

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

SÍNTESE DE DERIVADOS DE ÁCIDOS FENÓLICOS E ESTUDO DA SUA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

BRUNO MIGUEL MACEDO DA SILVA REIS

Mestrado em Engenharia Química
Ramo Optimização Energética na Indústria Química
Dezembro 2008

SÍNTESE DE DERIVADOS DE ÁCIDOS FENÓLICOS E ESTUDO DA SUA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

ORIENTADOR:

PROFESSOR DOUTOR JORGE MANUEL PINTO DE JESUS GARRIDO

CO-ORIENTADORES:

PROFESSORA DOUTORA ERMELINDA MANUELA PINTO DE JESUS GARRIDO

PROFESSOR DOUTOR PAULO ALEXANDRE PEREIRA DA SILVA

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar os mais sinceros e profundos agradecimentos:

Ao Professor Doutor Jorge Garrido pela orientação científica que me transmitiu e proporcionou ao longo deste trabalho, pelo seu apoio incondicional e compreensão, pela sua amizade constante e boa disposição com que sempre acompanhou este trabalho. Obrigado por toda a ajuda disponibilizada e por ter feito este projecto ganhar vida!

À Professora Doutora Manuela Garrido e ao Professor Paulo Silva, o meu agradecimento pela co-orientação deste trabalho, pela disponibilidade e compreensão que sempre demonstraram.

À Elodie Blanco pelo o seu precioso contributo na parte experimental do trabalho e amizade demonstrada durante o seu estágio em Portugal. À Marta pelo o apoio incondicional, pela boa disposição e companhia, pelas palavras de estímulo que me dirigiu nas alturas menos optimistas. Elodie e Marta, um muito obrigado. Aos meus colegas de laboratório, agradeço a ajuda disponibilizada durante este período de convivência.

Ao Eng. Mendes de Sousa (Instituto de Investigação da Floresta e Papel, RAIZ) pela sua compreensão, amizade e apoio nos momentos mais delicados. Sem ele não teria conseguido levar a avante este trabalho de mestrado.

Aos meus pais, que são fonte de carinho, compreensão e um exemplo a seguir. À minha avó e restante família, que partilharam comigo todos estes momentos e com quem posso sempre contar.

À Dina, por todo o apoio, por toda a ajuda, por todo o carinho, por todas as palavras de encorajamento nos momentos mais críticos, por ter me sempre dado a mão e puxado para cima quando mais precisei, por me ter ensinado que a vida pode ser, mesmo por breves momentos, utópica e recompensadora.

A Todos o Meu Muito Obrigado.

ALGUNS DOS RESULTADOS APRESENTADOS NESTA DISSERTAÇÃO CONSTAM DA SEGUINTE COMUNICAÇÃO:

REIS, B., BLANCO, E., GARRIDO, E. M., SILVA, P., GASPAR, A., MILHAZES, N., BORGES, F., GARRIDO, J. (2008). *ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PROTOCATECHUIC ACID AND DERIVATIVES*. XXI REUNIÃO NACIONAL DE ESPECTROSCOPIA, V CONGRESSO IBÉRICO DE ESPECTROSCOPIA, MURCIA, 9-11 DE SETEMBRO DE 2008 (COMUNICAÇÃO EM POSTER)

RESUMO

A peroxidação lipídica, além de causar sérios danos no corpo humano, é a principal causa da deterioração dos alimentos afectando a sua cor, aroma e valor nutricional, o que conduz a uma diminuição do seu ciclo de vida. O fenómeno de oxidação pode ser retardado com recurso a antioxidantes, de origem natural ou sintética, que inibam a formação de espécies reactivas, ou que reajam com estas, formando posteriormente radicais com menor grau de reactividade.

Nesta dissertação procedeu-se à síntese e elucidação estrutural de novos antioxidantes, derivados dos ácidos 3,4-diidroxibenzóico (PCA) e 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC), e à avaliação da sua actividade anti-radicalar e antioxidante. Os novos antioxidantes sintetizados foram caracterizados usando RMN de ^1H e de ^{13}C , FTIR e EM-IE. A avaliação da actividade antioxidante foi realizada com base no método do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH *) e por técnicas electroquímicas (voltametria de impulso diferencial e voltametria cíclica).

Os resultados obtidos permitiram concluir que a eficácia anti-radicalar (AE) é determinada por aspectos da estrutura molecular dos compostos, nomeadamente pela presença de grupos hidroxilo no anel aromático e também de grupos extensores relativamente à posição do grupo carboxílico. Os resultados permitiram verificar que o DOPAC apresenta a mais elevada eficiência anti-radicalar dos compostos em estudo, incluindo o trolox e o ácido gálgico (compostos de referência).

Com base nos resultados obtidos concluiu-se que, um menor potencial de oxidação conduz a uma melhor actividade anti-radicalar dos compostos. De facto, verificou-se para o PCA e respectivos ésteres o maior potencial de oxidação e também a menor eficiência anti-radicalar. Em contrapartida, os antioxidantes com maior eficiência anti-radicalar, DOPAC, trolox e ácido gálgico, apresentaram menor potencial de oxidação.

Palavras-Chave: Antioxidantes; Ácido 3,4-diidroxibenzóico; Ácido 3,4-diidroxifenilacético; Benzoatos; Fenilacetatos; DPPH * ; Voltametria.

ABSTRACT

The lipid peroxidation, besides causing serious damage to the human body, is the main cause of deterioration of food affecting its colour, flavour and nutritional value, leading to a decrease in its life cycle. The phenomenon of oxidation can be delayed using antioxidants of natural or synthetic origin, which inhibit the formation of reactive species, or that subsequently react with these leading to less reactive radicals.

In this dissertation we proceeded to the synthesis and structural elucidation of new antioxidants, esters derived from 3,4-dihydroxybenzoic acid (PCA) and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), and the evaluation of its anti-radical and antioxidant properties. The new synthesized antioxidants were characterized using ^1H and ^{13}C NMR, FTIR and MS-IE. The evaluation of the antioxidant activity was based on the method of 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl radical (DPPH) and electrochemical techniques (differential pulse voltammetry and cyclic voltammetry).

The results showed that the anti-radical efficiency (AE) is determined by aspects of the molecular structure of compounds, particularly the presence of hydroxyl groups on aromatic ring and also of spacer groups towards the position of carboxylic acid group. The results have shown that DOPAC presents the highest anti-radical efficiency of the compounds under study, including trolox and gallic acid (reference compounds).

Based on the results it was concluded that, a smaller potential for oxidation is generally associated to highest anti-radical activity of the compounds. In fact, PCA and its esters presented the greatest potential for oxidation and also the lesser anti-radical efficiency. In contrast, the antioxidants with more anti-radical efficiency, DOPAC, trolox and gallic acid, showed the lowest potential of oxidation.

Key words: antioxidants, 3,4-dihydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, protocatechuate, phenylacetate, DPPH, voltammetry

ÍNDICE GERAL

Capítulo 1. Oxidação e Antioxidantes	1
1.1. Oxigénio, Oxidação e Auto-Oxidação	2
1.1.1. Espécies Reactivas	2
1.1.2. Formação das EROs e ERNs	3
1.1.3. Peroxidação Lipídica	4
1.2. Antioxidantes: Definição e Aplicações	6
1.2.1. Campo de Aplicações dos Antioxidantes	6
1.2.2. Classificação de Antioxidantes	8
1.2.3. Pesquisa e Desenvolvimento de Novos Agentes Antioxidantes	9
1.2.3.1 Antioxidantes Fenólicos	10
Ácido Protocatecuico (PCA)	12
Ácido 3,4 – Dihidroxifenilacético (DOPAC)	13
1.2.4. Antioxidantes Fenólicos: Estudos de Relação Estrutura-Actividade	14
1.3. Objectivos	17
1.4. Bibliografia	17
Capítulo 2. Síntese de Derivados de Ácidos Fenólicos	23
2.1. Nomenclatura e Propriedades Físico-Químicas	24
2.1.1. Nomenclatura de Compostos Fenólicos	24
2.1.2. Nomenclatura de Ésteres Alquílicos de Ácidos Fenólicos	25
2.2. Métodos Gerais de Síntese de Ésteres de Ácidos Fenólicos	26
2.2.1. Esterificação <i>via</i> Halogeneto de Ácido	26
2.2.2. Esterificação <i>via</i> Éster Activado	27
2.2.3. Esterificação de Fisher	28
2.3. Condições Experimentais	29
2.3.1. Instrumentação Geral	29
2.3.2. Cromatografia	30
2.3.3. Reagentes e Solventes	30

2.3.4. Síntese de Ésteres Alquílicos do 3,4-Diidroxibenzoico (PCA) e 3,4-Diidroxifenilacético (DOPAC)	31
2.3.4.1. Método Geral de Preparação de Ésteres Alquílicos	31
2.3.4.1.1. Síntese do 3,4-Diidroxibenzoato de Metilo (PM)	32
2.3.4.1.2. Síntese do 3,4-Diidroxibenzoato de Etilo (PE)	33
2.3.4.1.3. Síntese do 3,4-Diidroxibenzoato de Propilo (PP)	33
2.3.4.1.4. Síntese do 3,4-Diidroxifenilacetato de Metilo (PPM)	34
2.3.4.1.5. Síntese do 3,4-Diidroxifenilacetato de Etilo (PPE)	35
2.3.4.1.6. Síntese do 3,4-Diidroxifenilacetato de Propilo (PPP)	35
2.4. Elucidação Estrutural dos Ésteres Alquílicos Sintetizados	36
2.4.1. Espectroscopia do IV	36
2.4.2. RMN ¹ H	37
2.4.3. Espectro de Massa por Impacto Electrónico (EM-IE)	38
2.5. Bibliografia	37
Capítulo 3. Avaliação da Actividade Antioxidante	41
3.1. Métodos de Avaliação da Actividade Antioxidante	42
3.2. Avaliação da Actividade Antioxidante: Método do DPPH	44
3.3. Avaliação da Actividade Antioxidante: Métodos Electroquímicos	46
3.3.1. Voltametria de Impulso Diferencial (DPV)	47
3.3.2. Voltametria Cíclica (CV)	47
3.4. Condições Experimentais	48
3.4.1. Instrumentação Geral	48
3.4.2. Reagentes e Solventes	49
3.4.3. Determinação da Actividade Antioxidante pelo Método do DPPH	50
3.4.3.1. Curva de Calibração	50
3.4.3.2. Método Geral de Preparação das Soluções dos Compostos em Estudo	50
3.4.4. Determinação da Actividade Antioxidante por Técnicas Electroquímicas	51
3.4.4.1. Método Geral de Preparação das Soluções dos Compostos em Estudo	52
3.5. Resultados e Discussão	53

3.5.1. Método do DPPH	53
3.5.1.1. Ácido Protocatecuico (PCA) e seus Ésteres (PM, PE e PP)	54
3.5.1.2. Ácido 3,4-Diidroxifenilacético (DOPAC)	60
3.5.1.3. Ácido 2,3,4-Triidroxibenzoico (Ácido Gálgico) e 2-Carboxi-2,5,7,8-Tetrametil-6-Cromanol (Trolox)	61
3.5.2. Métodos Electroquímicos	64
3.5.2.1. Ácido Protocatecuico (PCA) e seus Ésteres (PM, PE e PP)	64
3.5.2.2. DOPAC (DOPAC) e seus Ésteres (PPM, PPE e PPP)	67
3.6 Bibliografia	71
Capítulo 4. Conclusões e Sugestões para Trabalho Futuro	78

ÍNDICE DE FIGURAS**Capítulo 1. Oxidação e Antioxidantes**

Figura 1.1. Representação teórica das orbitais do oxigénio diatómico e seus derivados.	3
Figura 1.2. Representação das etapas de redução do O ₂ , da formação do grupo hidroxilo bem como da segunda molécula de água num sistema biológico.	4
Figura 1.3. Representação das etapas de auto-oxidação.	5
Figura 1.4. Representação esquemática do mecanismo de actuação de um antioxidante primário e secundário numa molécula alvo.	9
Figura 1.5. Representação esquemática das estruturas químicas para o ácido benzóico e alguns derivados.	11
Figura 1.6. Representação esquemática das estruturas químicas para o ácido fenilacético e alguns derivados.	12
Figura 1.7. Representação esquemática das estruturas químicas para o ácido cinâmico e alguns derivados.	12
Figura 1.8. Representação da estrutura química do PCA.	13
Figura 1.9. Representação da estrutura do ácido DOPAC.	14
Figura 1.10. Representação esquemática da reacção da oxidação de compostos fenólicos, na presença de radicais, com a formação do radical fenoxilo e respectivas estruturas de ressonância.	15

Capítulo 2. Síntese de Derivados de Ácidos Fenólicos

Figura 2.1. Representação da estrutura química dos ácidos benzóico e fenilacético	24
Figura 2.2. Nomes triviais e sistemáticos dos ácidos benzóicos e respectivos ésteres alquílicos sintetizados neste trabalho.	25
Figura 2.3. Representação esquemática da esterificação pelo Método de Fisher.	28

Capítulo 3. Avaliação da Actividade Antioxidante

Figura 3.1. Representação da estrutura química do trolox (a) e do ácido gálico (b)	44
Figura 3.2. Representação da estrutura química do radical DPPH* aquando da sua redução a hidrazina por um antioxidante (AH).	45
Figura 3.3. Representação da técnica voltametria de impulso diferencial (DPV): (a) – perfil de aplicação de potenciais; (b) – voltamograma de impulso diferencial.	47

Figura 3.4. Representação da técnica de voltametria cíclica (CV): (a) perfil de aplicação de potenciais; (b) voltamograma cíclico.	48
Figura 3.5. Hélios Gamma & Delta da ThermoSpectronic.	49
Figura 3.6. Potenciostato/galvanostato Autolab ® PGSTAT 12.	49
Figura 3.7. Célula electroquímica.	51
Figura 3.8. Representação gráfica da curva de calibração, $A = f([DPPH^*])$.	53
Figura 3.9. Representação gráfica do efeito da concentração do PCA na percentagem de inibição do radical DPPH* ao longo do tempo.	54
Figura 3.10. Representação gráfica do efeito da concentração do PM na percentagem de inibição do radical DPPH* ao longo do tempo.	55
Figura 3.11. Representação gráfica do efeito da concentração do PE na percentagem de inibição do radical DPPH* ao longo do tempo.	55
Figura 3.12. Representação gráfica do efeito da concentração do PP na percentagem de inibição do radical DPPH* ao longo do tempo.	56
Figura 3.13. Oxidação do ácido protocatecuico a quinona, (1), e desta à respectiva estrutura hemiacetal, (2).	58
Figura 3.14. Representação gráfica da percentagem de inibição do radical DPPH*, para as concentrações EC_{50} do PCA e respectivos ésteres, ao longo do tempo.	59
Figura 3.15. Representação gráfica do efeito da concentração do DOPAC na percentagem de inibição do radical DPPH* ao longo do tempo.	60
Figura 3.16. Representação gráfica do efeito da concentração do ácido gálico na percentagem de inibição do radical DPPH* ao longo do tempo.	61
Figura 3.17. Representação gráfica do efeito da concentração do trolox na percentagem de inibição do radical DPPH* ao longo do tempo.	62
Figura 3.18. Representação gráfica da percentagem de inibição do radical DPPH*, para as concentrações EC_{50} do PCA, benzoatos, DOPAC, trolox e ácido gálico, ao longo do tempo.	63
Figura 3.19. Representação gráfica do voltamograma de impulso diferencial do PCA.	64
Figura 3.20. Representação gráfica do voltamograma cíclico do PCA.	65
Figura 3.21. Representação gráfica do voltamograma de impulso diferencial, à esquerda, e do voltamograma cíclico, à direita, do a) PM, b) PE e c) PP.	66
Figura 3.22. Representação gráfica do voltamograma de impulso diferencial do DOPAC.	68
Figura 3.23. Representação gráfica do voltamograma de impulso diferencial, à esquerda, e do voltamograma cíclico, à direita, do a) PPM e b) PPE.	69
Figura 3.24. Representação gráfica do voltamograma de impulso diferencial, à esquerda, e do voltamograma cíclico, à direita, do c) PPP.	70

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 1. Oxidação e Antioxidantes

Tabela 1.1. Antioxidantes Permitidos pela Legislação Portuguesa.	8
--	---

Capítulo 2. Síntese de Derivados de Ácidos Fenólicos

Tabela 2.1. Dados de IV para os compostos PCA, PM, PE e PP.	36
Tabela 2.2. Dados de IV para os compostos DOPAC, PPM, PPE e PPP.	37
Tabela 2.3. Dados de RMN ¹ H para os ésteres do PCA e DOPAC, respectivamente.	37

Capítulo 3. Avaliação da Actividade Antioxidante

Tabela 3.1. Construção da curva de calibração da solução DPPH*.	50
Tabela 3.2. Massa de antioxidante pesado para obter a concentração de 2×10^{-2} M.	51
Tabela 3.3. Massa de antioxidante pesado para obter a concentração de 1×10^{-2} M.	52
Tabela 3.4. EC_{50} , T_{EC50} , AE e classificação do comportamento cinético e eficiência anti-radicalar, do PCA e respectivos ésteres.	57
Tabela 3.5. Parâmetros do modelo da potência para o comportamento cinético do PCA e respectivos ésteres.	59
Tabela 3.6. EC_{50} , T_{EC50} , AE e classificação do comportamento cinético e eficiência anti-radicalar, do PCA e respectivos ésteres, DOPAC, ácido gálgico e trolox.	62
Tabela 3.7. Potencial do pico de oxidação e respectiva altura obtidos por DPV e CV, para o PCA e respectivos ésteres, ácido gálgico e trolox.	67
Tabela 3.8. Potencial do pico de oxidação e respectiva altura (H), para o trolox e ácido gálgico, bem como o DOPAC e PCA, e respectivos ésteres.	70

Oxidação e Antioxidantes

Sumário

A

temática antioxidantes e espécies reactivas de oxigénio e azoto tem sido estudada no âmbito de diversas doenças como, a diabetes, reumatismo, inflamação crónica, distúrbios neurológicos, e alguns tipos de cancro. É importante desmitificar o papel dos radicais livres como espécies prejudiciais à vida, assim como associados aos antioxidantes se encontrarem apenas aspectos positivos. Os organismos vivos tentam manter constantemente um equilíbrio entre estes dois sistemas: os antioxidantes permitem manter os níveis de espécies reactivas de oxigénio e azoto baixos, conduzindo ao correcto funcionamento dos sistemas biológicos com o mínimo de danos possíveis.

Nos últimos anos muitos foram os estudos sobre os benefícios dos compostos fenólicos como antioxidantes naturais, com vista a neutralizar os radicais livres. Quando o sistema de defesa antioxidante falha, devido a um aumento excessivo da produção de espécies reactivas de oxigénio e azoto ou diminuição do nível de antioxidantes celulares, poderão ocorrer (i) danos ao nível do DNA levando a mutações e alguns tipos de cancro, (ii) inactivação oxidativa e acumulação de enzimas metabólicas bem como um aumento do nível de proteínas modificadas por oxidação e (iii) indução e iniciação da peroxidação lipídica responsável pela modificação oxidativa das lipoproteínas de baixa densidade.

Palavras-Chave: Oxidação; Stress oxidativo; Peroxidação lipídica; Espécies reactivas de oxigénio e azoto; Antioxidantes fenólicos; Estrutura-actividade.

1.1. Oxigénio, Oxidação e Auto-Oxidação

O oxigénio foi reconhecido, há mais de 100 anos, como o principal agente responsável pela deterioração de materiais orgânicos expostos ao ar. A função paralela do oxigénio, uma molécula essencial para muitas formas de vida, como agente nocivo para os tecidos vivos, foi descoberta por *Larson* em 1988. Estes efeitos nocivos sobre os seres vivos podem variar consideravelmente conforme o tipo de organismo, o estado fisiológico, as defesas antioxidantes e a dieta.

A identificação dos agentes de oxidação, causadores de efeitos tóxicos, relacionados com o oxigénio só foi possível há cerca de 50 anos, quando surgiu a sua teoria sobre o envolvimento destes radicais livres nos processos de mutagénese, cancro e envelhecimento (*Larson*, 1988). A partir de então, efectuaram-se diversas pesquisas visando elucidar os efeitos dos radicais livres nos sistemas biológicos.

1.1.1. Espécies Reactivas

Espécies reactivas de oxigénio (EROs) e espécies reactivas de azoto (ERNs) são agentes oxidantes que se encontram envolvidos numa série de processos degenerativos (*Halliwell*, 2006). As principais EROs distribuem-se em dois grupos, os radicalares: anião superóxido ($O_2^- \cdot$), hidroxilo ($HO\cdot$), hidroperóxilo ($HOO\cdot$) e o peróxilo ($ROO\cdot$); e os não-radicalares: peróxido de hidrogénio (H_2O_2), oxigénio singuleto (1O_2) e o ácido hipocloroso (HClO). De entre as ERNs destacam-se o radical óxido nítrico ($NO\cdot$), o óxido nitroso (N_2O_3), o ácido nitroso (HNO_2), os nitritos (NO_2^-), os nitratos (NO_3^-) e os peroxinitritos (ONOO).

A formação das espécies reactivas de oxigénio e azoto ocorre durante os processos oxidativos biológicos, sendo formadas fisiologicamente nos sistemas a partir de fontes endógenas (respiração aeróbia, inflamações) ou exógenas (ozono, radiações gama e ultravioleta, medicamentos, dieta) (*Halliwell*, 2006).

Proteínas, enzimas, ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA) são alguns dos componentes celulares que reagem imediatamente com estas espécies reactivas de oxigénio. Cada vez que uma proteína ou um lípido perde um electrão, estes sofrem transformações irreversíveis na forma e função, tornando-se num novo radical livre gerando uma reacção em cadeia. Os radicais livres são a causa básica de

envelhecimento, e a sua acção no organismo pode ser alterada por factores genéticos e/ou ambientais.

1.1.2. Formação dos EROs e ERNs

O oxigénio encontra-se presente na atmosfera no seu estado fundamental e na forma de um bi-radical triplete, $^3\text{O}_2$. Os dois electrões do O_2 apresentam o mesmo *spin*, exibindo spins paralelos, sendo este considerado o estado mais estável (Figura 1.1).

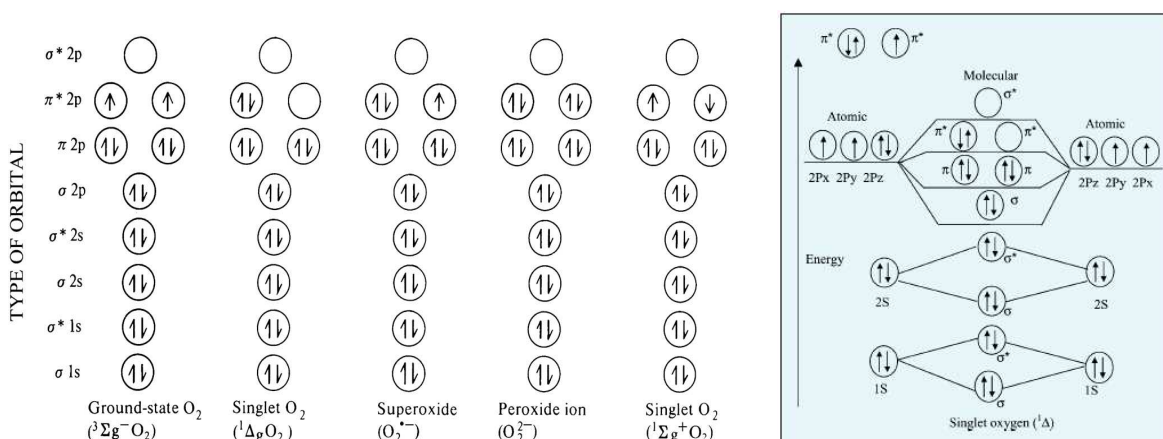


Figura 1.1. Representação teórica das orbitais do oxigénio diatómico e seus derivados (Halliwell, 2006; Lee e colaboradores, 2004).

O O_2 singuleto é gerado pela simples absorção de energia, o qual induz o rearranjo dos electrões. Em ambas as formas de oxigénio singuleto, a restrição de spin é removida e a capacidade de oxidação aumenta drasticamente. Apenas com um único electrão desemparelhado, o anião superóxido apresenta menor capacidade anti-radicalar que o O_2 . Em meio aquoso, a sua reacção principal é a dismutação, por acção da enzima *superóxido dismutase*, a qual leva à produção de uma molécula de peróxido de hidrogénio e uma molécula de oxigénio (Halliwell, 2006; Blokhina e colaboradores, 2003). Esta espécie reactiva é uma base fraca cujo ácido conjugado, o radical hidroperóxido (HOO^\bullet), é muito reactivo. O O_2^- pode reagir com o HO^\bullet produzindo oxigénio singuleto e com o óxido nítrico (NO^\bullet) produzindo peroxinitrilo (ONOO^-).

Quando a molécula de oxigénio entra num sistema biológico, esta é transformada através de um processo de redução (Figura 1.2). Durante a transformação ocorre a formação de água e de espécies reactivas de oxigénio (EROs), nomeadamente o radical superóxido, o radical hidroxilo e o peróxido de hidrogénio. Estes compostos são formados na

respiração, permitindo ao organismo o uso de oxigénio e a libertação de energia (Marcos, 2008; Acwhort e colaboradores, 1997; Janowick, 1996).

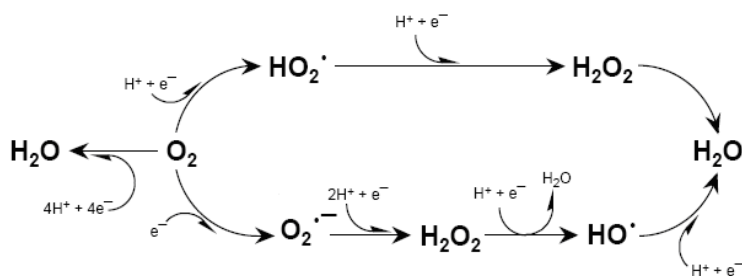


Figura 1.2. Representação das etapas de redução do O_2 , da formação do grupo hidroxilo bem como da segunda molécula de água num sistema biológico (Janowick, 1996).

De acordo com a Figura 1.2., o radical superóxido é o primeiro intermediário da redução monovalente do oxigénio até à água formando-se a partir dele outras espécies reactivas de oxigénio. O H_2O_2 é uma importante espécie reactiva devido à facilidade com que penetra nas membranas biológicas. A inactivação desta espécie pode ser efectuada pela acção de enzimas, ou de antioxidantes, dando origem a produtos como água e oxigénio.

1.1.3. Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica é responsável pela deterioração dos alimentos afectando a sua cor, aroma, textura e valor nutricional. A nível do organismo, este fenómeno leva à desintegração das células e das membranas, e ao aparecimento de doenças degenerativas (Kaur e Geetha, 2006; Belitz e Gresch, 1987).

A oxidação dos lípidos pode ocorrer por oxidação enzimática, foto-oxidação ou auto-oxidação (Santos, 2000; Silva, 1998). A foto-oxidação ocorre quando o oxigénio singuleto, na presença de raios ultravioletas, ataca a ligação dupla carbono-carbono existente nos ácidos gordos insaturados induzindo a formação do peróxido de hidrogénio. A oxidação enzimática pode ocorrer por catálise enzimática, nomeadamente por acção da *lipoxigenase*. Esta enzima actua sobre os ácidos gordos (ex. ácido linoleico e seus ésteres), catalisando a adição do oxigénio à cadeia hidrocarbonada poliinsaturada. O resultado é a formação de peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas, os quais se envolvem em reacções degenerativas. A reacção directa das moléculas lipídicas com o oxigénio é um processo designado por auto-oxidação e trata-se de um fenómeno puramente químico e bastante complexo, envolvendo reacções radiculares capazes de auto-propagação e que dependem do tipo de acção catalítica (ex.

temperatura, iões metálicos, radicais livres, pH) (Santos, 2000). A extensão do processo de auto-oxidação é determinada pela quantidade e tipo de substratos de oxidação, e pela interacção entre as espécies radicalares envolvidas. Este fenómeno também ocorre nas membranas celulares, por apresentarem na sua constituição elevadas quantidades de ácidos gordos insaturados. Estas reacções espontâneas ocorrem em 4 etapas: a iniciação ou a formação de radicais livres; a propagação da reacção; a respectiva ramificação e a terminação da reacção (Figura 1.3.).

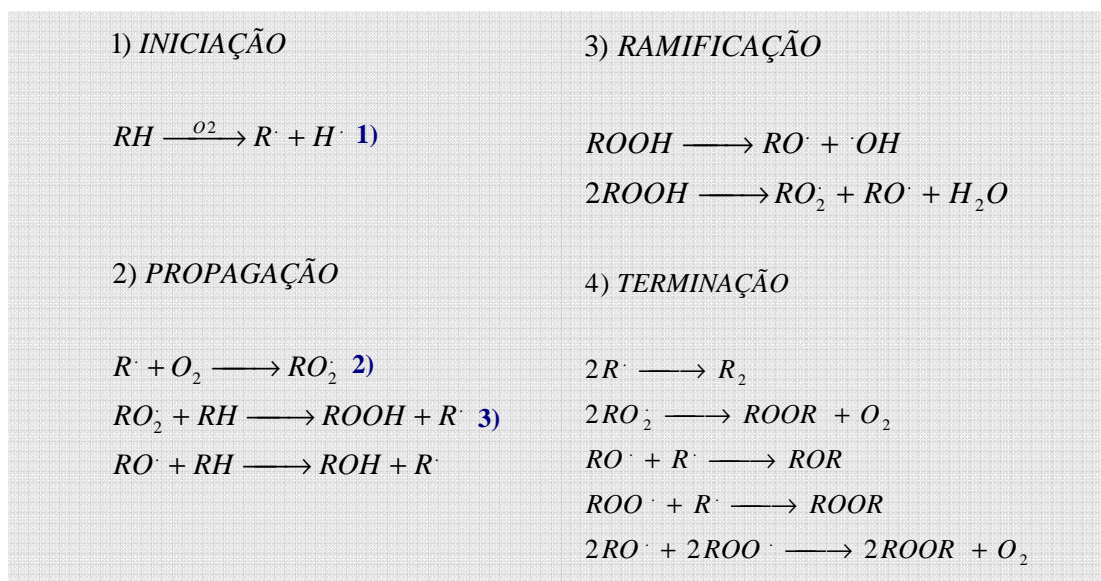


Figura 1.3. Representação das etapas de auto-oxidação (Adaptado: Silva, 1998; Santos, 2000).

Na etapa de iniciação ocorre a formação de um radical lipídico **1)**, após a captação de um átomo de hidrogénio, a partir de uma molécula de ácido gordo insaturado por acção do O_2 . Na etapa de propagação ocorre a reacção rápida dos radicais lipídicos com o oxigénio molecular originando a formação de radicais peróxido **2)**. Estes podem por sua vez reagir com novas moléculas de ácido gordo insaturado, com conseqüente formação de novos radicais lipídicos e de hidroperóxidos **3)**. Na ramificação ocorre a quebra homolítica da ligação O-O dos hidroperóxidos, o que poderá gerar outras espécies radicalares, nomeadamente radicais alcóxido, hidróxido e peróxido. A terminação envolve a reacção entre dois radicais com formação de produtos não radicalares estáveis. Desta forma ocorre a interrupção da etapa de propagação.

Os próprios intermediários das reacções de peroxidação lipídica podem participar no processo, propagando o efeito lesivo. Além disso, os produtos finais deste sistema reaccional podem promover a oxidação de outras macromoléculas como as proteínas.

1.2. Antioxidantes: Definição e Aplicações

Os organismos vivos desenvolveram vários mecanismos de defesa para neutralizar a acção dos radicais livres e evitar possíveis danos oxidativos. Os antioxidantes surgem como moléculas naturais ou sintéticas que inibem a formação de espécies reactivas de oxigénio e azoto, ou a sua reacção com as estruturas biológicas, formando posteriormente radicais de menor reactividade (Valko e colaboradores, 2007). Os antioxidantes são utilizados particularmente para inibir ou minimizar a peroxidação lipídica e danos nas proteínas.

Antioxidante é definido como qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo (Halliwell e colaboradores, 2000). De acordo com esta definição, nem todos os redutores envolvidos em reacções químicas são antioxidantes; apenas os compostos que exibem uma acção protectora fazem parte desta classe. Esta protecção pode ser realizada, como já foi referido, por vários mecanismos de acção, nomeadamente: inibição de formação e capacidade de neutralização de EROs e ERNs, capacidade quelante ou até mesmo por efeitos sinérgicos entre dois ou mais mecanismos.

1.2.1. Campo de Aplicação dos Antioxidantes

Existe um interesse crescente na avaliação da capacidade antioxidante e respectiva aplicação nas indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética. Este interesse advém da contribuição importante que as espécies reactivas EROs e ERNs têm para a degradação oxidativa dos alimentos, envelhecimento e doenças degenerativas (Lee e colaboradores, 2004).

Na indústria química, os antioxidantes são entendidos como aditivos que retardam a auto-oxidação dos produtos químicos, nomeadamente plásticos e borrachas.

Os radicais livres são também responsáveis pelo aparecimento de rugas, flacidez e perda da vitalidade da pele. Neste sentido, as indústrias cosméticas oferecem actualmente linhas de tratamento visando a renovação celular, em que os produtos apresentam na sua composição antioxidantes como a vitamina A e E, alfa-hidroxiácidos e ceramidas (Gaspar, 2007; Santos, 2000; Silva, 1998).

Uma área onde os antioxidantes têm tido um crescimento acentuado é na indústria farmacêutica. Nos últimos anos têm sido desenvolvidos tratamentos à base de antioxidantes fenólicos no combate ao cancro. Estes tratamentos são mais eficientes, com menos efeitos secundários e menos dolorosos para os pacientes (Gaspar, 2007; Santos, 2000;Silva, 1998).

Um outro campo de aplicação de antioxidantes é na área dos biocombustíveis. O biodiesel sem antioxidantes é instável e rapidamente pode produzir ranço (oxidação lipídica) e polímeros insolúveis. Estes subprodutos podem causar danos aos motores por meio da corrosão ou através da formação de depósitos. Outra área de extensa aplicação de antioxidantes é a dos materiais poliméricos que se encontram sujeitos à degradação, causada pelo o oxigénio, raios UV, entre outros factores. A utilização de antioxidantes em produtos de plástico ou borracha tem como principal objectivo inibir a oxidação aumentando o seu período de vida útil sem grandes alterações nas propriedades mecânicas e aparência (Gaspar, 2007; Santos, 2000;Silva, 1998).

No entanto, a área de aplicação de antioxidantes por excelência é a indústria alimentar e de bebidas, normalmente como forma de conservar ou regular a sua acidez. Segundo o Decreto de Lei nº 363/98, os antioxidantes adicionados aos alimentos definem-se como toda e qualquer substância que seja capaz de retardar ou prevenir as alterações provocadas por oxidação tal como, desenvolvimento de ranço ou outras adulterações de aroma e cor. O uso de antioxidantes em produtos alimentares encontra-se regulamentado por leis de cada país ou internacionais. Os antioxidantes devem satisfazer vários requisitos antes de serem aceites para incorporação nos alimentos, nomeadamente (Kiokias e colaboradores, 2008; Santos, 2000):

- Devem ser solúveis em gorduras;
- Não devem transmitir cor, odor e sabor estranhos, mesmo após longo período de armazenamento;
- Devem ser eficazes a baixas concentrações (de forma a não apresentar actividade pró-oxidante) e garantir o bom desempenho por um período mínimo de um ano, a temperaturas entre os 25 e os 30 °C;
- Devem ser estáveis ao aquecimento, de forma a evitar respectiva deterioração.

Baixo custo de obtenção, facilidade de aplicação, eficácia, termorresistência, neutralidade organoléptica e ausência reconhecida de toxicidade, são algumas das premissas para a utilização dos antioxidantes nas mais diversas áreas industriais (Silva, 1998).

Os aditivos alimentares permitidos pela legislação europeia são representados pela letra E seguida de um número com três algarismos, estando os antioxidantes incluídos no intervalo entre E300 e E385. A legislação portuguesa, em concordância com a legislação europeia, permite o uso dos antioxidantes alimentares descritos na Tabela 1.1.

Tabela 1.1. Antioxidantes Permitidos pela Legislação Portuguesa (Adaptado de DL nº 363/98).

Antioxidante	Designação
E300	Ácido L-ascórbico
E301	L-Ascorbato de sódio
E302	L-Ascorbato de cálcio
E304	Palmitato de ascorbilo
E306	Extractos naturais ricos em tocoferóis
E307	α -Tocoferol sintético
E308	γ -Tocoferol sintético
E309	δ -Tocoferol sintético
E310	Galhato de propilo
E311	Galhato de octilo
E312	Galhato de dodecilo
E320	Butil-hidroxianisol (BHA)
E321	Butil-hidroxitolueno (BHT)
E385	Etilenodiaminotetracetato de cálcio dissódico (EDTACaNa ₂)

1.2.2. Classificação dos Antioxidantes

Os antioxidantes são classificados dependendo do mecanismo com que inibem os radicais livres e respectivo local de intervenção. A inibição oxidativa pode ocorrer de duas formas (i) por eliminação de radicais livres, e neste caso o composto é descrito como antioxidante primário ou terminador de cadeia (*chain-breaking*), e (ii) por acção de um mecanismo que não envolva a eliminação directa dos radicais livres, e neste caso o

composto define-se como antioxidante secundário ou preventivo (Laguerl e colaboradores, 2007).

Os antioxidantes primários incluem os compostos fenólicos e actuam ao nível das etapas de iniciação ou de propagação de processos de auto-oxidação, promovendo o bloqueio da cadeia reaccional radicalar. O seu mecanismo de acção envolve normalmente a cedência de electrões ou átomos de hidrogénio aos radicais presentes (ex. radicais alquilo (R^{\bullet}), peróxido (ROO^{\bullet}) e alcoilo (RO^{\bullet})), os quais são convertidos em produtos mais estáveis (ex. RH , ROH , $ROOH$). Paralelamente ocorre a formação de novas espécies radicalares (A^{\bullet}) a partir das moléculas do antioxidante (AH), as quais devem ser suficientemente estáveis e incapazes de iniciar e/ou propagar a cadeia reaccional (Laguerl e colaboradores, 2007). Porém, em alguns casos, o radical fenóxido poderá aceitar electrões formando produtos estáveis (ex. RA , ROA , $ROOA$), Figura 1.4.

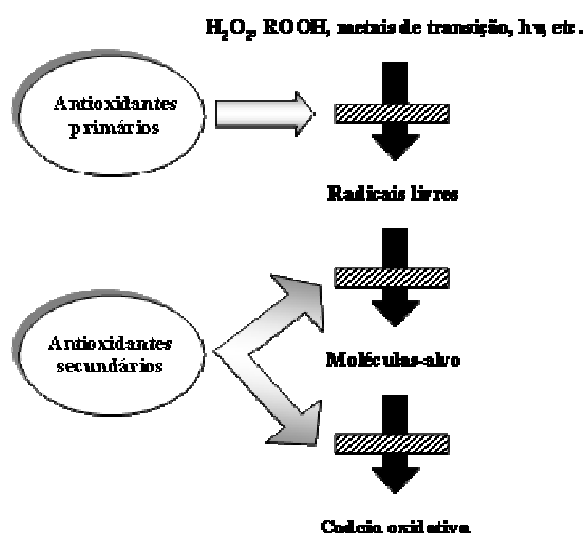


Figura 1.4. Representação esquemática do mecanismo de actuação de um antioxidante primário e secundário numa molécula alvo (Gaspar, 2007).

Os antioxidantes secundários apresentam vários mecanismos de actuação como a eliminação de oxigénio, a conversão de hidroperóxidos em espécies não radicalares, absorção de radiação UV e acção quelante de metais pró-oxidantes (como o ferro e cobre) (Karoatkova e colaboradores, 2002).

1.2.3. Pesquisa e Desenvolvimento de Novos Agentes Antioxidantes

Nas últimas duas décadas tem-se assistido a uma procura incessante de novos compostos com propriedades antioxidantes, de origem natural ou sintética, capazes de

serem aplicados a nível industrial. Na realidade tem sido dada uma especial atenção à descoberta e utilização de antioxidantes, isolados a partir de produtos naturais, facto que se baseia na pretensa inocuidade deste tipo de produtos (Frankel e colaboradores, 1996). No entanto, alguns destes compostos têm demonstrado alguma citotoxicidade (Baskin e colaboradores, 1997).

Os antioxidantes de origem sintética têm revelado maior capacidade de protecção contra os fenómenos oxidativos. A insatisfação quanto à eficácia e segurança dos compostos antioxidantes, actualmente usados em produtos alimentares, cosméticos ou medicamentos, motiva a realização de estudos de pesquisa e desenvolvimento de novos antioxidantes, obtidos não só a partir de fontes naturais, mas também por síntese química total ou por modificação molecular.

A realização de diversos trabalhos com extractos de plantas tem permitido isolar e identificar novos compostos com propriedades antioxidantes, a maior parte dos quais apresenta estruturas fenólicas (ex. ácidos fenólicos e flavonóides) (Madsen e colaboradores, 1997; Blekas e colaboradores, 1995; Madsen e colaboradores, 1995). Porém, esses compostos de origem natural têm demonstrado, na maior parte dos casos, uma menor eficácia de acção quando comparados com os antioxidantes sintéticos legalmente permitidos, facto para o qual contribui sobretudo a sua menor estabilidade nas condições normais de processamento e manuseamento dos produtos (Alaiz e colaboradores, 1995).

Os compostos fenólicos são um grupo extenso e complexo de fitoquímicos, e são encontrados em grandes quantidades nos vegetais e plantas, podendo também ser obtidos por *via* sintética. Além das propriedades antioxidantes, a sua presença contribui para a componente sensorial dos alimentos, como a cor, sabor e aroma. Esta classe de compostos tem evidenciado diversas actividades biológicas relevantes, como anti-bacteriana, antiviral, propriedades anti-proliferativas e citotóxicas em várias células tumorais (Fiuza e colaboradores, 2004).

1.2.3.1. Antioxidantes Fenólicos

Os antioxidantes fenólicos sintéticos mais utilizados na indústria são o butil-hidroxianisole (BHA), o butil-hidroxitolueno (BHT), a *terc*-butilhidroquinona (TBHQ) e o galhato de propilo (GP), uma vez que apresentam uma excelente estabilidade química, baixo custo e disponibilidade.

As recentes restrições impostas na ingestão diária aceitável pela *Join Expert Committee, Food Additive* (JECFA) da *Food and Agriculture Organization* (FAO) e a *World Health Organization* (WHO) para os antioxidantes sintéticos mencionados têm levado à necessidade de encontrar alternativas (Wurtzen, 1990). Actualmente, os estudos centram-se nos compostos fenólicos naturais, uma vez que também eles agem como captadores de radicais livres, interrompendo assim as reacções oxidativas em cadeia por eles induzidas, além de actuarem também noutra tipo de processos oxidativos, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Os compostos fenólicos encontram-se divididos em dois grandes grupos: os flavonóides e derivados, e os ácidos fenólicos (ácidos benzóicos, fenilacéticos, cinâmicos) e cumarinas. Os flavonóides possuem uma estrutura básica formada por 15 átomos de carbono ($C_6-C_3-C_6$), sendo os compostos quimicamente mais diversificados do reino vegetal. Neste grupo encontram-se as antocianidinas, flavonas, flavonóis e, com menor frequência, as auronas, calconas e isoflavonas, dependendo da posição, número e combinação dos grupos participantes da molécula. Os ácidos fenólicos encontram-se por sua vez divididos em três grupos. O primeiro é composto pelos ácidos benzóicos, que possuem sete átomos de carbono (C_6-C_1), e são os ácidos fenólicos de estrutura química mais simples encontrados na natureza. Os ácidos protocatecuico (PCA), gálgico e salicílico são os mais comuns (Figura 1.5).

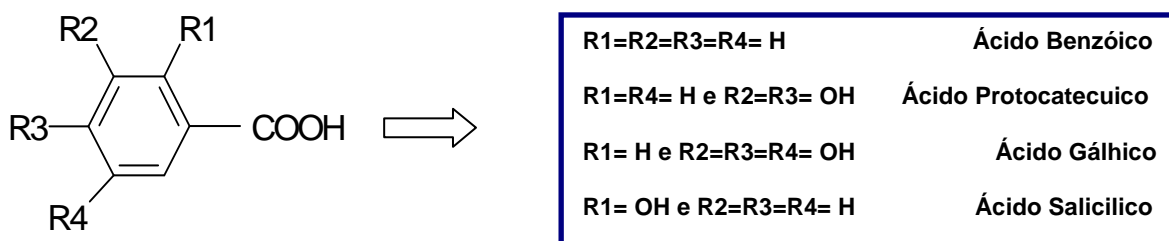


Figura 1.5. Representação esquemática das estruturas químicas do ácido benzóico e alguns derivados.

O segundo grupo é composto pelos ácidos fenilacéticos e são constituídos por 8 átomos de carbono (C_6-C_2). O ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) é o mais comum desta classe (Figura 1.6.).

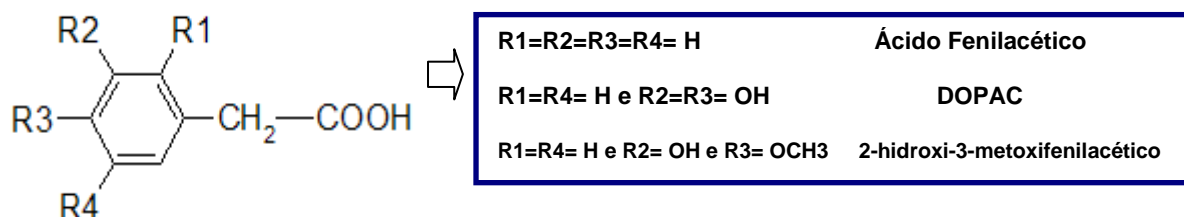


Figura 1.6. Representação esquemática das estruturas químicas do ácido fenilacético e alguns derivados.

O terceiro é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C₆-C₃). Os ácidos coumárico, ferúlico, cafeico e sinápico são os elementos mais comuns deste grupo (Figura 1.7.).

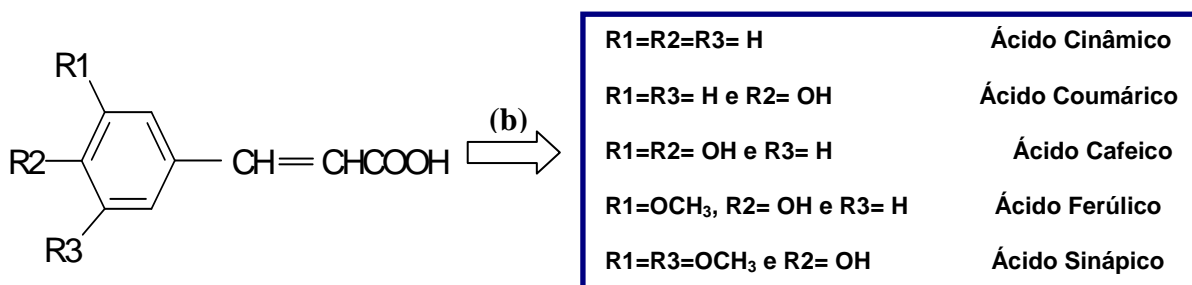


Figura 1.7. Representação esquemática das estruturas químicas do ácido cinâmico e alguns derivados.

ÁCIDO PROTOCATECUICO (PCA)

O ácido protocatecuico (PCA ou ácido 3,4-diidroxibenzóico ou 3,4-DHBA), Figura 1.8., é um metabolito da epinefrina e pode ser encontrado em alguns produtos naturais, como plantas e frutos. A eficiência do PCA como antioxidante tem vindo a ser amplamente estudado. A sua capacidade de captação de radicais livres permite a inibição de carcinogénicos (Saito e colaboradores, 2006; Siquet e colaboradores, 2006).

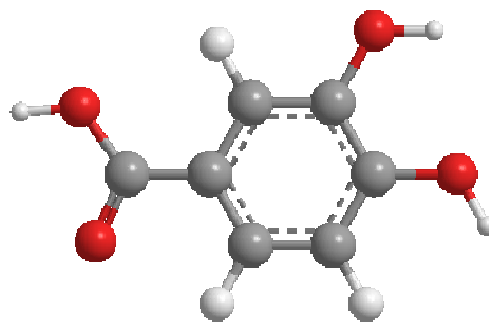


Figura 1.8. Representação da estrutura química do PCA.

A capacidade antioxidante do ácido protocatecuico é atribuída à energia de dissociação dos grupos OH, devido à facilidade de perda do protão. O grupo OH que se encontra na posição *para* apresenta uma energia de dissociação menor que o grupo hidroxilo que se encontra na posição *meta* (Hatzipanayiotti e colaboradores, 2006).

A actividade antioxidante do PCA poderá também estar relacionado com o seu processo de degradação, por oxidação ou ionização, principalmente na passagem do seu estado mais estável, PCA-H₃, a dianião, (PCA-H)²⁻ (Hatzipanayiotti e colaboradores, 2006). Por outro lado, a formação da *orto* quinona, durante a oxidação do PCA, poderá estar relacionada com o aumento da actividade anti-radicalar do ácido (Saito e Kawabata, 2008; Hatzipanayiotti e colaboradores, 2006; Saito e Kuwabat, 2006; Sroka e Cisowski, 2003; Saito, Okamoto, Kawabata, Kasai, 2003).

O PCA também pode ser encontrado em alguns efluentes industriais. A sua eliminação, como a de outros compostos fenólicos existentes em efluentes, pode ser efectuada recorrendo à ozonólise ou foto-oxidação na presença de H₂O₂ (Hatzipanayiotti e colaboradores, 2006).

Ácido 3,4 - Diidroxifenilacético (DOPAC)

O ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) apresenta uma estrutura química análoga à do ácido protocatecuico, mas possui um grupo CH₂ que separa o anel aromático do grupo carboxílico (Figura 1.9.). O DOPAC tem sido estudado na área do SNC (sistema nervoso central), mas não relacionada com as suas propriedades antioxidante *in vitro* ou *in vivo* (Megaw e colaboradores, 2001; Eldrup e Richter, 2000; Beart e Gundlach, 1980). Este composto fenólico é obtido *in vivo* pela acção *monoamino oxidase* sobre a dopamina nas terminações nervosas das células dopaminérgicas.

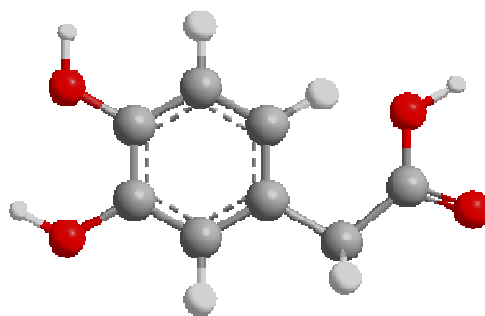


Figura 1.9. Representação da estrutura do ácido DOPAC.

Siquet e colaboradores (2006) observaram que o ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) apresenta maior capacidade antioxidante que o ácido 3,4-dihidroxi benzóico (PCA). Raneva e colaboradores (2001) estudaram e compararam o efeito inibitório do ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) e o ácido cafeico (CA) na peroxidação lipídica no plasma do rato. Este grupo de investigação demonstrou que o uso de concentrações micromolares destes ácidos exerce actividade antioxidante na degradação lipídica. Por outro lado, constataram que o DOPAC apresenta um melhor desempenho antioxidante, devido ao grupo CH_2 , do que o ácido cafeico (composto de referência), que possui uma cadeia saturada $\text{CH}=\text{CH}$, como espaçador entre o grupo aromático e o grupo carboxílico.

O DOPAC não é considerado um antioxidante oficial para a indústria. O composto estruturalmente mais próximo do DOPAC, e que se encontra no mercado, é o hidroxitirosol, um antioxidante natural com eficiência já demonstrada e que pode ser encontrado no azeite (Raneva e colaboradores, 2001).

1.2.4. Antioxidantes Fenólicos: Estudos de Relação Estrutura-Actividade

As relações estrutura-actividade, usadas normalmente no design e optimização de compostos líderes, são efectuadas alterando-se partes da estrutura química do composto em estudo e avaliando a sua influência na actividade antioxidante sob o ponto de vista qualitativo e quantitativo.

A actividade antioxidante encontra-se fortemente relacionada com a capacidade de cedência de electrões, não dependendo apenas da energia da ligação OH , mas também da estabilidade das espécies radiculares formadas (Cao e colaboradores, 2005). No passo inicial da oxidação dos compostos fenólicos forma-se um radical fenoxilo (Figura 1.10.). O radical fenoxilo é estabilizado pela deslocalização do electrão desemparelhado

no anel aromático e é tanto mais estável quanto maior for a capacidade dos grupos substituintes de o estabilizar por efeito mesomérico e/ou indutivo. As diferentes estruturas de ressonância que se formam a partir do radical fenóxilo podem participar em reacções de acoplamento, perda de prótons ou ataque nucleófilo (Ferreira e colaboradores, 2006; Hotta e colaboradores, 2002).

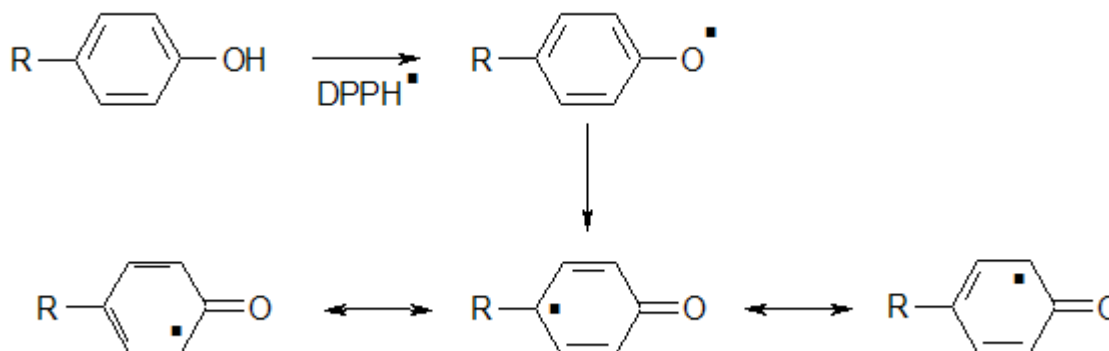


Figura 1.10. Representação esquemática da reacção da oxidação de compostos fenólicos, na presença de radicais, com a formação do radical fenóxilo e respectivas estruturas de ressonância.

Os compostos fenólicos podem ser constituídos por um ou mais anéis benzénicos hidroxilados e as suas propriedades redox encontram-se relacionadas com as suas características estruturais: o número e posições dos grupos hidroxilo no anel, a extensão da conjugação estrutural, a presença de grupos dadores ou aceitadores de densidade electrónica no anel aromático (Saito e colaboradores, 2006). Os compostos fenólicos apresentam uma estrutura química considerada ideal para exibir actividade anti-radicalar tendo estudos demonstrado que são antioxidantes mais eficientes *in vitro* que os antioxidantes oficiais, nomeadamente os tocoferóis e o ácido ascórbico (vitamina C).

A posição do grupo hidroxilo no anel fenólico é importante para a actividade antioxidante do composto. Quando este grupo ocupa a posição *para*, os antioxidantes são considerados mais activos do que quando esta função se encontra em *orto* ou *meta* (Cheng e colaboradores, 2003). Por outro lado, compostos com 2 ou 3 grupos substituintes hidroxilo no anel aromático, como o ácido cafeico, apresentam maior poder antioxidante do que os monohidroxilados, como o ácido coumárico. A capacidade antioxidante também aumenta com o tipo de espaçador que separa o anel aromático do grupo carboxílico. Segundo Silva e colaboradores (2000), os compostos com cadeia

hidrocarbonada mais pequena – galhato e cafeato de metilo - evidenciam um menor efeito antioxidante.

O poder antioxidante dos compostos fenólicos aumenta significativamente quando existem 2 grupos hidroxilos nas posições *meta* e *para*, estrutura apresentada pelos ácidos cafeico e 3,4-dihidroxibenzóicos (Marinova e Yanishlieva, 1992). Estes autores propuseram nos seus estudos a seguinte ordem de actividade antioxidante: ácido cafeico > ácido protocatecuico > ácido sinápico > ácido siríngico > ácido ferúlico > ácido coumárico > ácido vanílico. Dziedzic e Hudson (1984) avaliaram a eficiência de alguns ácidos fenólicos e observaram que o ácido cafeico, ferúlico, gálhico e sinápico possuem uma boa actividade antioxidante.

Às propriedades electrónicas soma-se a lipofilicidade, que representa a afinidade de uma molécula para um ambiente lipofílico. Esta propriedade encontra-se relacionada com o coeficiente de partilha, Log P, e quanto maior for o seu valor, maior a afinidade do composto pela fase orgânica ou seja, mais lipofílico ele é. O coeficiente de partilha é definido pela razão entre a concentração do composto na fase orgânica e a sua concentração na fase aquosa. Saija e colaboradores (2000) observaram que a lipofilicidade do ácido ferúlico é superior à do cafeico para pH 3 e 7,2. No entanto, estes compostos, assim como os demais ácidos fenólicos, possuem baixa solubilidade em meio lipofílico, limitando em parte, a sua utilização e o seu potencial antioxidante. Para aumentar a lipofilicidade dos antioxidantes, normalmente recorre-se à introdução de grupos mais lipofílicos como por exemplo, ácidos gordos de cadeia longa ou álcoois. Segundo Silva e colaboradores (2000), a lipofilicidade de um éster fenólico é uma propriedade de grande importância na área dos alimentos, cosméticos e farmacêuticos, uma vez que a um aumento da cadeia alquílica no grupo carboxílico encontra-se associado uma maior afinidade com a camada interna da dupla camada lipídica (hidrofóbica). Este grupo de investigação constatou que, e através da medição do Log P, um aumento da cadeia alifática, influencia positivamente o grau de lipofilicidade sendo esta superior nos ésteres cafeatos do que nos galhatos.

1.3. Objectivos

Esta dissertação tem como principais objectivos:

- A síntese de novos antioxidantes lipofílicos com base nos ácidos 3,4-diidroxibenzóico e 3,4-diidroxifenilacético, e a sua elucidação estrutural;
- Avaliação da actividade antioxidante dos novos compostos usando o método do DPPH e técnicas electroquímicas.

1.4. Bibliografia

Acworth, I.N., McCae, D.R., Mather, T.J. (1997). *The Analysis of Free Radicals, Their Reaction Products, and Antioxidants in Oxidants, Antioxidants and Free Radicals* (Baskin, S.I. and Salem, H. Ed.), 23-77, Taylor & Francis, Bristol;

Alaiz, M., Zamora, R., Hidalgo, F.J. (1995). *Natural Antioxidants Produced in Oxidized Lipid/Amino Acid Browning Reactions*. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **72** (12), 1571-1575;

Baskin, S.I., Salem, H. (1997). *Oxidants, Antioxidants, and Free Radicals*. 1, Taylor & Francis;

Beart, P.M., Gundlach, A.L. (1980). *3,4-Dihydroxyphenylacetic Acid (DOPAC) and The Rat Mesolimbic Dopaminergic Pathway: Drug Effects and Evidence for Somatodendritic Mechanisms*. *British Journal of Pharmacology*, 69, 241-247;

Belitz, H. D., Grosch, W. (1987). *Edible Fats and Oil*. *Food Chemistry*, 472-493;

Blekas, G., Tsimidou, M., Boskou, D. (1995). *Contribution of α -Tocopherol to Olive Oil Stability*. *Food Chemistry*, **52**, 289-294;

Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, V.K. (2003). *Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review*. *Annals of Botany*, 91, 179-194;

Cao, H., Cheng, W-X., Li, C., Xu-Lin, P., Xiao-Guang, X., Tao-Hong, L. (2005). *DFT Study on the Antioxidant Activity of Rosmarinic Acid*. Journal Molecular Structure, **719**(1-3), 177-183;

Cheng, Z., Ren, J., Yan, G., Li, Y., Chang, W., Chen, Z. (2003). *Quantitative Elucidation of the Molecular Mechanisms of Hydroxyl Radical Quenching Reactivity of Phenolic Compounds*. Bioorganic Chemistry, **31**(2), 149-162;

Decreto de Lei nº 363/98 – Aditivos Alimentares;

Dziedzic, S.Z., Hudson, B.J.F. (1984). *Phenolic Acids and Related Compounds as Antioxidants for Edible Oils*. Food Chemistry, **14**, 45-51;

Eldrup, E., Richter, E. A. (2000). *DOPAC, Dopamine, and DOPAC Concentrations in the Rat Gastrointestinal Tract Decrease During Fasting*. American Journal Physiology. Endocrinology and Metabolism, **279**(4), 815-822;

Falcão, S. M. (2008). *Avaliação da Actividade Electroquímica em Cogumelos Silvestres Comestíveis*. Departamento de Química, Universidade do Porto;

Fiuza, S. M., Gomes, C., Teixeira, L.J., Girão da Cruz, M.T., Cordeiro, M.N.D.S, Milhazes, N., Borges, F., Marques, M.P.M. (2004). *Phenolic Acid Derivatives with Potencial Anticancer Properties – A Structure-Activity Relationship Study. Part 1: Methyl, Propyl and Octyl Esters of Caffeic and Gallic Acids*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, **12**, 3581-3589;

Frankel, E.N. (1993). *In Search of Better Methods to Evaluate Natural Antioxidants and Oxidative Stability in Food Lipids*. Trends Food Science & Technology, **4** (7), 220-225;

Gaspar, A. M. N. (2007). *Síntese de Novos Antioxidantes Lipofílicos. Avaliação da Actividade Antioxidante*. Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa;

Halliwell, B. (2006). *Reactive Species and Antioxidants*. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Plant Physiology, **141**, 312-322;

Halliwell, B. (2000). *The Antioxidant Paradox*. Lancet, **355**, 1179-1185;

Hatzipanayioti, D., Karaliota, A., Kamariotaki, M., Aletras, V., Petropouleas, P. (2006). *Theoretical and Spectroscopic Investigation of the Oxidation and Degradation of Protocatechuic Acid*. *Chemical Physics*, 325, 341-350;

Janowiak, J. (1996). *Teaching Methods in Nutrition: Free Radicals, Antioxidants and Human Disease*. Report-Descriptive from Department of Curriculum and Instruction Appalachian State University Boone, North Carolina 28608;

Kaur, I. P., Geetha, T. (2006). *Screening Methods for Antioxidants – A Review*. *Mini-Review in Medicinal Chemistry*, 6(3), 305-312;

Kiokias, S., Varzakas, T., Oreopoulou, V. (2008). *In Vitro Activity of Vitamins, Flavonoids, and Natural Phenolic Antioxidants Against the Oxidative Deterioration of Oil-Based Systems*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48 (1), 78-93;

Korotkova, E. I., Karbainov, Y. A., Shevchuk, A. V. (2002). *Study of Antioxidant Properties by Voltammetry*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 518, 56-65;

Laguere, M., Lecowte, J., Villeneuve, P. (2007). *Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing Methods, New Trends and Challenges*. *Progress in Lipid Research*, 46, 244-82;

Larson, R.A. (1988). *The Oxidants of Higher Plants*. *Phytochemistry*, 27(4), 969-978;

Lee, J., Koo, N., Min, D.B. (2004). *Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 21-33;

Madsen, H.L., Bertelsen, G. (1995). *Spices as Antioxidants*. *Trends Food Science & Technology*, 1 (6), 271-277;

Madsen, H.L., Bertelsen, G., Skibsted, L.H. (1997). *Antioxidative Activity of Spices and Spice Extracts*, J Risch, Sara, Ho, Chi-Tang, (ed.), ACS symposium series 660: Spices: flavour chemistry and Antioxidant Properties, ACS, Washington;

Marinova, E.M., Yanishlieva, N.V. (1992). *Inhibited Oxidation of Lipids II: Comparison of the Antioxidative Properties of some Hydroxy Derivatives of Benzoic and Cinnamic Acids*. *Fett-Wissenschaft Technologie*, 94(11), 428-432;

Megaw, P., Morgan, I., Boelen, M. (2001). *Vitreol Dihydroxyphenylacetic Acid (DPAC) as an Index of Retinal Dopamine Release*. Journal of Neurochemistry, 76, 1636-1644;

Raneva, V., Shimasaki, H., Ishida, Y., Ueta, N., Niki, E. (2001). *Antioxidative Activity of 3,4-Dihydroxyphenylacetic Acid and Caffeic Acid in Rat Plasma*. Lipids, 35(10), 1111-1116;

Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., Pasquale, A., Uccella, N., Barbuzzi, T., Paolino, D., Bonina, F. (2000). *In vitro and In Vivo Evaluation of Caffeic and Ferulic Acids as Topical Photoprotective Agents*. International Journal of Pharmaceutics, 199(1), 39-47;

Saito, S., Gao, H., Kawabata, J. (2006). *DPPH (=2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl=2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl) Radical-Scavenging Reaction of Protocatechuic Acid Esters(=3,4-Dihydroxybenzoates) in Alcohols: Formation of Bis-Alcohol Adduct*. Helvetica Chimica Acta, 89, 821-831;

Saito, S., Kawabata, J. (2008). *A Novel Oxidative Dimer from Protocatechuic Esters: Contribution to the Total Radical Scavenging Ability of Protocatechuic Esters*. Bioscience. Biotechnology Biochemistry, 72 (7), 1877-1880;

Saito, S., Okamoto, Y., Kawabata, J., Kasai, T. (2003). *Quinone Hemiacetal Formation from Protocatechuic Acid during the DPPH Radical Scavenging Reaction*. Bioscience. Biotechnology. Biochemistry., 67, 1578-1579.

Santos, C. M. (2000). *Síntese e Avaliação da Actividade Antioxidante de 2-Estirilcromonas*. Tese de Mestrado em Química dos Produtos Naturais e Alimentos, Departamento de Química, Universidade de Aveiro;

Silva, F. A. (1998). *Síntese de Derivados de Ácidos Cinâmicos: Determinação da Actividade Anti-Radicalar e Antioxidante*. Tese de Mestrado em Controlo de Qualidade, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto;

Silva, F. M., Borges, F., Guimarães, C., Lima, J. L. F. C., Matos, C., Reis, S. (2000). *Phenolic Acids and Derivatives: Studies on the Relationship Among Structure, Radical Scavenging Activity, and Physicochemical Parameters*. Journal of Agriculture Food Chemistry, 48, 2122-2126;

Siquet, C., Paiva-Martins, F., Lima, J., Reis, S., Borges, F. (2006). *Antioxidant Profile of Dihydroxy- and Trihydroxyphenolic Acids – A Structure-Activity Relationship Study*. Free Radical Research, **40**(4), 433-442;

Soares, S. E. (2002). Ácidos Fenólicos como Antioxidantes. *Revista de Nutrição*, **15**(1), 71-81;

Sroka, Z. e Cisowski, W. (2003). Hydrogen Peroxide Scavenging, Antioxidant and Anti-Radical Activity of some Phenolic Acids. *Food and Chemical Toxicology*, **41**(6), 753-758;

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M., Telser, J. (2007). *Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, **39**(1), 44-84;

Wurtzen, G. (1990). *Shortcomings of Current Strategy for Toxicity Testing of Food Chemicals: Antioxidants*. *Food Chemistry and Toxicology*, **28**(11), 743-745.

Síntese de Derivados de Ácidos Fenólicos

Sumário

N

esta secção encontram-se descritos os reagentes e os instrumentos utilizados bem como os protocolos experimentais usados na síntese de 6 ésteres alquílicos obtidos a partir dos ácidos 3,4-diidroxibenzóico (PCA) e 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC). A esterificação dos 6 ésteres foi realizada pelo método de Fisher. Para a elucidação estrutural dos ésteres sintetizados foram efectuadas caracterizações ao nível da espectroscopia de infravermelho e de massa bem como ressonância magnética nuclear (RMN ^1H e ^{13}C).

Palavras-Chave: Ácidos Benzóicos; Ácidos Fenilacéticos; Método de Fisher; Síntese de Ésteres Alquílicos; Elucidação Estrutural.

2.1. Nomenclatura e Propriedades Físico-Químicas

As normas da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) recomendam o uso de nomes triviais para compostos naturais e nomes sistemáticos para compostos estruturalmente relacionados, de origem natural ou sintética. Os nomes sistemáticos da IUPAC para ácidos carboxílicos são obtidos pela eliminação do sufixo -*ano* do nome do alcano equivalente, que corresponde à maior cadeia do ácido, e pela adição -*óico* precedida pela palavra ácido.

Os ácidos carboxílicos são substâncias polares. As suas moléculas podem formar pontes de hidrogénio fortes entre elas e com a água. Como resultado, os ácidos carboxílicos possuem geralmente elevados pontos de ebulição, e os de baixo peso molecular apresentam solubilidade apreciável em água.

2.1.1. Nomenclatura dos Ácidos Fenólicos

Os ácidos benzóico e fenilacético são compostos aromáticos, cujo nome sistemático, de acordo com a IUPAC, corresponde ao próprio nome, ácido benzóico e ácido fenilacético (Figura 2.1.). O ácido benzóico apresenta um pK_a de 4,19 e é insolúvel em água reagindo facilmente com soluções aquosas de hidróxido de sódio e bicarbonato de sódio para formar sais de sódio estáveis (Solomons e Fryhle, 2001). A numeração dos átomos de carbono deverá ser efectuada a partir do átomo de carbono que se encontra ligado à cadeia alquílica (neste caso, é o grupo carboxílico) seguindo os menores números para os restantes grupos substituintes.

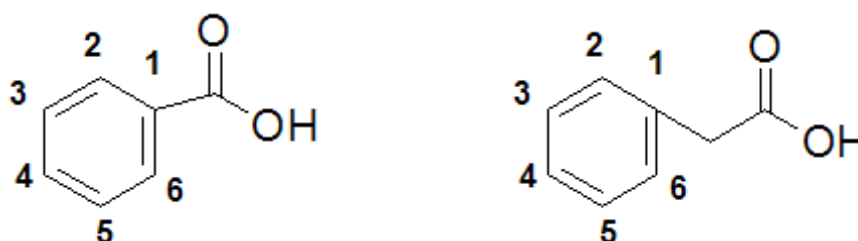


Figura 2.1. Representação da estrutura química dos ácidos benzóico e fenilacético.

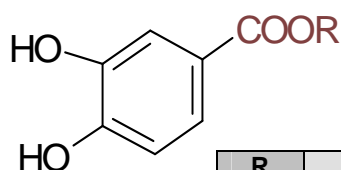
O ácido benzóico é designado por ácido hidroxibenzóico quando apresenta um grupo hidroxilo no anel aromático e ácido dihidroxibenzóico caso apresente dois grupos. Em ambos os casos, a posição onde o grupo se encontra deverá ser mencionada pelo respectivo número do carbono ao qual está ligado. Por exemplo, se o grupo hidroxilo

estiver ligado ao carbono 4 do anel benzénico (Figura 2.1.), o composto, segundo as regras da IUPAC, deverá ser ter o seguinte nome sistemático, ácido 4-hidroxibenzoico.

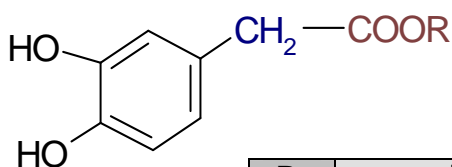
2.1.2. Nomenclatura de Ésteres Alquílicos de Ácidos Fenólicos

A função éster (R_1COOR_2), segundo as regras de nomenclatura da IUPAC, é designada através do seu anião R_1COO^- com sufixo *-ato* (carboxilato) seguindo-se a designação do radical (R_2) com o sufixo *-ilo* (IUPAC, 2007; Rigaudy e colaboradores, 1979). É normalmente mantida a numeração do ácido aromático correspondente. Os ésteres são compostos polares, no entanto, como não têm um hidrogénio ligado ao oxigénio, as suas moléculas não podem formar pontes de hidrogénio fortes entre elas. Como resultado, os ésteres possuem pontos de ebulição menores do que os ácidos e álcoois de peso molecular semelhantes.

Neste trabalho experimental foi efectuada a síntese de 6 ésteres alquílicos a partir dos ácidos fenólicos: 3,4-diidroxibenzoico e 3,4-diidroxifenilacético (Figura 2.2.).



R	Nome Sistemático/ Trivial	Sigla
H	Ácido 3,4-Diidroxibenzoico/ Ácido Protocatecuico	PCA
CH ₃	3,4-Diidroxibenzoato de metilo	PM
C ₂ H ₅	3,4-Diidroxibenzoato de etilo	PE
C ₃ H ₇	3,4-Diidroxibenzoato de propilo	PP



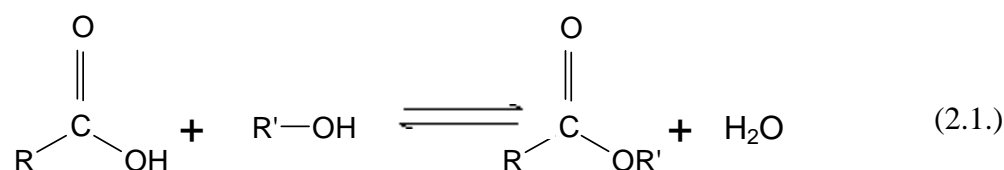
R ₁	Nome Sistemático	Sigla
H	Ácido 3,4-Diidroxifenilacético	DOPAC
CH ₃	3,4-Diidroxifenilacetato de metilo	PPM
C ₂ H ₅	3,4-Diidroxifenilacetato de etilo	PPE
C ₃ H ₇	3,4-Diidroxifenilacetato de propilo	PPP

Figura 2.2. Nomes triviais e sistemáticos dos ácidos fenólicos e respectivos ésteres alquílicos sintetizados neste trabalho.

2.2. Métodos Gerais de Síntese de Ésteres de Ácidos Fenólicos

A obtenção de ésteres é um processo importante em química orgânica, visto que estes representam não só um produto final, mas também correspondem a importantes intermediários sintéticos. O método clássico de obtenção de ésteres envolve a condensação de um ácido carboxílico com um álcool, sendo o processo genericamente designado por esterificação (Trost e colaboradores, 1991) (equação 2.1.).

Reacção Geral



As reacções de esterificação são reacções reversíveis que ocorrem muito lentamente na ausência de catalisadores (Mcmurry, 2004; Volhardt e colaboradores, 1999; Trost e colaboradores, 1991). Com o intuito de melhorar a velocidade e o rendimento da reacção recorre-se, geralmente, ao uso de catalisadores e/ou aquecimento, ou a um excesso de um dos reagentes de partida. Existem vários métodos de esterificação, nomeadamente a partir de cloretos de acilo, anidridos de ácidos carboxílicos, sendo que a mais simples é a esterificação directa ou de Fisher, com recurso a um ácido ou base inorgânico como catalisador.

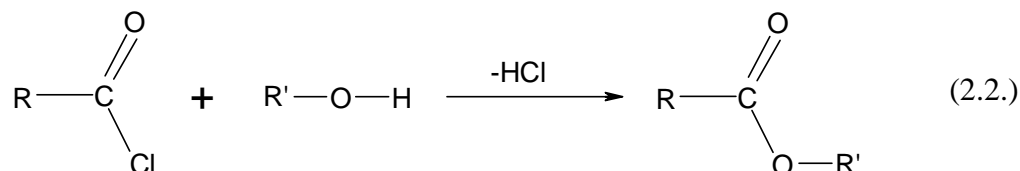
Os factores estéricos afectam a velocidade da hidrólise de ésteres catalisadas por ácidos ou bases inorgânicos. Grupos de elevado volume, tanto no componente álcool como no ácido, reduzem a velocidade em ambas as reacções de uma forma significativa (Solomons e Fryhle, 2001). Os álcoois terciários, como 2-metil-2-propanol, reagem tão lentamente em esterificações catalisadas por ácido que normalmente sofrem eliminação. Neste caso, para que a esterificação ocorra deve-se recorrer a cloretos de acilo e anidridos.

2.2.1. Esterificação *via* Halogeneto de Ácido

Os ésteres podem ser sintetizados a partir da reacção de cloretos de acilo com álcoois (equação 2.2.). Os cloretos de acilo são muito mais reactivos que os ácidos carboxílicos, pelo que a reacção entre um cloreto de acilo e um álcool ocorre rapidamente e não necessita de catalisador. A piridina é normalmente adicionada à mistura reaccional com o

objectivo de reagir não só com o HCl que se vai formando, de modo a evitar a ocorrência de reacções laterais, como também com o cloreto de acilo, formando um intermediário ainda mais reactivo (Solomons e Fryhle, 2001).

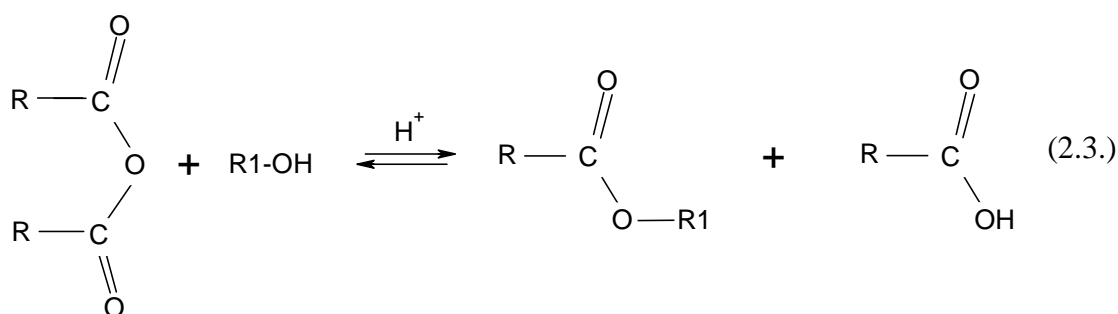
Reacção Geral



2.2.2. Esterificação *via* Éster Activado

Este método assume particular importância na síntese de ésteres, principalmente quando no material de partida existem grupos funcionais sensíveis a condições drásticas de trabalho (ex. meio ácido) (Trost e colaboradores, 1991). A título de exemplo refere-se os anidridos de ácidos carboxílicos, os quais reagem com álcoois para formar ésteres na ausência de um catalisador ácido (equação 2.3.). Os anidridos de ácido podem obter-se, entre outros processos, pela reacção do respectivo cloreto de acilo (RCOCl) com o sal sódico do ácido (RCOONa).

Reacção Geral



Encontra-se ainda referido na literatura um outro processo de obtenção de ésteres com base na reacção de sais sódicos dos ácidos carboxílicos com brometos e iodetos de alquilo primários e secundários, à temperatura ambiente e em solventes apróticos dipolares (Solomons e Fryhle, 2001).

2.2.3. Esterificação de Fisher

A esterificação de Fisher (Figura 2.3.) é um dos métodos correntemente utilizado para a obtenção de ésteres (Fiuza e colaboradores, 2004; Otera e colaboradores, 2003; Trost e colaboradores, 1991). Este método de esterificação directa é normalmente catalisado por ácidos ou bases inorgânicos.

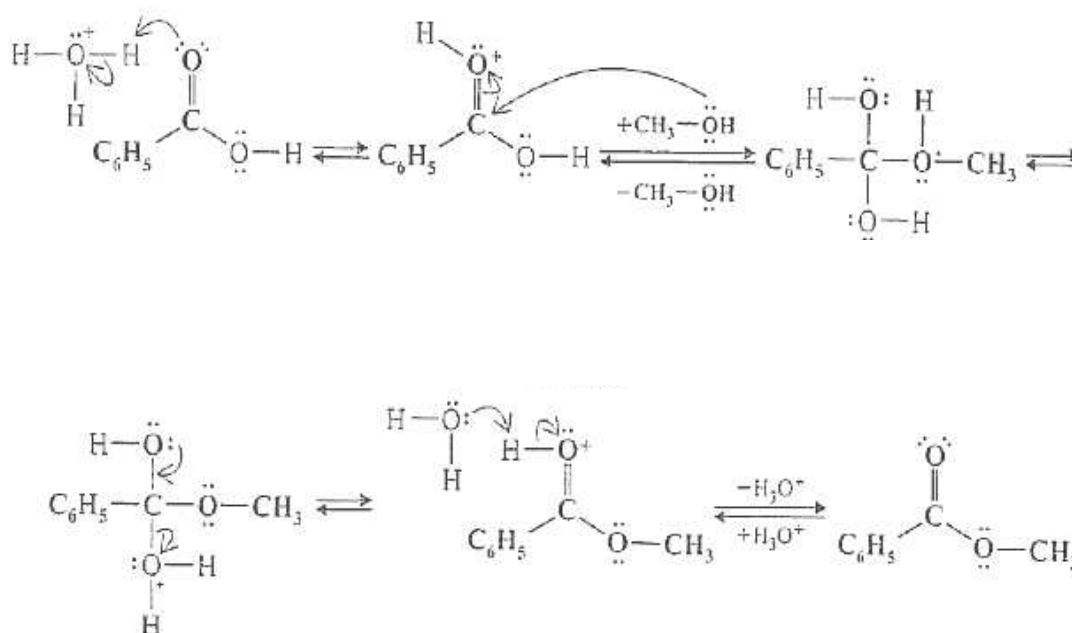


Figura 2.3. Representação esquemática da esterificação de Fisher (Adaptado Solomons e Fryhle, 2001).

No caso da esterificação de Fisher, o equilíbrio da reacção é normalmente alcançado em poucas horas. O mecanismo reaccional, largamente aceite para este tipo de esterificações, é um processo do tipo A_{AC2} (A= catálise ácida, AC= transferência de acilo, 2= bimolecular). Este mecanismo ocorre muitas vezes dividido em dois passos: primeiro de adição seguido de eliminação. A reacção de adição corresponde a uma activação do ácido carboxílico pelo catalisador, promovendo o ataque nucleofílico subsequente por parte do álcool. O passo da eliminação envolve a perda de água e formação do respectivo éster (Mcmurry, 2004; Otera e colaboradores, 2003; Volhardt e colaboradores, 1999; Trost e colaboradores, 1991).

2.3. Condições Experimentais

2.3.1. Instrumentação

Para a preparação dos ésteres alquílicos, sintetizados a partir do PCA e DOPAC, foi usado o seguinte equipamento:

- Balança Precisa 205 A, Superbal Series;
- Placa de agitação Trade Raypa;
- Os solventes foram evaporados utilizando um evaporador rotativo *Büchi*.

A elucidação estrutural dos compostos sintetizados foi estabelecida através da compilação de dados de Espectrofotometria de IV, Ressonância Magnética Nuclear Protónica (RMN de ^1H) e de Carbono 13 (RMN de ^{13}C) e Espectroscopia de Massa de Impacto Electrónico (EM-IE).

- Os pontos de fusão foram determinados num microscópio de Köfler da marca *Reichert Thermovar* e não foram corrigidos;
- Os espectros no infravermelho (IV) foram registados num espectrofotómetro RX1 (*Perkin Elmer*), usando pastilhas de brometo de potássio (*Uvasol Merck*), contendo aproximadamente 1.0% de amostra. Apenas as bandas mais importantes se encontram referidas ($\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1});
- Os espectros de massa (EM) foram registados num espectrómetro *VG AutoSpec* de impacto electrónico (IE) e referidos em m/z (% relativa);
- Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT) foram obtidos num aparelho *Bruker AMX 300*, à temperatura ambiente, a partir de soluções concentradas em dimetilsulfóxido deuterado, com um grau de deuteração superior a 99.0%. Como referência interna usou-se o tetrametilsilano (TMS). Nos espectros de ressonância magnética nuclear de protão (RMN ^1H), registados a 300.13 MHz, indica-se o desvio químico (δ) em partes por milhão (ppm), o número de protões, a multiplicidade e a(s) constante(s) de acoplamento.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^{13}C e DEPT (RMN ^{13}C) foram registados a 75.47 MHz, em que os desvios químicos de RMN ^{13}C são indicados (δ) em partes por milhão (ppm); os dados de ^{13}C de DEPT estão incluídos nos valores de ^{13}C (valores de δ).

2.3.2. Cromatografia

- Para a cromatografia de camada fina (CCF) usaram-se folhas revestidas de gele de sílica, Sil G/UV₂₅₄ (Macharey-Nagel), de espessura 0,2 mm. A fase móvel utilizada foi o sistema acetato de etilo/éter de petróleo;
- Na cromatografia em coluna (CC) usou-se como fase estacionária gele de sílica 60 de granulometria de 0.2-0.5 μm (Merk), e como fase móvel o sistema acetato de etilo/éter de petróleo 5:5 a 7:3. Foram recolhidas fracções de 25 mL, as quais foram sujeitas a controlo analítico por CCF.

As cromatografias de camada fina efectuadas foram reveladas à luz ultravioleta, 254 nm. Um dos critérios de pureza adoptados foi a observação de uma única mancha por cromatografia em camada fina.

2.3.3. Reagentes e Solventes

- Os solventes e reagentes utilizados foram todos de qualidade *pro analysis* ou equivalente, das firmas Merck, Aldrich, Sigma, Panreac, Rheidel-Haen, Carlo Erba e Macharey-Nagel;

Reagentes: 3,4-dihidroxibenzóico (Aldrich); 3,4-diidroxifenilacético (Aldrich); Metanol (Merck); Etanol (Panreac); Propanol (Sigma-Aldrich); Carbonato de sódio (Sigma); Sulfato de sódio anidro (Panreac); Ácido sulfúrico (Merck); Cloreto de cálcio (Sigma).

Solventes: Éter etílico (Riedel-Haen), Éter de petróleo (Panreac); Acetato de etilo (Carlo Erba).

2.3.4. Síntese de Ésteres Alquílicos do 3,4-Dihidroxibenzóico (PCA) e 3,4-Dihidroxifenilacético (DOPAC)

Um dos objectivos deste trabalho foi a síntese de novos compostos antioxidantes que contenham como núcleo base um ácido fenólico. Os compostos sintetizados foram obtidos por esterificação directa (Método Fisher) de ácidos fenólicos (PCA e DOPAC), catalisada por um ácido forte, H_2SO_4 , segundo o método modificado de Fiuza e colaboradores (2004). A metodologia utilizada apresenta algumas vantagens, nomeadamente:

- Os reagentes necessários à esterificação são considerados comuns, o que em termos económicos e de acessibilidade se torna num aspecto positivo;
- A reacção de esterificação faz-se num só passo, é relativamente rápida e apresenta rendimentos satisfatórios;
- A purificação dos produtos obtidos é, de uma forma geral, simples e rápida;
- O processo é adequado ao tipo de matéria-prima. A obtenção de cloretos de acilo de compostos com grupo catecol requer uma etapa preliminar de protecção do grupo;
- A utilização de um ácido (e não de uma base) teve como objectivo proteger o grupo catecol, caso contrário este degradaria-se;
- Poder ser realizado à temperatura ambiente, de forma a prevenir a ocorrência de polimerização (oligómeros) através dos grupos hidroxilos, o que tornaria o processo de purificação muito mais complexo e moroso, o que diminuía o rendimento da reacção.

2.3.4.1. Método Geral de Preparação de Ésteres Alquílicos

A técnica efectuada foi adaptada, com algumas modificações, de Fiuza e colaboradores (2004) e Silva (1998). Num balão de 250 mL colocou-se aproximadamente 1g (6,49 mmol de PCA; 5,95 mmol de DOPAC) do respectivo ácido fenólico em 75 mL de álcool apropriado. Adicionou-se 2 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), sendo a mistura submetida a agitação magnética durante 5 dias. O controlo reaccional foi realizado por

CCF (gel de sílica, fase móvel acetato de etilo/éter de petróleo (7:3)). Após a reação estar concluída, procedeu-se à evaporação do solvente com o auxílio de pressão reduzida. A solução foi neutralizada com uma solução de carbonato de sódio 1M (Na_2CO_3) e, em seguida, extraída com éter etílico (2 x 100 mL). As fases orgânicas reunidas foram desidratadas com sulfato de sódio anidro. Após a evaporação do solvente, com o auxílio de pressão reduzida, obteve-se um resíduo de cor amarela, o qual foi cristalizado com recurso ao sistema éter etílico/ n-hexano. Sempre que necessário efectuou-se a cromatografia em coluna (CC), de forma a purificar o composto, utilizando como fase móvel uma mistura de acetato de etilo/éter de petróleo 5:5.

2.3.4.1.1. Síntese do 3,4-Diidroxibenzoato de Metilo (PM)

Neste caso procedeu-se à evaporação do solvente e efectuou-se cromatografia em coluna. As fracções obtidas por CC, contendo predominantemente o composto pretendido, foram reunidas. O resíduo obtido foi cristalizado, à temperatura ambiente, obtendo-se cristais brancos.

PF: 133-135 °C (éter etílico/n-hexano).

Rendimento: 81%.

FTIR ν_{max} (cm^{-1}) (KBr): 3467, 3263, 1689, 1612, 1448, 1296, 1269, 1240, 1184, 1165, 1095, 764.

UV λ_{max} ,^{Etanol} (nm) (log ϵ): 297 (3,8), 262 (4,0), 221 (4,2), 208 (4,2),

RMN ^1H δ : 3,76 (3H, s, OCH_3), 6,80 (1H, d, $J=8,1$, H(5)), 7,30 (1H, dd, $J=8,2$, 2,1, H(6)), 7,34 (1H, d, $J=2,1$, H(2)), 9,64 (2H, brs, OH).

RMN ^{13}C δ : 51,6 OCH_3 , 115,3 C(5), 116,2 C(2), 120,5 C(6), 121,8 C(1), 145,1 C(3), 150,4 C(4), 166,2 (C=O).

EI-MS m/z (%): 168 ($\text{M}^{+\square}$, 59), 138 (15), 137 (100), 109 (27), 81 (17).

2.3.4.1.2. Síntese do 3,4-Diidroxibenzoato de Etilo (PE)

A cristalização do PE foi conseguida directamente com o sistema éter etílico/n-hexano. O resíduo obtido apresentava-se na forma de cristais finos brancos.

PF: 131-133 °C (éter etílico/ n-hexano).

Rendimento: 75 %.

FTIR ν_{\max} (cm⁻¹) (KBr): 3498, 3274, 1682, 1610, 1516, 1369, 1334, 1294, 1236, 1124.

UV $\lambda_{\max, \text{Etanol}}$ (nm) (log ϵ): 296 (3,8), 262 (4,0), 221 (4,2), 208 (4,2).

RMN ¹H δ : 1,27 (3H, *t*, *J*=7,1, CH₃), 4,22 (2H, *m*, OCH₂), 6,80 (1H, *d*, *J*=8,2, H(5)), 7,30 (1H, *dd*, *J*=8,2, 2,1, H(6)), 7,35 (1H, *d*, *J*=2,1, H(2)), 9,58 (2H, *brs*, OH).

RMN ¹³C δ : 14,3 CH₃, 60,0 OCH₂, 115,3 C(5), 116,2 C(2), 120,8 C(6), 121,7 C(1), 145,0 C(3), 150,3 C(4), 165,7 (C=O).

EI-MS *m/z* (%): 182 (M⁺, 50), 154 (25), 138 (17), 137 (100), 109 (22), 81 (14).

2.3.4.1.3. Síntese do 3,4-Diidroxibenzoato de Propilo (PP)

Neste caso procedeu-se também à evaporação do solvente e efectuou-se cromatografia em coluna. As fracções obtidas por CC, contendo predominantemente o composto pretendido, foram reunidas. O resíduo obtido foi cristalizado, à temperatura ambiente, obtendo-se cristais brancos.

PF: 113-115 °C (éter etílico/ n-hexano).

Rendimento: 71 %.

FTIR ν_{\max} (cm⁻¹) (KBr): 3492, 3328, 1684, 1608, 1442, 1292, 1230, 1161, 1099, 984, 771.

UV $\lambda_{\max, \text{Etanol}}$ (nm) (log ϵ): 296 (3,8), 262 (4,0), 221 (4,2), 208 (4,2).

RMN ^1H δ : 0,94 (3H, *t*, $J=7,4$, CH_3), 1,67 (2H, *m*, CH_2), 4,13 (2H, *t*, $J=6,6$, OCH_2), 6,80 (1H, *d*, $J=8,2$, H(5)), 7,31 (1H, *dd*, $J=8,3$, 2,1; H(6)), 7,36 (1H, *d*, $J=2,0$, H(2)), 9,57 (2H, brs, OH).

RMN ^{13}C δ : 10,4 CH_3 , 21,7 CH_2 , 65,5 OCH_2 , 115,3 C(5), 116,2 C(2), 120,8 C(6), 121,7 C(1), 145,1 C(3), 150,4 C(4), 165,7 (C=O).

EI-MS m/z (%): 196 ($\text{M}^{+\square}$, 33), 154 (72), 138 (17), 137 (100), 109 (24), 81 (16).

2.3.4.1.4. Síntese do 3,4-Diidroxifenilacetato de Metilo (PPM)

O composto apresenta-se na forma de um óleo em tons de amarelo.

Rendimento: 74 %.

FTIR ν_{max} (cm^{-1}) (KBr): 3535-3155, 1718, 1608, 1523, 1442, 1350, 1288, 1201, 1151,1115.

UV λ_{max} ,^{Etanol} (nm) (log ϵ): 283 (3,6), 206 (4,3).

RMN ^1H δ : 3,58 (3H, *s*, OCH_3), 6,49 (1H, *dd*, $J=8,1$, 2,1, H(6)), 6,65 (1H, *d*, $J=2,4$, H(2)), 6,66 (1H, *d*, $J=7,8$, H(5)), 8,84 (2H, brs, OH).

RMN ^{13}C δ : 39,7 CH_2 , 51,6 OCH_3 , 115,5 C(5), 116,7 C(2), 120,1 C(6), 125,0 C(1), 144,3 C(4), 145,2 C(3), 172,1 (C=O).

EI-MS m/z (%): 182 ($\text{M}^{+\square}$, 45), 124 (15), 123 (100), 77 (18), 51 (16).

2.3.4.1.5. Síntese do 3,4-Diidroxifenilacetato de Etilo (PPE)

O composto apresenta-se na forma de um óleo em tons de amarelo.

Rendimento: 79 %.

FTIR ν_{\max} (cm^{-1}) (KBr): 3589-3138, 1707, 1608, 1525, 1448, 1371, 1348, 1284, 1196, 1153, 1115, 1028.

UV $\lambda_{\max, \text{Etanol}}$ (nm) (log ϵ): 283 (3,4), 205 (4,2).

RMN ^1H δ : 1,16 (3H, *t*, $J=7,1$, CH_3), 4,04 (2H, *m*, OCH_2), 6,49 (1H, *dd*, $J=8,0$; 2,1, H(6)), 6,65 (1H, *d*, $J=2,1$, H(2)), 6,66 (1H, *d*, $J=8,0$, H(5)); 8,84 (2H, *brs*, OH).

RMN ^{13}C δ : 14,2 CH_3 , 40,0 CH_2 , 60,1 OCH_2 , 115,5 C(5), 116,6 C(2), 120,0 C(6), 125,1 C(1), 144,3 C(4), 145,1 C(3), 171,6 (C=O).

EI-MS m/z (%): 196 (M^+ , 38), 124 (15), 123 (100), 77 (16).

2.3.4.1.6. Síntese do 3,4-Diidroxifenilacetato de Propilo (PPP)

O composto apresenta-se na forma de um óleo em tons de amarelo.

Rendimento: 65 %.

FTIR ν_{\max} (cm^{-1}) (KBr): 3525-3192, 1710, 1608, 1522, 1446, 1348, 1284, 1194, 1146, 1113.

UV $\lambda_{\max, \text{Etanol}}$ (nm) (log ϵ): 283 (3,2), 204 (4,1).

RMN ^1H δ : 0,85 (3H, *t*, $J=7,4$, CH_3); 1,54 (2H, *m*, CH_2), 3,96 (2H, *t*, $J=6,6$, OCH_2), 6,48 (1H, *dd*, $J=8,0$, 2,0, H(6)), 6,65 (1H, *d*, $J=2,0$, H(2)), 6,65 (1H, *d*, $J=7,9$, H(5)), 8,83 (2H, *brs*, OH).

RMN ^{13}C δ : 10,3 CH_3 , 21,6 CH_2 , 40,0 CH_2 , 65,5 OCH_2 , 115,4 C(5), 116,6 C(2), 120,0 C(6), 125,1 C(1), 144,2 C(4), 145,1 C(3), 171,6 (C=O).

EI-MS m/z (%): 210 ($M^{+\square}$, 37), 124 (16), 123 (100), 77 (17).

2.4. Elucidação Estrutural dos Ésteres Alquílicos Sintetizados

A elucidação estrutural dos compostos sintetizados foi estabelecida através de dados de IV, RMN ^1H e ^{13}C bem como espectroscopia de massa por impacto electrónico (EM-IE).

2.4.1. Espectroscopia de IV

A espectroscopia de IV é um dos métodos mais utilizado na investigação da estrutura de compostos e na análise de grupos funcionais. A intensidade das bandas pode ser expressa em termos de transmitância (T) ou absorvância (A), onde $A = -\log T$. Os dados obtidos por espectrofotometria no IV para os ácidos benzóico e fenilacético, e derivados encontram-se descritos nas tabelas 2.1. e 2.2.

Tabela 2.1. Dados de IV para os compostos PCA, PM, PE e PP.

Grupos	PCA	PM	PE	PP
OH	3339	3467	3498	3492
	3187	3263	3275	3329
C=O	1594	1689	1682	1684
CH ₃ , CH ₂	-	1350-1500	1350-1500	1350-1500
C-O Ácido/ Éster	1269	1296	1294	1292
	1160	1095	1124	1099
C-O Fenol	1375	-	1369	-

Através das Tabelas 2.1 e 2.2, podemos observar que a frequência do grupo carbonilo dos ésteres é significativamente diferente quando comparado com o valor correspondente ao ácido de partida, PCA e DOPAC. Os valores da frequência de vibração do grupo C=O reflectem o efeito indutivo dos grupos alcoxilo, o que indica que a esterificação ocorreu. Por outro lado, os derivados de 3,4-diidroxifenilacético (Tabela 2.2.) apresentam uma frequência superior aos derivados de 3,4-diidroxibenzóico, o que pode ser uma consequência do grupo CH₂, que diminui a deslocalização de densidade electrónica do anel aromático em relação ao grupo carboxílico.

Tabela 2.2. Dados de IV para os compostos DOPAC, PPM, PPE e PPP.

Grupos	DOPAC	PPM	PPE	PPP
OH	3348	3155	3189	3192
	3457	3535	3589	3525
C=O	1685	1718	1707	1710
CH ₃ , CH ₂	1350-1500	1350-1500	1350-1500	1350-1500
C-O Ácido/ Éster	1280	1288	1284	1284
	1113	1115	1115	1113
C-O Fenol	1346	1350	1348	1348
	629	-	-	-

2.4.2. RMN ¹H

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica muito utilizada para identificar a presença de alguns grupos de átomos bem como a sua posição relativa na cadeia, conformação e isomerismo. Quando se coloca um composto contendo átomos de ¹H ou de ¹³C num campo magnético externo muito forte e simultaneamente se irradia com energia electromagnética, esses núcleos absorvem energia num processo denominado *ressonância magnética*, sendo essa energia medida pelos espectrofotômetros. Os dados obtidos por RMN ¹H para os ésteres sintetizados encontram-se descritos nas tabelas 2.3.

Tabela 2.3. Dados de RMN ¹H para os ésteres do PCA e DOPAC, respectivamente.

Composto	Grupo	δ (ppm)	Multiplicidade	Constante de Acoplamento (Hz)	Número de Vizinhos	Número de Protões
ÉSTERES DE PCA						
PM	-O-CH ₃	3,76	Singuleto	-	-	3
	H(5)	6,80	Dupleto	8,1	1	1
	H(6)	7,30	Dupleto	8,2	1	1
	H(2)	7,34	Dupleto	2,1	-	1
	-OH	9,64	-	-	-	2
PE	-CH ₂ -CH ₃	1,27	Tripleto	7,1	2	3
	-O-CH ₂ -CH ₃	4,22	Quadrupeto	-	3	2
	H(5)	6,80	Dupleto	8,2	1	1
	H(6)	7,30	Dupleto	8,2	1	1
	H(2)	7,35	Singuleto	2,1	-	-
	-OH	9,58	-	-	-	1

PP	-CH ₃	0,94	Tripleto	7,4	2	3
	-CH ₂ -CH ₃	1,67	Sextupletto	7,4	5	2
	-O-CH ₂ -CH ₂	4,13	Tripleto	6,6	2	2
	H(5)	6,80	Dupleto	8,2	1	1
	H(6)	7,31	Dupleto	8,3	1	1
	H(2)	7,36	Singuleto	2,0	-	1
	-OH	9,57	-	-	-	2
ÉSTERES DE DOPAC						
PPM	-O-CH ₃	3,58	Singuleto	-	-	3
	H(5)	6,66	Dupleto	7,8	1	1
	H(6)	6,49	Dupleto	8,1	1	1
	H(2)	6,65	Dupleto	2,4	1	1
	-OH	8,84	-	-	-	2
PPE	-CH ₂ -CH ₃	1,16	Tripleto	7,1	2	3
	-O-CH ₂ -CH ₃	4,04	Quadrupletto	-	3	2
	H(5)	6,60	Dupleto	8,0	1	1
	H(6)	6,49	Dupleto	8,0	1	1
	H(2)	6,65	Singuleto	2,1	-	1
	-OH	8,84	-	-	-	2
PPP	-CH ₃	0,85	Tripleto	7,4	2	3
	-CH ₂ -CH ₃	1,54	Sextupletto	-	5	2
	-O-CH ₂ -CH ₂	3,96	Tripleto	6,6	2	2
	H(5)	6,65	Dupleto	7,9	1	1
	H(6)	6,48	Dupleto	8,0	1	1
	H(2)	6,65	Singuleto	2,0	-	1
	-OH	8,83	-	-	-	2

No que diz respeito aos dados RMN ¹H dos ésteres dos ácidos PCA e DOPAC, podemos constatar que a ausência do sinal do protão do grupo COOH no espectro, $\delta \approx 12$ ppm (Silva, 1998), confirma a reacção de esterificação. Os ésteres metílicos, por exemplo, apresentam um singuleto a $\delta = 3.76$, para o PM, e 3.58 para o PPM. O deslocamento para menor campo do desvio químico dos protões do CH₃, poderá ficar a dever-se à protecção causada pelo grupo CH₂. A mesma conclusão pode ser efectuada para os restantes ésteres.

2.4.3. Espectro de Massa por Impacto Electrónico (EM-IE)

A análise por espectroscopia de massa fornece o peso molecular dos compostos. Através dos valores obtidos pelo EM-IE, podemos observar que se obteve os valores dos pesos moleculares referentes aos ésteres sintetizados.

2.5. Bibliografia

Fiuza, S. M., Gomes, C., Teixeira, L.J., Girão da Cruz, M.T., Cordeiro, M.N.D.S, Milhazes, N., Borges, F., Marques, M.P.M. (2004). *Phenolic Acid Derivatives with Potencial Anticancer Properties – A Structure-Activity Relationship Study. Part 1: Methyl, Propyl and Octyl Esters of Caffeic and Gallic Acids*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12, 3581-3589;

IUPAC (“International Union of Puré and Applied Chemistry”) (2008). *Nomenclature of Organic Chemistry-IUPAC*. Internet, site visitado em 28 de Fevereiro de 2008, www.chem.qmul.ac.uk/iupac/;

Mcmurry, J. (2004). *Organic Chemistry*. 6, Brooks-cole;

Otera, J. (2003). *Esterification: Methods, Reactions and Applications*. Willey-VCH;

Rigaudy, J., Klesney, S. P. (1979). *Nomenclature of Organic Chemistry-IUPAC*. Pergamon Press, Oxford.

Silva, F. A. (1998). *Síntese de Derivados de Ácidos Cinâmicos: Determinação da Actividade Anti-Radicalar e Antioxidante*. Tese de Mestrado em Controlo de Qualidade, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto;

Solomons, T. W. G., Fryhle, C. B. (2001). *Química Orgânica 2*. LTC Editora, 84-133;

Trost, B. M., Fleming, I. (1991). *Comprehensive Organic Synthesis: Selectivity, Strategy & Efficiency in Modern Organic Chemistry*. Pergamon Press, 6 (1);

Volhardt, K. P. C., Schore, N. E. (1999). *Organic Chemistry: Structure and Function*. W. H. Freeman and Company New York, 3.

Avaliação da Actividade Antioxidante

Sumário

Na literatura encontram-se descritas várias metodologias para determinar a actividade antioxidante de compostos orgânicos. A escolha do método deve ter em conta a lipofilicidade ou a hidrofiliicidade dos antioxidantes. A maioria dos métodos avalia a capacidade de bloqueio de radicais livres, alguns com cor como o DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) e o ABTS^{•+} (ácido 2'-azino-bis(3-etilbenzotiazoline-6 sulfónico). Nestes casos é possível a sua detecção e quantificação por UV-Vis. Outros avaliam a capacidade de absorção do oxigénio radicalar (ORAC, *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) com diferentes espécies reactivas (radicais peróxido, hidróxido, superóxido ou um metal de transição), usando trolox como padrão. Actualmente, utilizam-se também as técnicas electroquímicas como metodologia alternativa para caracterizar e avaliar o perfil antioxidante de substâncias orgânicas.

A actividade antioxidante dos compostos PCA, DOPAC e respectivos ésteres, sintetizados no Capítulo 2., bem como os de referência, trolox e ácido gálico, foi determinada através de dois métodos não enzimático, o método DPPH e as técnicas voltamétricas (voltametria cíclica e voltametria de impulso diferencial).

Palavras-Chave: Capacidade antioxidante; Métodos por transferência de hidrogénio (ATH); Métodos por transferência de electrões (ET); Radical DPPH[•]; Electroquímica; Voltametria cíclica; Voltametria de impulso diferencial.

3.1. Métodos de Avaliação da Actividade Antioxidante

A determinação da capacidade antioxidante de compostos de origem sintética ou natural constitui uma área de inegável interesse no campo da química dos alimentos, dos medicamentos e dos produtos cosméticos (Chimi e colaboradores, 1991). Nos últimos anos tem-se assistido a uma intensa investigação conducente à descoberta de novos compostos com capacidade antioxidante, tendo ocorrido paralelamente um incremento do desenvolvimento das metodologias associadas à avaliação desta actividade (Prior e colaboradores, 2005; Vitaly e colaboradores, 2005; Okuda e colaboradores, 1992).

De uma forma geral, os antioxidantes podem actuar por dois mecanismos distintos: por transferência de um átomo de hidrogénio (ATH) (equação 3.1.) ou por transferência de um electrão (ET) (equação 3.2.). No entanto, poderá haver situações em que estes dois mecanismos ocorram ao mesmo tempo.



A ocorrência preferencial de um ou de outro mecanismo depende da natureza do solvente e/ou da natureza físico-química dos compostos, nomeadamente do potencial de oxidação-redução das espécies envolvidas (Foti e colaboradores, 2004; Giacomelli e colaboradores, 2004; Wright e colaboradores, 2001). A transferência de um átomo de hidrogénio do antioxidante para o radical é, geralmente, o processo predominante em solventes apolares e depende essencialmente da entalpia de dissociação da ligação do hidrogénio à molécula do antioxidante (AH). O mecanismo que envolve a transferência de electrões ocorre predominantemente em solventes polares (como o etanol ou água) e depende do potencial de ionização da molécula do antioxidante (Foti e colaboradores, 2004; Giacomelli e colaboradores, 2004; Wright e colaboradores, 2001).

Num composto fenólico, a baixa entalpia de dissociação, normalmente associada à ligação OH, é considerada um parâmetro que indicia uma potencial capacidade antioxidante, uma vez que existe maior facilidade em doar átomos de hidrogénio ao radical (Siquet e colaboradores, 2006; Hatzipanayioti e colaboradores, 2006).

A actividade antioxidante também é exibida por outros grupos doadores de hidrogénio, como o NH ou SH, e aumenta com o número de grupos hidroxilos na estrutura (Brand-Williams e colaboradores, 1995; Miller e colaboradores, 1997 Foti e colaboradores, 2004; Giacomelli e colaboradores, 2004; Wright e colaboradores, 2001).

De acordo com o mecanismo reaccional (Halliwell e colaboradores, 1999; Prior e colaboradores, 2005), a actividade antioxidante pode ser classificada em:

- Transferência de um átomo de hidrogénio: inclui ensaios genericamente conhecidos por ORAC (*Oxygen Radical Absorvance Capacity*) e TRAP (*Total Radical-trapping Antioxidant Parameter*). Os ensaios ORAC medem a inibição de espécies reactivas, como o radical peroxilo (ROO^*) (Prior e colaboradores, 2005; Becker e colaboradores, 2004) e os ensaios TRAP monitorizam a capacidade do antioxidante interferir com a reacção de radicais peroxilo, gerados por compostos azo (ex. o dicloridrato de 2,2'-azobis-2-amidinopropano - AAPH) (Aguilar-Garcia e colaboradores, 2007; Wood e colaboradores, 2006; Schaich, 2006; Prior e colaboradores, 2005; Becker e colaboradores, 2004 Yagi e colaboradores, 2002);
- Transferência de um electrão: inclui ensaios do tipo FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), que se encontram intimamente relacionados com o potencial redox dos compostos (Prior e colaboradores, 2005);
- Conjugação dos dois mecanismos reaccionais atrás mencionados: inclui ensaios com radicais pré-formados, como por exemplo o radical catiónico do ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS^{*+}) e o radical do 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH^*). Os ensaios com o radical ABTS^{*+} e DPPH^* são muitas vezes referidos na literatura como ensaios TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) (Prior e colaboradores, 2005; Becker e colaboradores, 2004; Arts e colaboradores, 2004).

Neste trabalho, a avaliação da actividade antioxidante bem como das propriedades redutoras dos ácidos PCA e DOPAC, e ésteres sintetizados, foi realizado com recurso, respectivamente:

- Ensaio com o radical pré-formado DPPH*, o qual permite, de um modo rápido e fácil, avaliar a actividade antioxidante de compostos lipofílicos e hidrofílicos (Magalhães e colaboradores, 2008; Vitaly e colaboradores, 2005; Re e colaboradores, 1999);
- Ensaio electroquímicos, nomeadamente a voltametria cíclica para caracterizar a reacção quanto à sua reversibilidade, e a voltametria de impulso diferencial para quantificar a capacidade antioxidante (Magalhães, 2008; Falcão, 2008).

Os antioxidantes de referência utilizados foram o 2-carboxi-2,5,7,8-tetrametil-6-cromanol (trolox) (Figura 3.1. a)), um composto hidrossolúvel derivado da vitamina E (Siquet e colaboradores, 2006; Naguib 2000; Miller e colaboradores, 1997), e o ácido 3,4,5-diidroxibenzóico (ácido gálgico) (Figura 3.1. b)), um composto hidrofílico, líder de alguns antioxidantes que já se encontram aprovados e usados na indústria, como o galhato de propilo (Blasco e colaboradores, 2004; López e colaboradores, 2003).

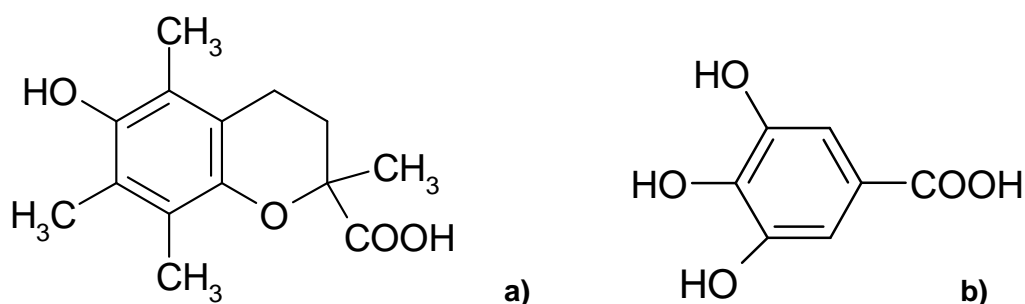


Figura 3.1. Representação da estrutura química do trolox (a) e do ácido gálgico (b).

3.2. Avaliação da Actividade Antioxidante: Método do DPPH

O 2,2-difenil-1-picrildrazilo (DPPH*) é considerado um composto estável sendo que a sua reacção redutora se deve à captação de um átomo de hidrogénio proveniente do antioxidante, formando assim, o composto reduzido DPPH-H, do tipo da hidrazina (Figura 3.2.). A captação de hidrogénio constitui o passo determinante da velocidade de reacção (Eklund e colaboradores, 2005).

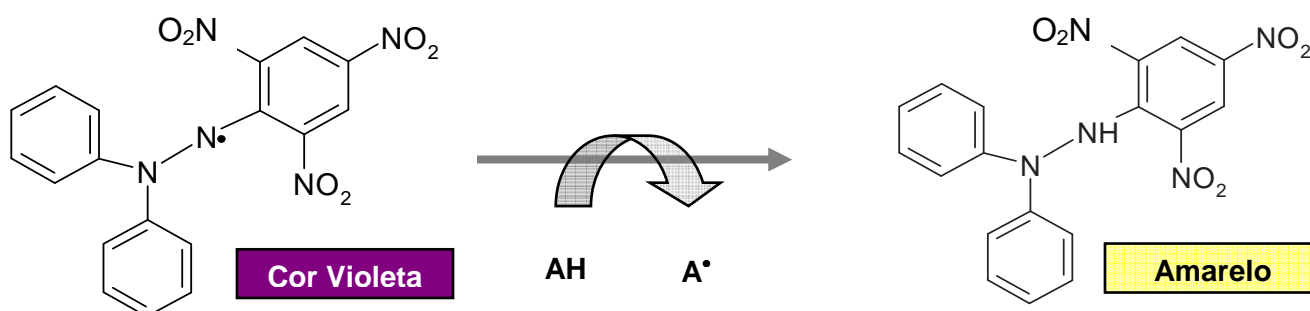


Figura 3.2. Representação da estrutura química do radical DPPH• aquando da sua redução a hidrazina por um antioxidante (AH).

O radical DPPH é solúvel em metanol, etanol e dimetil sulfóxido. As soluções etanólicas apresentam uma coloração violeta escuro e um máximo de absorvância a $\lambda = 517$ nm (Sharma e Baht, 2008). O método permite determinar o decréscimo da absorvância ao longo do tempo, por espectrofotometria de UV. Dependendo da concentração do composto em estudo, a diminuição da absorvância traduz a maior ou a menor capacidade antioxidante das substâncias.

Os resultados obtidos pelo método do DPPH são normalmente apresentados em termos de concentração eficiente (EC_{50}). Este parâmetro define a concentração de antioxidante necessária para inibir em 50% a concentração inicial do radical DPPH• (Sharma e Baht, 2008; Brand-Williams e colaboradores, 1995). A percentagem de DPPH• remanescente (% inibição) é calculada segundo a equação 3.3.

$$\% DPPH_{\text{Remanescente}} = (A_t / A_{t=0}) \times 100 \quad (3.3.)$$

em que $A_{t=0}$ corresponde à absorvância da solução inicial de DPPH• ($t=0$) e A_t à absorvância da solução DPPH• ao longo do tempo de ensaio. O tempo necessário para alcançar a estabilidade da absorção (patamar de equilíbrio) é calculado a partir da curva cinética e definido habitualmente para a EC_{50} (T_{EC50}). Sánchez-Moreno e colaboradores (1998) propuseram uma escala para classificar a cinética de reacção; consideram que para um T_{EC50} inferior a 5 minutos, a reacção apresenta uma cinética rápida; para um tempo entre os 5 e os 30 minutos, a reacção é considerada intermédia e para um tempo superior a 30 minutos, é designada como lenta. Um composto que apresenta uma actividade anti-radicalar excelente, mas possui uma cinética lenta, geralmente não apresenta interesse a nível industrial.

Um outro parâmetro proposto para quantificar a capacidade antioxidante de um composto é a eficiência anti-radicalar (AE) (equação 3.4.). Sánchez-Moreno e colaboradores (1998) também propuseram uma escala para classificar a eficiência anti-radicalar (AE) de um composto; consideram que para um $AE \leq 1 \times 10^{-3}$, a eficácia do composto é baixa; para $1 \times 10^{-3} < AE \leq 5 \times 10^{-3}$ a eficácia é considerada média; para $5 \times 10^{-3} < AE \leq 1 \times 10^{-2}$ a eficácia é elevada e muito elevada para valores superiores a 1×10^{-2} . Quanto menor for o valor EC_{50} e T_{EC50} , maior é a eficiência anti-radicalar.

$$AE = 1/(EC_{50} \times T_{EC50}) \quad (3.4.)$$

Embora com limitações, nomeadamente na morosidade de análise, que muitas vezes excede as 4h, o radical DPPH* não precisa de ser gerado antes da análise e não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação.

3.3. Avaliação da Actividade Antioxidantes: Métodos Electroquímicos

As técnicas electroquímicas têm sido ultimamente aplicadas na caracterização de antioxidantes (ex. ácidos fenólicos, flavonóides, ácido ascórbico, tocoferóis, carotenóides, BHT) (Shohami e colaboradores, 1999; Kohen e colaboradores, 1999; Chevion e colaboradores, 1997). De entre as técnicas voltamétricas mais usadas destacam-se a voltametria cíclica, a voltametria de impulso diferencial e a voltametria de onda quadrada.

A maioria dos compostos fenólicos é electroactiva, pelo que actuam como agentes redutores e, em solução, tendem a ser facilmente oxidados por eléctrodos inertes. A capacidade de redução de um composto por técnicas electroquímicas é normalmente analisada com base em 3 parâmetros, nomeadamente (i) o potencial de oxidação ou de meia onda, $E_{1/2}$, (ii) a intensidade do pico anódico ou catódico, I_a , e (iii) a área da curva anódica, S . S e I_p encontram-se intrinsecamente relacionados com a concentração de antioxidante presente na amostra (Kilmartin e colaboradores, 2002).

As técnicas voltamétricas apresentam vantagens em relação a outros métodos, nomeadamente na rapidez e simplicidade da análise, redução na utilização de reagentes bem como maior selectividade quando comparada com os métodos espectrofotométricos (Chevion e colaboradores, 2000). Estas técnicas podem ser executadas em soluções aquosas e em solventes orgânicos. Por outro lado, é importante salientar que a possível desactivação da superfície do eléctrodo, associada a adsorção da substância em análise,

limita a reprodutibilidade dos métodos electroquímicos (Romani e colaboradores, 2000). Apesar deste aspecto negativo, o método apresenta-se como uma boa ferramenta tanto na avaliação da capacidade antioxidante como na quantificação da composição electroactiva de antioxidantes.

3.3.1. Voltametria de Impulso Diferencial (DPV)

A voltametria de impulso diferencial mede a corrente ao longo do tempo após a aplicação de um degrau de potencial. A DPV é considerada uma técnica muito útil na medição de concentrações vestigiais de espécies orgânicas e inorgânicas electroactivas. Os impulsos de potencial de amplitude fixa (10-100 mV), ΔE , são sobrepostos a uma rampa de potencial que aumenta de forma linear com o tempo. A corrente é medida imediatamente antes da aplicação (1) e no final do impulso (2) (Figura 3.3. a)). O instrumento regista a diferença de intensidade de corrente, Δi , em cada impulso, como função do potencial aplicado sendo a resposta semelhante à primeira derivada de um voltamograma diferencial, isto é, um pico (Figura 3.3. b)) (Garrido, 2003; Wang, 2002; Brett e Brett, 1996).

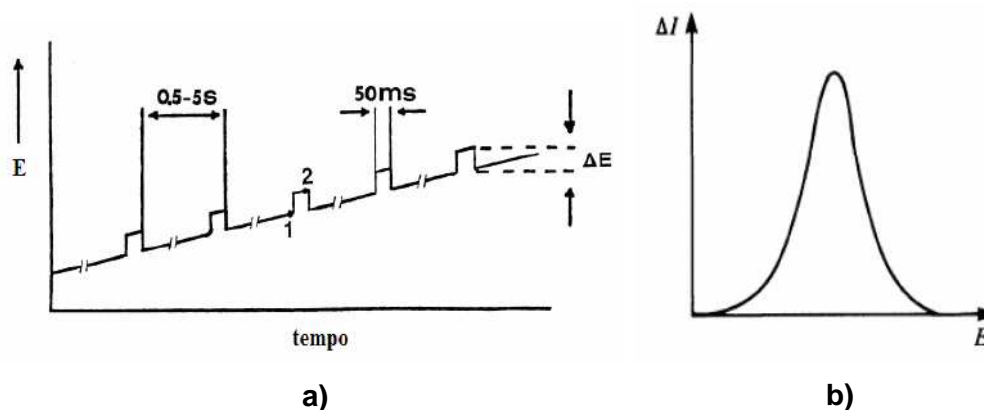


Figura 3.3. Representação da técnica voltametria de impulso diferencial (DPV): (a) – perfil de aplicação de potenciais; (b) – voltamograma de impulso diferencial.

3.3.2. Voltametria Cíclica (CV)

A voltametria cíclica é utilizada para obter informação qualitativa da reacção electroquímica bem como identificar espécies electroactivas presentes na solução. Na voltametria cíclica a corrente anódica começa por aumentar até atingir o potencial limite, E_{Final} . Depois de ultrapassar esta região de potencial, a direcção do varrimento é invertida até ao potencial inicial, $E_{inicial}$, e as moléculas inicialmente oxidadas poderão ser

reduzidas (reações faradaicas), de que resulta a onda catódica (Figura 3.4.) (Falcão, 2008; Wang, 2002; Brett e Brett, 1996). Em algumas situações, o pico catódico poderá não corresponder ao produto da reação principal, mas sim o de reações secundárias, pelo que, neste caso, se deverá proceder a sucessivos varrimentos e respectiva caracterização do(s) produto(s) por electrólise.

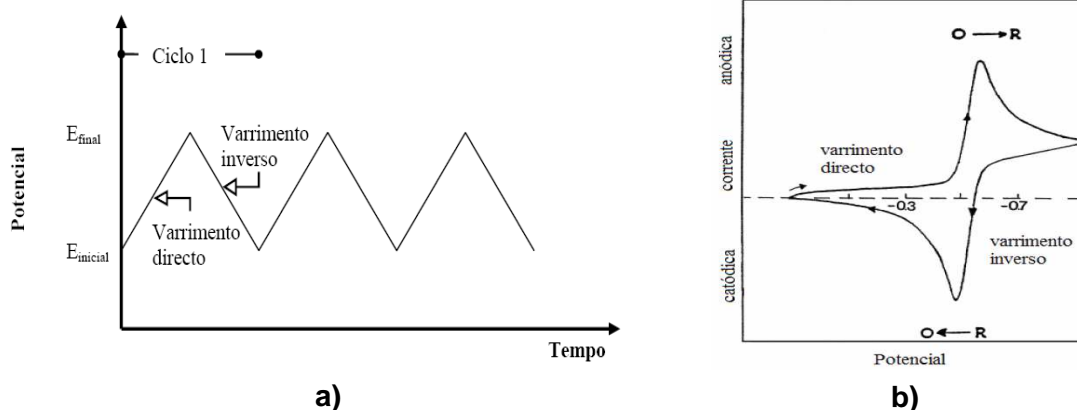


Figura 3.4. Representação da técnica de voltametria cíclica (CV): (a) perfil de aplicação de potenciais; (b) voltamograma cíclico.

3.4. Condições Experimentais

Com o presente trabalho procurou-se avaliar a actividade antioxidante do PCA e DOPAC, e respectivos ésteres (Capítulo 2.), a qual foi comparada com os compostos de referência, nomeadamente o ácido gálico e o trolox.

3.4.1. Instrumentação Geral

- As pesagens foram realizadas numa balança Precisa 205 A, Superbal Series;
- Pipetas da VWR;
- Banho de ultra-sons da VWR USC100TH;
- As determinações espectrofotométricas foram efectuadas num espectrofotómetro Helios UV/Visible de feixe duplo, usando células de quartzo, e controlado por um computador com o software *Thermo Electron UV-Visible Spectroscopy* (Figura 3.5.);



Figura 3.5. Helios Gamma & Delta da ThermoSpectronic.

- As medições voltamétricas foram efectuadas num potenciostato/galvanostato Autolab® PGSTAT 12 (Eco-Chemie, Netherlands) controlado por um computador com software *General Purpose for Electrochemical Systems* (GPES) da Autolab® (Figura 3.6.).

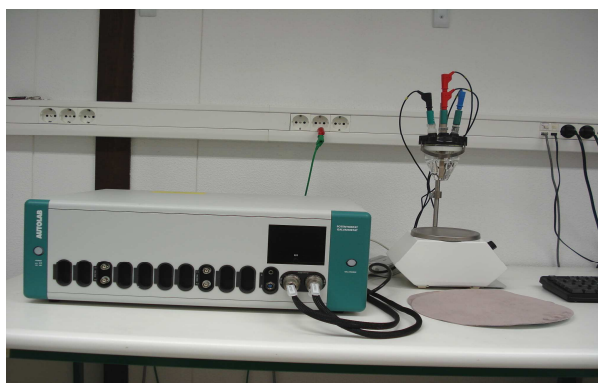


Figura 3.6. Potenciostato/galvanostato Autolab® PGSTAT 12.

3.4.2. Reagentes e Solventes

- Os solventes e reagentes utilizados foram todos de qualidade *pro analysis* ou equivalente, das firmas Merck, Sigma-Aldrich, Panreac, BDH, Riedel-Haen, Carlo Erba e Macharey-Nagel;

Reagentes: Alumina (BDH); Fosfato de potássio monobásico e fosfato de potássio dibásico (Sigma); Ácido gálico (Sigma); Ácidos 3,4-diidroxibenzóico e 3,4-diidroxifenilacético (Aldrich); 2,2-difenil-1-picril-Hidrazilo (DPPH*) e o trolox (Sigma).

Solventes: Etanol absoluto (Panreac); Água destilada.

3.4.3. Determinação da Actividade Antioxidante pelo Método do DPPH

3.4.3.1. Curva de Calibração

Antes de se proceder à quantificação da capacidade anti-radicalar dos compostos em estudo, relacionou-se a concentração do DPPH* com a absorvância, tendo-se elaborado para o efeito uma curva de calibração.

Num balão de 5 mL preparou-se uma solução etanólica de DPPH* de concentração $6,6 \times 10^{-3} \text{M}$ (0,03 mmol, 13,4mg) (**solução A**). A dissolução foi auxiliada por ultra-sons durante 2 minutos. De seguida, retirou-se 2 mL desta solução e diluiu-se em 25 mL de etanol (**solução B**). A partir da solução B efectuaram-se diluições em balões de 5mL e procedeu-se à medição da absorvância a 517 nm (Tabela 3.1.). Todas as soluções foram acondicionadas no escuro até à sua utilização.

Tabela 3.1. Construção da curva de calibração da solução DPPH*.

Soluções	Volume (μL)/ 5 mL	Absorvância	Concentração (μM)
1	150	0,118	15,9
2	250	0,212	26,6
3	370	0,318	39,3
4	500	0,426	53,1
5	600	0,513	63,7
6	800	0,686	85,0
7	1000	0,903	106,2
8	1300	1,135	138,1
9	1500	1,267	159,3
10	2000	1,680	212,4

3.4.3.2. Método Geral de Preparação das Soluções dos Compostos em Estudo

O procedimento experimental foi baseado no método descrito por Ohnishi e colaboradores (1994) e para cada antioxidante em estudo, bem como os de referência, trolox e ácido gálico, foram ensaiadas diferentes concentrações até se observar uma inibição de 50% de radical DPPH*.

Preparação da solução de DPPH* (Solução C): num balão de 25 mL adicionou-se 1 mL de solução A, de forma a obter uma solução etanólica de DPPH* de $2,6 \times 10^{-4} \text{M}$.

Preparação da solução-mãe do antioxidante: num balão de 5 mL pesou-se rigorosamente a quantidade apropriada de antioxidante em estudo e dissolveu-se em etanol de modo a obter uma concentração de $2 \times 10^{-2} \text{M}$ (Tabela 3.2.). Após a agitação em vórtex (30 segundos), a solução foi colocada num banho de ultra-sons durante 2 minutos. A solução foi preparada diariamente e mantida ao abrigo da luz até à sua utilização.

Tabela 3.2. Massa de antioxidante pesado para obter a concentração de $2 \times 10^{-2} \text{M}$.

Compostos	PCA	PM	PE	PP	DOPAC	PPM	PPE	PPP	Trolox	Ácido Gálico
Peso Molecular	154,1	168,2	182,2	196,2	168,2	182,2	196,2	210,2	250,1	170,1
Massa (mg)	15,4	16,8	18,2	19,6	16,8	18,2	19,6	21,0	25,0	17,0

Determinações das EC_{50} : diluiu-se 1 mL de solução-mãe do antioxidante em estudo, em 10 mL de etanol, de forma a obter uma concentração de $2 \times 10^{-3} \text{M}$. Posteriormente, para cada composto foram ensaiadas diferentes concentrações, em balões de 5 mL, até se alcançar uma inibição do radical DPPH* o mais próxima de 50%. A 2 mL de **solução C** adicionou-se 2 mL da concentração a testar do composto em estudo. Após rápida agitação em vórtex (aproximadamente 2 segundos), o decréscimo do valor da absorvância foi seguido por espectrofotometria no visível, $\lambda = 517 \text{ nm}$, à temperatura ambiente e usando etanol como branco. Os valores de absorvância foram registados para t_0 e em intervalos de 1 minuto até que a reacção atingisse o estado de equilíbrio. Para os casos em que o equilíbrio não foi alcançado, as leituras prosseguiram até ao tempo máximo de reacção de 300 minutos.

3.4.4. Determinação da Actividade Antioxidante por Técnicas Electroquímicas

Os estudos voltamétricos foram efectuados numa célula de vidro, de um compartimento, equipada com um eléctrodo de referência de Ag/AgCl saturado com KCl, um eléctrodo auxiliar de platina e um eléctrodo de trabalho de carbono vítreo, com um diâmetro de 2 mm (Figura 3.7.).

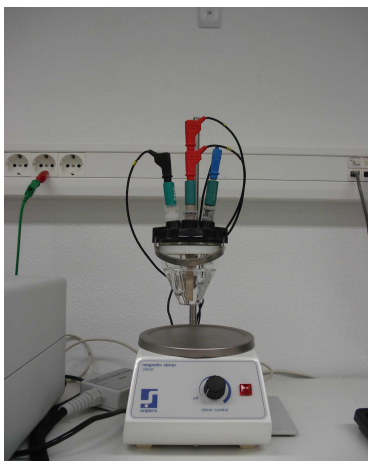


Figura 3.7. Célula electroquímica.

Antes de cada utilização, o eléctrodo de trabalho foi polido usando uma suspensão aquosa de alumina ($0,3 \mu\text{m}$), sob um disco de lixa fina Master-Tex (Buehler) e lavado com água destilada.

3.4.4.1. Método Geral de Preparação das Soluções dos Compostos em Estudo

O protocolo descrito de seguida foi o adoptado para as determinações efectuadas com os ésteres sintetizados, respectivos ácidos de partida bem como compostos de referência, trolox e ácido gálgico.

Preparação da solução-mãe do antioxidante: num balão de 5 mL pesou-se rigorosamente a quantidade apropriada de antioxidante em estudo e dissolveu-se em etanol de modo a obter uma concentração de $1 \times 10^{-2} \text{M}$ (Tabela 3.3.). O estudo voltamétrico foi efectuado usando uma solução tampão fosfato correspondente ao pH fisiológico, $\text{pH} = 7,38$.

Tabela 3.3. Massa de antioxidante pesado para obter a concentração de $1 \times 10^{-2} \text{M}$.

Compostos	PCA	PM	PE	PP	DOPAC	PPM	PPE	PPP	Trolox	Ácido Gálgico
Peso Molecular	154,1	168,2	182,2	196,2	168,2	182,2	196,2	210,2	250,1	170,1
Massa (mg)	7,7	8,4	9,1	9,8	8,4	9,1	9,8	10,5	12,5	8,5

Na célula electroquímica colocou-se 10 mL de solução tampão e 100 μL da solução mãe do antioxidante em estudo, de modo a que a concentração final fosse aproximadamente de $1 \times 10^{-4} \text{M}$. A análise foi efectuada imediatamente pós o contacto entre a solução e o eléctrodo de trabalho, com o objectivo de minimizar efeitos de adsorção.

Os estudos por voltametria cíclica, CV, foram efectuados entre os -0,2 V e um máximo de 1,25 V, e com uma velocidade de varrimento de 20 mV s⁻¹. Os estudos por voltametria de impulso diferencial, DPV, foram efectuados entre -0,2 V e um máximo de 1,5 V, com uma velocidade de varrimento de 5 mV s⁻¹ e amplitude de modulação de 50 mV.

3.5. Resultados e Discussão

A avaliação da capacidade antioxidante dos compostos sintetizados e ácidos de partida, foi efectuada através do método DPPH e por técnicas electroquímicas (voltametria cíclica e voltametria de impulso diferencial), respectivamente.

3.5.1. Método do DPPH

A selecção do comprimento de onda, para efectuar a medição da absorvância de cada composto ao longo do tempo, foi realizada com base nos dados de UV-Vis do radical DPPH* (UV/Vis $\lambda_{\text{máximo}}^{\text{Etanol}}$ (nm): 245, 325, 517) e dos compostos em estudo (Capítulo 2, secção 2.3.). Pelos dados obtidos por UV-Vis, observou-se que os compostos a analisar não absorvem a 517 nm, pelo que se assegura a não interferência por sobreposição de bandas com o radical DPPH*.

A calibração do método analítico foi efectuada com a construção de uma curva, em que se mediu a absorvância para concentrações de radical DPPH* compreendidas entre 0 e 212,4 μM (Tabela 3.1.). A equação de regressão obtida bem como o coeficiente de correlação dos dados encontram-se descritas na Figura 3.8.

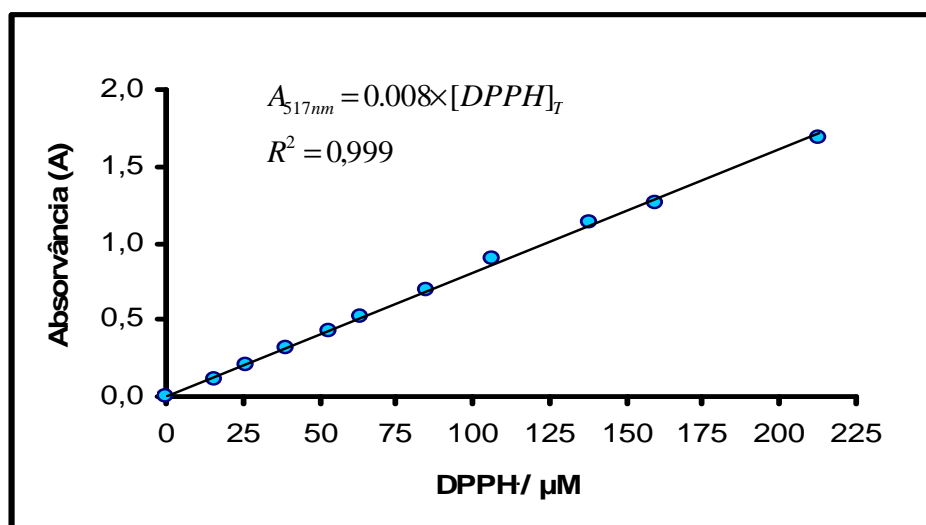


Figura 3.8. Representação gráfica da curva de calibração, $A = f([DPPH^*])$.

Posteriormente, e através da equação, foi possível calcular a variação percentual do DPPH[•] para cada concentração de composto em estudo. A captação do próton/electrão pelo radical e a formação da respectiva hidrazina, DPPH-H, foi acompanhada por uma pequena ou imperceptível mudança de cor da solução. A actividade antioxidante dos compostos em análise, expressa em diminuição da percentagem DPPH[•] em função do tempo e diferentes concentrações testadas, encontra-se representada nas Figuras 3.9 a 3.15. A representação gráfica, nas mesmas condições experimentais, relativamente aos antioxidantes de referência, trolox e ácido gálgico, podem ser observadas nas Figuras 3.16 e 3.17.

3.5.1.1. Ácido Protocatecuico (PCA) e seus Ésteres (PM, PE e PP)

As Figuras 3.9-3.12. apresentam o decréscimo de absorvância da solução do radical DPPH[•] ao longo do tempo, nomeadamente na presença do ácido protocatecuico e seus ésteres.

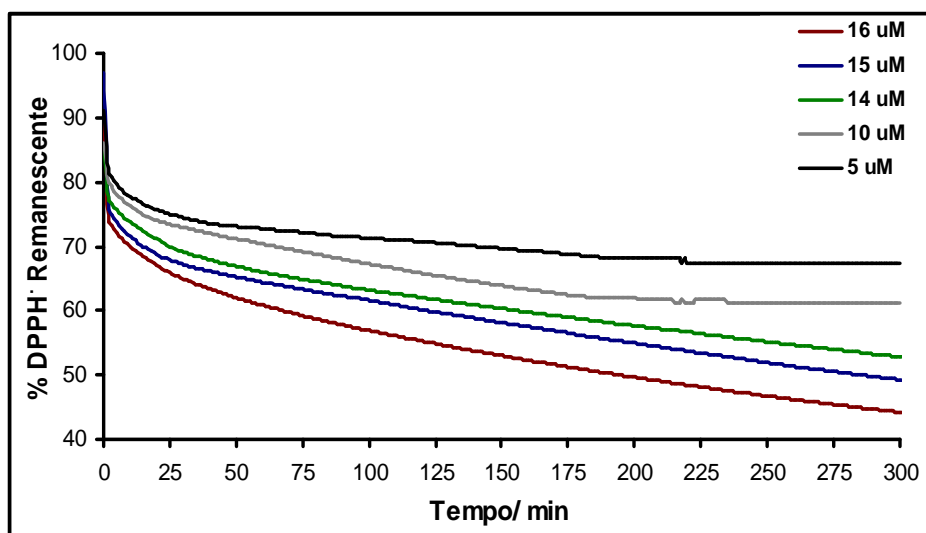


Figura 3.9. Representação gráfica do efeito da concentração do PCA na percentagem de inibição do radical DPPH[•] ao longo do tempo.

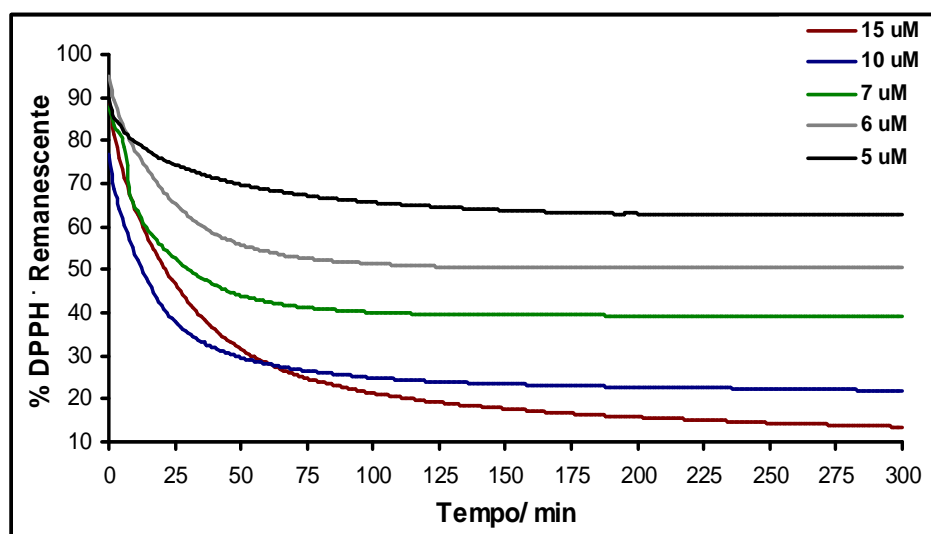


Figura 3.10. Representação gráfica do efeito da concentração do PM na porcentagem de inibição do radical DPPH* ao longo do tempo.

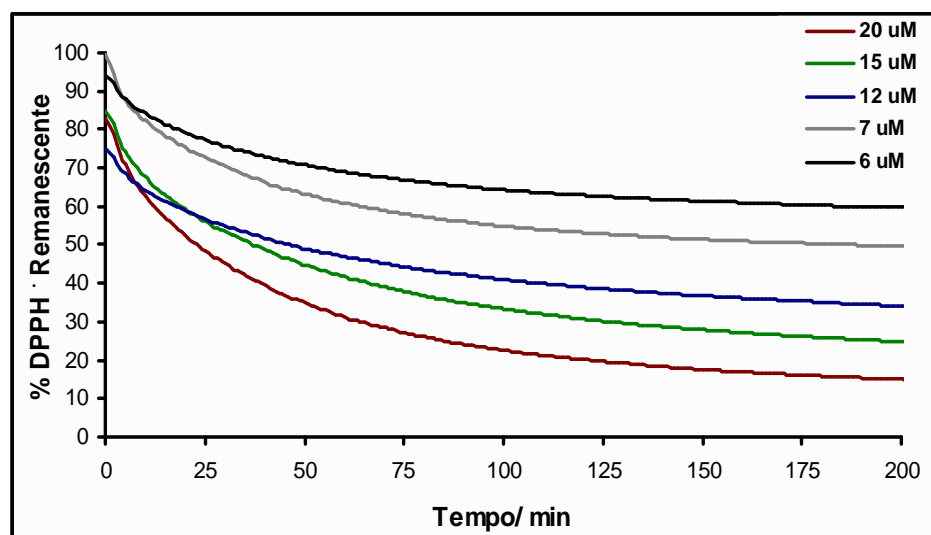


Figura 3.11. Representação gráfica do efeito da concentração do PE na porcentagem de inibição do radical DPPH* ao longo do tempo.

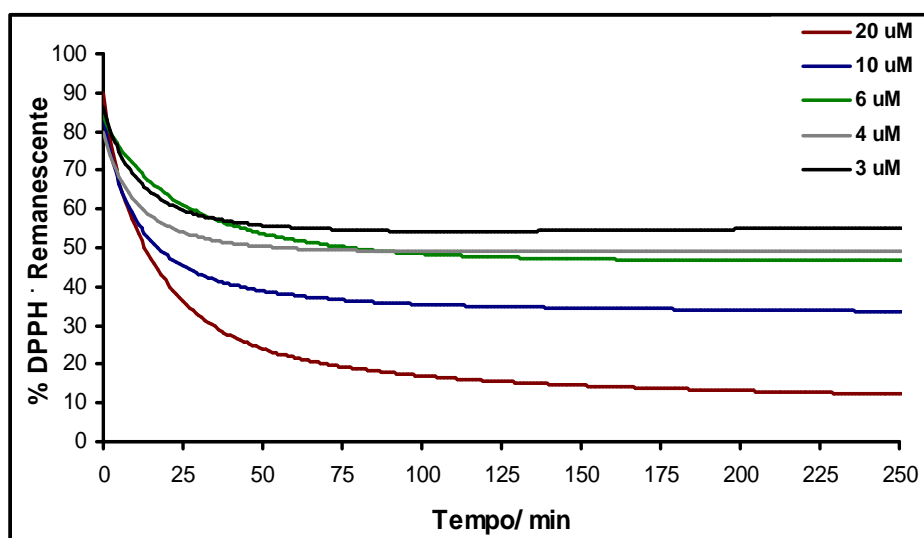


Figura 3.12. Representação gráfica do efeito da concentração do PP na percentagem de inibição do radical DPPH[•] ao longo do tempo.

Para concentrações em que a descoloração da solução do radical ocorreu com maior extensão, concentrações superiores a 5 µM, verificou-se que o maior decréscimo de absorvância, registado ao longo do ensaio, ocorreu nos primeiros 50 minutos, excepto para o ácido protocatecuico, cuja reacção não estabilizou ao fim de 300 minutos (Figuras 3.9. a 3.12.). Os dados sugerem que quanto mais rápido é o decréscimo de absorvância, maior a capacidade dos compostos em interagir com as espécies radicalares e portanto, reduzi-las.

Da análise das Figuras 3.9. a 3.12. podemos observar que, a evolução da cinética de redução do radical depende da concentração do composto ensaiado. Os dados obtidos indicam que o comportamento cinético do ácido PCA e dos respectivos ésteres é lenta, ou seja, o patamar correspondente ao equilíbrio observa-se para além dos 30 minutos ou, no caso do ácido de partida, não se atinge ao fim do tempo limite estabelecido para a reacção (300 minutos).

Na Tabela 3.4. encontram-se as concentrações de EC₅₀ para cada composto, a eficiência anti-radicalar (AE) e o respectivo tempo para que a estabilização da reacção ocorra, bem como a classificação quanto ao comportamento cinético e eficiência anti-radicalar, de acordo com Sánchez-Moreno e colaboradores (1998).

Tabela 3.4. EC₅₀, T_{EC50}, AE e classificação do comportamento cinético e eficiência anti-radicalar, do PCA e respectivos ésteres.

Compostos	EC ₅₀ (μM)	T _{EC50} (min)	AE x10 ⁻³	Classificação AE	Classificação Cinética
PCA	≈15	> 300	-	-	Lenta
PM	6	175	0,952	Baixo	
PE	7	175	0,816	Baixo	
PP	4	175	1,429	Médio	

De realçar que se verifica que, os ésteres evidenciam um aumento de reactividade com DPPH^{*} face ao PCA (Tabela 3.4.). Esta situação pode ficar a dever-se à diminuição do efeito indutivo por parte dos grupos substituintes na cadeia lateral do anel aromático.

Os resultados estão de acordo como os obtidos por Saito e colaboradores (2004), em que constataram que os benzoatos de metilo, etilo, butilo, isopropilo e tert-butilo, apresentam maior actividade antioxidante que o ácido de partida (PCA) em solventes próticos, nomeadamente metanol, etanol e propanol. No entanto, estes autores concluíram que a actividade anti-radicalar diminui, com o aumento da cadeia do éster. Esta conclusão teve por base as pequenas diferenças observadas (na ordem dos 0,5) nas capacidades de redução do radical DPPH^{*} pelos benzoatos em estudo.

De acordo com os dados obtidos neste estudo para o PM, PE e PP (Tabela 3.4.), podemos concluir que o aumento da cadeia alifática origina um aumento, ainda que ligeiro, da actividade anti-radicalar. A aparente discrepância entre os resultados obtidos e os descritos na literatura (Saito e colaboradores, 2004) resulta da relevância dada pelos referidos autores às diferenças observadas.

O ácido protocatecuico exibe uma actividade anti-radicalar significativamente mais baixa comparado com os seus ésteres (Figura 3.9. e Tabela 3.4.). A alteração de comportamento do PCA poderá ficar a dever-se à possível dissociação do grupo carboxílico, o que leva a uma diminuição da electrofilicidade da quinona e por conseguinte, diminuição do ataque nucleofílico por parte da molécula do solvente (Figura 3.13.). A deprotonação do grupo carboxílico induz um aumento da instabilidade do grupo quinona, por efeito de ressonância, o que aumenta a energia da orbital LUMO (orbital de maior energia) justificando assim a sua baixa reactividade com o DPPH^{*}.

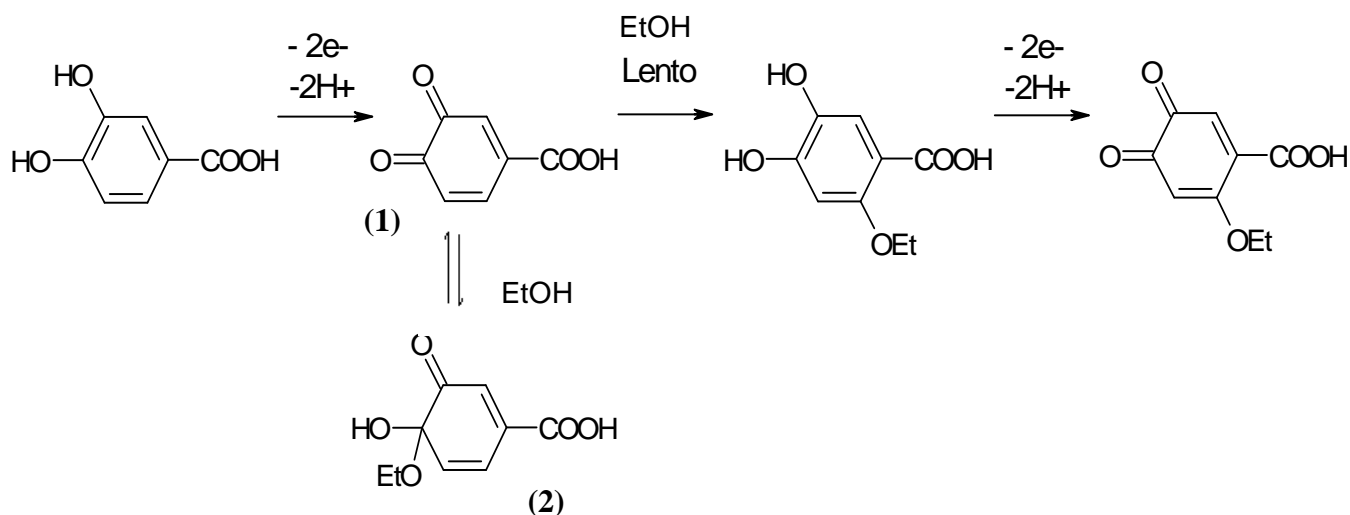


Figura 3.13. Oxidação do ácido protocatecuico a quinona, **(1)**, e desta à respectiva estrutura hemiacetal, **(2)** (Adaptado de Saito e colaboradores, 2004).

Saito e colaboradores (2006) observaram que a elevada capacidade anti-radicalar dos benzoatos em solventes próticos, se deve à repulsão electrónica que o catecol sofre na posição *para*, o que origina uma estrutura mais estável. Por outro lado, Saito e Kawabata (2008) sugerem que o grupo quinona é regenerado sucessivamente por *via* nucleofílica, o que permite reduzir mais radicais DPPH[•] e aumentar o efeito anti-radicalar do composto.

Huang e colaboradores (2005) e Blanco (2008) referem que uma outra hipótese para que o PCA apresente uma menor actividade anti-radicalar, comparativamente aos seus ésteres, poderá estar relacionada com a reversibilidade da reacção entre este composto e o DPPH[•], pelo que a probabilidade de ocorrer a estabilização da absorvância revela ser difícil.

O diferente comportamento cinético observado entre concentrações de um mesmo composto poderá ser justificado pelo próprio procedimento experimental e/ou pelo efeito estérico provocado pelos grupos volumosos da molécula DPPH[•]. A primeira situação poderá ser o resultado da diferença na frequência de colisões, devido à agitação, e portanto, diferença na fracção de colisões que ocorrem na orientação adequada para que a reacção ocorra. O segundo aspecto poderá ser o resultado de um condicionamento do acesso ao átomo de azoto, por parte do protão do antioxidante, devido ao impedimento estérico resultante dos grupos volumosos existentes na estrutura da molécula DPPH[•] (Silva, 1998).

Na Tabela 3.5. podemos observar o comportamento cinético do PCA e respectivos ésteres, apenas para a concentração EC_{50} , com base no modelo da potência: $\ln(DPPH \text{ Remanescente}) = b \ln(\text{tempo}) + \ln(a)$.

Tabela 3.5. Parâmetros do modelo da potência para o comportamento cinético do PCA e respectivos ésteres.

Composto	R ²	Declive (b) x 10 ⁻³	a
PCA	0,884	-0,110	4,58
PM	0,882	-0,116	4,53
PE	0,958	-0,144	4,69
PP	0,741	-0,062	4,21

Segundo Sánchez-Moreno e colaboradores (1998), e de acordo com o modelo matemático aplicado, o mesmo que no presente trabalho, referem que quanto maior o declive da curva, menor é o EC_{50} e por conseguinte, maior é a eficiência anti-radicalar. Neste sentido, o PCA apresenta um menor poder antioxidante, e portanto um valor de EC_{50} maior (menor AE), comparado com os seus ésteres (PM, PE e PP), situação já verificada anteriormente. Através da Tabela 3.5. e Figura 3.14., podemos constatar que, a curva EC_{50} do protocatenoato de propilo (PP) foi a que mais diminuiu nos primeiros minutos, o que poderá indicar uma maior capacidade em reduzir o radical DPPH*. Contrariamente ao referido na literatura (Saito e colaboradores, 2004), os dados obtidos mostram, mais uma vez, que a actividade antioxidante dos benzoatos tende a aumentar com o aumento da cadeia alquílica.

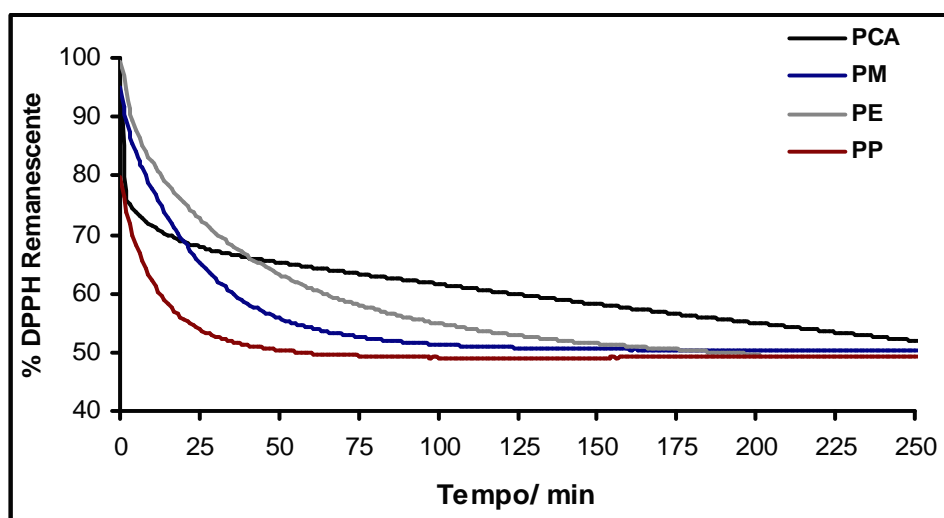


Figura 3.14. Representação gráfica da percentagem de inibição do radical DPPH*, para as concentrações EC_{50} do PCA e respectivos ésteres, ao longo do tempo.

3.5.1.2. Ácido 3,4-Diidroxifenilacético (DOPAC)

A Figura 3.15. evidencia o decréscimo de absorvância da solução do radical DPPH^{*} ao longo do tempo, na presença do ácido 3,4-diidroxifenilacético. Os ésteres do DOPAC encontram-se ainda sob estudo, razão pela qual os seus resultados não serão apresentados.

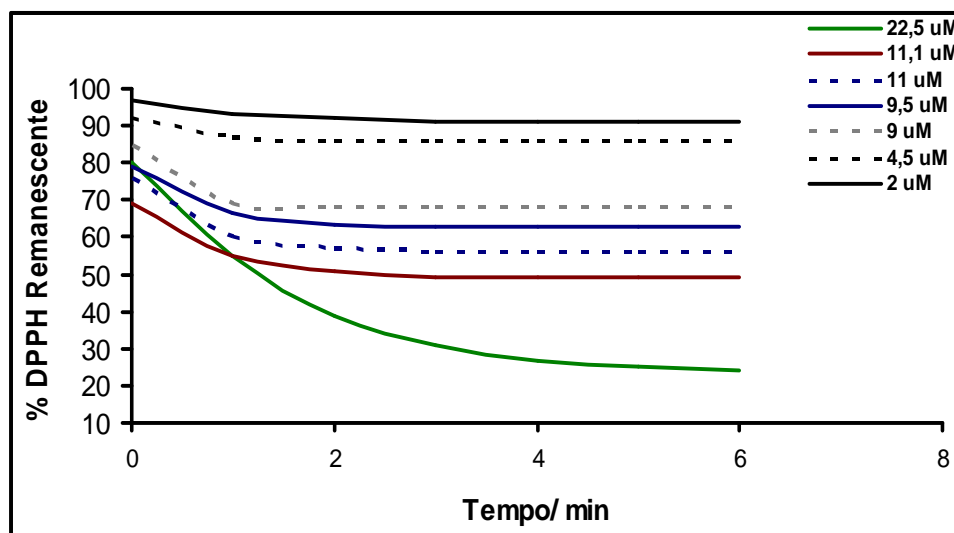


Figura 3.15. Representação gráfica do efeito da concentração do DOPAC na percentagem de inibição do radical DPPH^{*} ao longo do tempo (Blanco, 2008).

O DOPAC apresenta uma cinética de reacção muito mais rápida e definida que o ácido protocatecuico e respectivos ésteres. Mais de 50% do decréscimo da absorvância ocorre nos dois primeiros minutos de reacção.

O DOPAC apenas difere do PCA por apresentar um grupo CH₂ entre o anel aromático e o grupo carboxílico. O grupo CH₂ aparentemente diminui o efeito da densidade electrónica no anel aromático, provocada pela influência do grupo carboxílico (grupo desactivador), o que aumenta a susceptibilidade do composto à oxidação. O DOPAC (EC₅₀ = 11,1 µM) apresenta uma actividade antioxidante superior ao do PCA (EC₅₀ = 15 µM). Esta situação foi também observada por Siquet e colaboradores (2006) e Rice-Evans e colaboradores (1996). O DOPAC atinge o equilíbrio ao fim de 5 minutos, pelo que o comportamento cinético é classificado, de acordo com Sánchez-Moreno e colaboradores (1998), como rápido.

3.5.1.3. Ácido 3,4,5-Triidroxibenzoico (Ácido Gálgico) e 2-Carboxi-2,5,7,8-Tetrametil-6-Cromanol (Trolox)

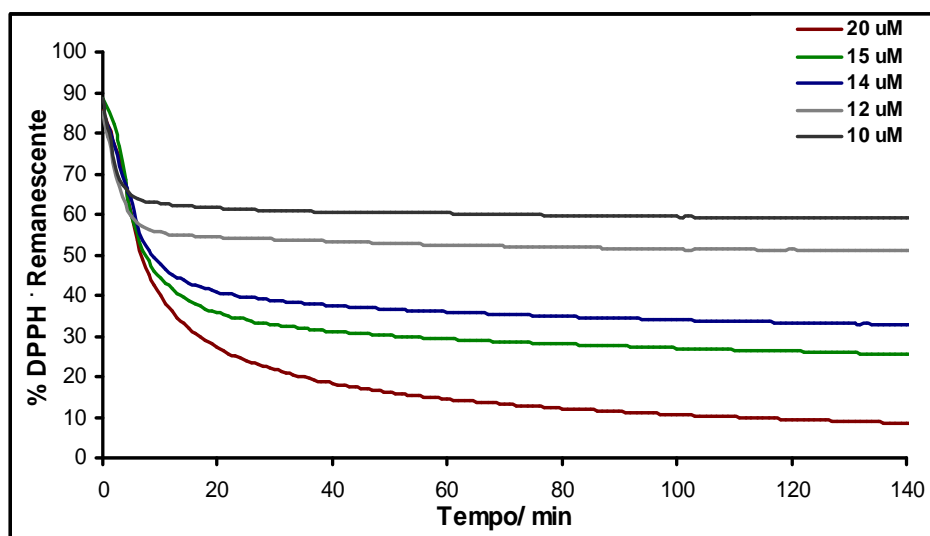


Figura 3.16. Representação gráfica do efeito da concentração do ácido gálgico na porcentagem de inibição do radical DPPH* ao longo do tempo.

O ácido gálgico (ácido 3,4,5-triidroxibenzoico) apresenta uma estrutura química semelhante à do PCA. A única diferença, para além de não possuir extensão de cadeia entre o anel aromático e o grupo carboxílico, como o DOPAC e respectivos ésteres, é a existência de um terceiro grupo hidroxilo na posição *orto*, o que potencia a sua actividade antioxidante.

Pela Figura 3.16. podemos observar que, o ácido gálgico apresenta uma cinética de reacção muito idêntica à do PCA e seus ésteres. No entanto, o tempo necessário para que a estabilização da absorvância ocorra, para cada uma das concentrações testadas, é consideravelmente inferior, aproximadamente 70 minutos contra os 175 minutos dos ésteres do PCA. A cinética lenta deste composto poderá ser o resultado, à semelhança do que foi descrito para o PCA, da desestabilização do grupo quinona na posição *orto*, *meta* e *para*, pelo grupo carboxílico, o que dificulta o ataque nucleofílico da molécula do solvente ou o equilíbrio. O EC_{50} obtido para este ácido foi cerca de 12 μ M.

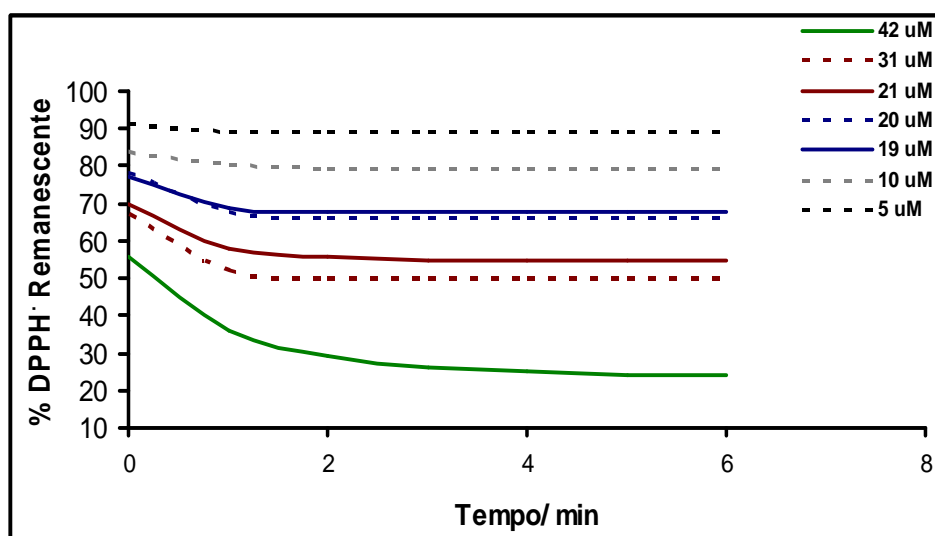


Figura 3.17. Representação gráfica do efeito da concentração do trolox na percentagem de inibição do radical DPPH[•] ao longo do tempo (Blanco, 2008).

O trolox apresenta um comportamento cinético muito idêntico ao obtido para o DOPAC (Figura 3.17.). Em ambos os casos, as curvas são bem definidas e o tempo para alcançar o patamar de equilíbrio de absorvância é sensivelmente de 4 minutos. Por outro lado, o EC₅₀ obtido para o DOPAC revelou ser cerca de 11,1 µM, um terço do Trolox, 31 µM.

Na Tabela 3.6. resume-se as EC₅₀ para cada composto em estudo, incluindo os de referência, a eficiência anti-radicalar (AE) e o respectivo tempo para que ocorra a estabilização da reacção, bem como a classificação quanto ao comportamento cinético e eficiência anti-radicalar, de acordo com Sánchez-Moreno e colaboradores (1998).

Tabela 3.6. EC₅₀, T_{EC50}, AE e classificação do comportamento cinético e eficiência anti-radicalar, do PCA e respectivos ésteres, DOPAC, ácido gálgico e trolox.

Compostos	EC ₅₀ (µM)	T _{EC50} (min)	AE x 10 ⁻³	Classificação AE	Classificação Cinética
PCA	≈15	> 300	-	-	Lento
PM	6	175	0,952	Baixo	
PE	7	175	0,816	Baixo	
PP	4	175	1,43	Médio	
DOPAC	11,1	4	22,5	Muito Elevado	Rápido
Ácido Gálgico	12	70	1,19	Médio	Lento
Trolox	31	4	8,06	Elevado	Rápido

Pela Tabela 3.6., podemos observar que são necessários apenas 4 μM de protocatenato de propilo (PP) para inibir a concentração inicial do radical DPPH $^{\bullet}$ em 50%. É o valor de EC_{50} mais baixo de todos os antioxidantes testados, incluindo os de referência. No entanto, a cinética de reacção não é um parâmetro independente e revela ser de extrema importância para compreender o seu modo de actuação. O PP apresenta uma cinética lenta bem como uma eficiência anti-radicalar significativamente baixa, quando comparado com o Trolox e o DOPAC (Figura 3.18.). Ao comparar o EC_{50} do DOPAC (11 μM), com o PP para a mesma concentração (10 μM), constata-se que mesmo assim, as cinéticas iniciais não se aproximam.

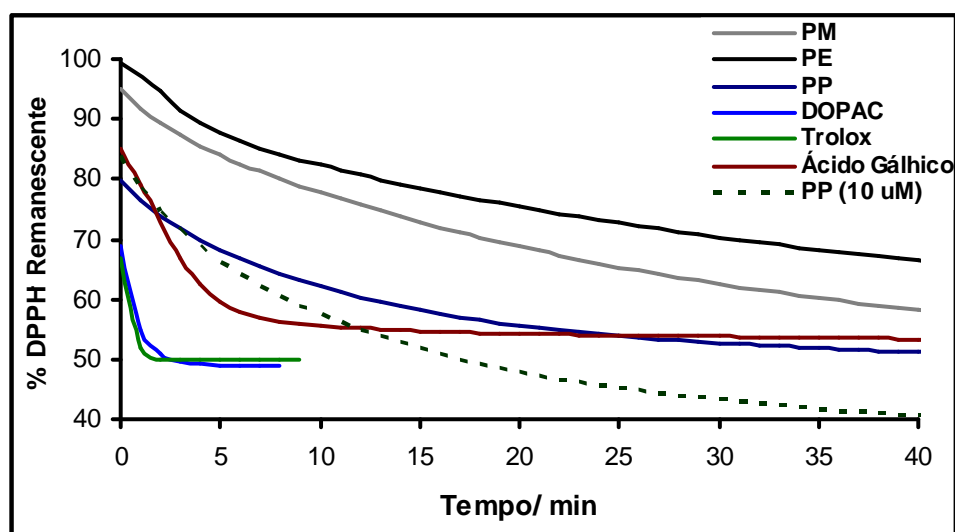


Figura 3.18. Representação gráfica da percentagem de inibição do radical DPPH $^{\bullet}$, para as concentrações EC_{50} do PCA, benzoatos, DOPAC, trolox e ácido gálico, ao longo do tempo.

Em termos de reactividade com o DPPH $^{\bullet}$ bem como cinética de reacção, o DOPAC é relativamente aos demais antioxidantes estudados aquele que apresenta a melhor eficiência anti-radicalar. Os dados obtidos permitem inferir que o efeito antioxidante do DOPAC é comparável ao do trolox, uma vez que ambos possuem uma cinética rápida e uma elevada eficiência anti-radicalar. Mais, o DOPAC evidencia uma eficácia 3 vezes superior e uma EC_{50} aproximadamente um terço da do trolox.

Como já foi referido, encontra-se em curso estudos que visam a obtenção dos resultados para os ésteres DOPAC. Tal como aconteceu para os ésteres PCA, é previsível que os ésteres DOPAC apresentem também uma melhor actividade anti-radicalar.

3.5.2. Métodos Electroquímicos

Os compostos de referência, trolox e ácido gálico, bem como os de partida, PCA e DOPAC, e respectivos ésteres, foram analisados por voltametria cíclica e de impulso diferencial em tampão fosfato pH 7,38.

3.5.2.1. Ácido Protocatecuico (PCA) e seus Ésteres (PM, PE e PP)

Para o ácido protocatecuico foi possível observar, pela técnica de impulso diferencial (DPV), a presença no voltamograma de dois picos anódicos sobrepostos (Figura 3.19.). Os dois picos de oxidação, $E_p = +0,188$ V e $E_p' = +0,317$ V, estão relacionados com a oxidação do grupo catecol.

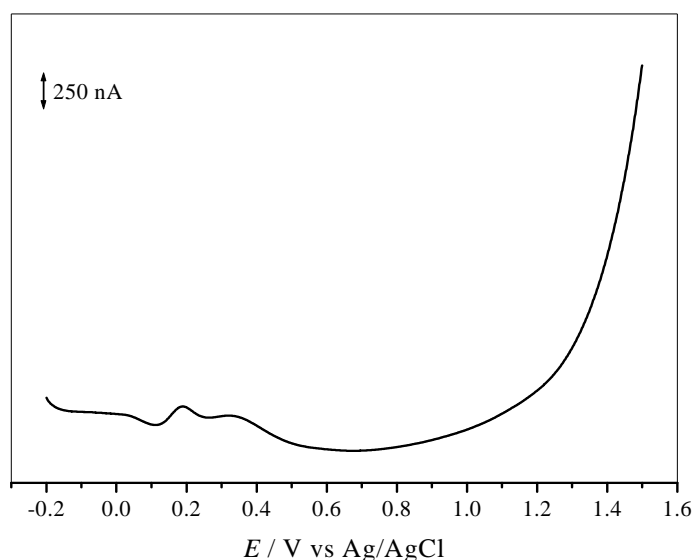


Figura 3.19. Representação gráfica do voltamograma de impulso diferencial do PCA.

Os dados obtidos por voltametria cíclica mostram que a reacção é reversível, uma vez que, ao inverter o sentido de varrimento, observa-se 2 picos catódicos (Figura 3.20.). Este comportamento está de acordo com os dados descritos na literatura relativos à oxidação de compostos contendo grupo catecol (Simié e colaboradores, 2007). A oxidação ocorre por formação de um grupo quinona, a qual pode ser reduzida ao catecol. Na literatura podemos encontrar alguns estudos que justifiquem esta conclusão. De facto, Saito e colaboradores (2006), e Saito e Kawabata (2006), indicam que a possível dissociação do grupo carboxílico do ácido protocatecuico, resulta na diminuição da electrofilicidade do grupo quinona e por conseguinte, diminuição do ataque nucleofílico por parte da molécula do solvente. Por outro lado, estudos electroquímicos efectuados com o ácido cafeico

demonstram que, o primeiro passo de oxidação envolve a transferência de dois electrões *per* molécula, os quais correspondem à formação do grupo quinona (Gaspar e colaboradores, 2008; Trabelsi e colaboradores, 2004; Giacomelli e colaboradores, 2002; Hapiot e colaboradores, 1996).

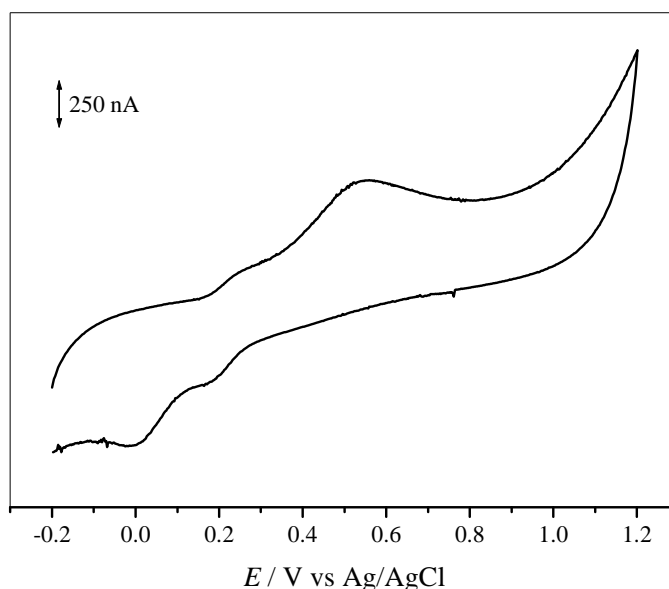


Figura 3.20. Representação gráfica do voltamograma cíclico do PCA.

Os voltamogramas de impulso diferencial dos ésteres do ácido protocatecuico evidenciam apenas a presença de um pico anódico bem definido (Figura 3.21). O PM, PE e PP são oxidados a $E_p = +0,244$, $E_p = +0,237$ e $E_p = +0,242$ V, respectivamente. À semelhança do ácido de partida, os voltamogramas cíclicos destes ésteres também exibem um pico catódico quando a direcção de corrente é invertida, o que indica a reversibilidade da reacção (Figura 3.21).

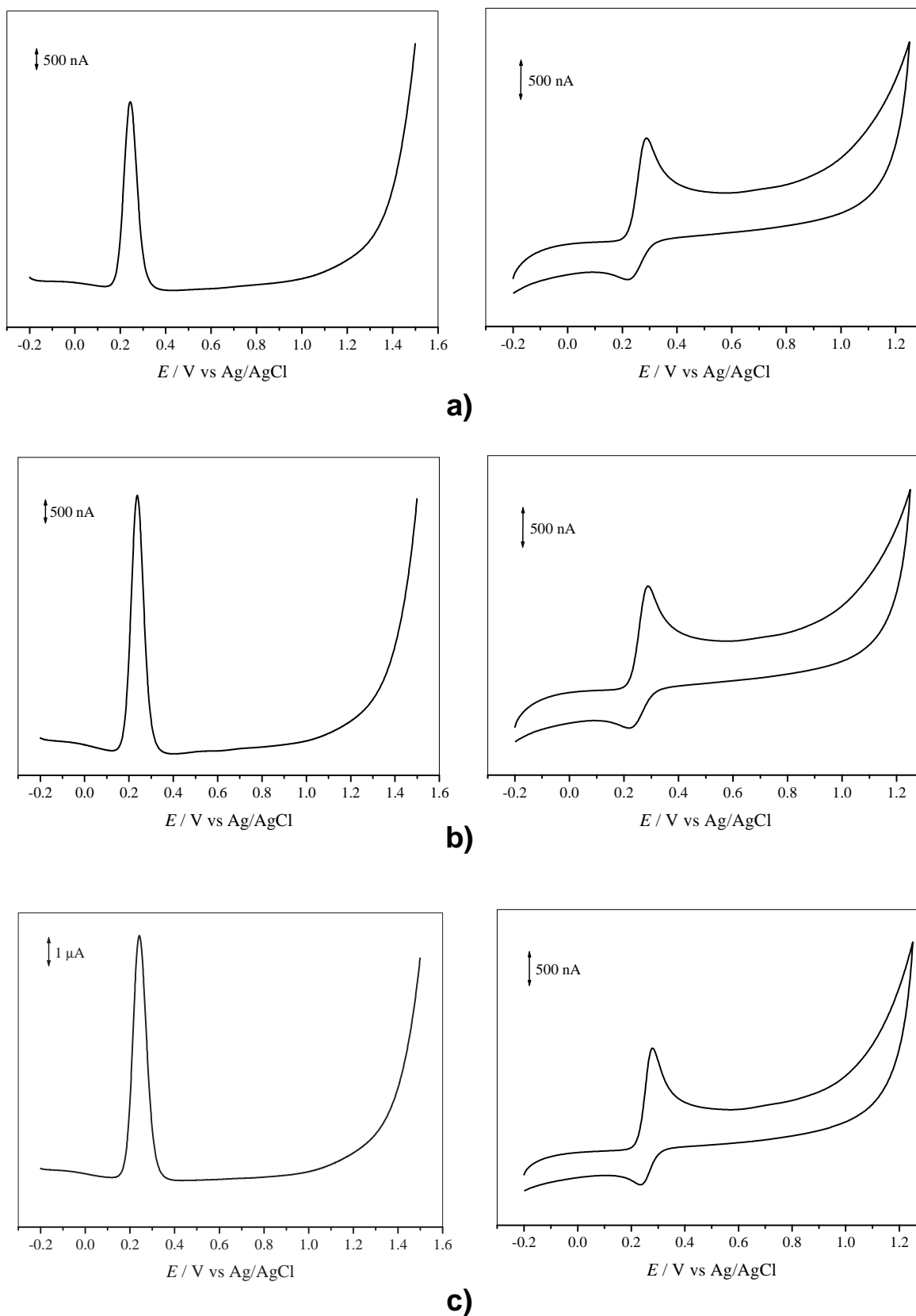


Figura 3.21. Representação gráfica do voltamograma de impulso diferencial, à esquerda, e do voltamograma cíclico, à direita, do a) PM, b) PE e c) PP.

Os potenciais de oxidação dos picos bem como as respectivas alturas (H), obtidos por voltametria de impulso diferencial (DPV) e cíclico (CV), para o ácido protocatecuico e ésteres encontram-se descritas na Tabela 3.7.

Tabela 3.7. Potencial do pico de oxidação e respectiva altura obtidos por DPV e CV, para o PCA e respectivos ésteres, ácido gálgico e trolox.

Composto	Impulso Diferencial		Cíclico			
	E_p / V	$H \times 10^{-6} / A$	E_p Anódico / V	$H \times 10^{-6} / A$	E_p Catódico / V	$H \times 10^{-6} / A$
Ácido Gálgico	+0,110/ +0,544	0,986/0,118	+0,183	0,536	-	-
Trolox	+0,113	4,28	+0,171	0,844	+0,108	-0,0109
PCA	+0,188/ +0,317	0,113	+0,520	-	0,003	-
PM	+0,244	5,30	+0,278	0,859	+0,247	-0,258
PE	+0,237	6,86	+0,286	1,21	+0,227	-0,0743
PP	+0,242	8,51	+0,278	1,39	+0,230	-0,387

Os resultados obtidos (Tabela 3.7.) mostram que os benzoatos apresentam sensivelmente o mesmo potencial de oxidação. Os resultados sugerem que o PP, por apresentar o pico mais intenso, exhibe uma maior facilidade em transferir electrões.

Gaspar e colaboradores (2008) verificaram que, o aumento do número de hidroxilos substituídos no anel aromático dos ácidos hidrocínâmicos, induz um aumento da sua nucleofilicidade. O ácido gálgico apresenta 2 picos anódicos distintos, a $E_p = + 0,110 V$ e $E_p' = + 0,544 V$, ambos relacionados com a oxidação dos três grupos hidroxilos. O PCA e os respectivos ésteres apresentam um potencial de oxidação superior ao do ácido gálgico, composto de referência, o que poderá indicar uma menor actividade antioxidante.

3.5.2.2. DOPAC e seus Ésteres (PPM, PPE e PPP)

O comportamento electroquímico do DOPAC é muito idêntico ao do PCA. O DOPAC apresenta dois picos anódicos sobrepostos (Figura 3.22.), relativos à oxidação do grupo catecol, a $E_p = +0,112 V$ e $E_p' = +0,275 V$, respectivamente. A existência de dois picos sobrepostos poderá ser o resultado da oxidação quer da forma livre quer adsorvida do composto. Neste caso, quando o eléctrodo de trabalho é mergulhado na solução do composto a analisar, parte dele é imediatamente adsorvido. O composto que se encontra livre é responsável pelo o primeiro pico, E_p , enquanto que o já adsorvido dá origem a um pico mais anódico, E_p' .

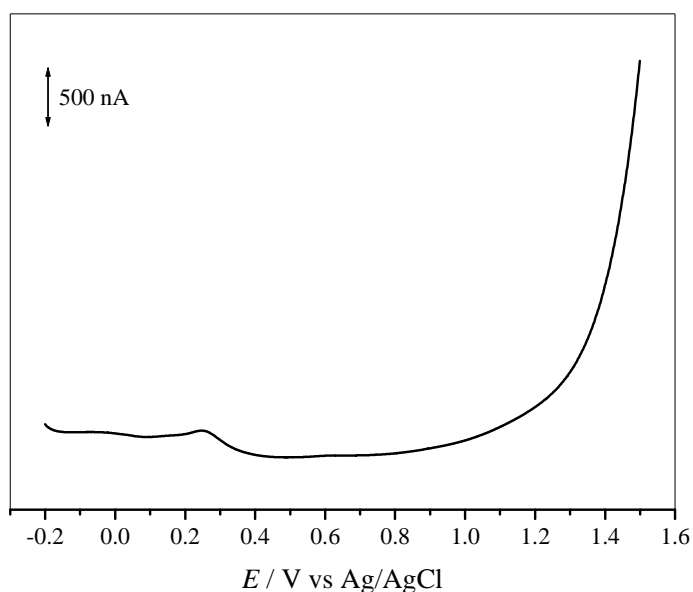


Figura 3.22. Representação gráfica do voltamograma de impulso diferencial do DOPAC.

No voltamograma de impulso diferencial (Figura 3.23. e 3.24.), os fenilacetatos evidenciam apenas um pico anódico resultante da oxidação do grupo catecol. O pico não é totalmente simétrico, o que evidencia, à semelhança do que sucedeu com o seu ácido de partida, a possibilidade de haver sobreposição de dois picos anódicos, provocado pela a oxidação da forma livre bem como da forma adsorvida do composto.

O PPM, PPE e PPP apresentam picos de oxidação a $E_p = +0,150$, $E_p = +0,137$ e $E_p = +0,130$ V. Analisando os potenciais de oxidação dos fenilacetatos torna-se visível a diminuição, ainda que moderada, do potencial com o tamanho da cadeia alifática dos ésteres, principalmente do metílico em relação ao propílico. Os dados obtidos pelos voltamogramas cíclicos dos ésteres mostram que a reacção é irreversível, uma vez que se observa apenas um pico anódico sem contrapartida catódica (Figura 3.23. e 3.24.). Neste caso, é provável que o radical formado por oxidação sofra um processo de dimerização e/ ou um processo de estabilização por ataque nucleofílico do solvente. De facto, Gaspar e colaboradores (2008) observaram a mesma situação com o ácido ferúlico e sinápico. O mecanismo de oxidação envolve a transferência de um electrão do ião fenoxilo, seguido de um processo de dimerização. A presença de um segundo grupo metóxido no ácido sinápico, em relação ao ácido ferúlico, aumenta a estabilidade do radical formado, o que induz um decréscimo no seu potencial de oxidação.

No caso dos fenilacetatos, e contrariamente ao que se observa com o PCA e seus ésteres, a presença do grupo CH_2 na cadeia lateral entre o COOH e o anel aromático

reduz o efeito da diminuição da densidade electrónica, induzida pela influência do grupo carboxílico. Esta situação provoca um aumento da estabilidade do radical formado e a susceptibilidade ao ataque nucleofílico do solvente e/ou dimerização.

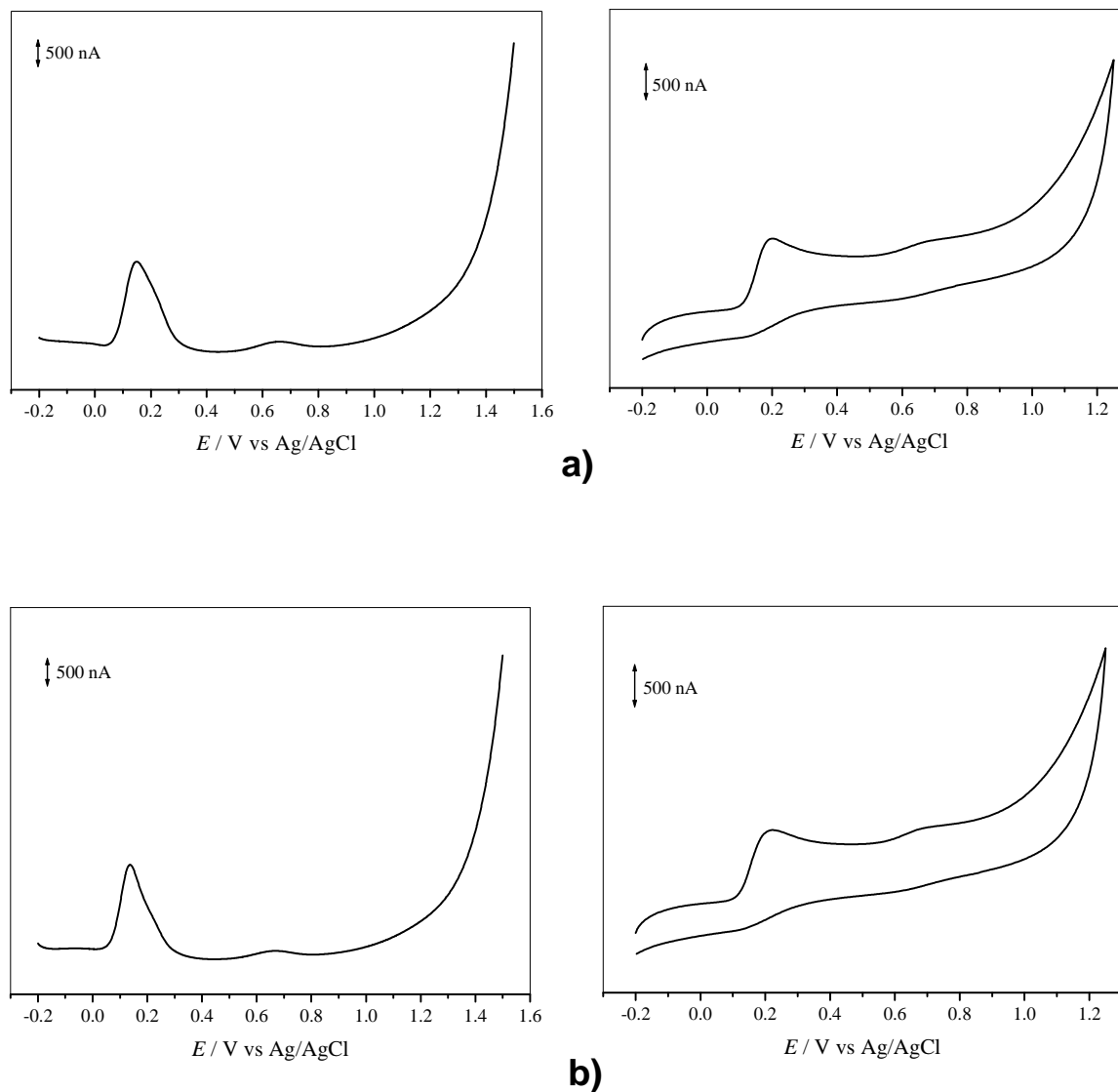


Figura 3.23. Representação gráfica do voltamograma de impulso diferencial, à esquerda, e do voltamograma cíclico, à direita, do a) PPM e b) PPE.

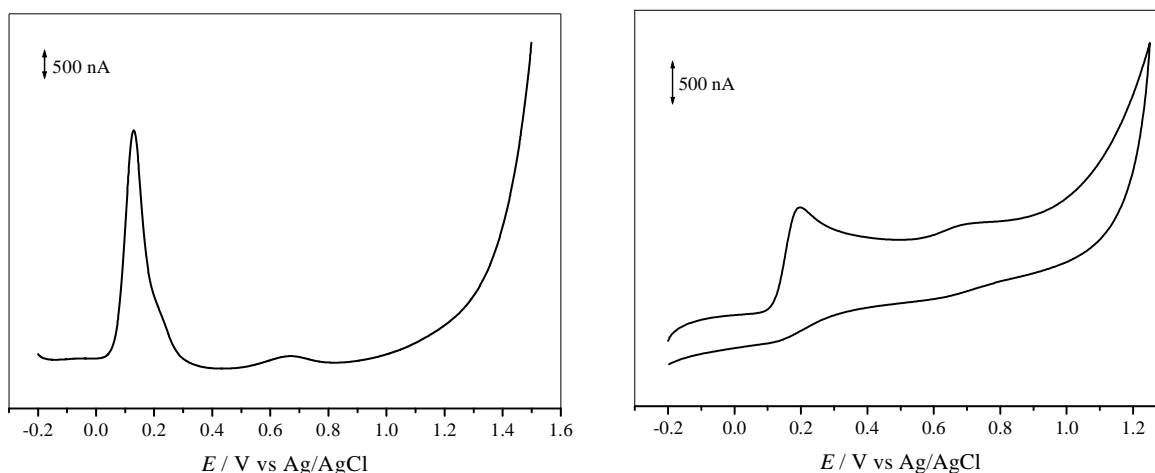


Figura 3.24. Representação gráfica do voltamograma de impulso diferencial, à esquerda, e do voltamograma cíclico, à direita, do PPP.

Na Tabela 3.8. resumem-se os potenciais de oxidação bem como as respectivas alturas, obtidos por voltametria por impulso diferencial e cíclica, para o DOPAC e respectivos ésteres, bem como os de referência, ácido gálgico e trolox.

Tabela 3.8. Potencial do pico de oxidação e respectiva altura (H), para o trolox e ácido gálgico, bem como o DOPAC e respectivos ésteres.

Composto	Impulso Diferencial		Cíclico			
	E_p / V	$H \times 10^{-6} / A$	E_p Anódico/ V	$H \times 10^{-6} / A$	E_p Catódico/ V	$H \times 10^{-6} / A$
Ácido Gálgico	+0,110/ +0,544	0,986 e 0,118	+0,183	0,536	-	-
Trolox	+0,113	4,28	+0,171	0,844	+0,108	- 0,011
DOPAC	+0,112/ +0,275	0,036/ 0,174	-	-	-	-
PPM	+0,150	1,70	+0,203	0,183	-	-
PPE	+0,137	1,82	+0,225	0,127	-	-
PPP	+0,130	4,40	+0,193	1,046	-	-

O PCA e os respectivos ésteres apresentam um potencial substancialmente superior aos restantes compostos (Tabela 3.7. e 3.8.). A instabilidade induzida pelo grupo carboxílico no anel aromático, diminui a susceptibilidade de oxidação do composto.

Os estudos efectuados por voltametria cíclica mostram que a reacção de oxidação do PCA e benzoatos é reversível, uma vez que se observa um pico anódico com counterpartida catódica. A oxidação poderá ter ocorrido por formação de *orto* quinona, sendo de seguida reduzida novamente a catecol.

Os benzoatos apresentam sensivelmente o mesmo potencial de oxidação enquanto que os fenilacetatos exibem uma ligeira diminuição do potencial com o aumento da cadeia alquílica. Por voltametria cíclica foi possível observar que, a reacção de oxidação dos fenilacetatos é irreversível, uma vez que se verifica um pico anódico sem contrapartida catódica. Neste caso, é provável que o radical formado sofra um processo de dimerização e/ ou um processo de estabilização por ataque nucleofílico do solvente (Saito e Kawabata, 2008; Saito e colaboradores, 2006).

O DOPAC e os seus ésteres mostram um potencial muito idêntico aos dos compostos de referência, nomeadamente trolox e ácido gálgico. O PPP apresenta um potencial semelhante à do Trolox, o que poderá constituir, em termos electroquímicos, uma alternativa a este composto de referência.

3.6. Bibliografia

Aguilar-Garcia, C., Gavino, G., Baragano-Mosqueda, M., Hevia, P., Gavino, V.C. (2007). *Correlation of Tocopherol, Tocotrienol, Gamma-Oryzanol and Total Polyphenol content in Rice Bran with Different Antioxidant Capacity Assays*. Food Chemistry, **102**(4), 1228-1232;

Arts, M.J.T.J., Haenen, G.R.M.M., Voss, H.P., Bast, A. (2004). *Antioxidant Capacity of Reaction Products Limits the Applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) Assay*. Food Chemistry Toxicology, **42**, 45–49;

Becker, E.M., Nissen, L.R., Skibsted, L.H. (2004). *Antioxidant Evaluation Protocols: Food Quality or Health Effects*. European Food Research Technology, 219,561 - 571.

Blanco, E. (2008). *Synthèse de Nouveaux Dérivés Phénoliques et Détermination de Leurs Propriétés Antioxydantes*. Departamento de Engenharia Química. Instituto Superior de Engenharia do Porto;

Blasco, A. J., González, M. C., Escarpa, A. (2004). *Electrochemical Approach for Discriminating and Measuring Predominant Flavonoids and Phenolics Acids Using Differential Pulse Voltammetry. Towards an Electrochemical Index of Natural Antioxidants*. Analytica Chimica Acta, **511**, 71-81;

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). *Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity*. Food Science Thecnology-LEB, 28, 25-30;

Brett, A. M., Brett, C.M. (1996). *Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações*, Almedina, Coimbra;

Briante, R., Febbraio, F., Nucci, R. (2003). *Antioxidant Properties of Low Molecular Weight Phenols Present in the Mediterranean Diet*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, **51**, 6975-6981;

Chevion, S., Berry, E. M., Kitrossky, N., Kohen, R. (1997). *Evaluation of Plasma Low Molecular Weight Antioxidant Capacity by Cyclic Voltammetry*. Free Radical Biology & Medicine, **22**, 411-21;

Chimi, H., Cillard, J., Cillard, P., Rahmani, M. (1991). *Peroxyl and Hydroxyl Radical Scavenging Activity of some Natural Phenolic Antioxidants*. Journal of the American Oil Chemists Society, **68** (5), 307-312;

Eklund, P. C., Langvik, O. K., Wärna, J. P., Salmi, T. O., Willför, S. M., Sjöholm, R. E. (2005). *Chemical Studies on Antioxidant Mechanisms and Free Radical Scavenging Properties of Lignans*. Organic & Biomolecular Chemistry, **3**, 3336-3347;

Falcão, S. M. (2008). *Avaliação da Actividade Electroquímica em Cogumelos Silvestres Comestíveis*. Departamento de Química, Universidade do Porto;

Ferreira, M., Varela, H., Torresi, R. M., Tremiliosi-Filho, G. (2006). *Electrode Passivation Caused by Polymerization of Different Phenolic Compounds*. Electrochimica Acta, **52**(2), 434-442;

Foti, M.C., Daquino, C., Geraci, C. (2004). *Electron-Transfer Reaction of Cinnamic Acids and Their Methyl Esters with DPPH Radical in Alcoholic Solutions*. Journal Organic Chemistry, 69, 2309-2314;

Garrido, J.M.P.J. (2003). *Mecanismos de Oxidação Electroquímica e Quantificação de Drogas de Abuso*. Dissertação para a obtenção do grau de Doutor, Universidade de Coimbra;

Gaspar, A., Garrido, E. M., Esteves, M., Quezada, E., Milhazes, N., Garrido, J., Borges, F. (2008). *New Insights into the Antioxidation Activity of Hydroxycinnamic Acids: Synthesis and Physicochemical Characterization of Novel Halogenated Derivatives*. European Journal of Medicinal Chemistry, doi: 10.1016/j.ejmech.2008.10.027;

Giacomelli, C., Ckless, K., Galato, D., Miranda, F.S., Spinelli, A., Braz, J. (2002). *Electrochemistry of Caffeic Acid Aqueous Solutions with ph 2.0 to 8.5*. The Brazilian Chemical Society, **13** (3), 332-338;

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999, *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3^a ed., Oxford University Press Inc., New York.

Hapiot, P., Neudeck, A., Pinson, J., Fulcrand, H., Neta, P., Rolando, C. (1996). *Oxidation of Caffeic Acid and Related Hydroxycinnamic Acids*. Electroanalytical Chemistry, 405 (1-2), 169-176;

Hatzipanayioti, D., Karaliota, A., Kamariotaki, M., Aletras, V., Petropouleas, P. (2006). *Theoretical and Spectroscopic Investigation of the Oxidation and Degradation of Protocatechuic Acid*. Chemical Physics, **325**, 341-350;

Hotta, H., Ueda, M., Nagano, S., Tsvjino, Y., Koyama, J. (2002). *Mechanistic Study of the Oxidation of Caffeic Acid by Digital Simulation of Cyclic Voltammograms*. Analytical Biochemistry, **303**(7), 66-72;

Huang, D., Ou, B., Ronald, P. (2005). *The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays*. Journal Agriculture Food Chemistry, **53**(6), 1841-1856;

Kilmartin, P.A., Zou, H. L., Waterhouse, A. L. (2002). *Correlation of Eine Phenolic Composition versus Cyclic Voltammetry Response*. American Journal of Enology and Viticulture, **53**(294);

Kohen, R. , Beit-Yannai, E., Berry, E., Tirosh, O. (1999). *Evaluation of the Overall Low Molecular Weight Antioxidant Activity of Biological Fluids and Tissues by Cyclic Voltammeter*. Methods in Enzymology, 285-295.

López, M., Martínez, F., Valle, C. D., Ferrit, M., Luque, R. (2003). *Study of Phenolic Compounds as Natural Antioxidants by a Fluorescence Method*. Talanta, **60**, 609-616;

Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., Lima, J. L. F. C. (2008). *Methodological Aspects about in Vitro Evaluation of Antioxidant Properties*. *Analytica Chimica Acta*, **613**(1), 1-19;

Milardovic, S., Ivekovic, D., Grabaric, B. S. (2006). *A Novel Amperometric Method for Antioxidant Activity Determination using DPPH Free Radical*. *Bioelectrochemistry*, **68**(2), 175-180;

Miller, J.N., Rice-Evans, C.A. (1997). *Factors Influencing the Antioxidant Activity Determined by the ABTS Radical Cation Assay*. *Free Radical Research*, 26, 195-199;

Naguib, Y.M.A.(2000). *A Fluorimetric Method for Measurement of Oxygen Radical-Scavenging Activity of Water-Soluble Antioxidants*. *Analytical Biochemistry*, 284, 93-98;

Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T. (1992). *Antioxidant Effects of Tannins and Related Polyphenols*. Mou-Tuan, H., Chi-Tang, H., Chang, Y. L. (ed.). *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II: Antioxidants and Cancer Prevention*, ACS, Washington;

Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005). *Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 4290-4302;

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., (1999). *Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay*. *Free Radical Biology & Medicine*, **26**(9-10), 1231-123;

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1996). *Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids*. *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 933-956;

Romani, A., Minunni, M., Mulinacci, N., Pinelli, P., Vincieri, F. F., Del Carlo, M., Mascini, M. (2000). *Comparison Among Differential Pulse Voltammetry, Amperometric Biosensor, and HPLC/DAD Analysis for Polyphenol Determination*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **48**(4), 1197-1203;

- Saito, S., Kawabata, J. (2008). *A Novel Oxidative Dimer from Protocatechuic Esters: Contribution to the Total Radical Scavenging Ability of Protocatechuic Esters*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **72**(7), 1877-1880;
- Saito, S., Kawabata, J. (2006). *DPPH (=2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl) Radical Scavenging Reaction of Protocatechuic Acid (= 3,4-Dihydroxybenzoic Acid): Difference in Reactivity between Acids and Their Esters*. *Helvetica Chimica Acta*, **89**, 1395-1407;
- Saito, S., Gao, H., Kawabata, J. (2006). *DPPH (=2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl = 2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-Trinitrophenyl)Hydrazyl) Radical Scavenging Reaction of Protocatechuic Acid Esters (= 3,4-Dihydroxybenzoates) in Alcohols: Formation of Bis-Alcohol Adduct*. *Helvetica Chimica Acta*, **89**, 821-831;
- Saito, S., Okamoto, Y., Kawabata, J. (2004). *Effects of Alcoholic Solvents on Antiradical Abilities of Protocatechuic Acid and Its Alkyl Esters*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **68**(6), 1221-1227;
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J., Saura-Calixto, F. (1998). *A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols*. *Journal of Science of Food and Agriculture*, **76**, 270-276;
- Schaich KM, 2006, *Developing a Rational Basis for Selection of Antioxidant Screening and Testing Methods*. *Acta Horticulturae*, 709, 79-94;
- Sharma, O.P., Bhat, T.K. (2008). *DPPH Antioxidant Assay Revisited*. *Food Chemistry*, doi: 10.1016/j.foodchem.2008.08.008;
- Shohami, E., Gati, I., Beit-Yannai, E., Trembovler, V., Kohen, R. (1999). *Closed Head Injury in the Rat Induces Whole Body Oxidative Stress: Overall Reducing Antioxidant Profile*. *Journal Neurotrauma*, **16**(5): 365-76;
- Silva, F. M., Borges, F., Guimarães, C., Lima, J. L. F. C., Matos, C., Reis, S. (2000). *Phenolic Acids and Derivatives: Studies on the Relationship Among Structure, Radical Scavenging Activity, and Physicochemical Parameters*. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, **48**, 2122-2126;

- Simié, A., Manojlovic, D., Segan, D., Todorović, M. (2007). *Electrochemical Behaviour and Antioxidant and Prooxidant Activity of Natural Phenolics*. *Molecules*, **12**, 2327-2340;
- Siquet, C., Paiva-Martins, F., Lima, J., Reis, S., Borges, F. (2006). *Antioxidant Profile of Dihydroxy- and Trihydroxyphenolic Acids: A Structure-Activity Relationship Study*. *Free Radical Research*, **40**(4), 433-442;
- Trabelsi, S.K., Tahar, N.B., Abdelhedi, R. (2004). *Electrochemical Behavior of Caffeic Acid*. *Electrochimica Acta*, **49**(9-10), 1647-1654.
- Villano, D., Fernandez-Pachon, M. S., Troncoso, M. A., Garcia-Parrilla, M. C. (2005). *Comparasion of Antioxidant Activity of Wine Phenolic Compounds and Metabolites in Vitro*. *Analytica Chimica Acta*. **538**, 391-398;
- Vitaly, R., Lissi, E.A. (2005). *Review of Methods to Determine Chain Breaking Antioxidant Activity in Food*. *Food Chemistry*, **92**, 235-254;
- Wang, J. (2000). *Analytical Electrochemistry*. Wiley-VHC, 2^a ed., Weinheim;
- Wood LG, Gibson PG, Garg ML, 2006, *A Review of the Methodology for Assessing in Vivo Antioxidant Capacity*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **86**(13), 2057-2006;
- Wright, J.S., Johnson, E.R., Dilabio, G.A. (2001). *Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants*, *Journal of the American Chemical Society*, **123**, 1173-1183;
- Yagi, A., Kabash, A., Okamura, N., Haraguchi, H., Moustafa, S.M., Khalifa, T.I. (2002). *Antioxidant, Free Radical Scavenging and Anti-Inflammatory Effects of Aloesin Derivatives in Aloe Vera*. *Planta Medica*, **68**(11), 957-960;

Conclusões e Sugestões para Trabalho Futuro

Neste trabalho procedeu-se à síntese de novos antioxidantes lipofílicos, pelo método de Fisher, com base nos ácidos 3,4-diidroxibenzóico (PCA) e 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC), bem como a sua caracterização e/ou elucidação estrutural. A avaliação da actividade antioxidante dos novos compostos foi realizada com base no método do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH*) e por técnicas electroquímicas (voltametria de impulso diferencial e voltametria cíclica).

Dos dados obtidos, conclui-se que o ácido protocatecuico (PCA) e os benzoatos sintetizados apresentam uma cinética de reacção lenta. A eficiência anti-radicalar do PCA obtida foi inferior a dos respectivos ésteres (considerando $EC_{50} = 15 \mu\text{M}$ e $T_{EC_{50}} = 300$ minutos). Os resultados permitiram concluir que o grupo carboxílico desempenha um papel importante na sua actividade anti-radicalar. A deprotonação do grupo COOH poderá ser responsável por um decréscimo da electrofilicidade da *orto* quinona, devido à maior desestabilização do radical fenoxilo, o que leva a uma menor incidência de ataque nucleofílico por parte do solvente. Os dados permitiram ainda concluir que, a esterificação do ácido protocatecuico induz um aumento da estabilidade do radical formado, permitindo uma maior eficiência na reacção com o DPPH*. Com base nos parâmetros EC_{50} e AE, bem como cinética de reacção, torna-se evidente um aumento da capacidade anti-radicalar, com o aumento da cadeia alifática dos ésteres protocatecuicos.

Os estudos efectuados por voltametria cíclica mostraram que a reacção de oxidação do PCA e ésteres é reversível, uma vez que se observa um pico catódico aquando da

inversão do varrimento. A reacção de oxidação envolve a formação de *orto* quinona, sendo de seguida reduzida novamente a catecol.

Os resultados obtidos foram comparados com um composto de referência, o ácido gálgico, o qual apresentou uma cinética de reacção lenta. No entanto, demora aproximadamente duas vezes menos a atingir o patamar de equilíbrio, quando comparado com o ácido protocatecuico e seus ésteres. A presença de três grupos fenólica poderá ser determinante para o seu maior poder antioxidante. Apesar do grupo carboxílico estar directamente ligado ao anel aromático e ser responsável pela diminuição da sua densidade electrónica, o que reduz a susceptibilidade do composto à oxidação, é possível que a presença dos grupos fenólicos em posições não adjacentes ao grupo COOH reduza consideravelmente esse efeito.

O DOPAC apresenta uma cinética de reacção rápida, bem como a mais elevada eficiência anti-radicalar dos compostos em estudo, incluindo o trolox e o ácido gálgico. O grupo extensor CH₂, presente na cadeia lateral, aumenta a susceptibilidade do composto à oxidação, uma vez que reduz e/ou elimina a influência que o grupo carboxílico possa ter sobre o anel aromático, situação que não ocorria com o PCA nem com o ácido gálgico.

Ao observar a melhoria de actividade anti-radicalar dos benzoatos em relação ao PCA, é previsível que as propriedades anti-radicalares dos ésteres do DOPAC sejam consideravelmente melhores. Actualmente encontram-se em curso estudos que visam a obtenção destes resultados. A reacção de oxidação dos fenilacetatos é irreversível, uma vez que se verificou por voltametria cíclica um pico anódico sem contrapartida catódica. Neste caso, é provável que o radical formado sofra um processo de dimerização e/ ou um processo de estabilização por ataque nucleofílico do solvente.

Os antioxidantes com maior actividade anti-radicalar, DOPAC, trolox e ácido gálgico, apresentam igualmente menor potencial de oxidação. Em contrapartida, o PCA e os respectivos ésteres apresentam a menor eficiência anti-radicalar, a qual se encontra associada a um maior potencial de oxidação. Com base nestes resultados poderemos concluir que, um menor potencial de oxidação conduz a uma melhor actividade anti-radicalar dos compostos.

Ao contrário do método do DPPH, as técnicas voltamétricas avaliam a capacidade redutora dos antioxidantes sem recorrer ao uso de espécies reactivas. Neste contexto,

esta metodologia de análise permite, de um modo simples e directo, determinar a capacidade antioxidante total do composto, uma vez que se baseia apenas nas suas propriedades físico-químicas.

No futuro, e para além de finalizar a quantificação da capacidade anti-radicalar dos fenilacetatos pelo método DPPH, sugerem-se estudos de continuidade deste trabalho que envolvam o cálculo do coeficiente de partição (Log P) dos compostos, de modo a estabelecer uma melhor correlação entre a sua estrutura e respectivas propriedades antioxidantes.

