as concentrações utilizadas. Esse comportamento indica que nas concentrações utilizadas e no tempo acompanhado não há gasto significativo de nenhum dos reagentes.



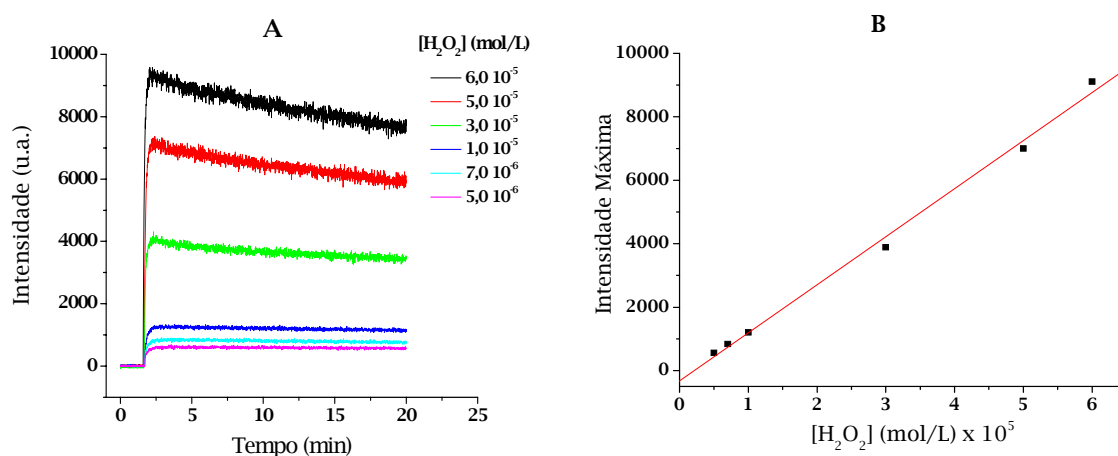
**Figura 29:** A) Cinética de emissão do sistema luminol/hemina/ $H_2O_2$ /SDS em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ; pH 11,6) na presença de diferentes concentrações de luminol. B) Relação entre a intensidade inicial de emissão e a concentração de luminol. [hemina] =  $8,0 \cdot 10^{-8}$  mol/L; [ $H_2O_2$ ] =  $1,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L e [SDS] =  $1,2 \cdot 10^{-2}$  mol/L.

A variação da concentração de hemina ocorreu no intervalo de  $8,0 \cdot 10^{-9}$  a  $4,0 \cdot 10^{-7}$  mol/L (Figura 30A). Aumentando-se esta concentração, há aumento na intensidade de emissão, e um decaimento mais pronunciado foi observado apenas com a concentração mais alta testada. Uma característica observada quando se plotou  $I_0$  em função da concentração de hemina, foi que nesse intervalo a relação é linear (Figura 30B). Isso difere do encontrado com o sistema em CTAB (Figura 17), mas esses resultados não podem ser diretamente comparados porque com CTAB o intervalo das concentrações de hemina testado foi diferente, de  $8,0 \cdot 10^{-8}$  a  $8,0 \cdot 10^{-6}$  mol/L.



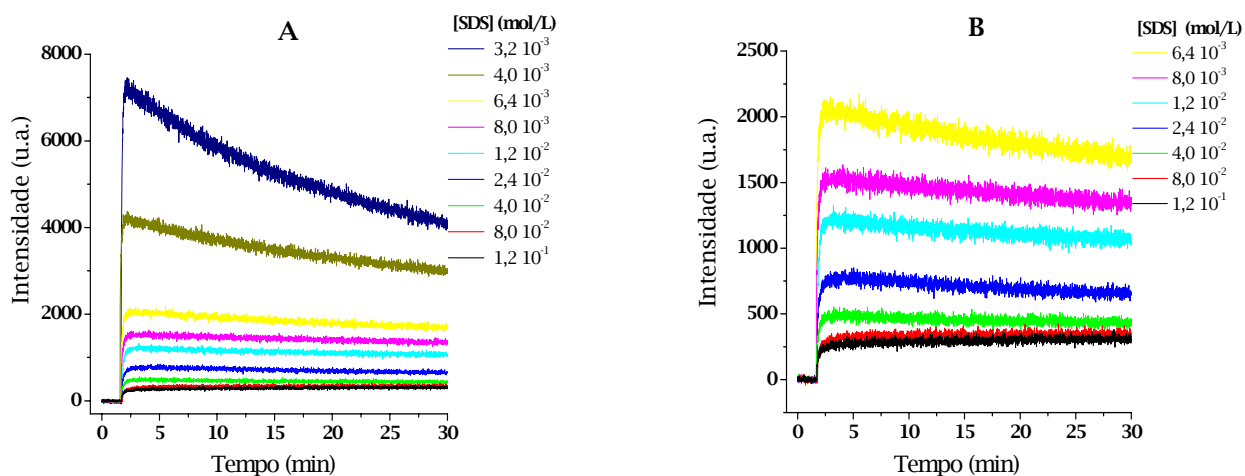
**Figura 30:** **A)** Cinética de emissão do sistema luminol/hemina/ $\text{H}_2\text{O}_2$ /SDS em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ; pH 11,6) na presença de diferentes concentrações de hemina. **B)** Relação entre a intensidade inicial de emissão e a concentração de hemina. [luminol] =  $1,0 \times 10^{-4}$  mol/L; [ $\text{H}_2\text{O}_2$ ] =  $1,0 \times 10^{-5}$  mol/L e [SDS] =  $1,2 \times 10^{-2}$  mol/L.

As concentrações de peróxido utilizadas variaram de  $5,0 \times 10^{-6}$  a  $5,0 \times 10^{-5}$  mol/L (Figura 31A). Esse intervalo, que é pequeno comparado ao verificado para luminol e hemina, demonstra o quanto a intensidade de emissão é sensível à concentração de peróxido. A intensidade inicial de emissão mostra uma correlação linear com a concentração de peróxido dentro do intervalo investigado (Figura 31B).

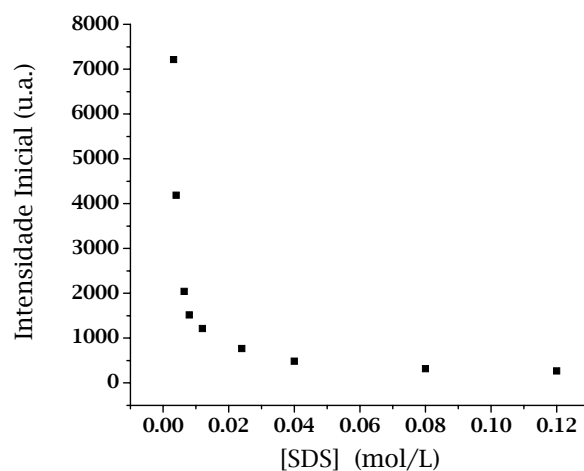


**Figura 31:** Cinética de emissão do sistema luminol/hemina/ $\text{H}_2\text{O}_2$ /SDS em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ; pH 11,6) na presença de diferentes concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . **B)** Relação entre a intensidade inicial de emissão e a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . [luminol] =  $1,0 \times 10^{-4}$  mol/L, [hemina] =  $8,0 \times 10^{-8}$  mol/L e [SDS] =  $1,2 \times 10^{-2}$  mol/L.

Foi avaliado o efeito da concentração de SDS na cinética de emissão num intervalo de  $3,2 \cdot 10^{-3}$  a  $0,12$  mol/L (Figura 32). O que se observou foi a diminuição da intensidade de emissão com o aumento da concentração de SDS até a concentração  $4,0 \cdot 10^{-2}$  mol/L; acima dessa concentração a intensidade é aproximadamente constante (Figura 33).

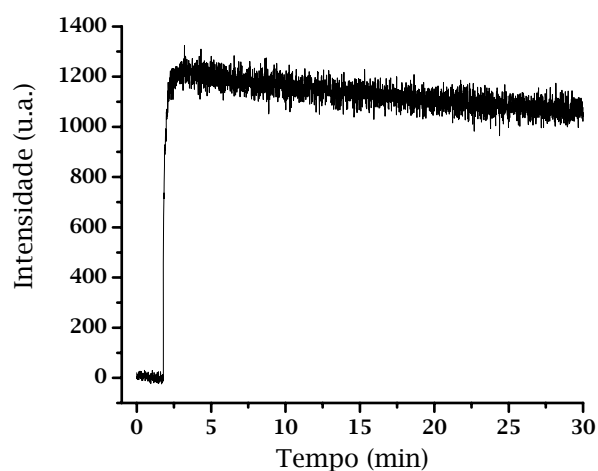


**Figura 32: A)** Cinética de emissão do sistema luminol/hemina/ $H_2O_2$ /SDS em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ , pH 11,6) na presença de diferentes concentrações de SDS. **B)** Ampliação do gráfico A para os 7 primeiros pontos. [luminol] =  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L, [hemina] =  $8,0 \cdot 10^{-8}$  mol/L e [ $H_2O_2$ ] =  $1,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L.



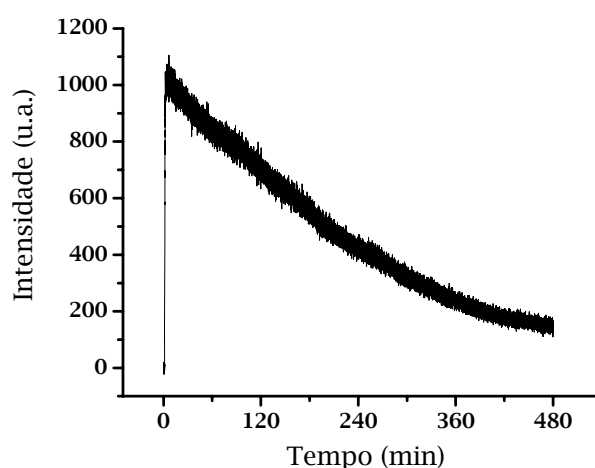
**Figura 33:** Relação entre a intensidade inicial de emissão e a concentração de SDS. [luminol] =  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L, [hemina] =  $8,0 \cdot 10^{-8}$  mol/L e  $[H_2O_2] = 1,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L em tampão fosfato pH 11,6.

Com base nos dados mostrados acima, definiram-se as condições da reação para ser utilizada como ensaio anti-radicalar como: [luminol] =  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L, [hemina] =  $8,0 \cdot 10^{-8}$  mol/L,  $[H_2O_2] = 1,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L e [SDS] =  $1,2 \cdot 10^{-2}$  mol/L em tampão fosfato de pH 11,6, cuja cinética de emissão está mostrada na Figura 34.



**Figura 34:** Cinética de emissão do sistema luminol/hemina/ $H_2O_2$ /SDS. [luminol] =  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L, [hemina] =  $8,0 \cdot 10^{-8}$  mol/L e  $[H_2O_2] = 1,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ) pH 11,6.

Este sistema mostra um decaimento consideravelmente lento para ser utilizado no ensaio anti-radicalar e ainda possui uma intensidade de emissão suficientemente alta para permitir medidas exatas e reprodutíveis. Para verificar melhor a velocidade de decaimento da intensidade de emissão nestas condições experimentais foi efetuada uma medida da cinética de emissão durante o período de 8 horas (Figura 35). O resultado obtido mostra que, nestas condições, a reação quimiluminescente possui um tempo de meia vida de cerca de 3,5 horas (210 min).

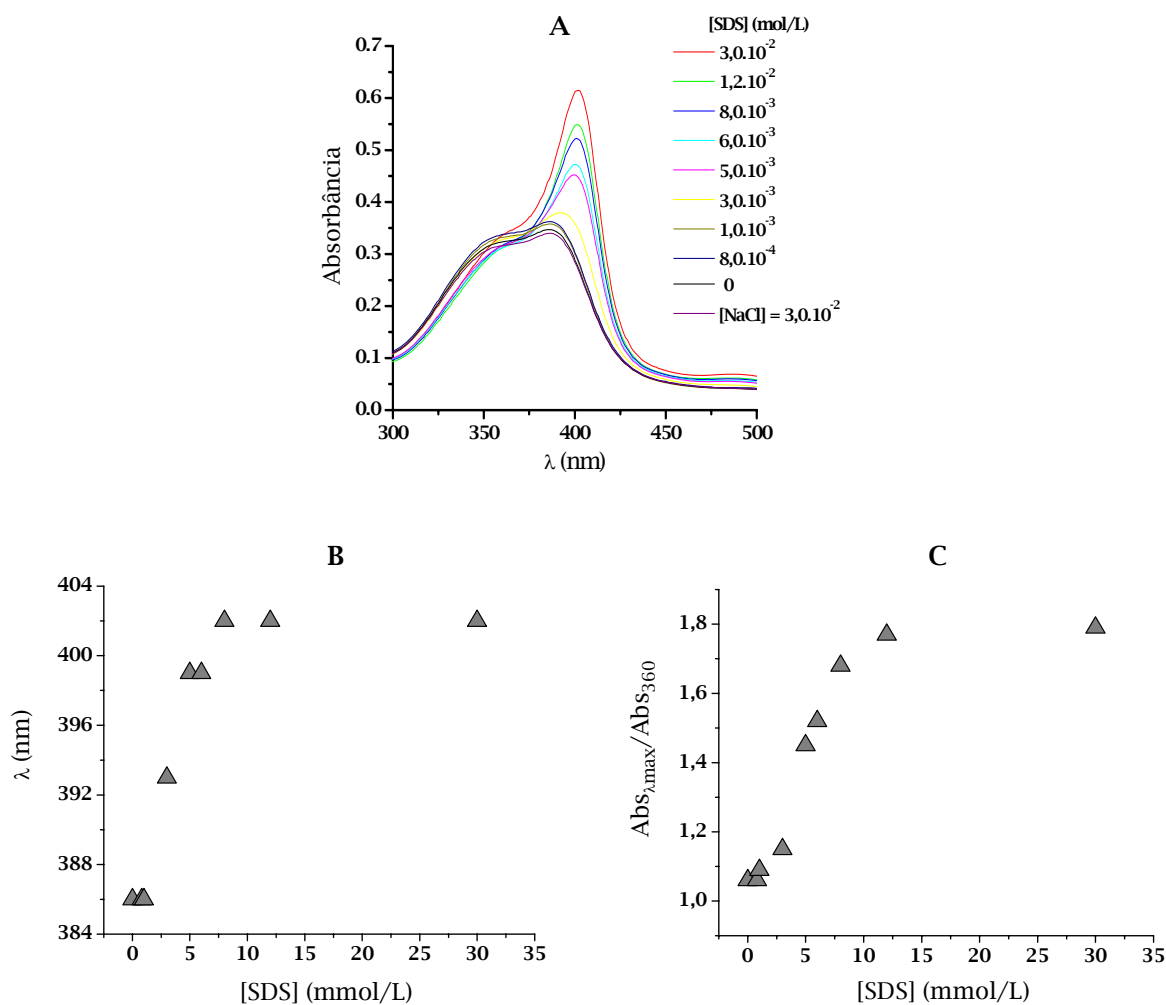


**Figura 35:** Cinética de emissão do sistema luminol/hemina/ $\text{H}_2\text{O}_2$ /SDS acompanhada por 8 horas.  $[\text{luminol}] = 1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L,  $[\text{hemina}] = 8,0 \cdot 10^{-8}$  mol/L e  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ) pH 11,6.

Para investigar se existe alguma interação entre a hemina e o SDS, foram registrados espectros de absorção da hemina em diferentes concentrações de tensoativo. Foi feito também um controle na ausência de SDS e na presença de NaCl  $3,0 \cdot 10^{-2}$  mol/L (Figura 36A). Os espectros na ausência de SDS, na presença de NaCl e nas concentrações de SDS iguais a  $8,0 \cdot 10^{-4}$  e  $1,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L são idênticos. Acima de  $1,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L de SDS observa-se um deslocamento batocrômico na banda em 385 nm. O aumento do comprimento de onda máximo com a concentração de SDS ocorre até  $8,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L, que corresponde a cmc do SDS em água (Figura 36B). A



absorbância dessa banda que sofreu deslocamento também aumenta com o aumento da concentração de SDS, enquanto a absorbância do ombro em 360 nm não muda significativamente. Para melhor visualizar esse efeito plotou-se a razão (*absorbância no  $\lambda_{max}$* )/(*absorbância em 360 nm*), e observou-se que essa razão varia muito pouco acima de  $8,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L (Figura 36C).



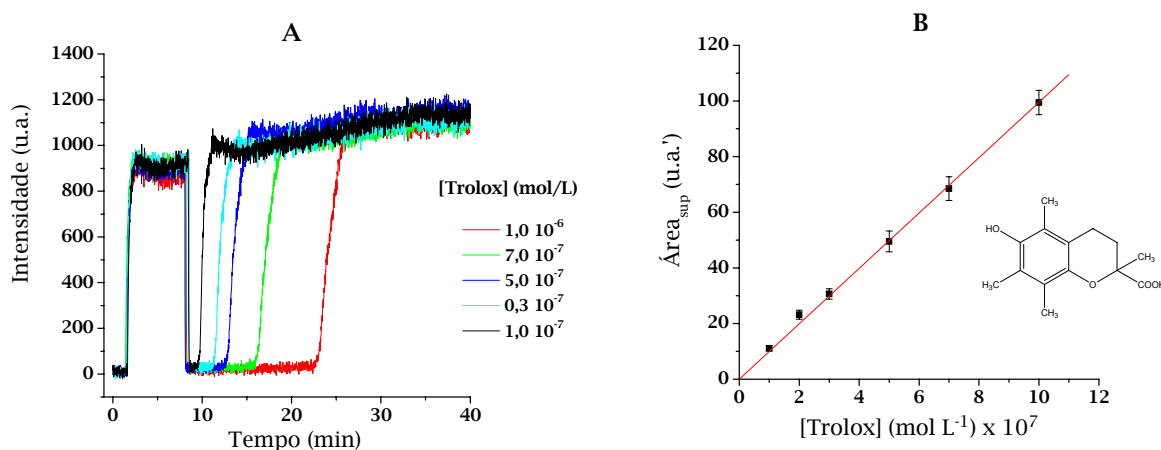
**Figura 36:** A) Espectros de absorção de hemina  $8,0 \cdot 10^{-6}$  mol/L em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ , pH 11,6) na presença de diferentes concentrações de SDS B) Dependência entre o comprimento de onda de máxima absorção e a concentração de SDS C) Razão absorbância máxima/absorbância em 360 nm em função da concentração de SDS.

## 4.2 Determinação da capacidade anti-radicalar

### 4.2.1 Determinação da capacidade anti-radicalar utilizando-se o ensaio quimiluminescente com luminol em meio micelar

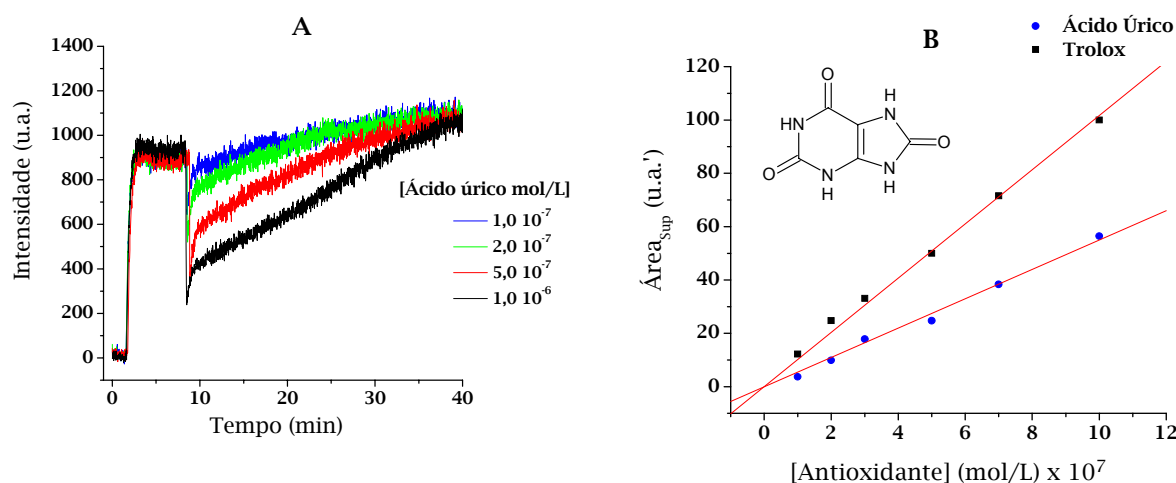
#### *Ensaio anti-radicalar em CTAB*

Definidas as condições experimentais, foram testadas algumas substâncias com conhecido caráter anti-radicalar. O primeiro composto testado, o trolox, foi escolhido como antioxidante de referência. O trolox é utilizado em muitos ensaios anti-radicalares como padrão, e tem sua capacidade anti-radicalar definida como  $n = 2$ , ou seja, cada molécula de trolox pode seqüestrar 2 radicais.<sup>39</sup> Adicionou-se uma amostra de trolox após 400 s do início da reação (a reação foi iniciada após 100 s da aquisição de dados, com a adição de  $H_2O_2$ ). Observa-se que rapidamente a luz é suprimida, e retorna após um tempo que depende da concentração de trolox adicionado (Figura 37A). As áreas de supressão foram relacionadas com a concentração do antioxidante, obtendo-se uma relação linear ( $Área = B \times [trolox]$ ) com  $B = 10,0 \pm 0.1$  e  $r = 0.9994$  (Figura 37B). Os valores da área de supressão ( $Área_{sup}$ ), utilizados no gráfico para cada concentração de trolox, correspondem a valores médios obtidos de oito experimentos independentes efetuados em dias diferentes.



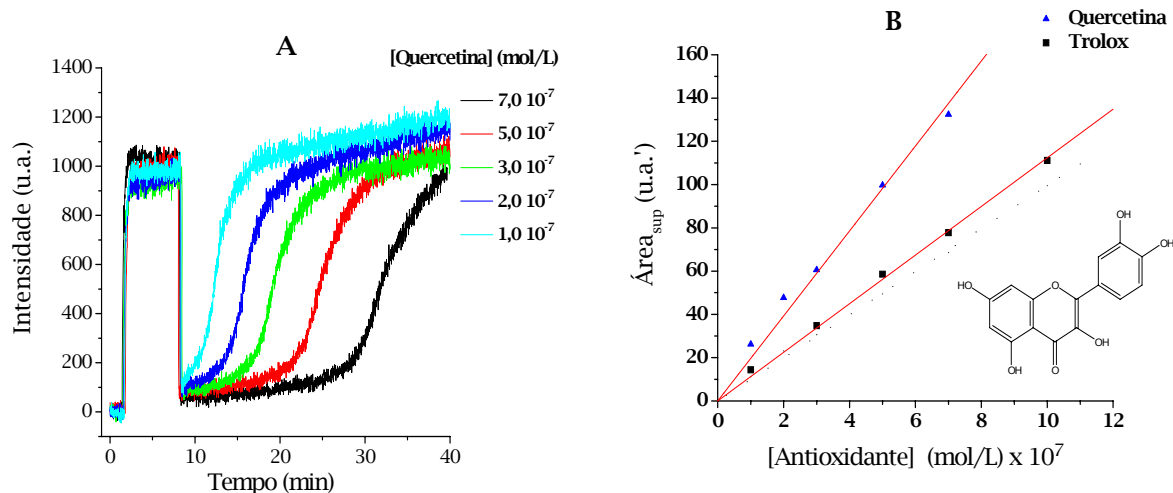
**Figura 37:** A) Efeito da adição de trolox sobre a cinética de emissão do sistema luminol/hemina/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/CTAB. B) Relação entre a área de supressão da emissão e a concentração de trolox. [luminol] =  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L, [hemina] =  $8,0 \cdot 10^{-7}$  mol/L, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] =  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L e [CTAB] =  $1,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L, em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ; pH 11,6).

Após mostrar a viabilidade de utilizar o ensaio anti-radicalar com luminol em meio micelar de CTAB com o antioxidante padrão trolox, foram efetuados experimentos da determinação da capacidade anti-radicalar dos antioxidantes ácido úrico, quercetina, rutina e vitamina E. Diferentemente do observado após a adição de trolox, a adição de ácido úrico provocou apenas uma supressão parcial da intensidade de emissão, e o subsequente aumento da intensidade ocorreu de maneira lenta (Figura 38A). Mesmo assim, foi possível obter as áreas de supressão a partir da integração das curvas cinéticas. A correlação entre as áreas de supressão e as concentrações de ácido úrico mostrou-se linear no intervalo de concentrações avaliado (Figura 38B), e o valor de  $n$  obtido por comparação com a correlação análoga com trolox foi igual a  $1,3 \pm 0,1$ . Esse valor é comparável ao obtido anteriormente através do ensaio em meio aquoso, com  $n$  igual a  $1,4 \pm 0,2$ .<sup>10</sup>



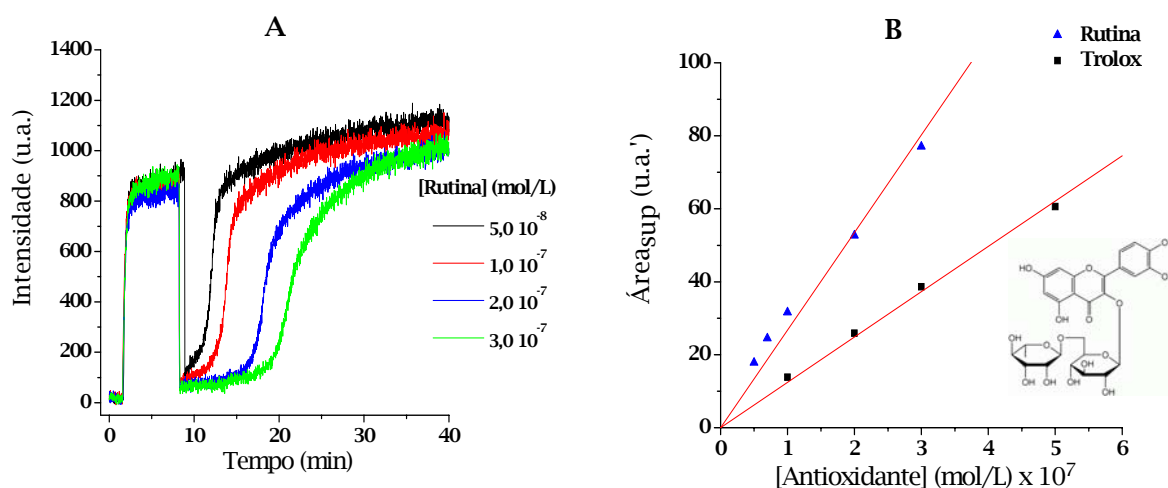
**Figura 38:** A) Efeito da adição de ácido úrico sobre a cinética de emissão do sistema luminol/hemina/ $\text{H}_2\text{O}_2$ /CTAB. B) (▲) Correlação entre a área de supressão de emissão e a concentração de ácido úrico (■) Correlação entre a área de supressão de emissão e a concentração de trolox. [luminol] =  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L, [hemina] =  $8,0 \cdot 10^{-7}$  mol/L, [ $\text{H}_2\text{O}_2$ ] =  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L e [CTAB] =  $1,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L, em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ) pH 11,6.

A adição de várias concentrações de quercetina ao sistema provocou supressão total da emissão, mas o posterior aumento da intensidade ocorreu com velocidade intermediária entre as observadas com trolox e ácido úrico (Figura 39A). A correlação entre a área suprimida pela quercetina e a sua concentração é linear (Figura 39B), e o  $n$  encontrado para a quercetina é igual a  $3,8 \pm 0,4$ , também similar ao encontrado no sistema aquoso, que foi de  $3,6 \pm 0,1$ .



**Figura 39:** A) Efeito da adição de quercetina sobre a cinética de emissão do sistema luminol/hemina/ $\text{H}_2\text{O}_2$ /CTAB. B) (▲) Correlação entre a área de supressão de emissão e a concentração de quercetina. (■) Correlação entre a área de supressão de emissão e a concentração de trolox. [luminol] =  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L, [hemina] =  $8,0 \cdot 10^{-7}$  mol/L, [ $\text{H}_2\text{O}_2$ ] =  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L e [CTAB] =  $1,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L, em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ) pH 11,6.

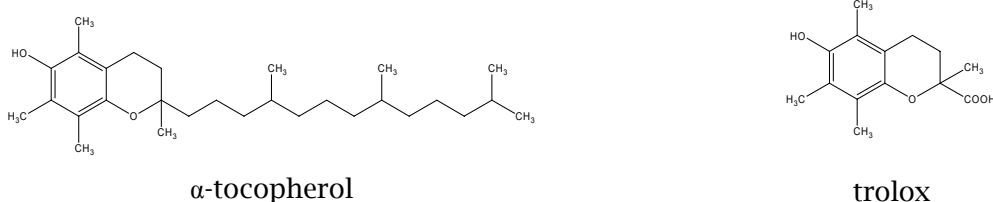
A rutina é um derivado glicosilado da quercetina, e a supressão na emissão do sistema após sua adição possui características similares às da supressão provocada pela adição de quercetina (Figura 40A). A correlação entre a área de supressão e a concentração de rutina se mostrou linear (Figura 40B), obtendo-se um valor de  $n = 4,0 \pm 0,2$  pela comparação da inclinação obtida com a do padrão trolox.



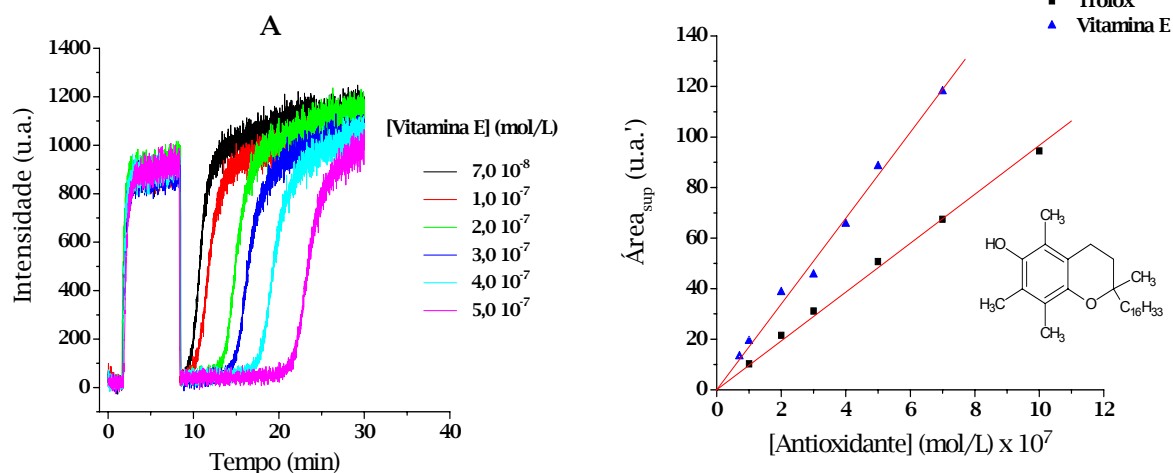
**Figura 40:** A) Efeito da adição de rutina sobre a cinética de emissão do sistema luminol/hemina/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/CTAB. B) (▲) Correlação entre a área de supressão de emissão e a concentração de rutina. (■) Correlação entre a área de supressão de emissão e a concentração de trolox. [luminol] = 1,0 × 10<sup>-4</sup> mol/L, [hemina] = 8,0 × 10<sup>-7</sup> mol/L, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 1,0 × 10<sup>-4</sup> mol/L e [CTAB] = 1,0 × 10<sup>-3</sup> mol/L, em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ) pH 11,6.

Para se ter maior confiabilidade nos valores encontrados para a capacidade antioxidante, no mesmo dia em que um antioxidante específico foi testado também foi feito o mesmo experimento com o antioxidante de referência, o trolox. Os valores de  $n$  apresentados foram obtidos da média de diferentes dias de experimento, e o  $n$  em cada experimento foi calculado em função da inclinação da reta obtida para o trolox no mesmo dia, pois se observou que os valores de  $n$  assim determinados eram mais reprodutíveis. Os gráficos apresentados são, portanto, correspondentes a apenas uma série de experimentos.

O principal motivo por que se iniciou o desenvolvimento de um ensaio em meio micelar é a possibilidade de se testar tanto substâncias hidro quanto lipossolúveis. Após verificarmos a concordância dos valores de  $n$  com os valores já reportados na literatura, realizamos o ensaio com a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), da qual o trolox é o derivado hidrossolúvel.



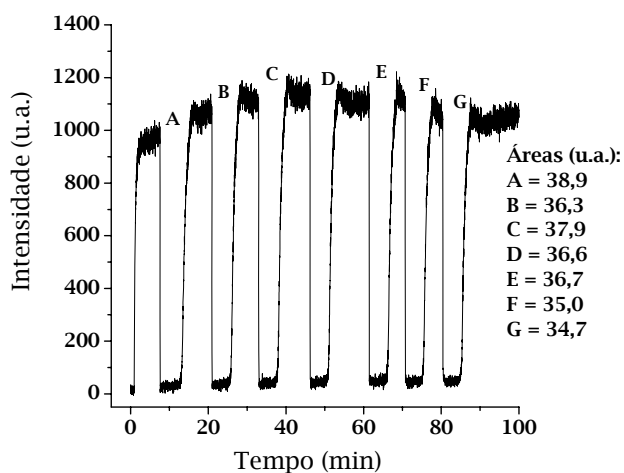
A solução de vitamina E foi preparada em etanol, pois na concentração da solução estoque preparada ( $3,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L) a dissolução em tampão fosfato/CTAB mostrou-se relativamente lenta. Para saber a interferência do etanol na curva de emissão, injetou-se 20  $\mu$ l desse solvente após 400 s do início da reação, e constatou-se que esse volume de etanol não interfere significativamente na emissão. Ao adicionar vitamina E no sistema, a emissão é totalmente suprimida, e da mesma forma que ocorre com o trolox, após certo tempo a intensidade aumenta rapidamente (Figura 41A). Entretanto, o valor de  $n$  encontrado para esse antioxidante,  $n = 3,5 \pm 0,1$ , foi consideravelmente maior que o para trolox ( $n=2$ ) (Figura 41B).



**Figura 41:** A) Efeito da adição de Vitamina E sobre a cinética de emissão do sistema luminol/hemina/ $H_2O_2$ /CTAB. B) (▲) Correlação entre a área de supressão de emissão e a concentração de Vitamina E. (■) Correlação entre a área de supressão de emissão e a concentração de trolox. [luminol] =  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L, [hemina] =  $8,0 \cdot 10^{-7}$  mol/L, [ $H_2O_2$ ] =  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L e [CTAB] =  $1,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L, em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ) pH 11,6.

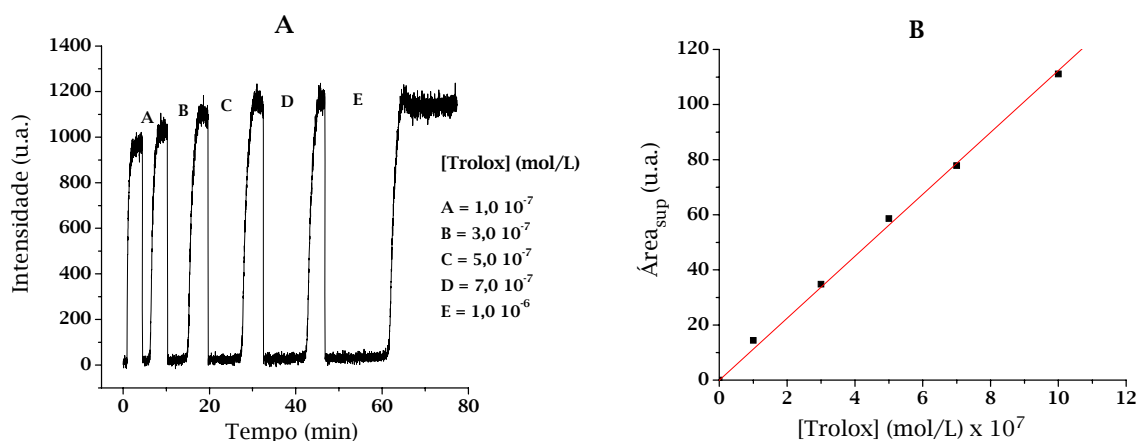
As condições escolhidas para a realização do ensaio apresentam intensidade de emissão praticamente constante durante um longo período de tempo (Figura 19). Além disso, após a aplicação da amostra anti-radicalar e a inibição da emissão, a intensidade atinge um valor aproximadamente igual ao que seria atingido na cinética sem a adição de antioxidante. Esses dois fatores possibilitaram verificar o efeito de injeções consecutivas de trolox durante o percurso da reação (Figura 43).

Quando se injetou a mesma quantidade de trolox ( $3,0 \cdot 10^{-7}$  mol/L) de maneira consecutiva por sete vezes, a área suprimida foi praticamente constante após cada injeção (Figura 42). Observou-se leve diminuição nessa área com o decorrer das injeções, porém esta é inferior à variação observada quando se realiza o mesmo experimento injetando-se trolox em ensaios diferentes. Utilizando-se consecutivamente concentrações diferentes de trolox (Figura 43A) obteve-se uma correlação linear entre a área de supressão e a concentração de trolox (Figura 43B).



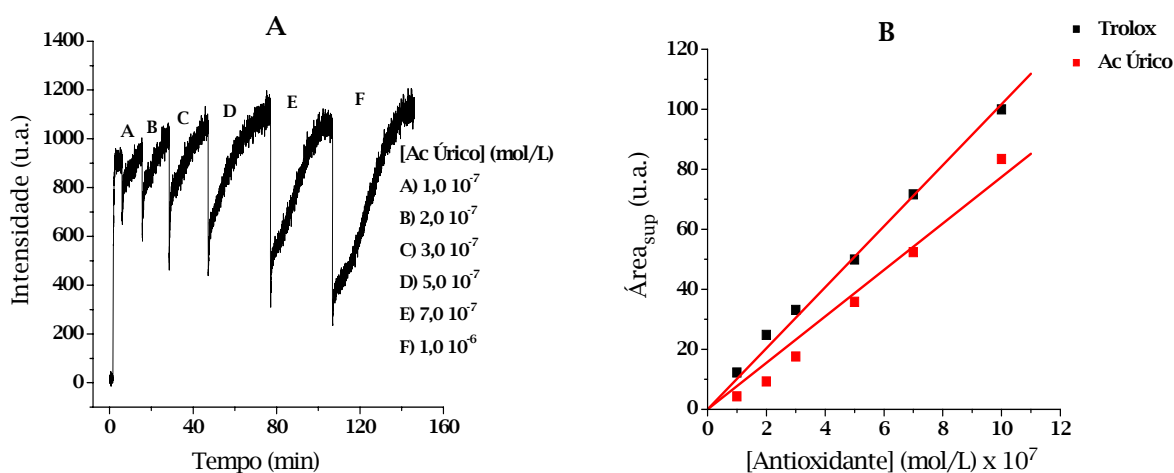
**Figura 42:** Cinética de emissão do sistema luminol em CTAB com injeções consecutivas de trolox  $3,0 \cdot 10^{-7}$  mol/L. [luminol] =  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L, [hemina] =  $8,0 \cdot 10^{-7}$  mol/L, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] =  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L e [CTAB] =  $1,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L, em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ) pH 11,6.



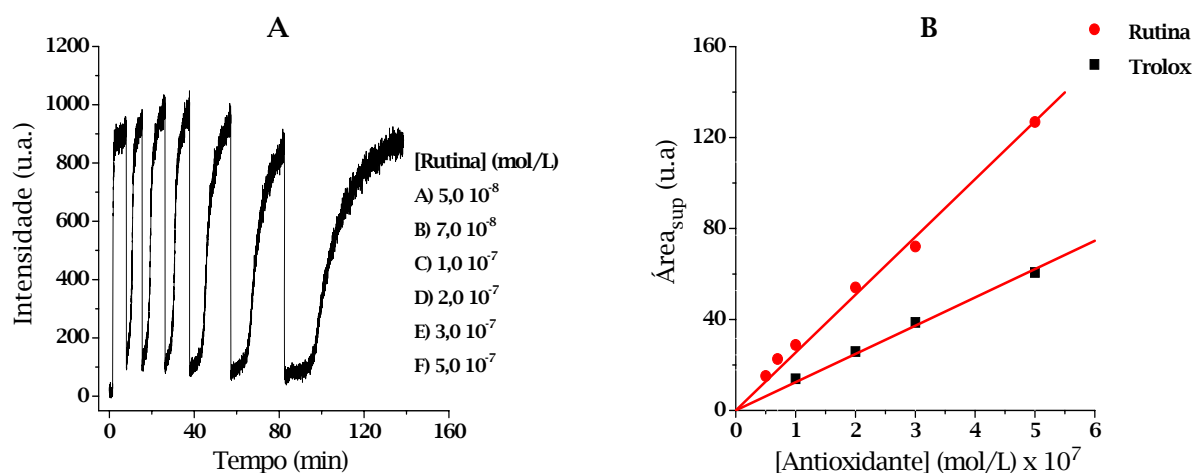


**Figura 43:** A) Cinética de emissão do sistema luminol em CTAB com injeções consecutivas de diversas concentrações de trolox. B) Correlação entre a concentração de trolox e a área de supressão obtida pelo gráfico do item anterior. Ajuste linear com relação à origem dos eixos:  $B = 11.2 \pm 0.2$ ,  $R = 0.99968$ . [luminol] =  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L, [hemina] =  $8,0 \cdot 10^{-7}$  mol/L, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] =  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L e [CTAB] =  $1,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L, em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ) pH 11,6.

O mesmo experimento foi realizado com ácido úrico irutina (Figura 44 e Figura 45). Os valores de  $n$  obtidos dessa forma (rutina:  $n = 4,1 \pm 0,2$ ; ácido úrico:  $n = 1,5 \pm 0,1$ ) concordam com os determinados anteriormente neste trabalho utilizando-se experimentos separados. Este fato indica que pelo menos para o número de injeções testado é possível aplicar esse método.



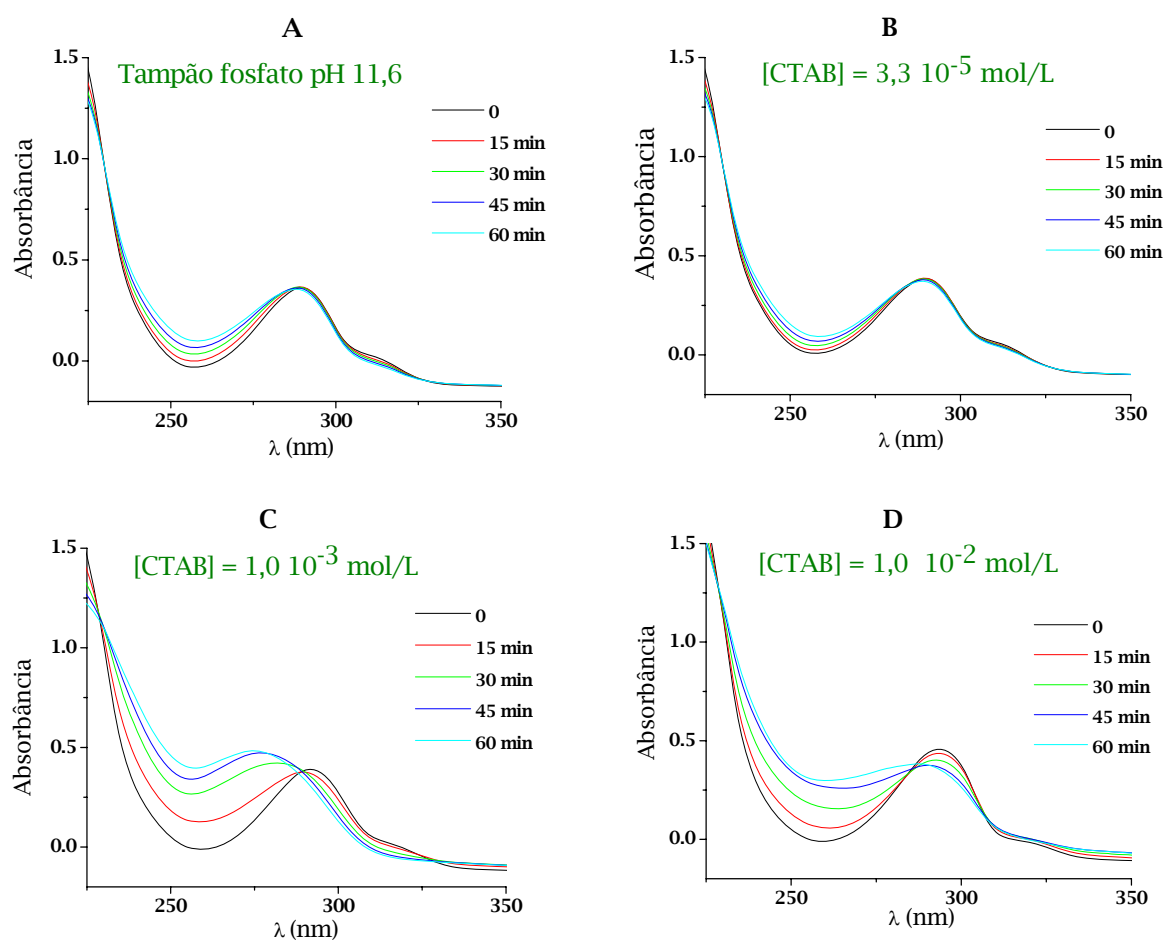
**Figura 44:** A) Cinética de emissão do sistema luminol em CTAB com injeções consecutivas de ácido úrico. B) Correlação entre concentração de antioxidante e área de supressão. [luminol] =  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L, [hemina] =  $8,0 \cdot 10^{-7}$  mol/L, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] =  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L e [CTAB] =  $1,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L, em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ) pH 11,6.



**Figura 45:** A) Cinética de emissão do sistema luminol em CTAB com injeções consecutivas de rutina; B) Correlação entre concentração de antioxidante e área de supressão. [luminol] =  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L, [hemina] =  $8,0 \cdot 10^{-7}$  mol/L,  $[H_2O_2]$  =  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L e [CTAB] =  $1,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L, em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ) pH 11,6.

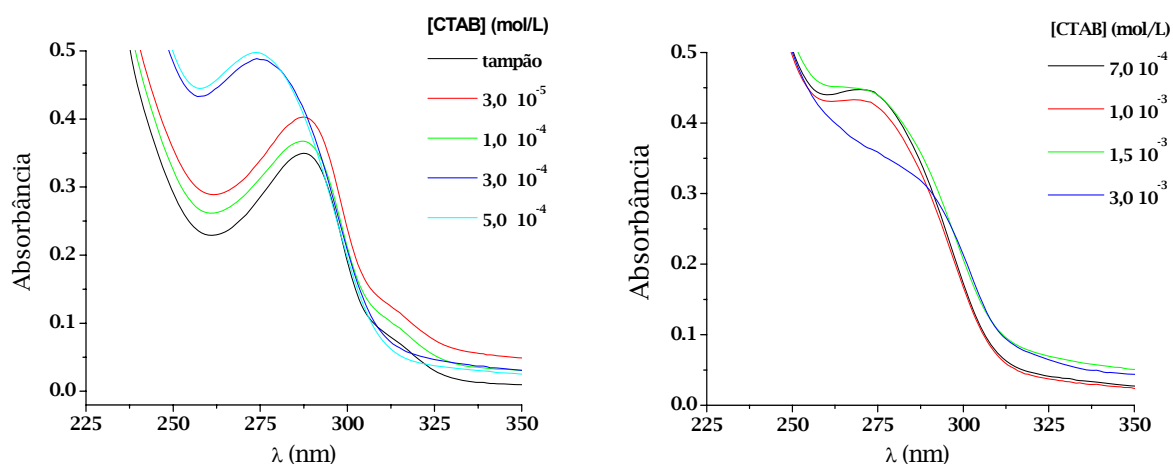
#### *Estabilidade do trolox em CTAB*

Nos experimentos aqui apresentados as soluções de todos os antioxidantes (exceto Vitamina E) foram preparadas em NaOH 0,01 mol/L. Observou-se, porém, que quando a solução de trolox era preparada em tampão fosfato/CTAB 1,0 mmol/L, as áreas de supressão obtidas eram até 50% menores que as obtidas quando se preparava em NaOH 0,01 mol/L. Para verificar uma possível destruição do trolox nesse meio foram acompanhadas as alterações no espectro de absorção do trolox como o tempo a partir do preparo da solução em CTAB. Os espectros foram registrados em intervalos de 15 min e o experimento foi realizado em diferentes concentrações de CTAB a fim de verificar o efeito da concentração de tensoativo sobre a velocidade e extensão do processo (Figura 46).



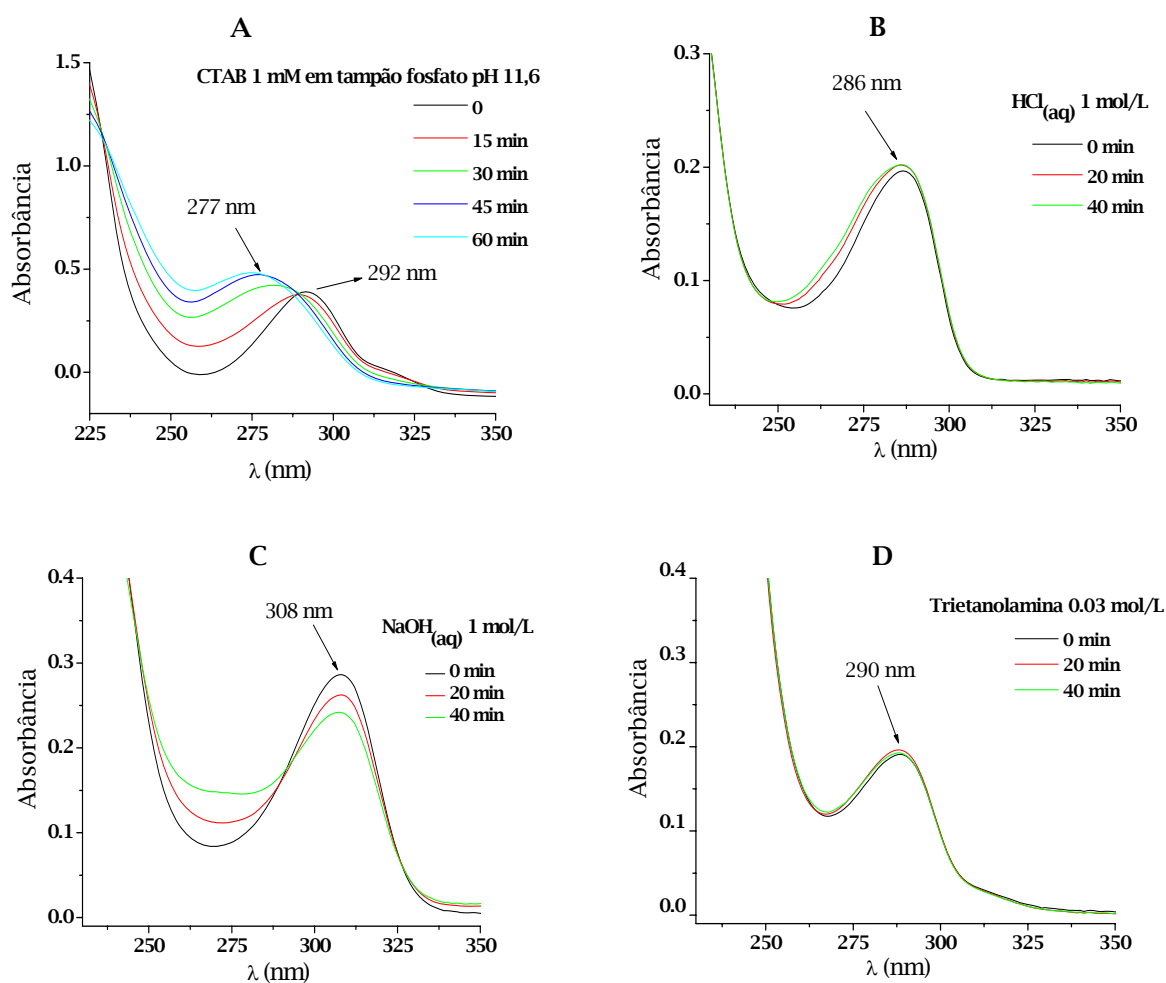
**Figura 46:** Espectros de absorção de trolox na presença de A) tampão fosfato B) CTAB  $3,3 \cdot 10^{-5}$  mol/L C) CTAB  $1,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L D)  $1,0 \cdot 10^{-2}$  mol/L, em tampão fosfato, registrados em intervalos de tempo após o preparo da solução. [trolox] =  $2,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L.

Pode-se ver que depois de uma hora o espectro de trolox em tampão apresenta poucas alterações, o mesmo ocorrendo em CTAB  $3,3 \cdot 10^{-5}$  mol/L (Figura 46A e B). No caso das concentrações maiores de CTAB,  $1,0 \cdot 10^{-3}$  e  $1,0 \cdot 10^{-2}$  mol/L, as mudanças espectrais aparecem a partir de 30 min do preparo das soluções (Figura 46C e D). Para explorar mais o efeito da concentração de CTAB, realizou-se esse mesmo experimento com outras concentrações de tensoativo. Foram empregadas concentrações de CTAB no intervalo de zero a  $3,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L. Abaixo são mostrados os espectros registrados 60 min após o preparo das soluções (Figura 47).



**Figura 47:** Espectros de absorção de trolox  $1,4 \cdot 10^{-4}$  mol/L em diferentes concentrações de CTAB registrados após 60 min do preparo das soluções. Tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ) pH 11,6.

Os gráficos da Figura 47 sugerem que a alteração espectral ocorre a partir de uma concentração específica de CTAB, igual a  $3,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L. Como a cmc desse tensoativo no tampão em questão é igual a  $2,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L, a questão levantada foi se o trolox está sofrendo uma reação no meio ou se a mudança espectral é devida a um processo de agregação/micelização. Para tentar responder essa pergunta, preparou-se uma solução de trolox em  $\text{HCl}_{(aq)}$ ,  $\text{NaOH}_{(aq)}$  e trietanolamina $_{(aq)}$ , e foram registrados espectros em intervalos de tempo a fim de verificar uma possível reação catalisada por ácido, base ou amina (impurezas comuns em sais de amônio quaternário como o CTAB) (Figura 48).



**Figura 48:** Espectros de absorção de trolox em A) CTAB  $1,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L B) HCl 1,0 mol/L C) NaOH 1,0 mol/L D) Trietanolamina 0,03 mol/L, registrados em intervalos de tempo após o preparo da solução. [trolox] =  $8,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L.

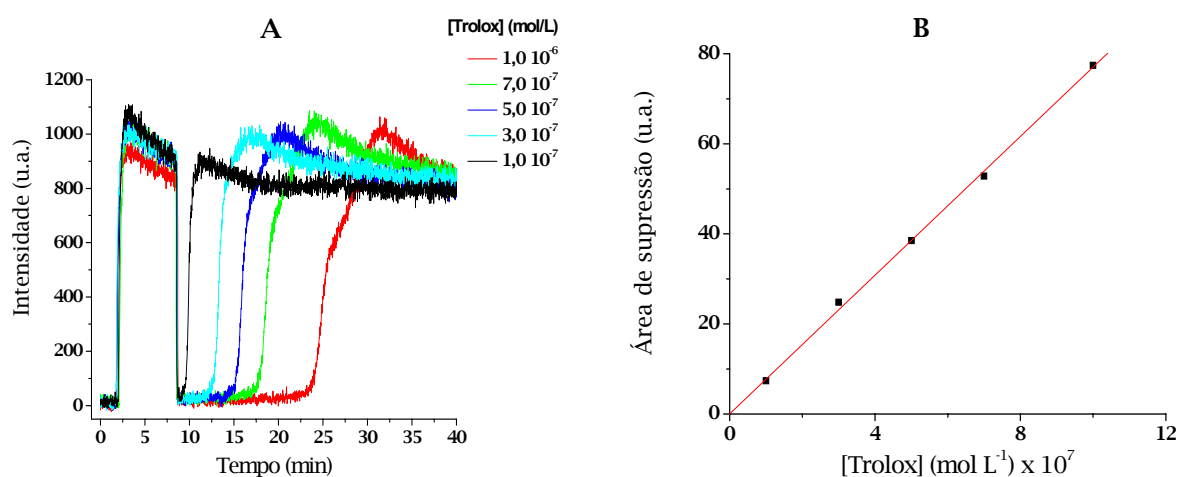
Nenhum dos meios utilizados apresentou as mesmas características do espectro em CTAB (Figura 48A). Isso não confirma, mas também não descarta a possibilidade de que é uma reação que está ocorrendo. O deslocamento batocrômico para 308 nm observado no espectro do trolox em NaOH (Figura 48C) deve indicar a formação do fenolato.

Apesar de não se ter chegado a uma conclusão sobre o fenômeno envolvendo o trolox em CTAB, ele ainda está sendo usado como padrão no ensaio anti-radicalar, uma vez que se pode supor que além do ensaio ser rápido, a reação com os radicais

provenientes da oxidação do luminol deve ser mais rápida que qualquer outra envolvendo o trolox.

### Ensaio anti-radicalar em CTAC

Estabelecido esse sistema, testou-se o antioxidante padrão, trolox. Na Figura 49A é mostrado o efeito da adição de diversas concentrações de trolox 400 s após o início da reação.

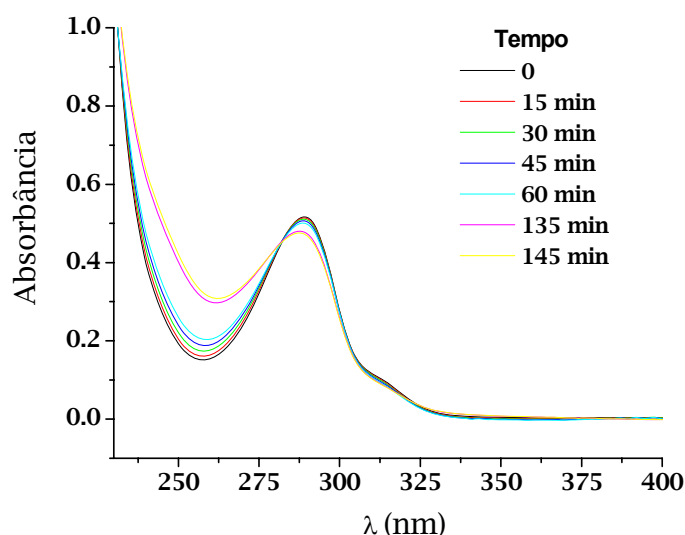


**Figura 49:** A) Efeito da adição de trolox na cinética de emissão do sistema luminol/hemina/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/CTAC em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ) pH = 11,6. B) Relação entre a área de supressão da emissão e a concentração de trolox. [luminol] = 1,0 10<sup>-4</sup> mol/L; [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 1,0 10<sup>-4</sup> mol/L; [hemina] = 8,0 10<sup>-7</sup> mol/L e [CTAC] = 5,0 10<sup>-2</sup> mol/L.

Observa-se que as áreas suprimidas são grandes o suficiente para determinar baixas concentrações de antioxidante, menores até que 10<sup>-7</sup> mol/L. Assim, as condições definidas parecem ser adequadas para a realização do ensaio. A dependência da área de supressão da emissão com a concentração de trolox é linear e expressa por  $\text{Área} = 7,7 \times [\text{trolox}]$  (Figura 49B).

### Ensaio anti-radicalar em SDS

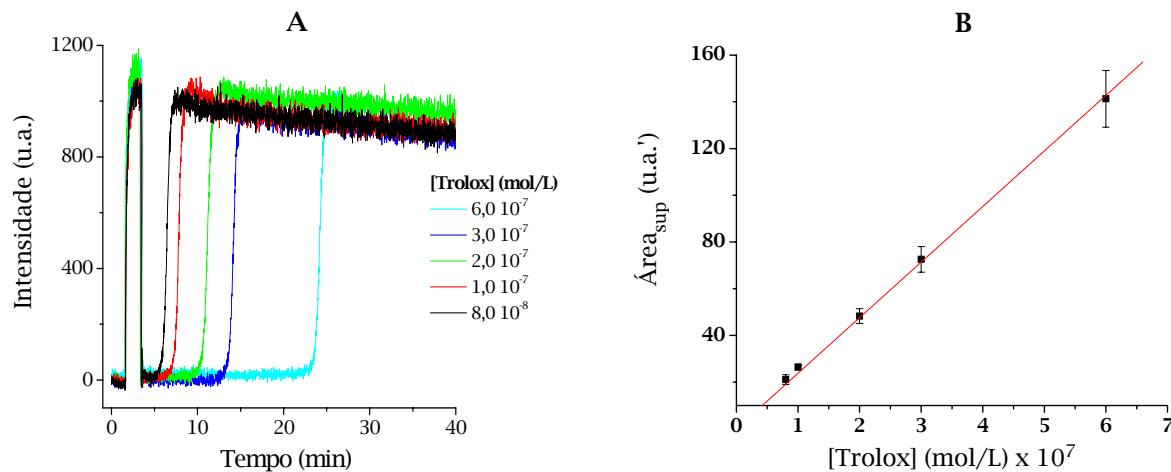
Um dos possíveis problemas na realização do ensaio anti-radicalar em CTAB é que o padrão, trolox, apresenta uma diminuição na capacidade anti-radicalar na presença de CTAB, o que é acompanhado de mudança no seu espectro UV-VIS. Diante disso, verificou-se o comportamento do espectro de absorção do trolox em SDS, sendo que o primeiro espectro foi registrado imediatamente após o preparo dessa solução. Na Figura 50 percebe-se que só é possível notar mudanças significativas no espectro após uma hora de preparo da solução, e isso representa uma vantagem em realizar o ensaio em SDS.



**Figura 50:** Espectros de absorção de trolox em SDS registrados em intervalos de tempo após o preparo da solução. [trolox] =  $2,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L e [SDS] =  $1,2 \cdot 10^{-2}$  mol/L, em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ; pH 11,6).

A adição de trolox ao sistema definido para a realização do ensaio foi feita após 100 s do início da reação e leva à supressão total da intensidade de emissão, a qual é recuperada ao valor esperado após consumo total do composto anti-radical (Figura 51A). A dependência da área de supressão com a concentração de trolox mostra-se linear e pode ser expressa por  $Área = 23,8 \times [trolox]$  (Figura 51B), o que indica uma sensibilidade maior do ensaio comparado com os sistemas em CTAB e

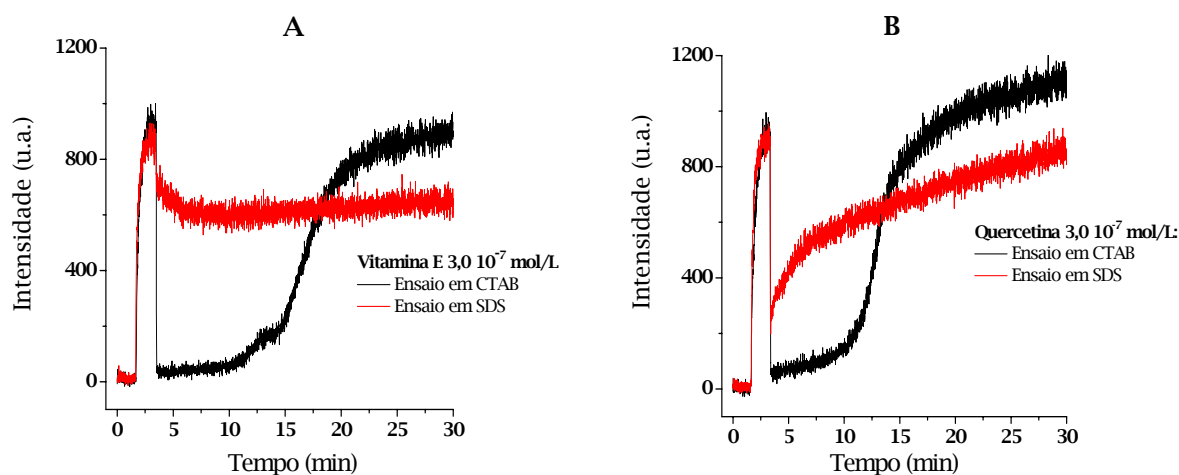
CTAC, os quais mostram uma dependência expressa respectivamente por  $\text{Área} = 10,0 \times [\text{trolox}]$  e  $\text{Área} = 7,7 \times [\text{trolox}]$ .



**Figura 51:** **A)** Efeito da adição de trolox na cinética de emissão do sistema luminol/hemina/ $\text{H}_2\text{O}_2$ /SDS em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ ) pH = 11,6. **B)** Relação entre a área de supressão da emissão e a concentração de trolox. [luminol] =  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L; [ $\text{H}_2\text{O}_2$ ] =  $1,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L; [hemina] =  $8,0 \cdot 10^{-8}$  mol/L e [SDS] =  $1,2 \cdot 10^{-2}$  mol/L.

A adição de vitamina E no sistema não suprimiu completamente a emissão e também não foi observado o posterior aumento da intensidade que ocorre quando esse antioxidante é adicionado ao sistema em CTAB (Figura 52A). Sendo assim, não foi possível determinar a capacidade antioxidante da vitamina E com esse ensaio em SDS. A adição de quercetina também tem um perfil de inibição da emissão diferente do apresentado no sistema em CTAB (Figura 52B), mas nesse caso a determinação da área é possível.

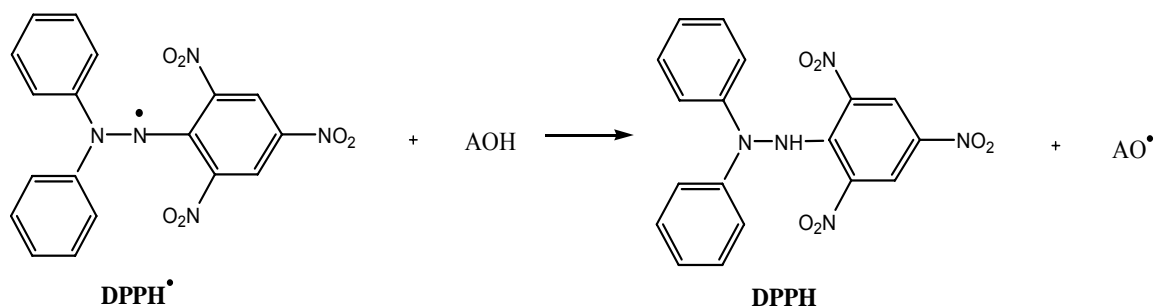




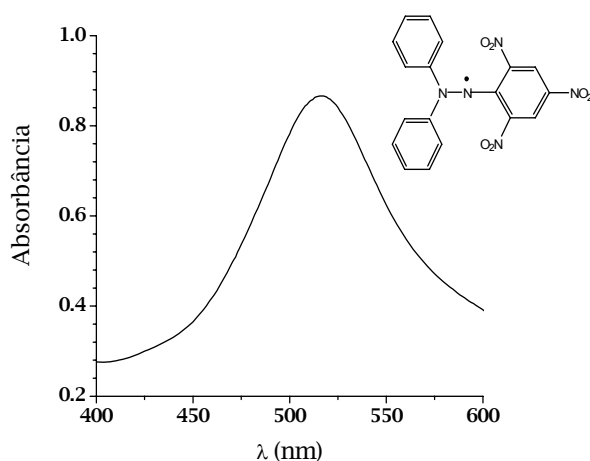
**Figura 52:** Cinética de emissão dos ensaios de determinação da capacidade anti-radicalar em CTAB e SDS após adição de **A)** vitamina E  $3,0 \cdot 10^{-7}$  mol/L e **B)** quercetina  $3,0 \cdot 10^{-7}$  mol/L .

#### 4.2.2 Determinação da capacidade anti-radical utilizando-se o ensaio com DPPH

Um ensaio de determinação da capacidade anti-radicalar bastante utilizado é o que se baseia na reação do radical estável DPPH<sup>•</sup>.<sup>64,65,66</sup> Em sua forma radical, DPPH tem uma banda de absorção em 515 nm que desaparece sob redução por um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R<sup>•</sup>) (Esquema 9). Se esse composto for o reagente limitante, uma solução de DPPH com absorbância inicial igual a  $A_i$  vai apresentar, após a reação, uma absorbância  $A_f$  que depende da concentração do composto antiradical e da sua capacidade anti-radicalar. Na Figura 53 tem-se o espectro de absorção do radical DPPH<sup>•</sup> em etanol, na concentração em que foi utilizado no ensaio.



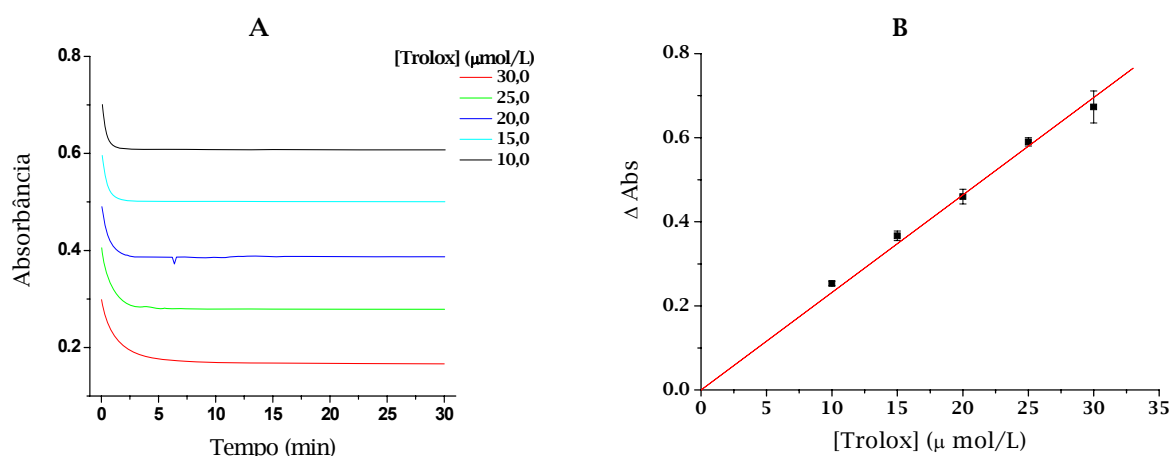
**Esquema 9:** Reação do radical DPPH<sup>•</sup> com antioxidantes.



**Figura 53:** Espectro de absorção do radical DPPH em etanol. [DPPH] =  $8,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L.

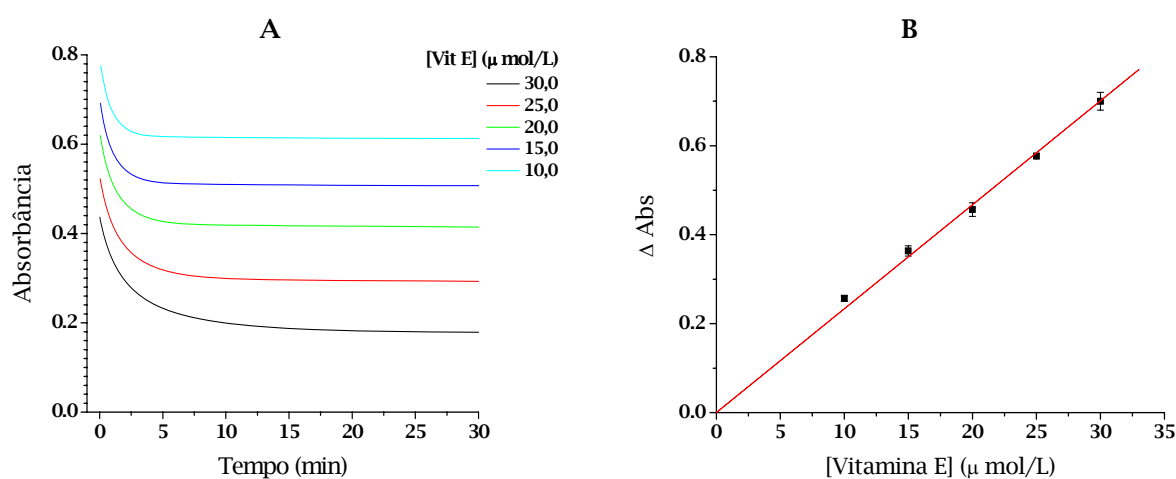
A seguir são mostrados os resultados obtidos com esse ensaio, a fim de comparar com os resultados obtidos com o ensaio quimiluminescente desenvolvido nesse trabalho. Para tal, utilizou-se o mesmo antioxidante padrão, o trolox.

Na Figura 54A é mostrada a cinética da reação de trolox com o radical, com diferentes concentrações iniciais desse composto anti-radicalar. Como se pode ver a reação é rápida e a absorbância final ( $A_f$ ) é atingida em menos de 5 minutos. Na Figura 54B foi plotado  $\Delta Abs$  ( $A_i - A_f$ ) em função da concentração de trolox, sendo que a dependência linear observada tem coeficiente linear  $\alpha$  igual a 0,023 e coeficiente de correlação  $r$  igual a 0,998, com o ajuste linear passando pela origem dos eixos.

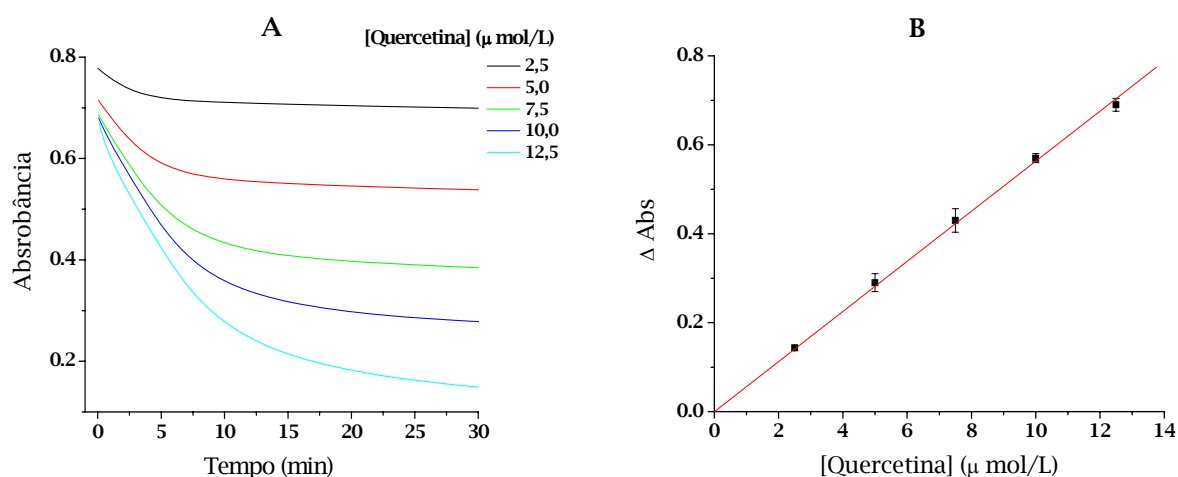


**Figura 54:** A) Cinética da reação de DPPH 80 μmol/L com trolox em etanol, monitorada em 515 nm. [trolox]: (—) 10,0 μmol/L; (—) 15,0 μmol/L; (—) 20,0 μmol/L; (—) 25,0 μmol/L; (—) 30,0 μmol/L. B) Correlação entre variação na absorbância ( $\Delta$ Abs) e concentração de trolox; ajuste linear em relação à origem dos eixos com  $\alpha = 0,023$  e  $r = 0,998$ .

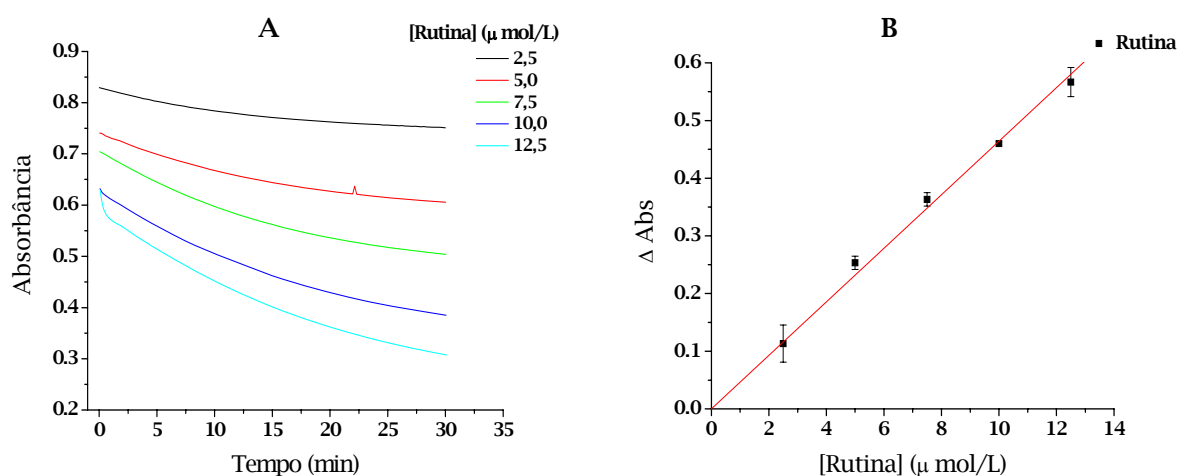
Os demais antioxidantes testados foram vitamina E, quercetina e rutina. Não se testou o ácido úrico devido à sua baixa solubilidade em etanol. Dos compostos testados, quercetina e rutina apresentaram as cinéticas mais lentas (Figura 56 e Figura 57). A vitamina E apresentou um comportamento intermediário, reagindo um pouco mais lentamente que trolox (Figura 55).



**Figura 55:** Cinética da reação de DPPH 80 μM com vitamina E em etanol, monitorada em 515 nm. [vitamina E]: (—) 10,0 μmol/L; (—) 15,0 μmol/L; (—) 20,0 μmol/L; (—) 25,0 μmol/L; (—) 30,0 μmol/L. B) Correlação entre variação na absorbância ( $\Delta$ Abs) e concentração de vitamina E.



**Figura 56:** A) Cinética da reação de DPPH 80  $\mu\text{mol/L}$  com quercetina em etanol, monitorada em 515 nm. [quercetina]: (—) 2,5  $\mu\text{mol/L}$ ; (—) 5,0  $\mu\text{mol/L}$ ; (—) 7,5  $\mu\text{mol/L}$ ; (—) 10,0  $\mu\text{mol/L}$ ; (—) 12,5  $\mu\text{mol/L}$ . B) Correlação entre variação na absorbância ( $\Delta\text{Abs}$ ) e concentração de quercetina.



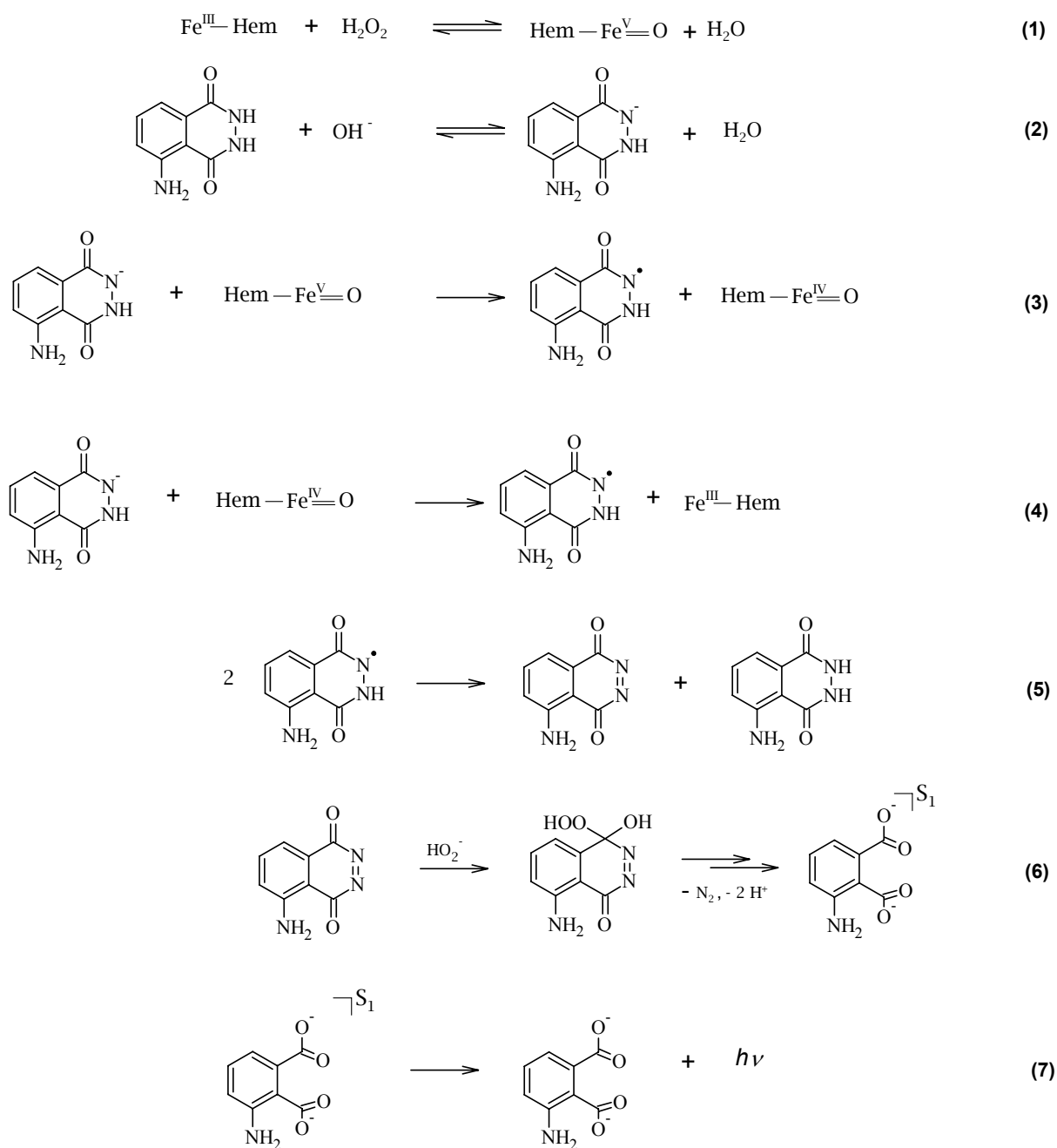
**Figura 57:** A) Cinética da reação de DPPH 80  $\mu\text{mol/L}$  com rutina em etanol, monitorada em 515 nm. [rutina]: (—) 2,5  $\mu\text{mol/L}$ ; (—) 5,0  $\mu\text{mol/L}$ ; (—) 7,5  $\mu\text{mol/L}$ ; (—) 10,0  $\mu\text{mol/L}$ ; (—) 12,5  $\mu\text{mol/L}$ . B) Correlação entre variação na absorbância ( $\Delta\text{Abs}$ ) e concentração de rutina.

Comparando as inclinações das retas obtidas quando se plotou  $\Delta\text{Abs}$  em função da concentração de antioxidante (Figura 55B, Figura 56B e Figura 57B), e considerando  $n=2$  para o trolox, os valores da capacidade antioxidante encontrados para os compostos foram  $n = 2,0 \pm 0,1$  para a vitamina E,  $n = 4,9 \pm 0,1$  para a quercetina e  $n = 4,0 \pm 0,1$  para a rutina.

## 5 DISCUSSÃO

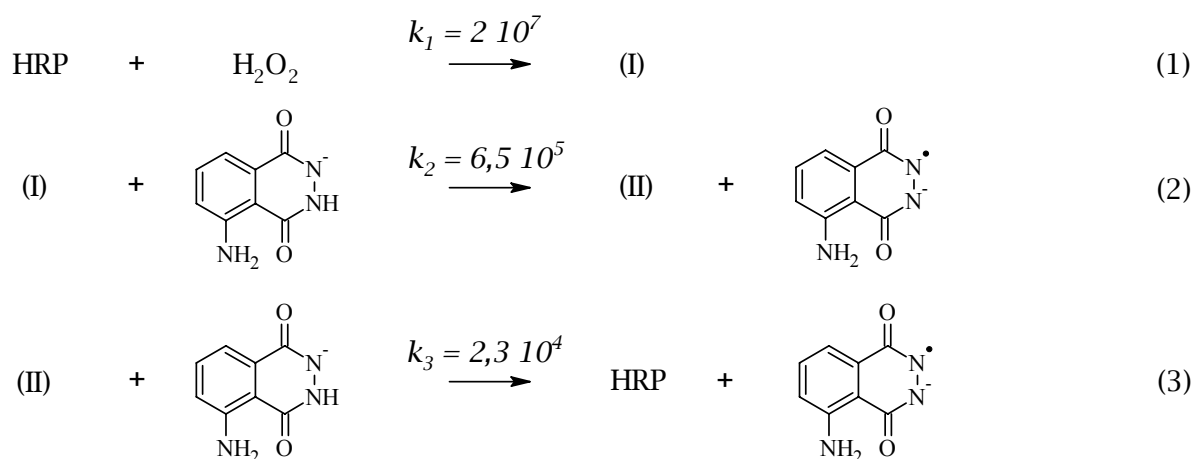
Métodos analíticos baseados em sistemas quimiluminescentes têm como principais vantagens os baixos limites de detecção, a ampla faixa de linearidade e simplicidade da instrumentação. Neste trabalho utilizou-se a reação de oxidação do luminol por  $H_2O_2$  catalisada por hemina para avaliar a capacidade anti-radicalar. Para a adequada interpretação dos resultados experimentais obtidos com a reação do luminol considera-se de importância crucial o entendimento do mecanismo desta transformação. Apesar do fato de que o mecanismo da oxidação quimiluminescente com hemina como catalisador não ser totalmente compreendido, se pode formular um mecanismo geral para esta transformação em analogia com aquele formulado para o caso da catálise com peroxidase (Esquema 10).<sup>13,67</sup>

Primeiramente, o peróxido de hidrogênio reage com a hemina para formar a espécie que é formalmente  $Hem-Fe^V=O$  (passo 1, Esquema 10), análoga ao complexo I da HRP (Esquema 11). Essa espécie reage com o mono-ânion do luminol em duas etapas, na primeira formando  $Hem-Fe^{IV}=O$  e na segunda recuperando o catalisador (passos 3 e 4, Esquema 10). Essas reações formam radicais do luminol, os quais por disproporcionamento dão origem à diazoquinona (passo 5, Esquema 10). O  $H_2O_2$  desempenha dois papéis na reação, formando a forma ativa do catalisador e atacando a diazoquinona para formar o hidroperóxido. Os passos pelos quais a decomposição do hidroperóxido leva à emissão de luz ainda geram muitas dúvidas, mas sabe-se que nessas etapas ocorre liberação de nitrogênio e é o 3-aminofalato no estado excitado, a espécie emissora (passo 6, Esquema 10).



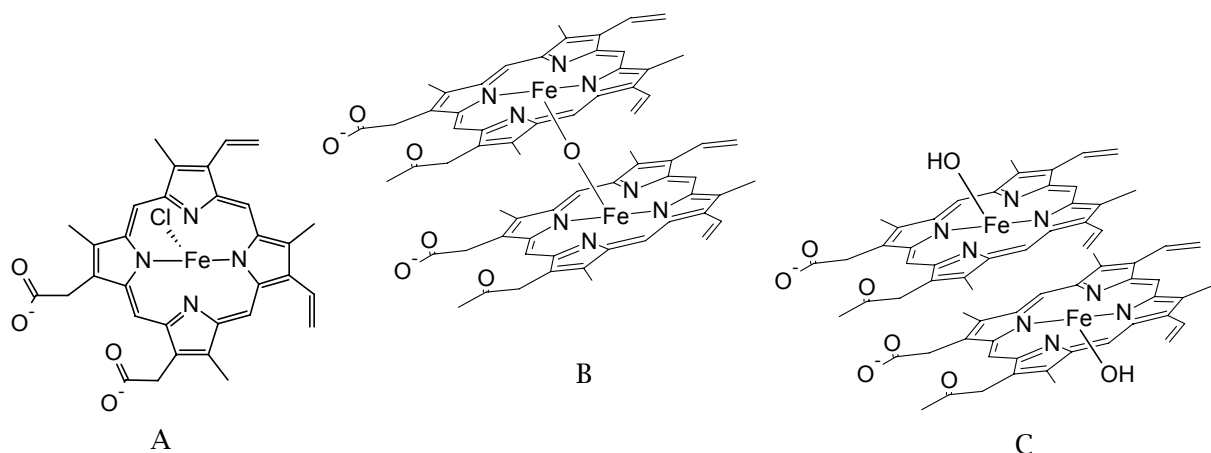
**Esquema 10:** Mecanismo proposto da reação de oxidação do luminol catalisada por hemina em meio alcalino.

A reação da hemina com  $\text{H}_2\text{O}_2$  e a posterior oxidação do luminol foram propostas em analogia ao mecanismo de catálise por HRP (Esquema 11).<sup>67, 68</sup>



**Esquema 11:** Oxidação do luminol catalisada por HRP.

As constantes de velocidade para a reação com HRP mostram que a etapa 1 (Esquema 11) é a mais rápida. Entretanto, os valores de  $k$  para esse sistema não podem ser estendidos diretamente ao sistema catalisado por hemina. A reação entre  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o derivado da hemina protohemin mono-3-(1-imidazolil)propilamida monometil éster apresenta velocidade igual a  $12 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , enquanto a mesma reação com HRP tem velocidade de  $1,8 \cdot 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .<sup>69</sup> Já a velocidade da reação dos complexos I e II com vários substratos parece não ser muito afetada quando se substitui HRP pelo mesmo composto.<sup>70</sup> Isso sugere que a maior reatividade da HRP comparada à hemina está justamente na velocidade da reação com peróxido, e isso ocorre devido à catálise básica intramolecular que facilita a saída de água após a formação do complexo  $\text{HRP-H}_2\text{O}_2$ .<sup>69</sup> Outra diferença a ser considerada na análise da catálise por hemina é a ocorrência de dimerização em meio aquoso. Sobre a estrutura deste dímero, que desde os anos 60 vinha sendo descrita como contendo uma ponte  $\mu$ -oxo<sup>71</sup>, foram encontradas recentemente evidências de que a interação entre as moléculas de hemina é não covalente e ocorre entre as faces sem ligantes do complexo pentacoordenado  $\text{H}_2\text{O}/\text{OH-Hem-Fe}^{\text{III}}$ <sup>72</sup> (Figura 58).



**Figura 58:** A) Monômero de hemina em solução básica; B) Dímero de hemina formado por ponte  $\mu$ -oxo; C) Dímero de hemina formado por interação não covalente entre as faces não ligantes.

### 5.1.1 Oxidação do luminol em meios micelares catiônicos de CTAB e CTAC e aniônicos de SDS

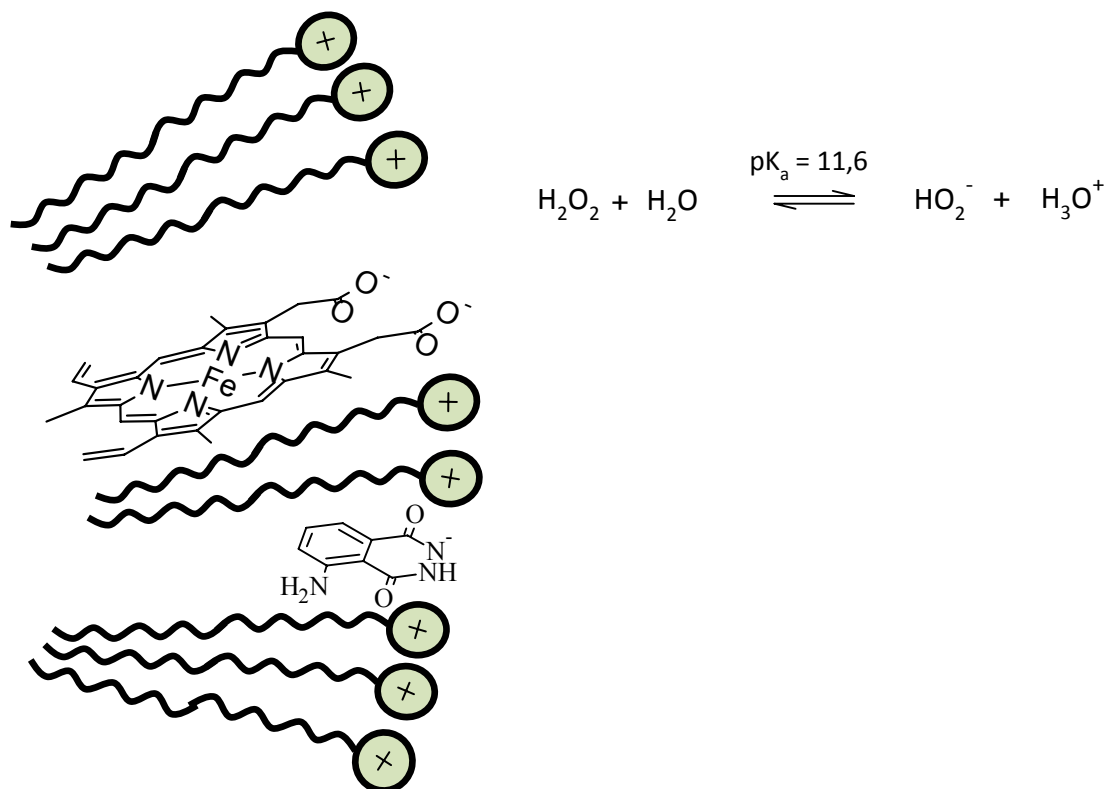
Nos experimentos cinéticos realizados da oxidação do luminol em meios micelares catiônicos foram variadas as concentrações de luminol, hemina, peróxido de hidrogênio e tensoativo e verificada a influência na intensidade de emissão. A intensidade de emissão está relacionada à velocidade da reação, pois corresponde à velocidade de formação do estado excitado. Considerando que o rendimento quântico permanece constante com a variação das concentrações dos reagentes, a intensidade de emissão deve ser diretamente proporcional à velocidade da reação. Desta maneira, a intensidade inicial de emissão pode ser utilizada como medida para a velocidade inicial da reação e pode-se assim verificar a influência da concentração dos reagentes sobre a velocidade da reação. Deve-se mencionar ainda aqui que na maioria das condições experimentais utilizadas, o decaimento da intensidade de emissão se mostrou extremamente lento, sendo assim, não foi possível obter as constantes de velocidade deste decaimento.

Experimentos iniciais mostraram que a presença de CTAB provoca uma diminuição em  $I_0$  de aproximadamente 500 vezes (Figura 13, p. 50). Essa baixa



intensidade de emissão revela que a presença do tensoativo causa um retardo na reação. Essa diminuição na velocidade da reação pode acontecer porque as espécies adicionadas à solução distribuem-se entre duas regiões distintas, o interior/superfície da micela e o solvente. As condições nessas duas regiões podem resultar em diferentes velocidades de reação, alterando a velocidade global que é acompanhada na cinética de emissão. Apesar do CTAB provocar uma mudança pronunciada em  $I_0$ , a quantidade total de luz emitida pelo sistema não é afetada pela presença de tensoativo, uma vez que o rendimento quântico da reação, determinado em duas condições, não mostrou diferenças significativas com o rendimento quântico determinado na ausência de CTAB (Figura 21, p. 57 e Figura 22, p. 58). A diminuição na velocidade da reação é acompanhada por mudanças no espectro de absorção do luminol e da hemina (Figura 23, p. 59 e Figura 24, p. 60). Portanto, as mudanças na cinética de emissão podem ser devidas à interação entre esses reagentes e o tensoativo.

Considerando que em meio básico tanto o luminol quanto a hemina apresentam cargas negativas, propôs-se que a distribuição dos reagentes em solução aquosa básica (tampão fosfato 0,01 mol/L, pH 11,6) contendo CTAB  $1,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L é a representada a seguir (Esquema 12).



**Esquema 12:** Partição dos reagentes na oxidação do luminol por  $\text{H}_2\text{O}_2$  catalisada por hemina em tampão fosfato ( $\mu = 0,1$ , pH 11,6) na presença de CTAB  $1,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L.

A hemina parece interagir mais efetivamente com o tensoativo, visto que as mudanças espectrais ocorrem em concentrações de CTAB abaixo da cmc. De fato, alguns trabalhos mostram que porfirinas formam agregados pré-micelares com tensoativos catiônicos.<sup>73,74</sup> A hemina poderia assim interagir tanto eletrostaticamente com a superfície da micela quanto por forças de van der Waals com as caudas apolares. As mudanças no espectro de absorção do luminol são mais pronunciadas acima da cmc, o que pode indicar que só existe interação entre luminol e CTAB após a formação de micelas.

O sistema utilizado como padrão no ensaio antioxidante em CTAB é realizado com luminol  $1,0 \cdot 10^{-4}$ , hemina  $8,0 \cdot 10^{-7}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$   $1,0 \cdot 10^{-4}$  e CTAB  $1,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L. Essas foram as concentrações utilizadas quando foi investigado o efeito da variação da concentração dos reagentes sobre a cinética de emissão. O efeito da concentração de peróxido foi verificado no intervalo de  $2,0 \cdot 10^{-5}$  a  $6,7 \cdot 10^{-4}$  mol/L e  $I_0$  mostrou-se

diretamente proporcional à concentração de peróxido (Figura 15, p. 52). O aumento da concentração de hemina, investigado de  $8,0 \cdot 10^{-8}$  a  $8,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L, provocou aumento não linear de  $I_0$  até  $8,0 \cdot 10^{-6}$  mol/L, sendo que para as duas maiores concentrações testadas  $I_0$  apresentou o mesmo valor (Figura 17, p. 53). Variando a concentração de luminol observou-se que no intervalo de  $5,0 \cdot 10^{-7}$  a  $5,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L a intensidade de emissão aumenta com a concentração de luminol. Acima de  $5,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L a intensidade é aproximadamente constante.

Como discutido anteriormente, a reação entre hemina e  $H_2O_2$  deve ser o passo lento da transformação e assim determinar a velocidade da oxidação do luminol. Se a partição dos reagentes no meio for a proposta no Esquema 12, a velocidade dessa reação pode ser ainda menor, pois o ataque do  $H_2O_2$  estaria dificultado pela localização da hemina. Tendo em vista o efeito da concentração dos reagentes sobre  $I_0$ , pode-se supor que numa etapa lenta a hemina reage com o  $H_2O_2$  para formar  $Hem-Fe^V=O$ . Por isso o aumento nas concentrações de hemina e  $H_2O_2$  provocam aumento em  $I_0$ . As espécies  $Hem-Fe^V=O$  e  $Hem-Fe^{IV}=O$  são formadas numa região com uma concentração local alta de luminol, por isso o aumento na concentração deste em um certo intervalo não leva à mudança em  $I_0$ .

A influência da concentração dos reagentes na cinética de emissão do sistema em SDS ocorre de forma análoga à observada nos experimentos em CTAB. A partir do sistema padrão do ensaio anti-radicalar (luminol  $1,0 \cdot 10^{-4}$ , hemina  $8,0 \cdot 10^{-8}$  e  $H_2O_2$   $10^{-5}$  mol/L), foram variadas sistematicamente as concentrações de todos os reagentes. Observou-se que a concentração de luminol provoca aumento em  $I_0$  até  $5,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L, e após essa concentração  $I_0$  fica constante (Figura 29, p. 66).  $I_0$  mostra-se diretamente proporcional à concentração de hemina (de  $8,0 \cdot 10^{-9}$  a  $4,0 \cdot 10^{-7}$  mol/L) e à concentração de  $H_2O_2$  (de  $5,0 \cdot 10^{-6}$  a  $6,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L) (Figura 30, p. 67 e Figura 31, p. 67). A dependência mais complexa de  $I_0$  com a concentração de hemina, observada no sistema em CTAB, pode ser causada pelas maiores concentrações de

hemina utilizadas, o que torna significativa a absorção no comprimento de onda da emissão do sistema (427 nm).

O efeito da concentração de CTAB sobre a cinética de emissão foi investigado num intervalo de  $3,0 \cdot 10^{-5}$  a  $2,5 \cdot 10^{-2}$  mol/L. Exceto para a concentração mais baixa,  $I_0$  não varia consideravelmente com a concentração de CTAB nesse intervalo. Isso pode indicar a formação de agregados com hemina em concentrações de CTAB bem abaixo da cmc.

As porfirinas podem existir na forma monomérica ou na forma agregada. Em solução aquosa a hemina existe principalmente na forma dimérica, e a pequena proporção de monômeros presentes é responsável pela atividade catalítica.<sup>75</sup> Isso pode ser atribuído ao impedimento do sítio ativo após a formação do dímero (Figura 58C, p. 94). As interações entre porfirinas e tensoativos podem ser tais que i) as repulsões não permitem a formação de qualquer agregado, independentemente da concentração do tensoativo; ii) a micelização ocorre sem a formação de agregados pré-micelares e iii) a micelização é precedida por agregados pré-micelares.<sup>74</sup> A formação de agregados entre hemina e tensoativos é favorável, uma vez que são reportados agregados entre hemina e tensoativos catiônicos<sup>76</sup>, aniônicos<sup>77</sup> e neutros.<sup>76, 78</sup>

No caso da solução de hemina em CTAB os espectros de absorção sugerem que a interação entre hemina e CTAB provoca a dissociação do dímero hemina-hemina, pois o deslocamento observado é condizente com o espectro do monômero. Os espectros também sugerem que essa dissociação ocorre mesmo em concentrações baixas de tensoativo ( $1,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L). Um dos fatores que favorecem a formação de agregados hemina-CTAB é a alta concentração de CTAB comparada à concentração de hemina em solução. Se esses agregados são formados em maior extensão que os dímeros hemina-hemina, e se neles a hemina tem também seu sítio ativo impedido, a reatividade da hemina será diminuída na presença de CTAB. A

reação em SDS ocorre mais rapidamente que em CTAB, porém mais lentamente que em meio aquoso (Figura 28, p. 65). Tal reatividade pode ser explicada pelo tipo de agregado formado pela hemina em SDS. Os espectros de absorção da hemina nesse meio mostram que ocorrem alterações na região de Soret apenas a partir da concentração de SDS igual a  $3,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L, e que essas mudanças se estabilizam a partir de  $8,0 \cdot 10^{-3}$  mol/L (Figura 36, p. 71). Isso pode indicar que neste caso ocorre micelização sem a formação de agregados pré-micelares e que a interação monômero-SDS é menor que a interação monômero-CTAB, o que é esperado considerando que SDS e hemina são espécies aniônicas. O deslocamento observado no espectro da hemina na presença de SDS também é condizente com o espectro do monômero em solução aquosa, o que sugere que o tensoativo desfaz os dímeros para formar agregados monômero-tensoativo. A correlação entre  $I_0$  e a concentração de SDS corrobora esse argumento, pois se observa que  $I_0$  diminui quando a concentração de SDS varia de  $3,2 \cdot 10^{-3}$  a  $2,4 \cdot 10^{-2}$  mol/L, ficando aproximadamente constante nas concentrações maiores. Uma vez que a formação de agregados impede o sítio ativo do catalisador, ela pode explicar a ordem de reatividade ( $r$ ) ser

$$r_{\text{aquoso}} > r_{\text{SDS}} > r_{\text{CTAB}}$$

### 5.1.2 Determinação da capacidade anti-radicalar

O ensaio proposto nesse trabalho utiliza meios aquosos micelares como meio reacional, e é uma adaptação do ensaio de determinação da capacidade anti-radicalar desenvolvido anteriormente neste laboratório, o qual é realizado em meio aquoso homogêneo.<sup>10, 60</sup> Com essa adaptação buscou-se estender o uso desse ensaio à análise de substâncias lipofílicas. O método baseia-se no consumo de radicais produzidos durante a oxidação do luminol quando espécies anti-radicalares são adicionadas ao sistema. Esse consumo provoca supressão na intensidade de

emissão, a qual aumenta após todas as espécies anti-radicalares reagirem. Na Tabela 1 são mostradas as condições experimentais utilizadas nos ensaios em meio aquoso, CTAB, CTAC e SDS.

**Tabela 1:** Sistemas padrão dos ensaios da capacidade anti-radicalar.

<b>Sistema</b>	<b>[Luminol] (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>[Hemina] (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>[H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>[tensoativo] (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Condições do fluorímetro</b>
<b>aquoso</b>	1,0 10 <sup>-4</sup>	8,0 10 <sup>-8</sup>	1,0 10 <sup>-5</sup>	-	Fenda = 10 nm Voltagem = 700 V
<b>CTAC</b>	1,0 10 <sup>-4</sup>	8,0 10 <sup>-7</sup>	1,0 10 <sup>-4</sup>	1,0 10 <sup>-2</sup>	Fenda = 20 nm Voltagem = 950 V
<b>CTAB</b>	1,0 10 <sup>-4</sup>	8,0 10 <sup>-7</sup>	1,0 10 <sup>-4</sup>	1,0 10 <sup>-3</sup>	Fenda = 20 nm Voltagem = 950 V
<b>SDS</b>	1,0 10 <sup>-4</sup>	8,0 10 <sup>-8</sup>	1,0 10 <sup>-5</sup>	1,2 10 <sup>-2</sup>	Fenda = 20 nm Voltagem = 950 V

A adição de alguns antioxidantes suprime totalmente a emissão, cuja intensidade fica igual à da linha base. Após um determinado tempo, que depende da concentração e da capacidade antioxidante do composto, a intensidade de emissão aumenta rapidamente atingindo o valor da intensidade esperado na ausência do antioxidante. Dos compostos testados no ensaio em CTAB, trolox e vitamina E tiveram esse comportamento. Já a adição de ácido úrico provocou diminuição parcial da intensidade, e o posterior aumento da intensidade ocorreu lentamente. O comportamento de rutina e quercetina foi intermediário ao de trolox e ácido úrico. Por causa dessas diferenças no perfil de supressão foi adotada a área de supressão como medida da capacidade antioxidante em vez do tempo de supressão.<sup>10, 60</sup> A supressão da emissão pode ocorrer devido à reação do antioxidante com as espécies reativas da hemina (Hem-Fe<sup>V</sup> e Hem-Fe<sup>IV</sup>), com os radicais de luminol e/ou com superóxido (Esquema 4). A reatividade do antioxidante perante essas espécies, é que

determinará se a emissão será suprimida completamente ou parcialmente, pois o antioxidante concorre com o caminho que leva à emissão.<sup>10, 25</sup>

Os valores de  $n$  obtidos no presente trabalho com o ensaio luminol em CTAB encontram-se reunidos na Tabela 2, junto com os resultados obtidos no presente trabalho com o ensaio com DPPH; para efeito de comparação relata-se também os resultados obtidos anteriormente com o ensaio luminol em meio aquoso. O mecanismo e a velocidade da reação com DPPH• dependem da estrutura do antioxidante. Com alguns compostos a reação é rápida e o número de radicais seqüestrados DPPH• é igual ao número de grupos hidroxila que ela contém.<sup>79</sup> Porém, para a maioria dos compostos a cinética é mais lenta e/ou o mecanismo parece ser mais complexo. Como exemplo, pode-se citar o BTH, antioxidante artificial cuja reação com DPPH• só se completa após 5 horas. Outra característica é que alguns compostos não levam a um completo desaparecimento de DPPH•, o que pode indicar que a reação é reversível. Isso pode ser demonstrado adicionando-se DPPH no final da reação. Se houver um aumento da concentração de DPPH• restante é porque a reação é reversível. Um exemplo desse comportamento é o isoeugenol.<sup>79</sup>

A tabela mostra que os valores de  $n$  para quercetina e rutina são semelhantes tanto para o ensaio com DPPH quanto no sistema quimiluminescente em CTAB. Esse resultado pode ser atribuído às semelhanças estruturais dos dois compostos, uma vez que a rutina é um derivado glicosilado da quercetina. No sistema quimiluminescente aquoso, entretanto, o  $n$  obtido com quercetina é quase três vezes maior que o obtido para a rutina.

A capacidade antioxidante da vitamina E no ensaio em CTAB foi surpreendentemente maior que a do trolox. Já em SDS esse parâmetro não pode ser determinado porque a adição de vitamina E não suprime totalmente a emissão, a qual posteriormente tem um aumento de intensidade tão lento que não foi possível determinar a área suprimida. Isso mostra que a reatividade desse antioxidante

depende fortemente do meio, e neste contexto a avaliação da capacidade antioxidante em meios micelares é um ponto de partida para estudos de sistemas com membranas mais complexos. O valor de  $n$  obtido com o ensaio com DPPH para a vitamina E mostrou-se igual ao obtido para trolox, confirmando o valor de  $n = 2$  já proposto para todos os derivados da vitamina E.<sup>39</sup>

**Tabela 2:** Capacidade anti-radicalar determinada por diferentes ensaios e expressa em termos de número de radicais seqüestrados por molécula ( $n$ ).<sup>a</sup>

Composto	$n$	$n$	$n$	$n$
	DPPH	Luminol/Aquoso <sup>10, 25</sup>	Luminol/CTAB	Luminol/CTAB (repetitivo)
Vitamina E	2,0 ± 0,1	<sup>b</sup>	3,5 ± 0,1	
Quercetina	4,9 ± 0,1	3,6 ± 0,2	3,8 ± 0,4	
Rutina	4,0 ± 0,1	1,34	4,0 ± 0,2	4,1 ± 0,2
Ácido úrico	<sup>b</sup>	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1

<sup>a</sup>Em todos os casos foi utilizado  $n = 2$  para trolox, o antioxidante de referência;

<sup>b</sup>Não foi determinado por causa da solubilidade.

A presença de CTAB no meio reacional provocou diminuição na velocidade de reação, o que resultou em um grande intervalo de tempo em que a intensidade de emissão permanece aproximadamente constante. Sob tais condições foi possível verificar o efeito de injeções consecutivas de antioxidante numa mesma cubeta. Quando foram adicionadas alíquotas com a mesma concentração de trolox, as áreas de supressão foram aproximadamente constantes (Figura 42, p. 78), enquanto a injeção de diferentes concentrações de trolox mostrou uma relação linear entre essa



concentração e a área suprimida (Figura 43, p. 79). A fim de avaliar a viabilidade de realizar o ensaio desse modo foram testados rutina e ácido úrico (Figura 44, p. 79, e Figura 45, p. 80). Os valores de  $n$  assim obtidos concordam com os encontrados realizando o ensaio normal, com injeções separadas (Tabela 2). A realização do ensaio com injeção consecutiva tem as vantagens de tornar o ensaio mais rápido e economizar reagentes. Há também a possibilidade de se injetar o antioxidante padrão na mesma reação onde se injeta a amostra de interesse, levando supostamente a valores de  $n$  mais exatos.

## 6 CONCLUSÕES

A reação do luminol com  $\text{H}_2\text{O}_2$  catalisada por hemina foi realizada em meios micelares de CTAB, CTAC e SDS, e nesses meios foi possível determinar condições experimentais adequadas à realização de um ensaio para determinação da capacidade anti-radicalar. Com o ensaio em CTAB foram testados ácido úrico, quercetina, rutina e vitamina E, e os valores de  $n$  obtidos são comparáveis aos obtidos com o ensaio com luminol em meio aquoso e com DPPH. Assim, o ensaio desenvolvido em CTAB é adequado para a determinação da capacidade anti-radicalar tanto de substâncias hidrossolúveis quanto lipossolúveis. Resultados preliminares indicam a viabilidade da realização do ensaio também em CTAC e SDS.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- <sup>1</sup> Campbell, A. K.; "Chemiluminescence: Principles and Applications in Biology and Medicine", Ellis Horwood Ltd., Chichester, England, 1988.
- <sup>2</sup> Stevani, C. V. Laboratório de bioluminescência de fungos Home Page. <http://www.iq.usp.br/wwwdocentes/stevani/FungusLux/galeria.html#grid>. Acessado em 20/05/2008.
- <sup>3</sup> Flickr- Compartilhamento de imagens Home Page B) Terry Priest C) Timo Newton-Syms D) Jeff Farmer - <http://www.flickr.com/>. Acessado em 20/05/2008.
- <sup>4</sup> Halliday, D.; Resnick, R.; Walker, J. **Fundamentos de Física**, 4<sup>a</sup>. Edição Rio de Janeiro, ed LTC: 1995, Vol 4.
- <sup>5</sup> Baader, W. J.; Stevani, C. V.; Bastos, E. L. **The Chemistry of Peroxides**, 1<sup>a</sup>. Edição, Chichester, ed. Z. Rappoport: 2006 Vol. 2, 1211-1278.
- <sup>6</sup> Nery, A. L. P.; Baader, W. J. Quimiluminescência de peróxidos orgânicos: geração de estados eletronicamente excitados na decomposição 1,2-dioxetanos. *Quim. Nova*, 24 (2001) 626-636.
- <sup>7</sup> Albrecht, H. O. Chemiluminescence of aminophthalic hydrazide. *Z. Phys. Chem.*, 135 (1928) 321-330.
- <sup>8</sup> Marquette, C.A.; Blum, L. J. Applications of the luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 385 (2006) 546-554.
- <sup>9</sup> Ferreira, E. C.; Rossi A. V. A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise; *Quim. Nova*, 25 (2002) 1003-1011.
- <sup>10</sup> Bastos, E. L.; Romoff, P.; Eckert, C. R.; Baader, W. J. Evaluation of antiradical capacity by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Hemin- induced luminol chemiluminescence. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 7481-7488.
- <sup>11</sup> Rose, A. L.; Waite, T. D. Chemiluminescence of Luminol in the Presence of Iron(II) and Oxygen: Oxidation Mechanism and Implications for Its Analytical Use. *Anal. Chem.*, 73 (2001) 5909-5920.

- 
- <sup>12</sup> Lind, J.; Merényi, G.; Eriksen, T. E. Chemiluminescence Mechanism of Cyclic Hydrazides Such as Luminol in Aqueous Solutions. *J. Am. Chem. Soc.*, 105 (1983) 7655-7661.
- <sup>13</sup> Merényi, G.; Lind, J.; Eriksen, T. E. Luminol chemiluminescence: chemistry, excitation, emitter. *J. Biolumin. Chemilumin.*, 5 (1990) 53-56.
- <sup>14</sup> Merényi, G.; Lind, J.; Eriksen, T. E. Nucleophilic Addition to Diazaquinones. Formation and Breakdown of Tetrahedral Intermediates in Relation to Luminol Chemiluminescence. *J. Am. Chem. Soc.*, 108 (1986) 7716-7726.
- <sup>15</sup> Michl, J. The role of biradicaloid geometries in organic photochemistry, *Photochem. Photobiol.*, 25 (1977) 141-154.
- <sup>16</sup> Ljunggren, S.; Merényi, G.; Lind, J. A Plausible Mechanism for the Chemiexcitation of Cyclic Hydrazides. The "Double-Crossing" Model. *J. Am. Chem. Soc.*, 105 (1983), 7662-1666.
- <sup>17</sup> Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.*, 186 (1990); 1-85.
- <sup>18</sup> Finkel, T.; Holbrook, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408 (2000) 239-247.
- <sup>19</sup> Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M., David, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova*, 29 (2006) 113-123.
- <sup>20</sup> Ferreira, A. L. A.; Matsubara, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 43 (1997) 61-68.
- <sup>21</sup> Halliwell, B.; Gutteridge J. M. Free radicals biology and medicine. (1999) 3<sup>a</sup> ed. Oxford: Oxford Science.
- <sup>22</sup> Mitscher, L. A.; Jung, M.; Shankel, D.; Dou, J.; Steele, L.; Pillai, S. P. Chemoprotection: A review of the potential therapeutic antioxidant properties of green tea (*Camellia sinensis*) and certain of its constituents. *Med. Res. Rev.*, 17 (1997) 327-365.
- <sup>23</sup> Cerqueira, F. M.; Medeiros, M. H. G.; Augusto, O. Antioxidantes dietéticos: Controvérsias e Perspectivas. *Quim. Nova*, 30 (2007) 441-449.
- <sup>24</sup> Kim, S. Y.; Kim, J. H.; Kim, S. K.; Oh, M. J.; Jung, M. Y. Antioxidant activities of selected oriental herb extracts. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71(1994) 633-640.

- 
- <sup>25</sup> Eckert, C. R. "Determinação da Atividade Anti-radicalar de Flavonóides e Extratos de Espécies de *Baccharis* Através da Reação Quimiluminescente do Luminol", *Dissertação de Mestrado* - Instituto de Química, Universidade de São Paulo (2006).
- <sup>26</sup> Pérez-Jiménez, J.; Arranz, S.; Taberner, M.; Díaz- Rubio, M. E.; Serrano, J. / Goñi, I.; Saura-Calixto, F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Res. Int.*, 41 (2008) 274-285.
- <sup>27</sup> Rusak, G.; Komes, D.; Likic, S.; Horžic, D.; Kovac, M. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chem.*, 110 (2008) 852-858.
- <sup>28</sup> Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Rad. Biol. Med.*, 18 (1995) 125-126.
- <sup>29</sup> Prior, R. L.; Cao, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Rad. Biol. Med.*, 27 (1999) 1173-1181.
- <sup>30</sup> Halliwell, B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem. Pharmacol.*, 49 (1995) 1341.
- <sup>31</sup> Rivero-Pérez, M. D.; Muñiz, P.; Gonzalez-Sanjosed, M. L. Antioxidant Profile of Red Wines Evaluated by Total Antioxidant Capacity, Scavenger Activity, and Biomarkers of Oxidative Stress Methodologies. *J. Agric. Food Chem.*, 55 (2007) 5476 -5483.
- <sup>32</sup> American Chemical Society. "Antioxidant Controversy: Scientists Seek Measurement Standards." ScienceDaily 1 July 2004. Acessado em 9 de junho de 2008 <[http://www.sciencedaily.com- /releases/2004/07/040701090055.htm](http://www.sciencedaily.com/releases/2004/07/040701090055.htm)>.
- <sup>33</sup> Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *J. Agric. Food Chem.*, 53 (2005) 4290-4302.
- <sup>34</sup> Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (2005) 1841 -1856.

- 
- <sup>35</sup> Cao, G.; Alessio, H. M.; Cutler, R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.*, 14 (1993) 303-311.
- <sup>36</sup> Miller, N. J.; Rice-Evans, C. A.; Davies, M. J.; Gopinathan, V.; Milner, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.*, 84 (1993) 407-412.
- <sup>37</sup> Folin, O.; Ciocalteu, V. Tyrosine and tryptophan determinations in proteins. *J. Biol. Chem.*, 73 (1927) 627-650.
- <sup>38</sup> Blois, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181 (1958) 1199 - 1200.
- <sup>39</sup> Wayner, D. D. M.; Burton, G. W.; Ingold, K. U.; Locke, S. Quantitative measurement of the total, peroxyl radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Lett.*, 187 (1985) 33-37.
- <sup>40</sup> Romay, C.; Castillo, M. C.; Pascual, C.; Campos, A. M.; Escobar, J.; Lissi, E. A. Evaluation of the total content of antioxidants in complex mixtures. *Cienc. Cult.*, 48 (1996) 86-95.
- <sup>41</sup> Ghiselli, A.; Serafinia, M.; Natellaa, F.; Scaccinia, C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Rad. Biol. Med.*, 29 (2000) 1106-1114.
- <sup>42</sup> Lissi, E.; Pascual, C.; Castillo, M. D. Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Rad. Res. Comms.*, 17 (1992) 299-311.
- <sup>43</sup> Lissi, E.; Salim-Hanna, M.; Pascual, C.; Castillo, M. D. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Rad. Biol. Med.*, 18 (1995) 153-158.
- <sup>44</sup> Maniasso, N. Ambientes micelares em química analítica. *Quim. Nova*, 24 (2001) 87-93.
- <sup>45</sup> Moroi, Y. **Micelles: Theoretical and Applied Aspects**, New York, ed. Plenum Press: 1992, 252p.

- 
- <sup>46</sup> Lasovský, J.; Grambal, F. Micellar complexes of energy transfer. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 15 (1986) 95-102.
- <sup>47</sup> Pelizzetti, E.; Pramauro E. Analytical applications of organized molecular assemblies. *Anal. Chim. Acta*, 169 (1985) 1-29.
- <sup>48</sup> Paleos, C. M.; Vassilopoulos, G.; Nikokavouras, J. Chemiluminescence in oriented systems: chemiluminescence of 10,10'-dimethyl-9,9'-biacridinium nitrate in micellar media. *J. Photochem.*, 18 (1982) 327-334.
- <sup>49</sup> Klopf, L. L.; Nieman T. A. Use of Surfactants to improve analytical performance of lucigenin chemiluminescence. *Anal. Chem.*, 56 (1984) 1539-1542.
- <sup>50</sup> Yamada, M.; Suzuki, S. Micellar enhanced chemiluminescence of 1,10-phenanthroline for the determination of ultratraces of copper (II) by flow injection method. *Anal. Lett.*, 17 (1984) 251-263.
- <sup>51</sup> Abdel-Latif, M. S.; Guilbault, G. G. Peroxide optrode based on micellar-mediated chemiluminescence reaction of luminol. *Anal. Chim. Acta*, 221 (1989) 11-17.
- <sup>52</sup> Hadjianestis J.; Nikokavouras J. Luminol chemiluminescence in micellar media. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 67 (1992) 237-243.
- <sup>53</sup> Safavi A.; Karimi M. A. Flow injection determination of cationic surfactants by using *N*-bromosuccinimide and *N*-chlorosuccinimide as new oxidizing agents for luminol chemiluminescence. *Anal. Chim. Acta*, 468 (2002) 53-63.
- <sup>54</sup> Herbert, E. **Organic Electronic Spectral Data**, Ungmade, ed. Interscience Publish: 1960, Vol. II, 846.
- <sup>55</sup> Cotton, M. L.; Dunford, H. B. Horseradish peroxidase. XI. On the nature of compounds I and II as determined from the kinetics of the oxidation of ferrocyanide. *Can. J. Chem.*; 51 (1973) 582-587.
- <sup>56</sup> Lee, J.; Wesley, A. S.; Ferguson, J. F.; Seliger, H. H. The use of luminol as a standard of photon emission, **Bioluminescence in Progress**, F. H. Johnson and Y. Haneda, Eds., Princeton University Press, Princeton, NJ, (1966) 35-43.

- 
- <sup>57</sup> Lee, J.; Seliger, H. H. Quantum yields of luminol chemiluminescence reaction in aqueous and aprotic solvents. *Photochem. Photobiol.*, 4 (1972) 227-237.
- <sup>58</sup> Baxter, J. G.; Robeson, C. D.; Taylor, J. D.; Lehman, R. W. Natural  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -tocopherols and certain esters of physiological interest. *J. Am. Chem. Soc.*, 65 (1943) 918-924.
- <sup>59</sup> Burton, G. W.; Hughes, L.; Ingold, K. U. Antioxidant Activity of Phenols Related to Vitamin E - Are There Chain-Breaking Antioxidant Better than  $\alpha$ -Tocopherol? *J. Am. Chem. Soc.*, 105 (1983) 5950-5951.
- <sup>60</sup> Bastos, E. L. "Desenvolvimento de um ensaio para determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais através da quimiluminescência do luminol". *Dissertação de Mestrado* - Instituto de Química, Universidade de São Paulo (2000).
- <sup>61</sup> Kalyanasundaram, K.; Thomas, J. K. Environmental effects on vibronic and intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. *J. Am. Chem. Soc.*, 99 (1977) 2039-2044.
- <sup>62</sup> Ananthapadmanabhan, K. P.; Goddard, E. D.; Turro N. J.; Kuo, P. L. Fluorescence probes for critical micelle concentration. *Langmuir*, 1 (1985) 352-355.
- <sup>63</sup> Bastos, E. L.; Ciscato, L. F. M. L.; Bartoloni, F. H.; Catalani, L. H.; Baader, W. J. Studies on PVP hydrogel-supported luminol chemiluminescence: 1. Kinetic and mechanistic aspects using multivariate factorial analysis. *Luminescence*, 22 (2007) 113-125.
- <sup>64</sup> Blois, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181 (1958) 1199-1200.
- <sup>65</sup> Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 28 (1995) 25-30.
- <sup>66</sup> Molyneux, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar J. Sci. Technol.*, 26 (2004) 211-219.
- <sup>67</sup> Baj, S.; Krawczyk, T. An investigation into the reaction of hemin-catalysed luminol oxidation by peroxy compounds. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 183 (2006) 111-120.



---

<sup>68</sup> Candy, T. E. G.; Hodgson, M.; Jones, P. Kinetics and mechanism of a chemiluminescent clock reaction based on the horseradish peroxidase catalysed oxidation of luminol by hydrogen peroxide. *J. Chem. Soc. Perkin Trans., 2* (1990) 1385-1388.

<sup>69</sup> Traylor, T. G.; Lee, W. A.; Stynes, D. V. Model Compound Studies related to peroxidases. Mechanisms of reaction of hemins with peracids. *J. Am. Chem.Soc.*, 106 (1984) 755-764.

<sup>70</sup> Traylor, T. G.; Lee, W. A.; Stynes, D. V. Model Compound Studies related to peroxidases II - the chemical reactivity of a high valent protohemin compound. *Tetrahedron*, 40 (1984) 553-568.

<sup>71</sup> Brown, S. B.; Jones, P.; Lantzke, I. R. Infrared Evidence for an oxo-bridged (Fe-O-Fe) haemin dimer. *Nature*, 223 (1969) 960-961.

<sup>72</sup> Villiers, K. A.; Kaschula, C. H.; Egan, T. J.; Marques, H. M. Speciation and structure of ferriprotoporphyrin IX in aqueous solution: spectroscopic and diffusion measurements demonstrate dimerization, but not  $\mu$ -oxo dimer formation. *J. Biol. Inorg. Chem*, 12 (2007) 101-117.

<sup>73</sup> Hinoue, T.; Kobayashi, J.; Ozeki, T.; Watarai, H. Complex formation between water-soluble porphyrin and cationic surfactant below the critical micelle concentration. *Chem. Lett.*, 26 (1997) 763-764.

<sup>74</sup> Maiti, N. C.; Mazumdar, S.; Periasamy, N. J- and H-Aggregates of porphyrin-surfactant complexes: time-resolved fluorescence and other spectroscopic studies. *J. Phys. Chem. B*, 102 (1998) 1528-1538.

<sup>75</sup> Brown, S. B.; Dean, T. C.; Jones, P. Catalytic activity of iron(III)-centered catalysts. *Biochem. J.*, 117 (1970) 741-744.

<sup>76</sup> Simplicio, J.; Schwenzer, K. Hemin Intercalated in Micellar Cetyltrimethylammonium Bromide and Triton X-100. A Kinetic, Spectral, and Equilibrium Study with Cyanide. *Biochemistry*, 12 (1973)1923-1929.

<sup>77</sup> Simplicio, J. Hemin Monomers in Micellar Sodium Lauryl Sulfate. A Spectral and Equilibrium Study with Cyanide. *Biochemistry*, 11 (1972) 2525-2528.

<sup>78</sup> Travascio, P.; Li, Y.; Sen, D. DNA-enhanced peroxidase activity of a DNA aptamer-hemin complex. *Chemistry and Biology*, 5 (1998) 505-517.

<sup>79</sup> Bondet, V.; Brand-Williams, W.; Berset, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensm-Wiss Technol*, 30 (1997) 609-615.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)