Susana Maria Miranda Teixeira

ESTUDO DA COMPLEXAÇÃO DO COBRE (II) COM COMPOSTOS FENÓLICOS DA UVA E DO VINHO

Mestrado em Controlo de Qualidade
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

2001

Susana Maria Miranda Teixeira

ESTUDO DA COMPLEXAÇÃO DO COBRE (II) COM COMPOSTOS FENÓLICOS DA UVA E DO VINHO

FACULDADE DE FARMÁCIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 03 / 02 / 07
Reg. 1973
Cota
FFM
TEI

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE MESTRE APRESENTADA À FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

Índice

Agradecimentos iv

Resumo vii

Abstract viii

Capítulo I 1

1. Introdução 2

2. Composição fenólica não volátil da uva e do vinho 4
   2.1. Ácidos fenólicos 4
      2.1.1. Ácidos hidroxibenzóicos 4
      2.1.2. Ácidos hidroxicinâmicos 5
   2.2. Flavonóides 7
      2.2.1. Flavonas 12
      2.2.2. Flavanonas 13
      2.2.3. Flavonóis 13
      2.2.4. Flavanonóis 13
      2.2.5. Flavanas 14
      2.2.6. Flavanóis 14
      2.2.7. Chalconas e di-hidrochalconas 15
   2.3. Derivados do feniletanol 15

3. Biossíntese dos compostos fenólicos 17

4. Compostos fenólicos e a Saúde 21

4.1. Compostos fenólicos e as doenças cardiovasculares 22

4.2 Compostos fenólicos e a carcinogénese 23

4.3. Compostos fenólicos e as doenças infecciosas 23

4.4. Actividade biológica de ácidos cinâmicos, de flavonóides e de derivados do feniletanol 24

5. Actividade antioxidante dos compostos fenólicos 27

5.1. Inibição da peroxidação liídica 27

5.2. Mecanismo de acção dos antioxidantes 30

5.2.1. Actividade anti-radicalar 31

5.2.2. Complexação de metais de transição 31

Capítulo II 34

2. Parte experimental 35

2.1. Introdução 35

2.2. Determinação potenciométrica das constantes de equilíbrio 36

2.3. Sistema de titulação 39

2.4. Reagentes e soluções 41

2.4.1. Solução de ácido nítrico 42

2.4.2. Solução de hidróxido de sódio 42

2.5. Calibração do sistema de titulação 44

2.5.1. Titulação potenciométrica das soluções de antioxidantes 53

2.6. Teste de ausência de carbonato na solução de hidróxido de sódio 54

Capítulo III 59

3. Resultados 60

3.1. Complexação do cobre (II) por compostos fenólicos da uva e do vinho 60

3.1.1. Constantes de equilíbrio do tirosol 61

3.1.2 Constantes de equilíbrio do ácido 4-hidroxicinâmico 69

3.1.3. Constantes de equilíbrio da catequina 78

3.1.4. Constantes de equilíbrio da taxifolina 87

Capítulo IV 95

4. Conclusões 96

Capítulo V 102

5.Bibliografia 103

Anexo 116

Agradecimentos

Aos meus Pais, agradeço todo o seu amor, toda a sua dedicação e todos os valores que me incutiram e que sempre me têm acompanhado ao longo de toda a minha vida e que são um exemplo para mim. Agradeço em particular ao meu Pai, um grande orgulho na sua pessoa e em tudo aquilo que ele representa e também porque que foi por sua causa que me encontro a realizar este Mestrado.

Aos meus irmãos, amigos de todos os momentos e com quem posso sempre contar, manifesto a minha gratidão por terem estado sempre ao meu lado e por sempre me terem ajudado durante toda a vida.

Ao Francisco agradeço o seu carinho, compreensão dispensados, em todos os momentos, pela sua paciência e preciosa ajuda.

À professora Doutora Maria Fernanda M. Borges manifesto a minha enorme admiração pela sua pessoa, manifesto também a minha profunda gratidão por ter estado incondicionalmente ao meu lado em todos os momentos, mesmos naqueles em que era suposto estar com os seus. Agradeço a sua enorme amizade e todos os ensinamentos que sempre alegremente e contagiantemente me disponibilizou ao longo de todo este trabalho. Agradeço ainda, todo o entusiasmo e toda a incansável dedicação com que animou o meu trabalho e que sem o seu apoio, este trabalho nunca se teria realizado.

À professora Doutora Maria de La Salette de F. F. Hipólito Reis expresso o meu agradecimento pelos preciosos conhecimentos científicos que me transmitiu ao longo do meu trabalho, pela disponibilidade que sempre me dispensou e por todas as suas palavras de encorajamento.

À Doutora Maria São José Nascimento agradeço todo o seu apoio e o entusiasmo que sempre me soube dar, dando resposta a todas as necessidades que iam surgindo ao longo de todo o Mestrado.

Ao Doutor Rui Lapa manifesto a minha enorme gratidão por ter estado sempre e em todas as horas ao meu lado, ajudando a solucionar todos os problemas técnicos inerentes ao meu trabalho experimental.

Ao laboratório de Química-Física da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, na pessoa do Doutor José Luís F. Costa Lima, agradeço todo o apoio prestado ao longo de todo o trabalho experimental e a disponibilização de todos os meios materiais para a realização deste trabalho.

Ao Nuno, ao Jorge a ao César agradeço toda a alegria, amizade, disponibilidade. Destaco um agradecimento especial ao Nuno e ao Jorge por toda a ajuda que sempre me dispuseram ao longo deste Mestrado e por ter podido contar sempre com o seu apoio e interesse.

À Adriana, Emília, Nestor, Marlene, Carla, João e Christophe agradeço também toda a sua amizade e companheirismo. Agradeço em especial à Adriana, todas os seus esforços para suprir os percalços que foram surgindo na elaboração da parte experimental, e à Emília pela sua amizade, com que sempre pude contar.

Aos Serviços Administrativos, na pessoa da Srª. D. Maria manifesto também a minha gratidão por terem sempre me ajudado em todos os momentos, sabendo sempre dar resposta a todas as necessidades.

À Mestre Maria João manifesto a minha sincera gratidão pelas palavras amigas e de encorajamento que sempre me soube dar durante todos estes anos de trabalho. Agradeço também o entusiasmo dado nesta fase, uma vez que sem o seu apoio nunca teria tido a possibilidade de concluir este Mestrado.

À Dra. Fátima Silva agradeço toda a sua amizade, dedicação e pela ajuda que sempre me dedicou quando necessária.

À Ana Luísa, Sandra, Fátima, membros dos Serviços da Química e Organoléptica da Escola Superior de Biotecnologia que com a sua paciência e amizade sempre mostraram interesse por este trabalho.

Resumo

Os compostos fenólicos são constituintes intrínsecos da uva e dos produtos a partir dela processados, como por exemplo o vinho. Estes representam um grande grupo de compostos químicos constituídos por diferentes classes, das quais se destacam os ácidos fenólicos e seus derivados e os flavonóides.

Tendo como objectivo contribuir para a interpretação do papel dos compostos fenólicos *in situ* foram efectuados estudos relativos à complexação de diversos ligandos: dois flavonóides (catequina e taxifolina), um ácido cinâmico (ácido 4-hidroxicinâmico) e um derivado do feniletanol (tirosol) com o cobre (II).

As propriedades de complexação destes compostos polifuncionais em relação ao cobre (II) foram determinadas por potenciometria sendo as constantes de acidez dos ligandos e as constantes de formação dos complexos ligando-metal avaliadas pelos programas Superquad e Best.

O estudo permitiu concluir que os compostos fenólicos anteriormente referidos possuírem a capacidade de complexar o cobre (II). De facto, verificou-se que a catequina apresenta uma maior capacidade de complexação relativamente à taxifolina e que o ácido 4-hidroxicinâmico possui uma actividade similar à do ácido ferúlico. Dos compostos estudados, o tirosol foi o agente quelante mais fraco apresentando ainda problemas de solubilidade nas condições de trabalho estabelecidas.

Os resultados obtidos permitem perspectivar o desenvolvimento de novos aditivos de origem natural com propriedades antioxidantes que poderão ser aplicados nas Indústrias Alimentar e Farmacêutica. Para além disso, estes resultados podem contribuir significativamente para compreensão do papel dos compostos fenólicos como agentes antioxidantes e dos seus benefícios para a Saúde.

Abstract

Phenolic compounds are intrinsic constituents of grapes and wine. They represent a large group of compounds such as phenolic acids and their derivatives and flavonoids.

To contribute to the elucidation of the role of phenolic compounds *in situ* and to better preview the possible interactions occurring between them and metals, the complexation properties of some ligand models and copper (II) were investigated by potentiometry with a glass electrode. The ligands studied were tyrosol, 4-hydroxycinnamic acid, catechin and taxifolin. Acidity constants of the ligands and the formation constants of the ligand-metal complexes were evaluated by potentiometry. The titration curves modelisation were performed using computer programs Superquad and Best.

A quantitative examination of the complexation species formed in copper (II)/phenols systems and their respective formation constants are presented. Results have shown that the complexation properties of the compounds are quite different. In fact, catechin shows higher complexation than taxifolin towards copper (II) and 4-hydroxycinnamic acid has a similar activity as ferulic acid. Although some solubility problems occurred in the working conditions it was verified that tyrosol was the weakest chelating agent among the phenolic compounds used in the study.

The obtained results could bring some developments in the use of new antioxidant natural products as additives in food and pharmaceutical industries. The data is also important to understand the role of phenolic compounds as antioxidants, and its benefits in Human Health.

Capítulo I

Introdução

1. Introdução

Os compostos fenólicos representam um grupo heterogéneo de compostos químicos constituídos por diferentes classes: os ácidos fenólicos, os flavonóides, os derivados do feniletanol, os taninos, os estilbenos e as cumarinas [1-3].

Estes compostos são actualmente reconhecidos como biomarcadores de estados fisiológicos, como por exemplo do crescimento e da maturação da uva. Os compostos fenólicos desempenham um papel importante a nível das propriedades sensoriais da uva e dos produtos a partir dela processados, visto serem responsáveis por algumas das suas características organolépticas, nomeadamente a cor e a adstringência.

Estes compostos, quer na forma livre quer conjugada, são extremamente reactivos devido, principalmente, ao carácter acídico dos seus grupos fenólicos e às propriedades dos seus anéis aromáticos, sendo muitos deles substratos para diversas enzimas, como por exemplo as esterases, as glucosidases e as oxidases. O conhecimento da estrutura e das propriedades físico-químicas destes compostos, assim como dos mecanismos que levaram à sua formação, é uma tarefa de pesquisa importante, a qual permitirá prever e controlar a qualidade do vinho [4-6].

Como as plantas taxonomicamente relacionadas produzem tipos de compostos fenólicos semelhantes, torna-se importante o conhecimento da composição química das diferentes espécies de uva, para desta forma ser obtida uma base de dados a qual pode ser importante e relevante para a identificação química do vinho produzido a partir de uma dada espécie.

A determinação da relação existente entre a composição fenólica e a qualidade do vinho é também um dos maiores desafios de investigação em enologia. A composição fenólica depende fundamentalmente do tipo de uva, dos factores varietais, das condições de fabrico e da fermentação do vinho e também do envelhecimento.

Os compostos fenólicos são hoje em dia considerados importantes componentes da dieta devido aos seus efeitos benéficos na Saúde. A estes compostos estão associadas propriedades, antialérgicas, anti-inflamatórias tendo sido já demonstrado a existência de efeitos inibitórios a nível da mutagénese e da carcinogénese [1, 7- 12].

Aos compostos fenólicos são atribuídas propriedades antioxidantes as quais estão relacionadas com a sua capacidade de doar hidrogénios ou electrões e com a estabilidade dos radicais fenoxilo resultantes [13-14]. Estes compostos reagem com radicais livres formados durante os processos de oxidação, *e.g.* radicais alquilo ($R^{\bullet}$), peroxilo ($ROO^{\bullet}$) e alcoxilo ($RO^{\bullet}$), actuando como "chain-breakers" através de um mecanismo anti-radicalar [15-16]. No entanto, outros mecanismos de acção podem estar envolvidos nesta actividade, como por exemplo, a complexação de metais de transição, como o cobre ou ferro, os quais são agentes catalisadores dos processos oxidativos [17].

No sentido de contribuir para um melhor conhecimento das propriedades dos compostos fenólicos existentes na uva e no vinho foi efectuado neste trabalho um estudo visando a avaliação das suas constantes de dissociação e capacidade de complexação do cobre (II). De entre a diversidade química existente neste tipo de matriz seleccionou-se, para este trabalho, quatro tipos de compostos, um derivado do feniletanol, (o tirosol), um ácido cinâmico (ácido 4-hidroxicinâmico) e dois flavonóides (a catequina e a taxifolina). O trabalho desenvolvido poderá contribuir a longo prazo para um conhecimento do papel dos compostos fenólicos da uva e do vinho *in situ* e das propriedades biológicas a eles associados.

2. Composição fenólica não volátil da uva e do vinho

Existe uma grande diversidade química na composição fenólica não volátil da uva e do vinho. A complexidade química existente ocorre não só pela variedade química das classes de compostos, mas também porque estes estão presentes quer na forma livre quer na forma conjugada. Os compostos fenólicos podem estar ligados a uma ou mais unidades de açúcar (por exemplo a glucose, a galactose, a sacarose e a ramnose) estando já identificados os mono, di-, tri- ou tetraglucosídeos [18].

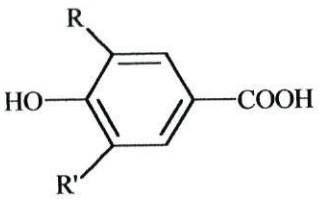
Os compostos fenólicos não voláteis podem ser agrupados nas seguintes classes: ácidos fenólicos, flavonóides, derivados do fenilpropanol, taninos, estilbenos e, cumarinas. No entanto neste trabalho somente serão evidenciadas as classes de compostos acerca dos quais foi efectuado o estudo experimental. As restantes classes foram abordadas num trabalho de revisão anterior [19].

2.1.Ácidos fenólicos

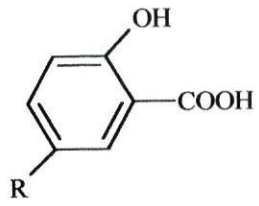
Os ácidos fenólicos são classicamente divididos em dois grupos: os ácidos benzóicos, que possuem na sua estrutura 7 átomos de carbono (C6-C1) e os ácidos cinâmicos, os quais correspondem a estruturas com 9 átomos de carbono (C6-C3). Estes compostos existem predominantemente na sua forma hidroxilada daí se designarem vulgarmente por ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos, respectivamente. Os ácidos fenólicos podem existir na sua forma livre e/ou conjugada (esterificada) [20].

2.1.1. Ácidos hidroxibenzóicos

Na uva e no vinho foram caracterizados diversos tipos de ácidos hidroxibenzóicos (AHB), dos quais se salienta o ácido *para*-hidroxibenzóico, o ácido protocatequíco, o ácido vanílico, o ácido gálhico, o ácido siríngico, o ácido salicílico e o ácido gentísico (Figura 1.1.).



R=R'=H; ácido *p*-hidroxibenzóico
R=OH, R'=H; ácido protocatequíco
R=OCH_3 , R'=H; ácido vanílico
R=R'=OH; ácido gálhico
R=R'=OCH_3; ácido siríngico



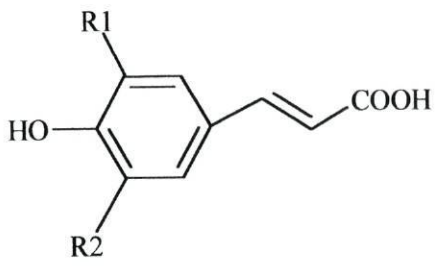
R=H; ácido salicílico
R=OH; ácido gentísico

Figura 1.1. - Estrutura química de ácidos hidroxibenzóicos existentes na uva e no vinho.

2.1.2. Ácidos hidroxicinâmicos

Os ácidos hidroxicinâmicos (AHC) são uma das maiores classes de compostos fenólicos, do tipo não flavonóides, existentes nas uvas e no vinho [21].

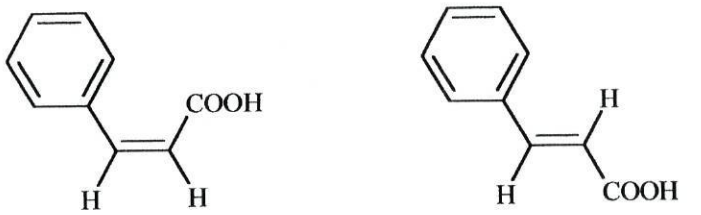
A título de exemplo refere-se alguns dos mais citados na literatura como o ácido *para*-cumárico, o ácido cafeico, o ácido ferúlico e o ácido sinápico (Figura 1.2.). Estes ácidos cinâmicos estão envolvidos em reacções de escurecimento do vinho e do mosto, sendo descritos como percursores de compostos fenólicos voláteis [21].



R1=R2=H; ácido *p*-cumárico
R1=OH, R2=H; ácido cafeico
R1=OCH_3, R2=H; ácido ferúlico
R1=R2=OCH_3; ácido sinápico

Figura 1.2. - Estrutura química de ácidos hidroxicinâmicos presentes na uva e no vinho

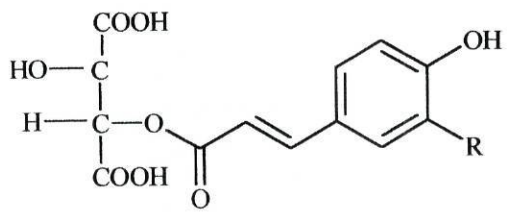
Os ácidos cinâmicos podem existir sob duas formas isómericas: o isómero *cis* e o *trans*, devido à presença de uma dupla ligação na cadeia lateral (Figura 1.3.). Estas duas formas são interconvertíveis sob acção da luz solar ou por via enzimática. A forma *trans* é mais estável, sendo a que ocorre com maior frequência na Natureza.



Ácido *cis*-cinâmico Ácido *trans*-cinâmico

Figura 1.3. - Isómeros *cis* e *trans* do ácido cinâmico.

Os ácidos hidroxicinâmicos de origem natural existem normalmente conjugados, sob a forma de ésteres, cuja unidade base é o ácido quínico ou a glucose. No entanto, na uva, os derivados anteriormente referidos não se encontram presentes ocorrendo predominantemente a formação de ésteres a partir do ácido tartárico. Estes são designados genericamente como ésteres hidroxicinamoiltartáricos (Figura 1.4.) [18].



R=H; ácido *p*-cumaroiltartárico (ácido cutárico)
R=OH; ácido cafeoiltartárico (ácido caftárico)
R=OCH_3; ácido feruoiltartárico (ácido fertárico)

Figura 1.4. - Estrutura química de ácidos hidroxicinamoiltartáricos.

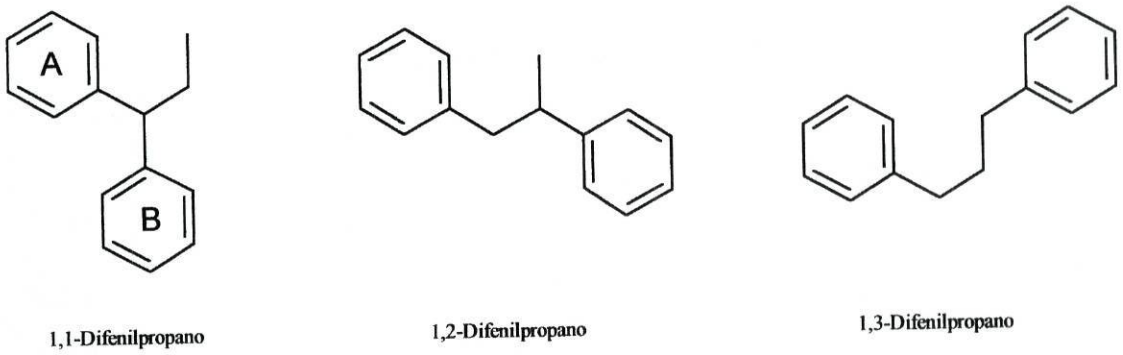
Estes ácidos contribuem para a adstringência da uva e do vinho. No caso da *Vitis vinifera* as percentagens de ésteres *p*-cumaroil e cafeioiltartáricos podem ser usados para diferenciar diferentes variedades sendo por isso descritos como marcadores taxonómicos quer da uva quer do vinho [22]. Embora os vinhos brancos possuam um teor em compostos fenólicos relativamente baixo, quando comparado com os vinhos tintos, estes contêm uma percentagem relativamente elevada de ácidos hidroxicinamoiltartáricos, nomeadamente de ácido caftárico.

Durante a fermentação ocorre hidrólise parcial deste tipo de ésteres ocorrendo a formação de ácidos hidroxicinâmicos livres os quais durante o processamento são transformados nos seus ésteres etílicos, como por exemplo o etilcumarato e o etilcafeiato [23].

2.2. Flavonóides

Os compostos fenólicos mais largamente distribuídos são os flavonóides [24]. Estes são um grupo de compostos polifenólicos com estrutura química e características variadas que se encontram nas plantas, tendo sido identificados mais de 4000 tipos diferentes de flavonóides.

Os favonóides pertencem a uma família química cujo esqueleto base é constituído por 15 átomos de carbono englobando dois anéis aromáticos (A e B) ligados por uma cadeia de três átomos de carbono (C6-C3-C6) a qual pode, ou não, formar um terceiro anel (Figura 1.5.). Este tipo de estrutura e a disposição desta cadeia central é responsável pela diversidade de compostos que integram os flavonóides (Figura 1.5.). Em cada um destes casos poderão ainda existir outros tipos de ligações envolvendo um hetero-átomo, geralmente oxigénio, com a formação de um anel heterocíclico de cinco ou seis lados.



1,1-Difenilpropano 1,2-Difenilpropano 1,3-Difenilpropano

Figura 1.5. - Estruturas químicas de 1,1-, 1,2- e 1,3-difenilpropanos.

Actualmente os flavonóides são divididos em várias classes, as quais diferem fundamentalmente no grau de oxidação do anel central de pirano, excepto no caso das chalconas (Figura 1.6). De acordo com a unidade estrutural básica, podem ser dadas várias designações sistemáticas aos flavonóides.

Na designação de flavonóides estão incluídos diferentes tipos de compostos como por exemplo as flavonas (Figura 1.6.A), os flavonóis (Figura 1.6.A), as flavanonas (Figura 1.6.B), as flavanas (Figura 1.6.C), os flavanóis (Figura 1.6.C), as antocianidinas e antocianinas (Figura 1.6.E) e as chalconas e di-hidrochalconas (Figura 1.6.D) [25- 27].

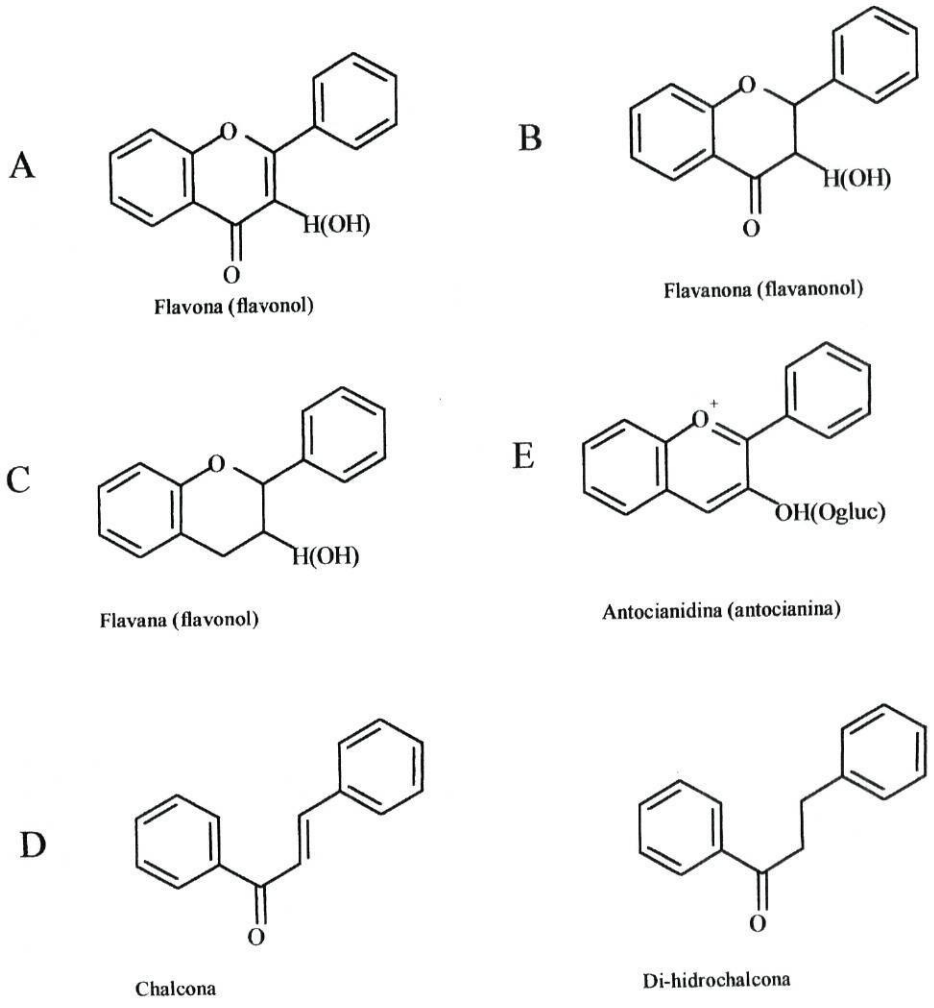
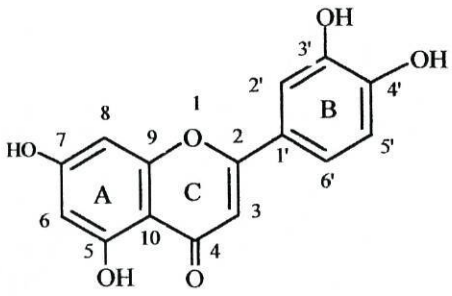
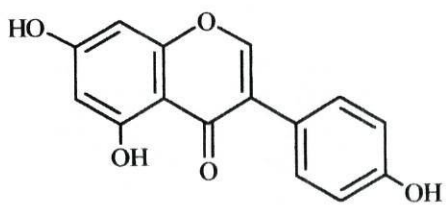


Figura 1.6. - Exemplos de estruturas de flavonóides [25, 28].

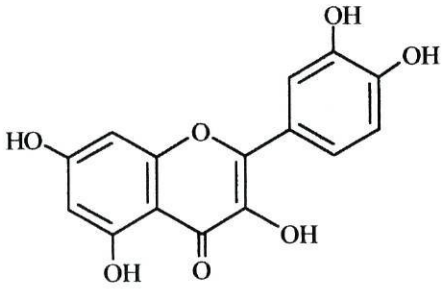
Nas figuras 1.7. e 1.8. indica-se a título de exemplo alguns flavonóides existentes na uva e no vinho. A numeração da estrutura flavonóica recomendada pela IUPAC está representada na figura 1.7..



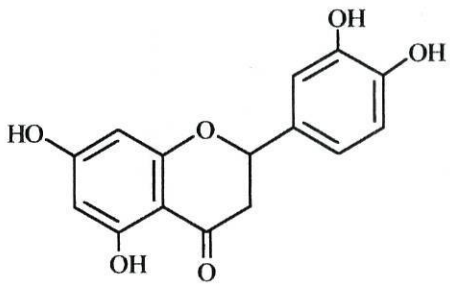
Luteolina **(Flavona)**



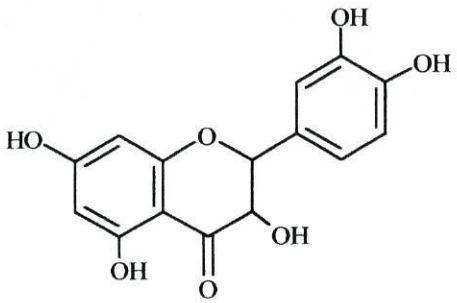
Genisteina **(Isoflavona)**



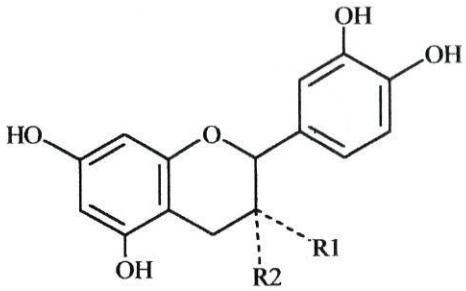
Quercetina **(Flavonol)**



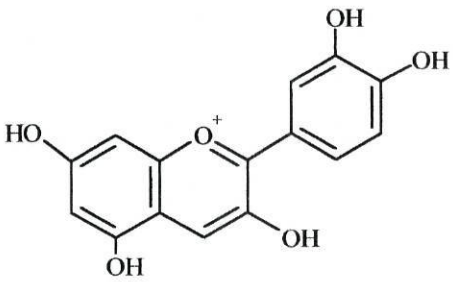
Eriodicitol **(Flavanona)**



Taxifolina **(Flavanonol)**

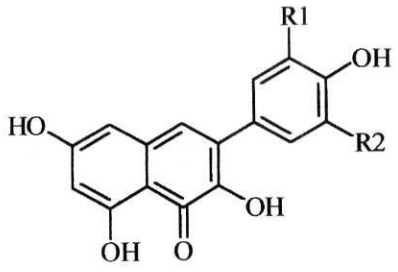


R1=OH Catequina **(Flavanol)**
R2=OH Epicatequina



Cianidina **(Antocianidina)**

Figura 1.7. - Exemplos de flavonóides que ocorrem na uva e no vinho.



R1=H, R2=H; Quenferol
R1=OCH_3, R2=H; Isorametina
R1=OH, R2=OH; Miricetina

Figura 1.8. - Estrutura de flavonóis existentes na uva e no vinho.

Os flavonóides podem existir na forma livre ou combinada. Este tipo de compostos encontram-se muitas vezes esterificados com um açúcar(es), através de um ou mais grupos hidroxilos (*O*-glucosídeos; gluc). A ligação formada é do tipo hemiacetal, sendo susceptível de ser destruída por hidrólise ácida.

A *O*-glucosidação pode-se dar em qualquer grupo hidroxilo do flavonóide, mas geralmente ocorre no OH existente na posição C7 das flavonas e flavanonas, quer nos grupos OH em C3 e C7 dos flavonóis e flavanonóis ou nos grupos OH nas posições C3 e C5 das antocianidinas [29].

Existem no entanto outros derivados em que a ligação do açúcar ocorre através de uma ligação C-C (C-glucosídeos) directamente no núcleo flavónico. Estes compostos mais resistentes às condições hidrolíticas que os O-glucosídeos.

A glucosilação é um processo que ocorre na Natureza para tornar o flavonóide menos reactivo e mais hidrossolúvel. O tipo de açúcar envolvido na ligação glucosídica pode ser de natureza diversa, como por exemplo, a glucose, a galactose, a ramnose, a xilose e a arabinose. No entanto nos C-glucosídeos o açúcar mais frequente na ligação é a glucose.

Perante a diversidade química desta família de compostos surgiram na literatura diferentes classificações, para agrupar os compostos. De realçar que há autores que os

dividem em três grandes grupos: os flavonóides glucosilados, as aglíconas flavonóides e os glucosídeos das antocianidinas (antocianinas) [26].

A diversidade *versus* complexidade química dos flavonóides está relacionada principalmente com a variedade de aglíconas e do número de glucosídeos possíveis, e também com a possibilidade da sua condensação originando moléculas mais complexas.

A condensação pode levar à formação de dímeros e polímeros, sendo os flavonóides poliméricos estruturas heterogénicas que correspondem à maior fracção de fenóis totais encontrados em todos os estágios da produção do vinho. Esta polimerização leva à formação dos taninos [30].

Neste trabalho optou-se por apresentar outra classificação, considerando-se pertinente referir, de um modo sistematizado, as diferentes classes deste tipo de compostos, sendo só descritos aqueles que foram identificados na uva e no vinho.

2.2.1. Flavonas

As flavonas (Figura 1.6.A) são caracterizadas por possuírem uma dupla ligação entre C2 e C3, e ausência de um grupo hidroxilo na posição C3. Os compostos pertencentes a esta classe são referidos como tendo um papel importante a nível fisiológico e farmacológico, para além de um significado quimiotaxonómico relevante. [31]. As flavonas estão amplamente distribuídas nas plantas superiores sob a forma de aglíconas ou glucosídeos, não sendo contudo um grupo químico significativamente presente na uva. A luteolina é a flavona mais referida neste sistema biológico (Figura 1.7.).

As isoflavonas são isómeros das flavonas nas quais o anel aromático B está na posição C3, sendo a genisteína um flavonóide deste tipo já identificado na uva e no vinho (Figura 1.7.).

2.2.2. Flavanonas

As flavanonas (Figura 1.6.B) possuem uma cadeia saturada entre C2-C3, sendo muitas vezes designadas por analogia com o grupo anterior de di-hidroflavonas [31] A título de exemplo cita-se o eriodicitol (Figura 1.7.).

2.2.3. Flavonóis

Os flavonóis (Figura 1.6.A) são caracterizados por possuírem uma dupla ligação entre C2-C3 e um grupo hidroxilo em C3, sendo muitas vezes designados por 3-hidroxiflavonas [32].

Estes compostos diferem entre si no tipo e número, de hidroxilação existente nos anéis A e B. Aproximadamente 90% dos constituintes deste grupo são hidroxilados em C5-C7 sendo conhecidos por derivados 3,5,7-tri-hidroxilados. Na uva foram caracterizados glucosídeos das seguintes aglíconas: quercetina (3',4'-diOH), quenferol (4'-OH), isorametina (3'-MeO da quercetina) e miricetina (3',4',5'-triOH) (Figuras 1.7. e 1.8.). A presença simultânea das quatro aglíconas foi detectada em diferentes tipos de vinho tinto proveniente de *Vitis vinifera*. No vinho branco foram somente detectadas a quercetina e o quenferol [31].

Existem várias formas conjugadas desta classe de compostos sendo a maior percentagem *O*-glucosídeos, *O*-sulfatos e compostos que possuem na sua estrutura açúcares acilados com ácidos alifáticos ou aromáticos [18].

2.2.4. Flavanonóis

Os flavanonóis (Figura 1.6.B) apresentam um grupo hidroxilo em C3 e não possuem a dupla ligação no anel heterocíclico, sendo também referidos como 3-hidroxiflavanonas ou di-hidroflavonóis. A taxifolina é um dos compostos desta classe mais citados na literatura (Figura 1.7.).

Os flavanonóis apresentam dois átomos de carbono assimétricos em C2 e em C3, permitindo a existência na Natureza de isómeros ópticos [31].

2.2.5. Flavanas

As flavanas (Figura 1.6.C) são flavonóides caracterizados por possuírem uma cadeia saturada entre C2-C3 e ausência do grupo carbonilo em C4 .

2.2.6. Flavanóis

Os flavanóis (Figura 1.6.C) possuem uma cadeia saturada entre C2-C3, ausência do grupo carbonilo em C4 e presença de um grupo hidroxilo em C3.

Existem na Natureza os flavan-3-óis e os flavan-3,4-dióis, sendo estes últimos encontrados frequentemente na madeira e nas cascas das árvores, aparecendo raramente nas frutas (Figura 1.9.).

Os flavan-3-óis ou flavanóis mais representados na Natureza são a catequina e o seu isómero óptico a epicatequina (Figura 1.7.).

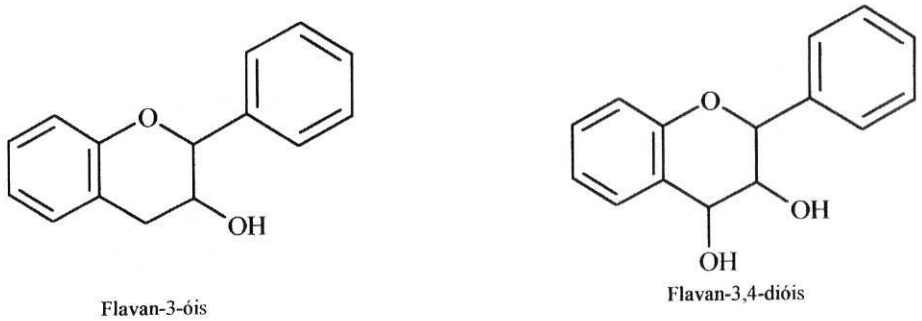
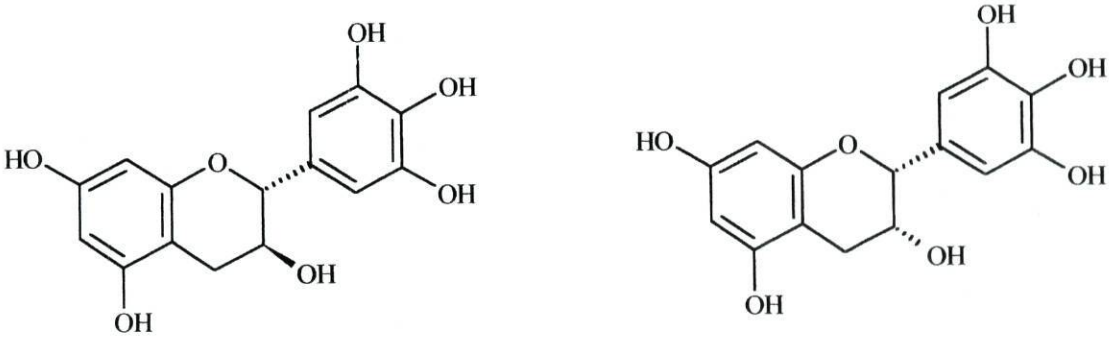


Figura 1.9.- Estrutura de flavan-3-óis e flavano-3,4-dióis.

Estes compostos existem na pele e sementes da uva fazendo parte integrante do vinho. Em vinhos brancos produzidos com limitação de contacto com a pele das uvas verifica-se que o flavonóide mais representado é a catequina, contribuindo este composto

significativamente para o seu sabor [30]. Alguns derivados da catequina foram identificados na uva e no vinho, nomeadamente a galhocatequina e a epigalhocatequina (Figura 1.10.) [32].



(+)-galhocatequina

(-)-epigalhocatequina

Figura 1.10. Estrutura química da galhocatequina e epigalhocatequina.

2.2.7. Chalconas e di-hidrochalconas

As chalconas são flavonóides caracterizados por possuírem os anéis aromáticos A e B ligados por um sistema carbonílico α,-β-insaturado (Figura 1.6.D).

As di-hidrochalconas estão directamente relacionadas com as chalconas, visto poderem ser obtidas a partir destas por redução do sistema carbonílico α,-β-insaturado (Figura 1.6.D).

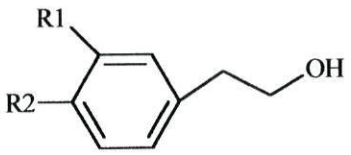
2.3. Derivados do feniletanol

Os derivados do feniletanol são compostos que possuem, na sua estrutura, oito átomos de carbono (C6-C2) estando descritos como exemplos típicos o 3,4-dihidroxifeniletanol (hidroxitirosol) e o 4-hidroxifeniletanol, conhecido vulgarmente por tirosol (Figura 1.11.).

Estes álcoois superiores são formados durante o processo de fermentação a partir de aminoácidos. O tirosol é um álcool fenólico existente no vinho sendo produzido por

leveduras a partir da tirosina por leveduras no decurso da fermentação (Figura 1.11.) [20].

A quantidade de tirosol presente no vinho não depende do tipo nem da sua idade [33- 36].



R1=H; R2=OH Tirosol

R1=OH; R2=OH Hidroxitirosol

Figura 1.11. - Estrutura química de derivados de feniletanol.

De salientar que, como foi referido anteriormente, estes compostos são provenientes da actividade microbiana a qual contribui de uma forma indirecta, para que o tipo e teor de compostos fenólicos do vinho seja diferente do da uva.

3. Biossíntese dos compostos fenólicos

Os compostos identificados em diferentes tipos de vinhos reflectem claramente o tipo de uva que lhe deram origem. Seguindo a sua biossíntese eles são geralmente agrupados em duas grandes classes de metabolitos: os metabolitos primários e os metabolitos secundários. Entre os metabolitos secundários, os compostos fenólicos são de longe os mais importantes do ponto de vista enológico, tendo também actualmente um impacto positivo na saúde dos consumidores.

É frequentemente referido na literatura a sua localização preferencial na uva: os ácidos fenólicos estão presentes nos vacúolos e nas paredes celulares, e o ácido gálhico e os flavonóides nas sementes. Os ácidos fenólicos do tipo benzóico e cinâmico e, os flavonóides, os estilbenos e as antocianinas (só presentes nas uvas pretas) estão também localizados na pele. Na polpa da uva encontram-se predominantemente os flavonóides e os ácidos fenólicos do tipo benzóico [37].

A biossíntese dos ácidos cinâmicos ocorre via xíquimato a partir da fenilalanina. Este aminoácido é convertido em ácido *trans*-cinâmico, após um processo de eliminação enzimática de amónia [25]. Os outros ácidos cinâmicos são formados a partir deste por processos de hidroxilação e O-metilação (Figura 1.12.).

Os ácidos cinâmicos são actualmente considerados como os precursores biossintéticos das diferentes famílias químicas referidas ao longo do ponto 2., sendo este o motivo principal porque os compostos fenólicos referidos anteriormente foram identificados na uva e no vinho [38]. Os ácidos cinâmicos são o ponto de partida biossintético, no que diz respeito ao metabolismo dos compostos fenólicos nas plantas, obtendo-se a partir deles através de diferentes reacções, *e.g.* hidroxilações, interconversões, conjugações, polimerizações e degradações, outro tipo de compostos.

Assim os produtos desta inter-relação biossintética são diferentes compostos fenólicos como por exemplo os ácidos benzóicos, os ácidos cinâmicos, os flavonóides, etc. (Figura 1.12.).

De salientar que biossinteticamente estão descritos processos de conjugação, como por exemplo de glucosilação, os quais são importantes fisiologicamente visto

permitirem uma maior solubilidade e estabilidade dos compostos, convertendo-os em formas mais adequadas ao armazenamento.

A via mista do xiquimato/acetato na qual estão envolvidas unidades fenilpropanóide e acetato é proposta para a família dos flavonóides e antocianinas. Basicamente o anel A é formado por condensação de três unidades acetato provenientes da malonil-CoA, enquanto que o anel B e os átomos 2, 3 e 4 do anel C são formados a partir do precursor fenilpropanóide (Figura 1.13.) [18, 27, 39].

Todos os compostos fenólicos referidos anteriormente têm uma inter-relação biossintética bem definida, a qual justifica a sua presença e, também, a sua localização preferencial, que de uma forma sistematizada, como foi referido, está expressa nas figuras 1.12. e 1.13..

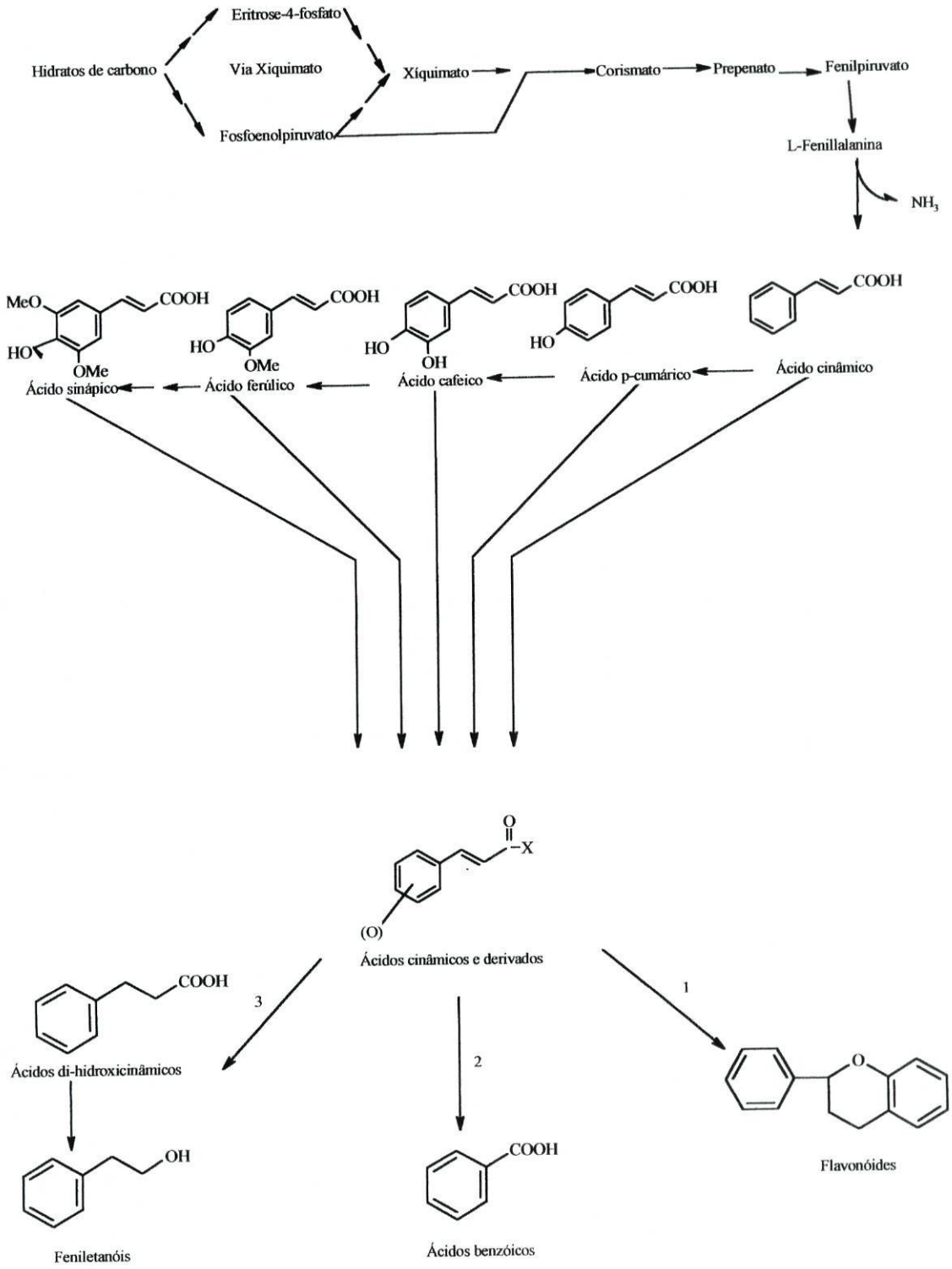


Figura 1.12. - Inter-relação biossintética dos compostos fenólicos

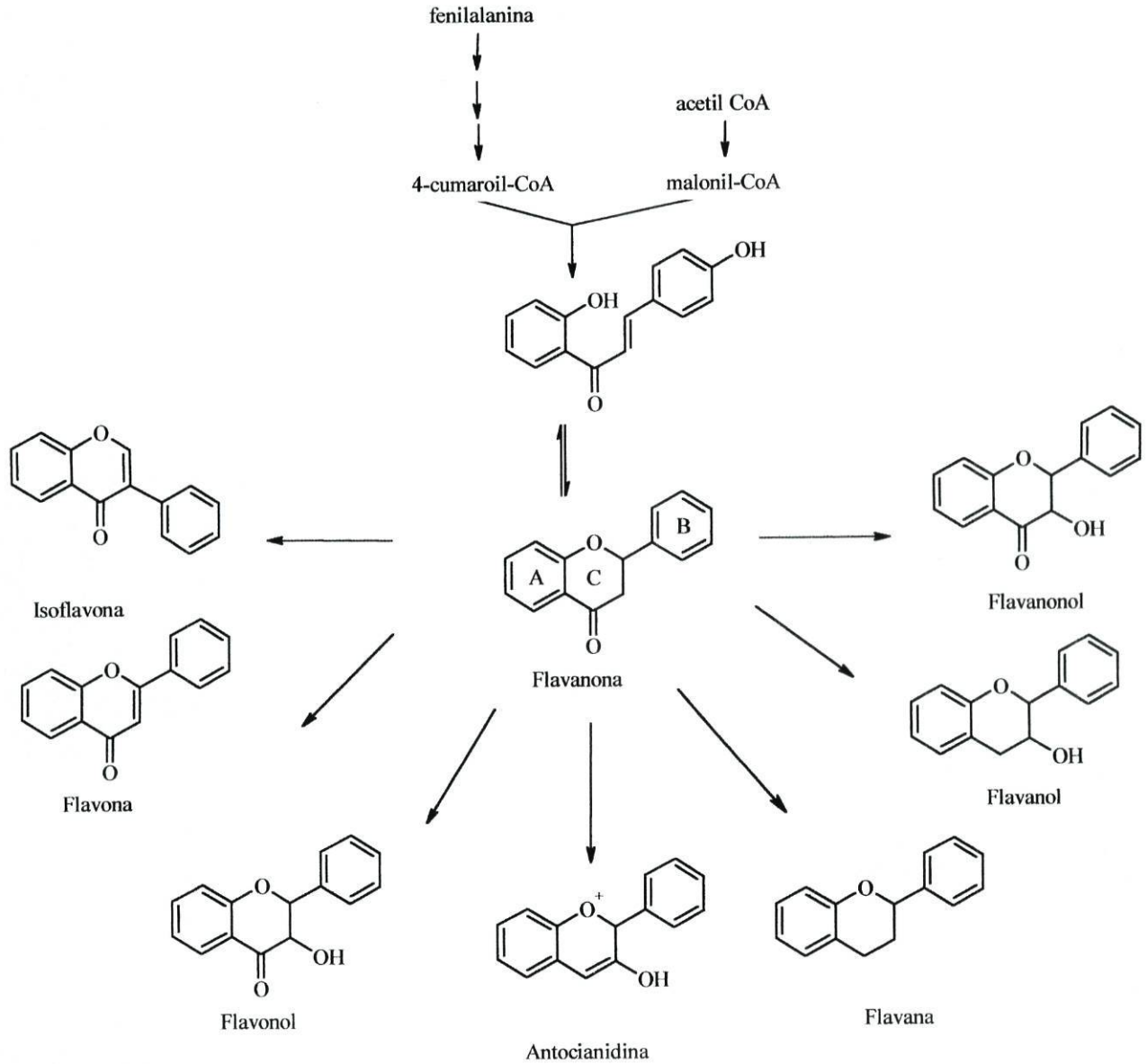


Figura 1.13. - Via biossintética proposta para as várias classes de flavonóides [40].

4. Compostos fenólicos e a Saúde

Os compostos fenólicos constituem um dos grupos de compostos naturais com maior incidência de estudos na área da Saúde. Estes compostos ocorrem predominantemente nas plantas superiores, principalmente nas folhas, flores e frutos, mas também surgem nos produtos processados [11, 41].

Os estudos efectuados relativos à relação da dieta-Saúde têm demonstrado que uma alimentação equilibrada pode ser a base para a prevenção de determinadas doenças. Na verdade, pesquisas efectuadas permitiram concluir que o vinho, como componente habitual da dieta, pode prevenir doenças do foro cardiovascular como a arteriosclerose, a qual é uma das maiores causas de morte nas civilizações modernas. No entanto, será de realçar que esta temática é, ainda hoje, alvo de controvérsia na comunidade científica [41-42].

Muitas e variadas funções têm sido demonstradas e/ou propostas para os compostos fenólicos *in situ*, tais como: agentes fotoprotectores de radiações ultra-violeta, agentes de controlo de hormonas, etc.. Os compostos fenólicos, uma vez que interagem com enzimas e, deste modo, com processos biológicos da célula, podem também exibir outras funções biológicas e farmacológicas. Assim, para vários compostos fenólicos têm sido descritos diferentes propriedades, das quais se salientam, devido ao extensivo estudo efectuado, a actividade em relação à protecção cardiovascular, a actividade anticancerígena e a actividade antimicrobiana. Outros efeitos biológicos, para além dos referidos, estão descritos para este tipo de compostos tais como a actividade antioxidante, a actividade anti-inflamatória, a actividade anti-alérgica, a actividade antimutagénica e a actividade anti-hemorrágica [1, 10, 27, 29, 43- 46].

4.1 Compostos fenólicos e as doenças cardiovasculares

O consumo de vinho e de outras bebidas alcoólicas está actualmente associado a uma considerável redução no risco de doenças coronárias e outras doenças do foro cardiovascular [8, 10, 44, 47- 58]. Existem actualmente evidências que permitem concluir que o consumo moderado de álcool reduz o risco de doenças cardiovasculares. A acção biológica referida relaciona-se fundamentalmente numa protecção do organismo em relação ao ataque cardíaco, traduzindo-se no aumento das lipoproteínas de alta densidade (HDL) e numa diminuição das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) [8, 30, 47, 59].

O efeito protector do vinho é parcialmente atribuído ao etanol, que é um dos componentes maioritários, mas também à presença de compostos do tipo fenólico, aos quais estão também atribuídas propriedades antioxidantes. Nomeadamente no que se refere aos vinhos tintos está demonstrado que o seu teor de polifenóis, o qual inclui os flavonóides monoméricos, os ácidos fenólicos, as procianidinas e os taninos poliméricos, é responsável pelo efeito protector observado [44, 47, 60-61].

A modificação oxidativa das LDL está também implicada na formação da placa aterogénica, sendo esta uma das maiores causas de doenças coronárias. Os compostos fenólicos da dieta, devido às suas propriedades antioxidantes, protegem a oxidação das LDL ocorrendo desta forma uma protecção às doenças coronárias [10, 62-63]. Esta actividade protectora da oxidação das LDL está também associada a compostos fenólicos existentes nos vinhos tintos [44].

Vários estudos epidemiológicos evidenciam que um maior consumo de compostos fenólicos, como por exemplo, os flavonóides e ácidos cinâmicos nos alimentos, induz uma diminuição de doenças coronárias [2, 64].

4.2. Compostos fenólicos e a carcinogénese

A actividade biológica dos compostos fenólicos está também relacionada com os mecanismos que originam a carcinogénese, os quais estão intimamente relacionados com a presença de radicais livres e com os danos oxidativos que estes produzem nos lipídos, nas proteínas e nos ácidos nucleícos [1, 65].

Os compostos fenólicos, como por exemplo os flavonóides, os ácidos cinâmicos e o resveratrol, possuem propriedades antioxidantes tendo por isso um papel muito importante na prevenção deste tipo de doenças na medida que previnem ou minimizam a formação de radicais livres [60, 66- 71].

A uva e os produtos a partir dela processados, como por exemplo o vinho, contêm diversos tipos de compostos fenólicos cujas propriedades antioxidantes e efeitos protectores na carcinogénase estão já descritos na literatura [72-76].

4.3. Compostos fenólicos e as doenças infecciosas

A muitos dos compostos fenólicos referidos neste trabalho foram já atribuídas diversas actividades relacionadas com doenças do foro microbiológico, como por exemplo a antibacteriana, a antiviral e a antifúngica. A actividade antibacteriana foi atribuída a derivados do ácido cinâmico e a determinados flavonóides, e a actividade antiviral a procianidinas [60].

4.4. Actividade biológica de ácidos cinâmicos, de flavonóides e de derivados do feniletanol

- Os estudos da avaliação da actividade biológica de ácidos cinâmicos de origem natural, efectuados nesta última década, visaram fundamentalmente a procura de compostos com propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antitumorais e antimicrobianas.

A actividade antioxidante de diversos ácidos cinâmicos foi avaliada em relação à sua capacidade "scavenger" de radicais hidroxilo ($OH^{\bullet}$), peroxilo ($ROO^{\bullet}$) e superóxido ($O_2^{\bullet}$) [25].

Os antioxidantes pertencentes a esta família química, de origem natural, demonstraram também possuir efeitos antitumorais e quimiopreventivos [25].

O estudo da actividade antimicrobiana, nomeadamente a actividade antifúngica, foi efectuado para os ácidos clorogénico, cafeico, ferúlico, isoferúlico e análogos estruturais[25]. A avaliação da actividade colerética, colagoga e antiespasmódica de ácidos cinâmicos está também descrita na literatura.

Como nota final salienta-se que, para os ácidos cinâmicos e derivados, são atribuídas diversas propriedades alelopáticas [25].

- Os flavonóides constituem um dos grupos mais numerosos de compostos naturais heterocíclicos. Nas plantas superiores podem ocorrer em todos os órgãos das plantas, mas estão geralmente, mais concentrados nas folhas, flores e frutos.

Muitas e variadas funções têm sido demonstradas e/ou propostas para os flavonóides nas plantas. Estas funções incluem: (1) protecção das plantas contra radiações ultravioletas, contra insectos, vírus e bactérias; (2) atracção de polinizadores, contribuindo para a polinização directa e cruzada; (3) acção como antioxidantes; (4) controlo de hormonas de plantas; (5) inibição de enzimas; (6) acção como agentes aleloquímicos, etc [77].

Uma das funções mais importantes dos flavonóides nas plantas é atribuído à protecção que desempenham contra danos causados por microorganismos. Os flavonóides, devido às propriedades inerentes à sua boa capacidade de absorção na região

do ultravioleta, são capazes de exercer uma excepcional e efectiva protecção a biomoléculas vitais (tirosina, tiamina, NAD/NADP) as quais são susceptíveis de alteração devido à radiação ultravioleta.

Como os flavonóides são compostos fenólicos, eles podem reagir com as proteínas e, desse modo, podem interagir com determinadas enzimas podendo tornar-se tóxicos para certos microorganismos.

Os flavonóides, uma vez que interagem com enzimas e desse modo, com processos biológicos na célula, poderão ter potenciais aplicações farmacológicas. Para vários compostos deste grupo têm sido descritos diversos tipos de actividade, como por exemplo, as seguintes: antimicrobiana, citotóxica, anti-inflamatória, antivírica, anticancerígena e anti-hemorrágica.

No seguimento da sua aplicabilidade como fármacos, já existem alguns medicamentos, no mercado, à base de flavonóides. Estes são usados no tratamento de problemas circulatórios e da hipertensão.

É sabido que muitos flavonóides naturais se comportam como fitoalexinas. Partindo desse facto já foram encontradas para diversos compostos desta família actividades fungicida, bactericida e anti-vírica, podendo estes compostos vir a ter aplicações importantes como biocidas.

Vários investigadores sugeriram que uma das funções mais importantes dos flavonóides é o de funcionarem como antioxidantes naturais, quer na protecção de lípidos quer do ácido ascórbico.

O ácido ascórbico é um componente das células das plantas, o qual funciona como agente biológico de oxidação-redução, sendo facilmente oxidado a ácido desidro-ascórbico, sendo este regenerado após redução. Por esse facto, o ácido ascórbico actua, biologicamente, como transportador de electrões. Porém, o ácido ascórbico perde a sua actividade biológica quando o ácido desidro-ascórbico sofre oxidação degradativa, a qual é catalisada por iões metálicos ou por enzimas com grupos prostéticos que contenham iões metálicos. Vários flavonóides evitam ou minimizam esta degradação actuando como antioxidantes, provavelmente por remoção de iões metálicos por complexação.

Os flavonóides também apresentam actividade antioxidante em sistemas contendo lípidos oxidáveis, tais como, ácido linoleico e carotenos, actuando provavelmente como captadores de radicais livres.

Os flavonóides fazem parte da nossa dieta, calculando-se o consumo diário de várias gramas de flavonóides. Atendendo à actividade antioxidante e às características adoçantes de alguns flavonóides, tais compostos poderão vir a ter ainda um futuro promissor na indústria alimentar [77].

- Aos derivados do feniletanol, como por exemplo o tirosol, são atribuídas propriedades antioxidantes [78], nos quais se refere a inibição da peroxidação lipídica e a capacidade de "scavenging" de radicais livres [79]. A minimização da oxidação das lipoprotreinas de baixo peso molecular (LDL) [79] é também atribuída a este composto tendo sido descrito como um antioxidante preventivo em patologias associadas a doenças coronárias como a arteriosclerose [80].

5. Actividade antioxidante dos compostos fenólicos

5.1. Inibição da peroxidação lipídica

A oxidação lipídica é um processo espontâneo e dinâmico o qual evolui ao longo do tempo, constituindo a principal causa de deterioração dos corpos gordos (lipídos e matérias gordas) e de todos os produtos que a partir deles são formulados (*e.g.* alimentos, cosméticos, medicamentos) [81-82].

Os fenómenos de oxidação dos corpos gordos dependem de mecanismos reaccionais diversos e extremamente complexos, os quais estão relacionados com o tipo de estrutura lipídica e o meio onde esta se encontra. O número e a natureza das insaturações presentes, o tipo de interface entre os lípidos e o oxigénio (fase lipídica contínua, dispersa ou em emulsão), a exposição à luz, o calor, a presença de agentes pró-oxidantes (*e.g.* iões metálicos de transição) ou antioxidantes, são factores determinantes da estabilidade oxidativa dos lípidos [83-84].

Os ácidos gordos insaturados são o principal alvo da degradação oxidativa, a qual pode ocorrer por várias vias, em função do meio e dos agentes catalisadores.

A autoxidação lipídica é um fenómeno puramente químico e bastante complexo, envolvendo reacções radicalares capazes de auto-propagação. A sequência reaccional deste tipo de oxidação é classicamente dividida em três etapas [85]:

- **Iniciação**, durante a qual ocorre a formação de um radical lipídico ($L^{\bullet}$) após abstracção de um átomo de hidrogénio a partir de uma molécula de ácido gordo (in)saturado, por acção de um iniciador.

- **Propagação,** desencadeada pela reacção rápida dos radicais lipídicos com o oxigénio molecular originando a formação de radicais peroxilo ($LOO^{\bullet}$). Estes podem por sua vez reagir com novas moléculas de ácido gordo, com consequente formação de novos radicais lipídicos e de hidroperóxidos (LOOH). A quebra homolítica da ligação O-O dos hidroperóxidos pode

originar a formação de outras espécies radicalares, nomeadamente radicais alcoxilo ($LO^{\bullet}$) e hidroxilo ($^{\bullet}OH$).

- **Terminação,** a qual envolve a reacção entre dois radicais com formação de produtos não radicalares estáveis. Desta forma ocorre a interrupção da etapa de propagação.

A peroxidação lipídica pode ser iniciada quer pelo oxigénio quer por espécies reactivas de oxigénio ocorrendo neste processo a formação de radicais lipídicos e peroxílo, assim como de hidroperóxidos lipídicos. Estas reacções podem também ser catalisadas por metais de transição, nomeadamente pelo ferro e/ou cobre, os quais podem decompor os hidroperóxidos lipídicos e levar à formação de uma grande variedade de produtos, como por exemplo os compostos carbonílicos (Figura 1.14.) [86].

A fase de propagação pode ser terminada por processos de inactivação do tipo enzimático ou não enzimático, isto é, através da participação de enzimas ou de compostos que possuem actividade sequestrante de radicais livres, como por exemplo os antioxidantes [87].

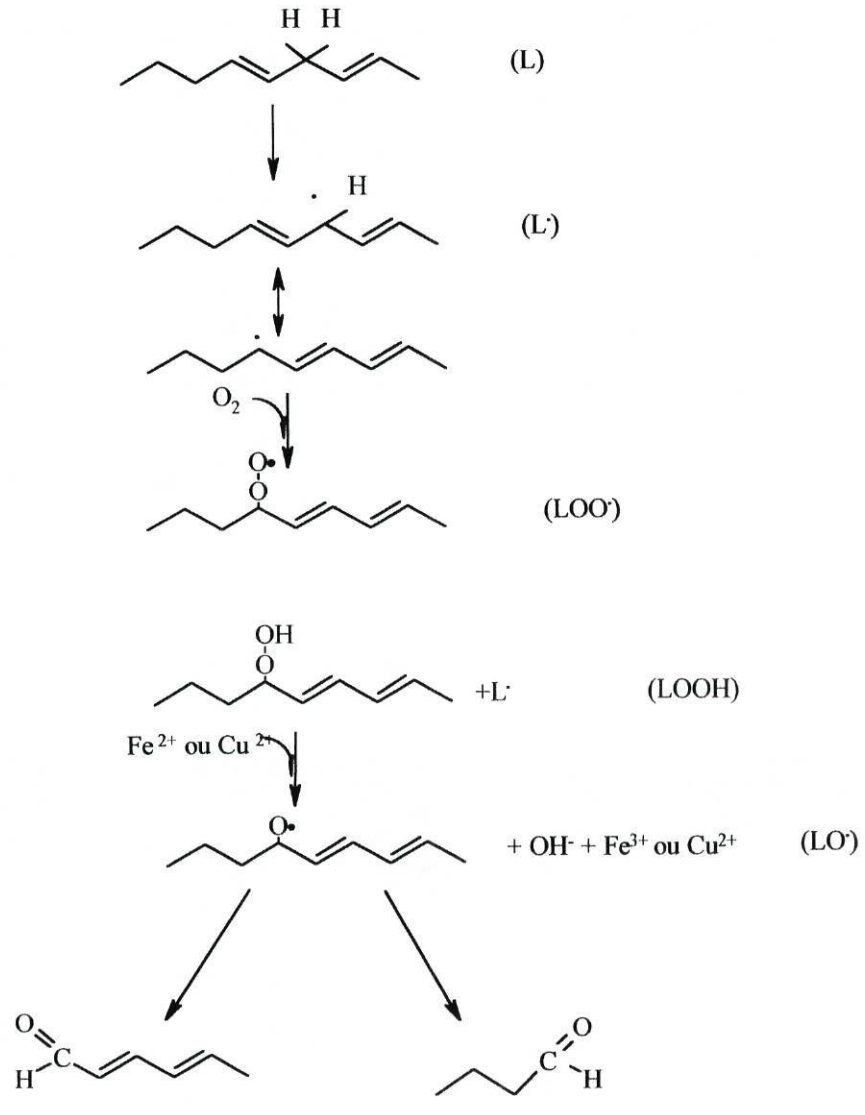


Figura 1.14. - Peroxidação lipídica de um lípido insaturado [86].

Embora a (auto)oxidação dos lípidos e a formação de radicais livres correspondam a fenómenos naturais que ocorrem ao nível dos sistemas biológicos, é do conhecimento geral que qualquer modificação no estado redox normal poderá conduzir a um aumento da concentração de radicais os quais podem originar danos oxidativos. O processo de peroxidação lipídica está relacionado com o envelhecimento da célula e diversas desordens patológicas, como a arteriosclerose e o cancro.

5.2. Mecanismo de acção dos antioxidantes

Os antioxidantes podem definir-se como substâncias que, numa concentração consideravelmente menor que a do substrato oxidável retardam o processo oxidativo, diminuindo a velocidade inicial da reacção ou prolongando o seu período de indução. Contudo este tipo de compostos não suprimem de forma definitiva o fenómeno da oxidação lipídica [81, 83, 88- 89].

De acordo com a sua função, os antioxidantes podem subdividir-se em primários ou terminadores de cadeia (chain-breaking), preventivos e secundários [58, 90].

Os antioxidantes primários ou terminadores de cadeia actuam ao nível das etapas de iniciação ou de propagação do processo de (auto)oxidação, promovendo o bloqueio das etapas radicalares. [91-92]. Os antioxidantes preventivos e secundários retardam a (auto)oxidação sem intervir directamente nas etapas atrás referidas.

Os antioxidantes podem exercer a sua actividade por mecanismos de acção diferentes, como por exemplo a nível radicalar (actividade anti-radicalar), através da complexação de metais pró-oxidantes (e.g. ferro e cobre) ou por uma acção complementar, isto é efectuando a regeneração de antioxidantes primários através da cedência de átomos de hidrogénio [90, 91].

Encontram-se descritos efeitos sinérgicos entre compostos antioxidantes primários e preventivos. O efeito sinérgico resulta da combinação dos respectivos mecanismos de acção e permite, em algumas situações, reduzir a dose eficaz dos antioxidantes primários e alargar o seu campo de aplicação [90, 91].

É interessante referir que algumas das propriedades farmacológicas dos compostos do grupo dos flavonóides e ácidos cinâmicos, têm sido relacionadas com a sua capacidade de captar radicais livres e inibir a peroxidação lipídica [87].

5.2.1. Actividade anti-radicalar

Embora o oxigénio seja um componente essencial aos organismos aeróbios, a formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) corresponde a um processo inevitável. Não obstante a sua formação ocorrer no decurso de processos biológicos normais, estas espécies representam uma ameaça para os sistemas biológicos vulneráveis, desempenhando um papel crucial em diversos processos de dano oxidativo.

Se as ROS não forem inactivadas, podem danificar outras biomoléculas como as proteínas, os hidratos de carbono, os lípidos e os ácidos nucleicos [93]. No sentido de minimizar os danos das ROS os seres vivos possuem um sistema antioxidante endógeno o qual opera de uma forma complementar sendo constituido por enzimas e compostos de natureza química diversa como a glutationa , vitamina E e a vitamina C [93].

O mecanismo de acção geralmente aceite para os antioxidantes endógenos e exógenos (AH) envolve a cedência de electrões ou átomos de hidrogénio aos radicais presentes *e.g.* radicais alquilo ($R^{\bullet}$), peroxilo ($ROO^{\bullet}$) e alcoxilo ($RO^{\bullet}$), os quais são convertidos em produtos mais estáveis RH, ROH e ROOH, respectivamente. Paralelamente ocorre a formação de novas espécies radicalares ($A^{\bullet}$) a partir das moléculas de antioxidante (AH), as quais são suficientemente estáveis evitando/minimizando as etapas de iniciação e propagação da peroxidação lipídica [27, 91- 92, 94].

5.2.2. Complexação de metais de transição

Os compostos fenólicos possuem actividade antioxidante, como já foi referido anteriormente, visto sequestrarem as espécies reactivas do oxigénio como seja o radical hidroxilo, o anião superóxido, o radical alcoxilo, o radical peroxilo, etc actuando assim por um mecanismo do tipo "chain-breaking".

Está já descrito na literatura que os compostos fenólicos, nomeadamente os ácidos cinâmicos e flavonóides, podem complexar metais de transição, que são catalisadores de processos que dão origem ao "stress oxidativo" nos sistemas biológicos [27, 75].

A complexação de metais de transição (*e.g.* cobre e ferro) é um mecanismo que pode contribuir para a actividade antioxidante exercida por um composto. Estes compostos podem funcionar como ligandos devido a possuirem a capacidade de complexar com metais de transição evitando desta forma que funcionem como catalisadores de reacções de oxidação.

Os iões metálicos, a nível biológico, participam num número variado de processos fisiológicos (*e.g.* na geração do ATP, na função das hemoproteinas, como cofactores de diversas enzimas, como a SOD, o citocromo oxidase, a lisina oxidase, dopamina-β-oxidase e a ceruloplasmina, etc.) sendo também agentes catalíticos da formação de ROS. A título de exemplo cita-se a catálise efectuada pelo cobre na geração de $^{\bullet}OH$ em condições fisiológicas normais (reacção de Haber-Weiss).

$$Cu^{2+} + O_2^{\cdot -} \longrightarrow Cu^{+} + O_2$$

$$Cu^{+} + H_2O_2 \longrightarrow Cu^{2+} + OH + OH^{-}$$

$$O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \xrightarrow[\text{catalitico}]{\text{metal}} O_2 + {}^{\bullet}OH + OH^{-}$$

Como foi referido os iões de cobre são poderosos catalisadores de danos oxidativos efectuados pelos radicais livres quer convertendo H_2O_2 em $OH^{\bullet}$, quer decompondo os peroxidos lipídicos, ou catalisando a autoxidação de reacções de compostos endógenos, a oxidação do DNA [95, 96]. Os iões de cobre actuam principalmente na decomposição dos peróxidos lipídicos a radicais os quais podem ser responsáveis pela etapa de propagação:

$$LOOH + Cu^{2+} \longrightarrow LO^{\bullet}{}_2 + Cu^{+} + H^{+}$$

$$LOOH + Cu^{+} \longrightarrow LO^{\bullet} + Cu^{2+} + OH^{-}$$

O cobre pode também ser um agente catalítico na peroxidação das lipoproteinas de baixa densidade (LDL) [86].

Os catiões metálicos existentes no vinho podem ter origens diversas como, por exemplo, existirem naturalmente ou serem provenientes de processos de adição e/ou contaminação. A sua presença no vinho pode levar à precipitação do tartarato (K e Ca), à formação de depósitos (Al, Cu e Fe), ou à catalise de reacções de oxidação de compostos fenólicos (Cu e Fe) [24, 28]. A existência de cobre no vinho pode ser devida aos "sprays" usados no tratamento das vinhas, ao equipamento e à adição de sais de cobre nas operações da vindima [30]. Para níveis superiores a 9 mg/L, o cobre pode inibir ou atrasar o processo de fermentação alcoólica [30].

O estudo da natureza química dos compostos resultantes da interacção metal/polifenóis é considerado actualmente uma importante área de interesse em enologia. A presença de cobre é considerado um dos principais factores na formação de depósitos sendo este responsável pela precipitação de compostos fenólicos, particularmente de leucoantocianinas e epicatequina [24].

Capítulo II

Parte Experimental

2. Parte experimental

2.1. Introdução

A actividade biológica da maior parte das substâncias com interesse terapêutico depende das suas propriedades ácido-base, não só pelo facto de actuarem na forma neutra, ou na forma ionizada, mas também, porque o seu transporte através das membranas, depende da sua lipossolubilidade que é afectada pelo valor de pH do meio que por sua vez, condiciona o grau de ionização dos compostos [97].

A determinação das constantes de equilíbrio em solução é uma área da Química que tem sido largamente estudada, dado o seu interesse, não só do ponto de vista meramente químico, ao permitir conhecer as possíveis interacções entre as substâncias em solução e o seu comportamento como ácidos, bases ou complexos moleculares, mas também, pelo interesse que estas constantes, podem ter na resolução de problemas em outros campos da ciência, como por exemplo; na Farmacologia, na Biologia e na Bromatologia [98-99].

O estudo de sistemas em equilíbrio é baseado no conhecimento quantitativo das espécies presentes em solução, e, definido na constante de equilibro termodinâmica pela razão, entre as actividades dos produtos e dos reagentes do sistema.

O sistema químico é constituído por um conjunto de espécies sendo cada uma definida pelos coeficientes estequiométricos p, q, r, ...,(onde p corresponde ao ligando, q ao cobre(II) e r ao protão), e pelas correspondentes constantes de estabilidade. Neste trabalho nos casos em que há libertação de um protão o coeficiente estequiométrico que lhe corresponde é negativo (-1).

No entanto, o cálculo das constantes de equilíbrio termodinâmicas não é experimentalmente fácil de realizar. Sendo por isso usual a determinação de constantes de equilíbrio estequiométricas, ao utilizar-se um meio iónico inerte cujo electrólito de suporte possui uma concentração superior, de pelo menos cem vezes, às das espécies em estudo [100-102].

Assim, e como já se referiu, se se mantiver a força iónica constante com o recurso de um electrólito inerte, esta divisão deixa de ter sentido e as constantes de equilíbrio

passam a ser constantes estequiométricas, sendo necessário definir, de uma forma inequívoca, as condições experimentais utilizadas [103].

Para um sistema químico constituído pelos reagentes M, L, H,...., as reacções químicas em solução podem ser representadas de uma forma genérica pelo equilíbrio:

$$_pM + _qL + _rH + ... \rightleftharpoons M_pL_qH_r....$$

Para cada uma das espécies químicas em solução, $M_pL_qH_r....$, está associada uma constante de equilíbrio, $\beta_{pqr...}$, dada pelo coeficiente de concentrações:

$$\beta_{pqr...} = \frac{[M_pL_qH_r]}{[M]^p[L]^q[H]^r}$$

onde $[M],[L],[H],...$ são as concentrações livres dos reagentes M, L, H,... e p, q, r,...são os coeficientes estequiométricos das espécies que constituem o sistema.

2.2. Determinação potenciométrica das constantes de equilíbrio

As constantes de equilíbrio foram determinadas potenciometricamente com um eléctrodo de vidro a partir da variação da diferença de potencial (E) em função da concentração do protão (c_H) .

Quando se usa a potenciometria nos estudos de equilíbrio químico, é necessário utilizar um eléctrodo sensível a uma das espécies presentes, para medir, conforme as condições experimentais, actividades ou concentrações, pois a diferença de potencial estabelecida entre um eléctrodo sensível a uma espécie e um eléctrodo de referência, permite quantificar essa espécie livre em solução. Essa diferença de potencial é, porém, dependente das quantidades relativas em solução do ião principal e de outras espécies que possam estar presentes na solução.

O potencial de um eléctrodo de membrana está relacionado com a actividade de uma espécie X em solução através da equação de Nernst [101, 103-104]

$$E = K_1 + \frac{RT}{Z_X F} \ln a_X$$

onde K_1 engloba o potencial normal do eléctrodo indicador, o potencial do eléctrodo de referência e o potencial de junção líquida, expressos em mV, à temperatura T (em Kelvin), quando a actividade a_x é igual à unidade. F é a constante de Faraday ($9{,}64846\times10^4$ C mol^{-1}), R a constante dos gases (8,3144 J K^{-1} mol^{-1}) e z_x representa o número inteiro com o sinal e a grandeza igual à carga do ião x.

Relacionando a diferença de potencial criada entre os eléctrodos indicador e de referência com o logaritmo da actividade da espécie a determinar, é de esperar, em determinado intervalo de actividades, uma relação linear com um declive de 59,16 mV (ou submúltiplos) a 25 °C.

A actividade está estreitamente relacionada com a concentração através dos coeficientes de actividade e se estes forem mantidos constantes, pelo uso de um electrólito inerte em concentração adequada [104], a equação 1 assumirá a forma:

$$E = K + \frac{RT}{Z_X F} \ln c_X \qquad (1)$$

em que,

$$K = K_1 + \frac{RT}{Z_X F} \ln \gamma_X$$

A grandeza γ_x corresponde ao coeficiente de actividade da espécie x.

As equações anteriores evidenciam, que o potencial de qualquer eléctrodo depende da temperatura a que são efectuadas as determinações e consequentemente os valores das constantes de equilíbrio também dependem deste parâmetro, tornando-se

necessário estabelecer com rigor uma temperatura constante. Desta forma, todos os ensaios potenciométricios efectuados, foram sempre realizados numa célula termostatizada a 25,0±0,1°C.

A maneira como é efectuada a calibração dos eléctrodos e, portanto, a determinação experimental de K e de $\frac{RT}{z_X F}$, [104] é fundamental para a fiabilidade dos resultados experimentais. Dada a sua importância nos valores determinados para as constantes de equilíbrio e para a sua validação, a descrição pormenorizada da calibração do sistema é efectuada subsequentemente.

Neste trabalho, as determinações potenciométricas, foram efectuadas sempre utilizando eléctrodos indicadores sensíveis ao catião hidrogénio e por adição de base forte a soluções de amostra com concentrações conhecidas, dado que os compostos em estudo têm propriedades ácido-base fracas ou intermédias. Este método tem algumas limitações, uma das quais, quando se trabalha em zonas extremas de concentração de catião hidrogénio, para concentrações elevadas deste catião a protonação dos compostos é praticamente completa, o que torna impossível a determinação das concentrações livres das espécies existentes em solução, enquanto que para baixas concentrações deste catião a concentração das mesmas é insensível a variações deste catião.

Todas as titulações foram efectuadas sob atmosfera de azoto, previamente purificado, numa célula termostatizada de paredes duplas e em que a temperatura foi mantida constante a 25,0±0,1°C por recirculação de água. A descrição pormenorizada do sistema de titulação potenciométrica e do tipo de calibrações usadas é de seguida efectuada.

2.3. Sistema titulação

O aparecimento nos últimos anos de micro-computadores de baixo custo, tornou possível o desenvolvimento de sistemas automáticos de titulação muito mais versáteis e optimizados para tarefas de rotina ou para a aquisição de dados de sistemas simples.

Neste trabalho utilizou-se um sistema automático, representado na figura 2.1., constituido por um decimilivoltímetro Crison (mod. Micro pH 2002) uma microbureta Crison (mod. Micro BU 2031) com um êmbolo de capacidade de 2,5 cm^3, uma cuba de titulação termostatizada, um agitador magnético Crison (mod. 2038 micro ST) e um banho termostatizado modelo FAC Instruments (FA 90 Termostat Unit Performance).

Utilizou-se um eléctrodo de vidro marca Russel SWL e como eléctrodo de referência, o de dupla junção AgCl/Ag, da marca Orion 900029/4. No compartimento interno do eléctrodo de referência, usou-se a solução Orion 90-00-02 saturada com AgCl. Como solução externa do eléctrodo de referência empregou-se o electrólito de suporte usado como ajustador da força iónica das soluções a ensaiar (nitrato de potássio 0,10 mol dm^{-3}).

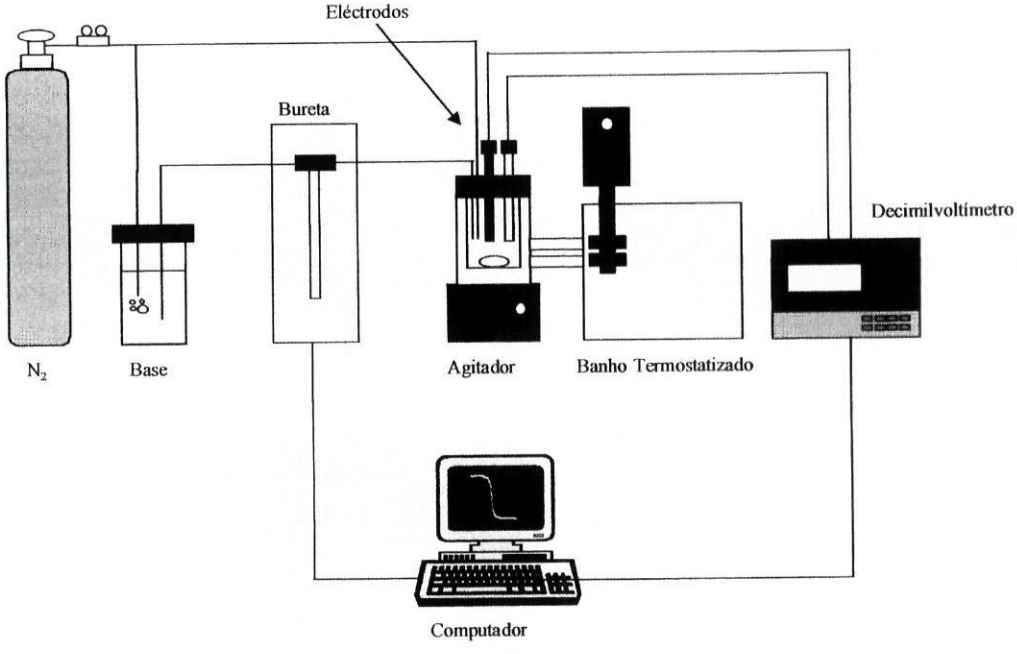


Figura 2.1. - Representação esquemática do sistema automático de titulação [105]

O sistema descrito pode ser utilizado para qualquer titulação potenciométrica, sendo apenas necessário usar o titulante e os eléctrodos adequados.

O sistema é comandado por um micro-computador Philips que permite o controlo das condições experimentais e a aquisição dos resultados, através de um programa escrito em linguagem BASIC e desenvolvido no Laboratório de Química-Física da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Este sistema está ainda ligado a um computador para o tratamento dos resultados obtidos nas calibrações efectuadas.

O programa de controlo tem várias opções de entrada, tornando-se necessário definir alguns parâmetros que condicionam as condições experimentais ou o tipo de controlo de leituras potenciométricas a registar, como sejam:

- Volume de amostra (cm^3)
- Concentração de titulante (mol dm^{-3})
- Volume da bureta (cm^3)
- Adições fixas ou variáveis
- Incremento de adições
- Volume total de titulante
- Potencial final
- Número de leituras
- Espera após a adição
- Adição inicial (cm^3)
- Filtro (%)

É possível, assim, escolher um entre dois tipos diferentes de adição de titulante. De facto, a adição de titulante pode ser efectuada por incrementos variáveis ao longo das determinações potenciométricas ou por incrementos constantes, fixando inicialmente o valor deste. No primeiro caso, após a adição de um volume inicial, previamente fixado, e da medição do potencial, os volumes a serem posteriormente adicionados são automaticamente calculados e inversamente proporcionais ao declive da curva, permitindo, desta forma, obter um maior número de pontos experimentais perto do ponto

de equivalência. No segundo caso, a primeira adição é fixada para toda a titulação e, consequentemente, a adição de volumes é sempre igual.

Em qualquer das situações experimentais, pode fixar-se um tempo de espera constante entre cada adição de volume e a respectiva leitura de potencial. Esta leitura de potencial só é aceite quando a diferença entre várias leituras do potencial (número este fixado inicialmente) de um dado ponto experimental é inferior a um critério de estabilidade do eléctrodo, previamente definido. Estas opções permitem contornar problemas de resposta e estabilidade do eléctrodo em certas soluções.

O fim de uma titulação potenciométrica pode também ser controlado, podendo fixar-se quer o volume máximo de titulante adicionado quer um determinado potencial máximo ou mínimo.

A representação gráfica da curva de titulação potenciométrica pode ser visualizada e acompanhada no monitor do computador. Quando a titulação termina, o programa permite o cálculo do volume equivalente pelo método da primeira e segunda derivadas e, ainda, da sua representação gráfica.

Os resultados experimentais assim obtidos são, posteriormente, tratados por um programa de regressão linear e escrito em QBASIC que permite o cálculo do volume equivalente, v_e, pelo método de Gran e dos parâmetros de calibração do eléctrodo, aplicando a equação de Nernst e/ou método de Gran [105-106].

2.4. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram usados sem qualquer purificação adicional e obtidos da seguinte forma: nitrato de cobre (II) da Orion, o ácido nítrico, o nitrato de potássio e o hidróxido de sódio da Riedel, o ácido 4-hidroxicinâmico e o tirosol da Aldrich e a catequina e taxifolina da Sigma. Todos os restantes reagentes referidos foram da marca Merck de qualidade pró-analise.

Todas as soluções foram preparadas com água bidesionizada apresentando condutividade inferior a 0,1 $\mu S\ cm^{-1}$.

A força iónica foi mantida constante, (I=0,10 mol dm^{-3}), sendo o nitrato de potássio o electrólito usado em todos os ensaios.

2.4.1. Solução de ácido nítrico

A solução de ácido nítrico 0,100 mol dm^{-3} (HNO_3) foi preparada por diluição de uma solução comercial concentrada (ampola de HNO_3 padrão) e armazenada em frasco de vidro escuro à temperatura ambiente. A partir desta solução, preparou-se, por diluição rigorosa, as soluções necessárias a cada caso de trabalho, mantendo-se sempre constante a força iónica a 0,10 mol dm^{-3} com KNO_3.

2.4.2. Solução de hidróxido de sódio

As soluções alcalinas para serem usadas como soluções padrão devem ser preparadas de forma a serem isentas de carbonato e protegidas do dióxido de carbono atmosférico [103].

O processo utilizado para preparar a solução de hidróxido de sódio isenta da carbonatos baseia-se na baixa solubilidade do carbonato de sódio em soluções concentradas [107]. Assim, preparou-se uma solução saturada de NaOH (cerca de 50% m/m), a partir da qual se conseguiu a solução isenta de carbonato, usando água aquecida à ebulição e arrefecida em corrente de azoto.

A solução saturada de hidróxido de sódio foi adicionada à água à temperatura ambiente, através de uma seringa com filtro, removendo-se assim, o precipitado de carbonato de sódio e obtendo-se uma solução ($\cong 2\times10^{-2}$ mol dm^{-3}). A força iónica foi mantida com KNO_3 a 0,10 mol dm^{-3}. A solução de NaOH é mantida em corrente de azoto. Este é purificado com uma solução alcalina de pirogalhol, de forma a remover o CO_2 e, posteriormente, humidificado, de modo a evitar o arrastamento da solução alcalina. Nestes procedimentos, recorre-se ao uso de dois frascos lavadores.

A solução de hidróxido de sódio assim preparada é padronizada por titulação potenciométrica com a solução de HNO_3 (1×10^{-3} mol dm^{-3}), pelo método de Gran [108], como descrito em 2.5..

A determinação do volume equivalente (v_e), numa titulação de uma solução padrão de ácido forte (ácido nítrico), com uma base forte (hidróxido de sódio) pode ser efectuada por métodos gráficos, como o de Gran [108-109] e, naturalmente, permite a padronização da base.

A partir da representação da diferença de potencial (E) em função do volume de hidróxido de sódio adicionado, pode obter-se representações da primeira derivada, $\frac{dE}{dV}$, (a curva apresenta um máximo no ponto de inflexão e que corresponde ao v_e), da 2ª derivada, $\frac{d^2E}{dv^2}$, (v_e corresponde ao volume para o qual a 2ª derivada se anula) e $\frac{dv}{dE}$ (a função apresenta um mínimo que corresponde ao valor de v_e) [109]. Para além do cálculo do volume equivalente, a derivação de E=f(v) também permite, de uma forma inequívoca, a detecção da presença ou não de carbonato neste tipo de soluções, que se traduz por dois máximos ou pontos de inflexão quando se usa o método de primeira e segunda derivadas no cálculo de v_e. Neste caso, é necessário obter experimentalmente muitos valores de diferenças de potencial junto do ponto de equivalência, o que é facilmente conseguido se for realizada uma titulação com incrementos de adição de volume de titulante variáveis, como é referido em 2.3.

O método de Gran também permite determinar a percentagem de carbonato presente na solução de hidróxido de sódio. De facto, a diferença entre os dois volumes equivalentes calculados respectivamente na zona ácida e na zona alcalina de titulação (ver 2.5.), reflecte, teoricamente, o carbonato presente na solução.

2.5. Calibração do sistema de titulação

Apesar da determinação de constantes de equilíbrio por potenciometria com eléctrodo de vidro sensível ao catião hidrogénio ser uma das técnicas analíticas mais generalizadas na determinação destas constantes, ainda existe uma enorme controvérsia sobre a forma mais adequada de calibrar este sistema.

Para que os valores das constantes de equilíbrio possam ser comparadas e possam ser usados, indubitavelmente, em trabalhos posteriores, é necessário fixar alguns parâmetros que possam influenciar a exactidão dos resultados. Um desses parâmetros é, como já se referiu, as condições de calibração dos eléctrodos, definindo, desta forma, o conceito do valor de pH medido e, naturalmente, o significado do valor das constantes determinadas.

Pode fixar-se três escalas operacionais de pH diferentes dependendo do processo de calibração utilizado [110-112]. Uma primeira pode ser definida como uma escala de actividades, em que se mede a actividade do catião hidrogénio, ao se calibrar os eléctrodos com padrões dos Estados Unidos (National Bureau Standards, NBS) ou outros similares e, desta forma experimental, torna-se possível eliminar os potenciais de junção. Uma escala prática que é obtida quando se usam eléctrodos de vidro combinados e estes são calibrados com tampões NBS ou outros semelhantes. Por fim, os eléctrodos de vidro podem ainda ser calibrados em termos da concentração de iões de hidrogénio, c_H . Foi este tipo de calibração efectuado em todo o trabalho aqui apresentado. Usou-se assim, uma escala de concentrações calibrando o sistema por titulação ácido forte/ base forte, definindo-se, assim, as leituras do decimilivoltímetro em termos de $-\log c_H$. O termo c_H é a concentração (c) do catião hidrogénio (H^+).

É de referir que sempre que se apresentam valores de pH determinados durante a execução dos trabalhos apresentados nesta dissertação refere-se a valores de $-\log c_H$ pelo que os dois termos poderão aparecer exactamente com o mesmo significado.

A comparação ou a própria utilização dos valores das constantes de equilíbrio obtidas por diferentes escalas de pH, só é possível se se recorrer a factores de conversão.

Por exemplo, as escalas de actividade e de concentração são convertíveis usando-se os coeficientes de actividade dos iões hidrogénio.

A calibração do eléctrodo de vidro com tampões comerciais de pH, é válida quando apenas é necessária uma escala relativa de acidez, mas não é, um procedimento ideal para a determinação de constantes de equilíbrio. Mesmo que se assuma uma relação matemática entre o pH definido e a actividade do ião hidrogénio num tampão será sempre difícil relacioná-los correctamente com a concentração do catião hidrogénio de uma solução amostra, como a que é utilizada na determinação das constantes de equilíbrio. De facto, devido às diferentes composições iónicas das soluções tampão e de estudo, o coeficiente de actividade do catião hidrogénio não é sempre o mesmo. Esta situação é agravada quando se usam concentrações elevadas de electrólito ajustador da força iónica das soluções.

Neste trabalho procedeu-se à calibração do sistema de titulação em termos da concentração do catião hidrogénio com força iónica ajustada.

As calibrações foram efectuadas utilizando um eléctrodo de vidro em termos da concentração do catião hidrogénio por titulação de ácido forte/base forte (HNO_3 $1{,}0\times 10^{-3}$ mol dm^{-3}; I=0,10 mol dm^{-3} em KNO_3 e NaOH isento de carbonato $\approx 2 \times 10^{-2}$ mol dm^{-3}; I= 0,10 mol dm^{-3} em KNO_3) à temperatura de 25,0 ±0,1 °C e sempre em atmosfera de azoto, utilizando o método de Gran [109] que consiste numa linearização da equação de Nernst expressa, pela equação:

$$E = K + K_2 \log c_H$$

Como a concentração de iões H^+ (c_H), antes do ponto de equivalência é dada, em cada ponto, pela expressão

$$c_H = c_B \frac{(v_e - v_i)}{(v_0 + v_i)}$$

sendo v_e o volume equivalente da titulação, v_0 o volume inicial de ácido a titular, vi o volume de base adicionado em cada ponto da titulação e c_B a concentração de base usada. No caso da concentração de ácido ser H, c_B é dado pela expressão:

$$c_B = \frac{v_0 H}{v_e}$$

Após substituição na equação de Nernst, esta reescreve-se na forma:

$$E = K + K_2 \log c_B \frac{(v_e - v_i)}{(v_0 + v_i)}$$

ou ainda

$$\frac{E - K}{K_2} = \log c_B \frac{(v_e - v_i)}{(v_0 + v_i)}$$

Aplicando o anti-logaritmo a ambos os membros da equação anterior, obtém-se:

$$10^{\frac{E-K}{K_2}} = c_B \frac{(v_e - v_i)}{(v_0 + v_i)}$$

ou

$$\frac{10^{\frac{E}{K_2}}}{10^{\frac{K}{K_2}}} = c_B \frac{(v_e - v_i)}{(v_0 - v_i)}$$

Esta expressão anterior pode, ainda, reescrever-se na forma seguinte:

$$10^{\frac{E}{K_2}}(v_0 + v_i) = 10^{\frac{K}{K_2}} c_B(v_e - v_i)$$

Na expressão anterior, cada um dos termos representa a função ψ de Gran que, assim, pode escrever-se nas duas formas seguintes:

$$\psi = (V_o + V_i)10^{\frac{E}{K_2}}$$

ou

$$\psi = c_B(v_e - v_i)10^{\frac{K}{K_2}}$$

Após manipulações algébricas simples, a função ψ de Gran pode ainda exprimir-se como:

$$\psi = 10^{\frac{E}{K_2}} v_0 + 10^{\frac{E}{K_2}} v_i$$

ou

$$\psi = 10^{\frac{K}{K_2}} c_B v_e - 10^{\frac{K}{K_2}} c_B v_i$$

De acordo com as expressões anteriores, a função ψ de Gran é linear para os valores de v_i do volume. Assim, na sua representação gráfica em função do volume v_i, obtém-se uma recta cuja ordenada na origem, A, pode ser igual a:

$$A = c_B v_e 10^{\frac{K}{K_2}}$$

e cujo declive, B, é dado por:

$$B = -c_B 10^{\frac{K}{K_2}}$$

A função de Gran anula-se para $v_i=v_e$. O volume equivalente v_e pode, então ser determinado pela expressão:

$$v_e = -\frac{A}{B}$$

Tanto a ordenada na origem como o declive da recta $\psi=f(v_i)$ permitem a determinação de K. Com efeito, se:

$$-\frac{B}{c_B} = 10^{\frac{K}{K_2}}$$

então, após aplicação do logaritmo a ambos os membros da igualdade anterior, vem:

$$\log\left|\frac{B}{c_B}\right| = \frac{K}{K_2}$$

donde se obtém:

$$K = K_2 \log\left|\frac{B}{c_B}\right|$$

Por outro lado, como:

$$\frac{A}{c_B v_e} = 10^{\frac{K}{K_2}}$$

após aplicação do logaritmo obtém-se:

$$K = K_2 \log\left[\frac{A}{c_B v_e}\right]$$

Na zona alcalina da curva de titulação, isto é, depois do ponto de equivalência, a concentração de iões OH^-, c_{OH} é dada, em cada ponto, por qualquer uma das seguintes expressões e onde c_A é a concentração do ácido:

$$c_{OH} = c_B \frac{(v_i - v_e)}{(v_0 + v_i)}$$

como $K_{ag}=c_{OH}c_H$, então c_H pode exprimir-se na forma:

$$c_H = \frac{(v_0 + v_i)K_{ag}}{c_B(v_i - v_e)}$$

Introduzindo a expressão anterior na equação de Nernst, esta vem:

$$E = K + K_2 \log \frac{K_{ag}(v_0 + v_i)}{c_B(v_i - v_e)}$$

Após aplicação do anti-logaritmo à expressão anterior, obtém-se:

$$\frac{10^{\frac{E}{K_2}}}{10^{\frac{K}{K_2}}} = \frac{(v_0 + v_i)K_{ag}}{c_B(v_i - v_e)}$$

que se pode ainda escrever na forma:

$$10^{\frac{E}{K_2}} c_B(v_i - v_e) = 10^{\frac{K}{K_2}} K_{ag}(v_0 + v_i)$$

Por manipulações algébricas simples, a equação anterior pode rescrever-se como:

$$10^{-\frac{K}{K_2}\frac{c_B}{K_{ag}}(v_i - v_e)} = 10^{-\frac{E}{K_2}(v_0 + v_i)}$$

onde cada um dos membros representa a função ψ de Gran, que pode então definir-se pela expressão:

$$\psi = 10^{-\frac{K}{K_2}\frac{c_B}{K_{ag}}v_i} - 10^{-\frac{K}{K_2}\frac{c_B}{K_{ag}}v_e}$$

Do mesmo modo que para a zona ácida da curva de titulação também para a zona alcalina, a função de Gran é linear com v_i e a sua representação gráfica em função de v_i é uma recta cujo declive, B, é igual a:

$$B = 10^{-\frac{K}{K_2}\frac{c_B}{K_{ag}}}$$

e cuja ordenada na origem, A, é dada pela expressão:

$$A = -10^{-\frac{K}{K_2}\frac{c_B}{K_{ag}}v_e}$$

FACULDADE DE FARMÁCIA DO PORTO BIBLIOTECA

A partir das duas expressões anteriores pode, então, calcular-se o volume v_e e o valor de K, dados, respectivamente por:

$$v_e = -\frac{A}{B}$$

e

$$K = -K_2 \log\left[B\frac{K_{ag}}{c_B}\right]$$

A utilização do método de Gran torna assim possível, determinar o volume equivalente da titulação de ácido nítrico com hidróxido de sódio e, consequentemente, calcular o valor da concentração da base. Permite, igualmente, a calibração do eléctrodo de vidro, pois podem ser estimados outros parâmetros como o declive de resposta do eléctrodo, determinado pela equação de Nernst, ou o desvio ao declive teórico da resposta do eléctrodo, o termo constante da equação de Nernst (K) e a constante de auto-protólise da água (K_{ag}).

O método de Gran surge como um método rápido e preciso de calibrar o sistema potenciométrico, uma vez que apenas necessita de pontos experimentais afastados do ponto de equivalência, minimizando, assim, o tempo experimental ao se recorrer a adições de titulante com incrementos constantes.

Durante a execução deste trabalho usou-se o sistema automático de titulação descrito em 2.3.., cuja calibração foi efectuada pelo método de Gran [109], em termos da concentração do ião hidrogénio. O tratamento dos resultados experimentais obtidos foi efectuado com um programa de cálculo, escrito em linguagem BASIC. Este permite determinar os valores de v_e, c_b, K, K_{ag} e o desvio ao declive teórico (Q) ou o declive real da resposta do eléctrodo (S).

O método de Gran permite:

- uma calibração rápida do eléctrodo de pH em termos da concentração de iões H^+, pois necessita de poucos pontos de titulação;
- uma calibração sem usar pontos junto ao ponto de equivalência, normalmente afectados de maior erro e onde a resposta do eléctrodo é usualmente mais lenta;
- uma estimativa do volume equivalente sem se ultrapassar o seu valor na titulação;
- determinar a percentagem de carbonato presente na solução de hidróxido de sódio. A diferença entre os dois volumes equivalentes calculados respectivamente na zona ácida e na zona alcalina da titulação reflecte, teoricamente, o carbonato presente na solução, isto é, partindo da suposição que num eléctrodo de vidro o declive e o termo constante da equação de Nernst têm os mesmos valores quando as medições são realizadas na presença de um excesso de protão ou de anião hidróxido.

2.5.1. Titulação potenciométrica das soluções de antioxidantes

As titulações potenciométricas das soluções aquosas de antioxidantes usando um eléctrodo de vidro, foram realizadas, num sistema automático já anteriormente descrito no ponto 2.3..

As constantes de acidez dos antioxidantes foram determinadas por titulação de 20.00ml das respectivas soluções aquosas de concentrações $\cong 1\times10^{-3}$ mol dm^{-3}, acidificadas com ácido nítrico 1×10^{-3} mol dm^{-3} (I=0,1 mol dm^{-3} em KNO_3) com NaOH isento de carbonato ($\cong 2\times10^{-2}$ mol dm^{-3}; I=0,1 mol dm^{-3} em KNO_3) a 25±0,1 °C. Em todos os ensaios foi mantida uma atmosfera de azoto durante as titulações e a amostra foi agitada com um agitador magnético.

A determinação das constantes de formação foram realizadas de forma semelhante às usadas na determinação das constantes de acidez mas usando soluções de

antioxidantes que continham também nitrato de cobre 1×10^{-3} mol dm^{-3}. Em todas as titulações potenciométricas a relação da concentração de ligando-metal é de 1:1.

A calibração do sistema foi efectuada sempre imediatamente antes e depois de cada ensaio, a partir da titulação de HNO_3 (1×10^{-3} mol dm^{-3}; I=0,10 mol dm^{-3} em KNO_3) com hidróxido de sódio isento de carbonato ($\cong2\times10^{-2}$ mol dm^{-3}; I=0,10 mol dm^{-3} em KNO_3) pelo método de Gran como descrito em 2.5..

Os dados obtidos foram posteriormente tratados com os programas Superquad e Best para avaliar as constantes de acidez e de formação dos ligandos e dos complexos metal-ligando, respectivamente.

O valor de pK_{ag} igual a 13,75 usado nos cálculos dos valores das constantes de equilíbrio foi obtido a partir dos dados de titulações feitas neste trabalho, pelo método de Gran, como é descrito em 2.5. Os valores da 1ª e 2ª protólise do cobre utilizados no cálculo das constantes de equilíbrio foram, respectivamente, de 7,48 e 13,68 [113].

2.6. Teste da ausência de carbonato nas soluções de hidróxido de sódio

No ponto 2.4.2. em que é descrita a preparação de hidróxido de sódio isento de carbonato, é referida a necessidade de se efectuar um teste de certificação da ausência de carbonato nestas soluções antes da sua utilização.

Neste trabalho as titulações são baseadas no tratamento matemático dos dados experimentais de titulações de um ácido forte (ácido nítrico) com uma base forte (hidróxido de sódio). Ambas as soluções tinham a mesma força iónica.

Por um lado, foi referido em 2.5. (calibração sistema de titulação) que os volumes equivalentes determinados pelo método de Gran com os dados obtidos na zona ácida e na zona alcalina nem sempre são semelhantes e, por vezes, são significativamente diferentes. Esta diferença traduz teoricamente a percentagem de carbonato existente na solução de hidróxido.

A presença de carbonato na solução traduz-se pelo aparecimento de dois máximos quando se usa o método da primeira derivada no tratamento dos dados experimentais da curva de titulação.

Na figura 2.2., 2.3. e 2.4.. são apresentadas, respectivamente, as representações gráficas da função E=f(v_i), da primeira derivada desta função, $\frac{dE}{dv} = f(v_i)$, e da função de Gran, ψ=f(v_i), de uma titulação de 20,00 ml de ácido nítrico (1×10^{-3} mol dm^{-3}) com hidróxido de sódio ($\approx2\times10^{-2}$ mol dm^{-3}) sem e com carbonato, respectivamente. As titulações foram efectuadas com incrementos variáveis de adição de volume de titulante

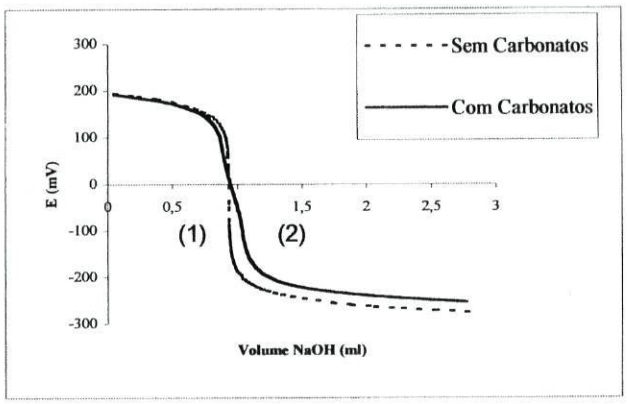
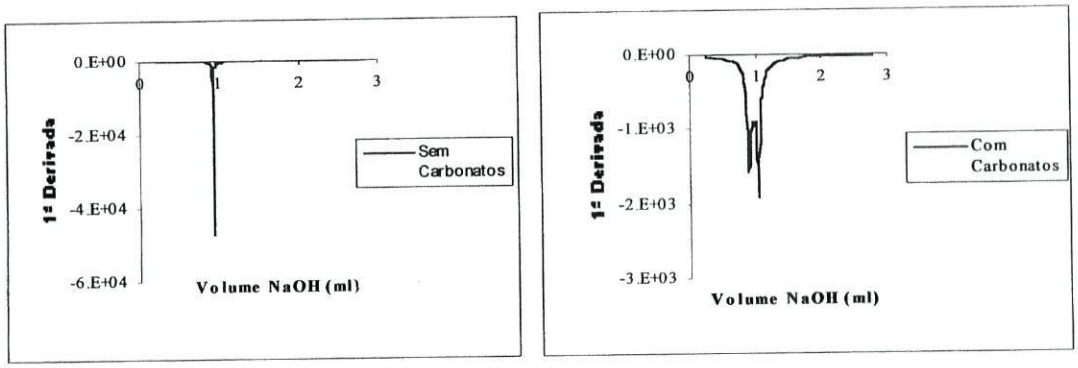


Figura 2.2. - Representação gráfica de E=f(vi) em função do volume de hidróxido de sódio sem e com carbonato adicionado a 20,00 ml de uma solução de ácido nítrico 1×10^{-3} mol dm^{-3}.

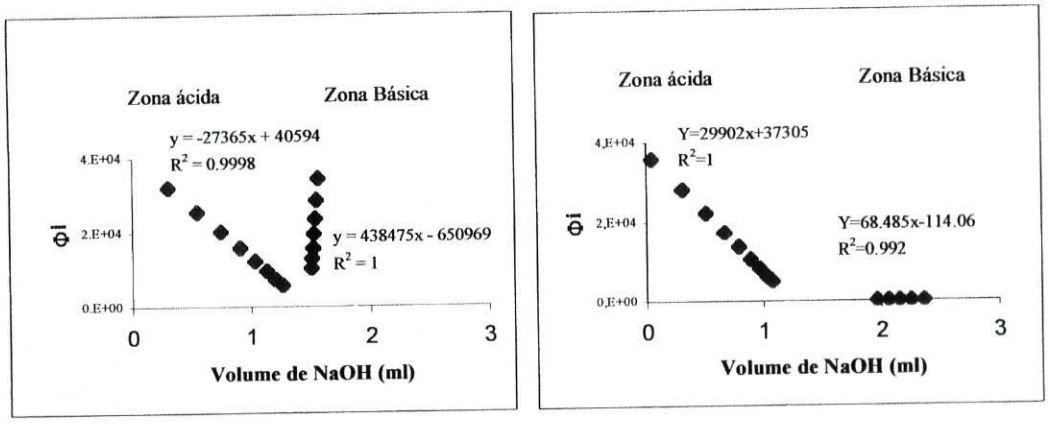
Para o caso (1) que corresponde à titulação com hidróxido de sódio isento de carbonato, pode ser observado que a derivada apresenta um único máximo e que os volumes equivalentes obtidos pela função Gran com os dados experimentais da zona ácida e da zona alcalina são semelhantes, o que mostra a não existência de carbonato na solução de hidróxido de sódio usada como titulante. No caso (2) observam-se duas inflexões, a mais pequena corresponde ao ponto de equivalência do carbonato e a maior ao do ácido nítrico.



(1) (2)

Figura 2.3. - Representação gráfica de dE/dV versus volume de NaOH adicionado:
(1) Titulação com NaOH sem carbonatos
(2) Titulação com NaOH contaminado com carbonatos

O método derivativo é um método onde os resultados podem ser tratados rapidamente após as titulações potenciométricas, este método pode ser utilizado quando são pretendidas análises qualitativas da presença de CO_3^{2-}. A figura 2.4. mostra os valores da função Gran versus volume de NaOH adicionado. Os valores da função Gran foram calculados a partir dos resultados das titulações potenciométricas usando um programa de computador (Método de Gran).



(1) (2)

Figura 2.4. - Representação gráfica da função ψ versus volume de NaOH adicionado: solução de NaOH sem carbonatos (1) e solução de NaOH contaminado com carbonatos (2)

(1)

Zona ácida: Veq=1,48

Zona básica: Veq=1,48

(2)

Zona ácida: Veq=1,25

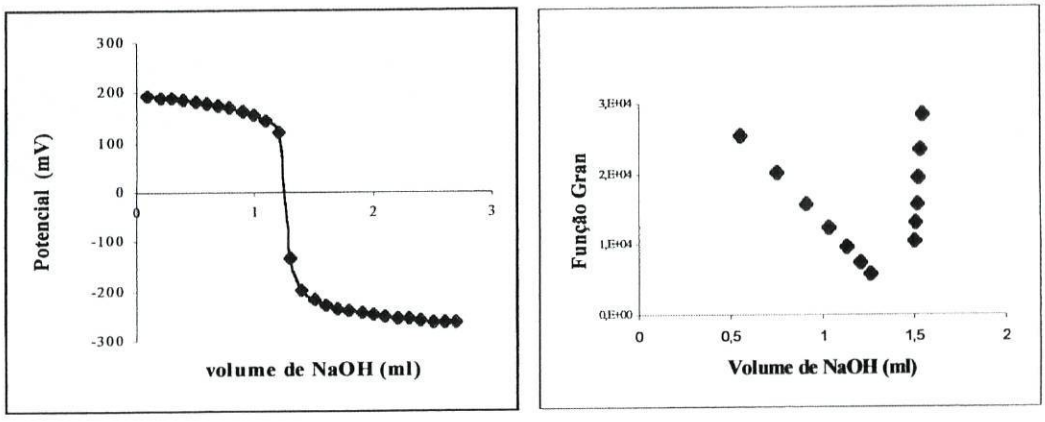
Zona básica: Veq=1,67

Através dos gráficos da função Gran pode concluir-se que o volume equivalente calculado a partir das zonas básica e ácida são diferentes quando a solução de NaOH está contaminada com CO_3^{2-}. A diferença 0,42 ml e 0 ml reflecte o teor de carbonato, que foi de 35%* no caso representado na figura 2.4. (2) e 0% no caso figura 2.4. (1).

*Percentagem de $CO_3^{2-} = \frac{0.42}{2 \times 1,67} \times 100$

Quando se pretende detectar somente a presença de carbonato numa solução alcalina deve usar-se o método da primeira derivada, pois este permite de uma forma inequívoca a detecção da presença ou não de carbonato neste tipo de soluções, desde que os ensaios sejam realizados em condições experimentais adequadas. Neste caso, é necessário obter experimentalmente muitos valores de diferenças de potencial, E, junto de ponto de equivalência, o que é facilmente conseguido se for realizada uma titulação com incrementos de adição de volume de titulante variáveis, como foi já referido anteriormente (ver 2.3. Sistema de titulação).

Quando o objectivo é somente a calibração dos eléctrodos não são necessários valores de muitos pontos da titulação e, assim, esta deve ser realizada experimentalmente com incrementos de adição de volume de titulante fixos, o que permite efectuar a calibração num curto intervalo de tempo usando o método de Gran (Figura 2.5.).



(1) (2)

Figura 2.5. - Representação gráfica de uma titulação a volume constante (1) e a sua linearização pelo método de Gran (2).

A figura 2.5. (2) mostra a linearização da curva de titulação da função E=f(V) pelo método de Gran ψ=f(V) (função Gran). Com este programa é possível determinar as constantes que relacionam o potencial da célula com a concentração de H^+ e também a concentração na solução de NaOH.

Na figura 2.5. (2) os volumes equivalentes obtidos para a zona ácida e para a zona alcalina são de 1,48, ou seja, neste caso não existem carbonatos na solução de hidróxido de sódio.

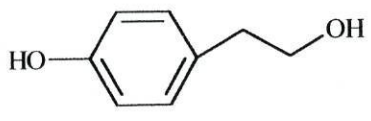
Capítulo III

Resultados

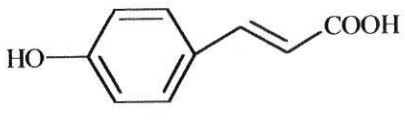
3. Resultados

3.1. Complexação do cobre (II) por compostos fenólicos da uva e do vinho

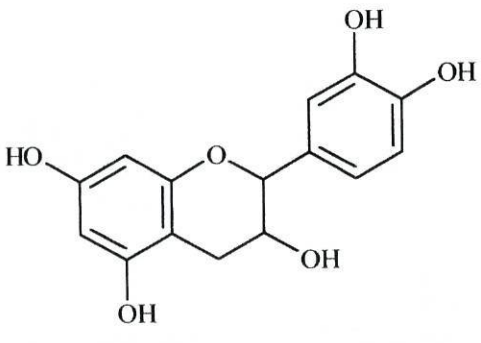
• Como já foi referido os compostos fenólicos são uma família de compostos naturais, os quais apresentam na sua maioria actividade antioxidante. Da lista extensa de compostos fenólicos existentes na uva e no vinho [19], foram seleccionados para este estudo quatro compostos pertencentes a três classes químicas diferentes, mas possuindo contudo uma funcionalização idêntica. Neste trabalho foram utilizados como modelos de ligandos para o estudo das suas propriedades de complexação com o cobre (II), um derivado do feniletanol (tirosol), um ácido cinâmico (ácido 4-hidroxicinâmico), e dois flavonóides (catequina e taxifolina) (Figura 3.1.).



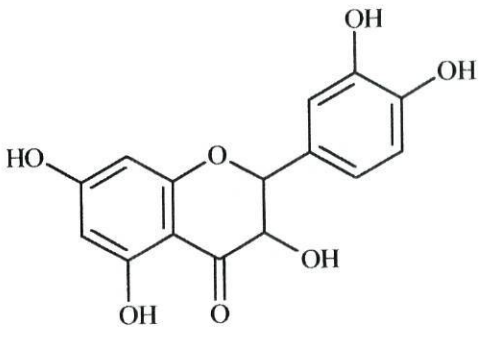
Tirosol



Ácido 4-hidroxicinâmico



Catequina



Taxifolina

Figura 3.1- Compostos fenólicos existentes na uva e no vinho estudados neste trabalho.

Neste tipo de estudos é necessário efectuar a avaliação das propriedades físico-químicas destes compostos, sendo a determinação das constantes de dissociação das funções de natureza acídica (grupo carboxilico e fenol) a primeira etapa a efectuar.

Os métodos potenciométricos são normalmente a técnica escolhida para o estudo quer das propriedades ácido-base quer de complexação dos compostos fenólicos. A utilização preferencial do cobre (II) neste tipo de estudos de complexação em vez de outros metais deve-se à maior estabilidade dos complexos formados [114-115].

A interacção entre os ligandos e os metais pode levar à modificação das suas propriedades físico-químicas, como a biodisponibilidade, e por outro lado exacerbar a sua actividade antioxidante, uma vez que pode ocorrer a minimização de processos de oxidação por um mecanismo complementar.

Numa tentativa de sistematizar a apresentação dos resultados obtidos, estes serão divididos em quatro secções diferentes, de acordo com o ligando em estudo.

3.1.1. Constantes de equilíbrio do tirosol

A estrutura química do tirosol, 3-(4-hidroxifenil)-etanol, representada na figura 3.2. apresenta um único grupo funcional que lhe confere propriedades ácido-base nas condições experimentais usadas neste trabalho. A molécula deste derivado do feniletanol apresenta um grupo álcool cujas características ácidas somente são exacerbadas em função de uma base forte do tipo amideto de sódio.

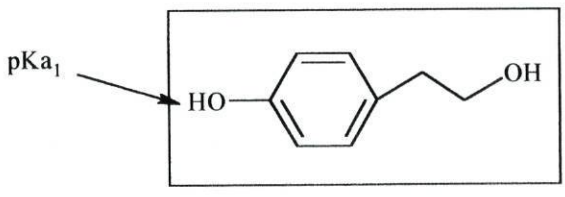


Figura 3.2. - Estrutura química do tirosol.

No tratamento dos resultados obtidos para a determinação das constantes de acidez, o modelo que melhor se ajusta aos dados experimentais considera a existência de um único equilíbrio químico o qual corresponde à desprotonação do grupo fenólico representado pela reacção seguinte:

$$HL \rightleftharpoons L + H$$

onde HL se refere ao tirosol na forma protonada e L ao respectivo anião. Nesta representação as cargas foram omitidas para simplificação.

Os valores das constantes de acidez (logβ) do tirosol determinadas a partir dos dados experimentais obtidos por titulação potenciométrica estão apresentados na tabela 3.1.. Os cálculos das constantes de acidez foram efectuados com o programa Superquad [116] e Best [100] e os dados usados neste tratamento abrangem um intervalo de -log c_H entre aproximadamente 3,1-10,2.

Tabela 3.1.- Valores das constantes de acidez (logβ) do tirosol a 25°C (força iónica de 0,10 mol dm^{-3}, ajustada com KNO_3).

Ligando	ião	p	q	r	Espécie possível	ΔpH	logβ (Superquad)	logβ (Best)
Tirosol	H^+	1	0	-1	$[L]^-$	3,1-10,2	-9,86±0,04	-9,33±0,07

Para o cálculo dos valores de logβ foram usados os dados de 6 titulações independentes. Os resultados são apresentados como média ± erro de seis ensaios independentes, tendo sido utilizados, no mínimo, 20 pontos experimentais para cada uma das titulações. Para cada um dos casos, o valor de logβ apresentado é igual à média aritmética dos antilogaritmos dos valores de logβ determinados em cada ensaio. Os erros associados aos valores de logβ apresentados foram calculados pelo método proposto por Albert e Serjeant [117]. Neste método o erro associado ao valor de logβ é igual à diferença máxima entre o logaritmo da média dos antilogaritmos dos valores calculados nos vários ensaios e dos seus valores individuais.

O valor de pK_{a1} obtido para o tirosol foi de 9,86 (Tabela 3.1.). Não se encontraram valores para este composto descritos na literatura.

Na figura 3.3. está representado o diagrama de distribuição das espécies presentes neste sistema em função do valor de pH. Em soluções aquosas de pH inferiores a ≅ 7,5

existe apenas uma espécie que corresponde ao ligando na forma protonada (HL); para valores de pH superiores começa a ocorrer a desprotonação do tirosol, originado a espécie L^-.

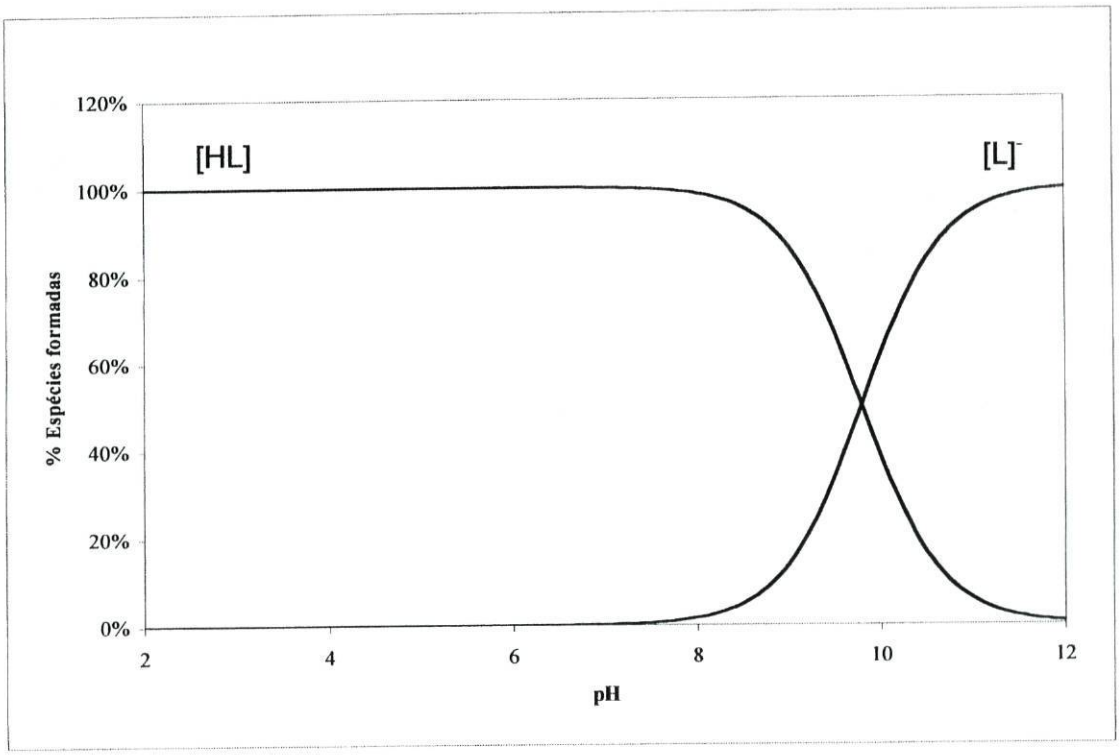


Figura 3.3. - Diagrama de distribuição das espécies presentes numa solução aquosa de tirosol a 25°C (força iónica de 0,10 mol dm^{-3}, ajustada com KNO_3).

Na figura 3.4. apresenta-se os gráficos dos valores de pH em função do volume de hidróxido de sódio ($\cong 2\times10^{-2}$ mol dm^{-3}) adicionado a 20,00 mL de uma solução contendo tirosol ($\cong 1\times10^{-3}$ mol dm^{-3}). Na figura estão representados quer os dados adquiridos experimentalmente, quer a curva simulada calculada com o programa de cálculo Best. Nesta figura pode ser observado o bom ajustamento do modelo teórico aos resultados experimentais.

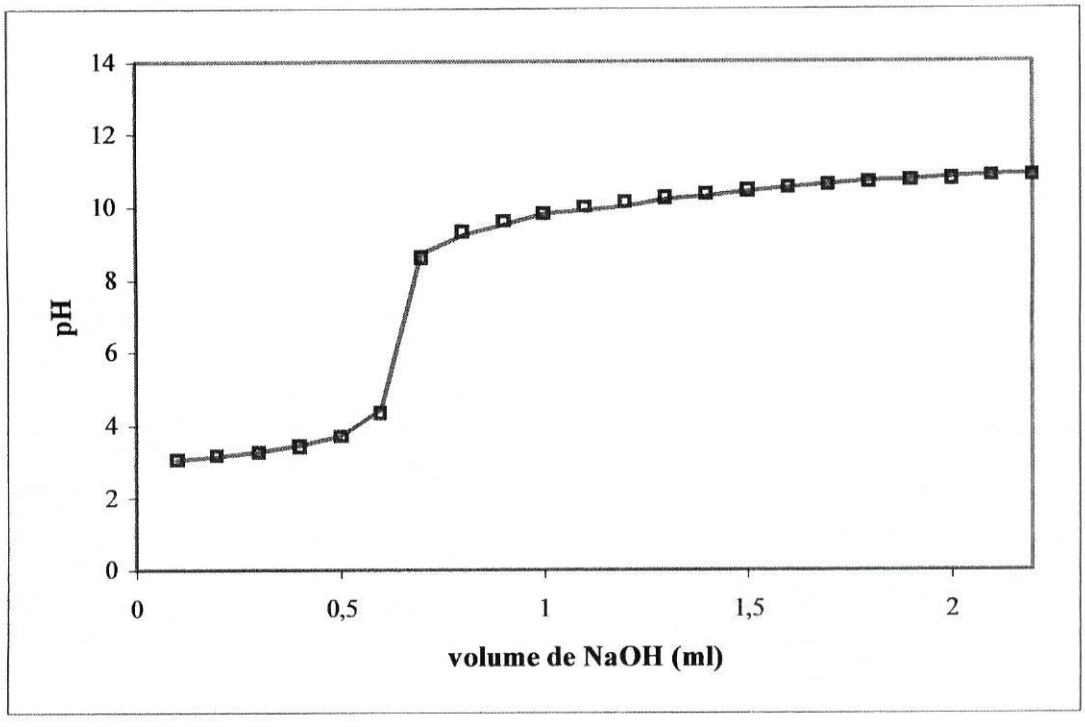


Figura 3.4. - Curvas de pH em função do volume de hidróxido de sódio adicionado a 20,00 mL de uma solução contendo tirosol; curva experimental (□) e simulada (——).

Na figura 3.5. encontra-se a representação gráfica das curvas de titulação potenciométrica de 20,00 mL de uma solução de tirosol ($\cong 1\times10^{-3}$ mol dm^{-3}), com hidróxido de sódio ($\cong 2\times10^{-2}$ mol dm^{-3}) e de uma solução constituída pelo mesmo ligando ($\cong 1\times10^{-3}$ mol dm^{-3}) e nitrato de cobre (1×10^{-3} mol dm^{-3}). Ambas as soluções tinham força iónica (0,10 mol dm^{-3}) ajustada com KNO_3. A diferença existente nos valores de pH ao longo da titulação, para as duas soluções, deve-se à complexação do cobre (II) pelo tirosol.

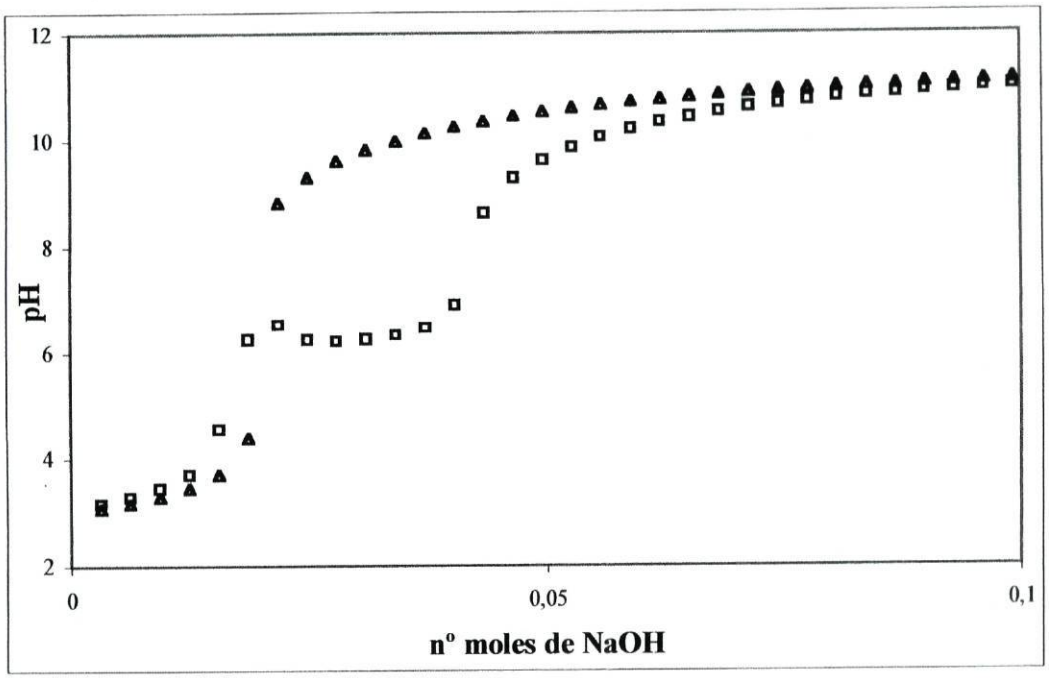


Figura 3.5.- Curvas de titulação de 20,00 mL de solução de tirosol com hidróxido de sódio $\cong 2\times10^{-2}$ mol dm^{-3}, na presença de cobre (II) (□) e na ausência de cobre (II) (△).

O modelo que melhor se ajusta aos resultados obtidos experimentalmente considera a existência do seguinte equilíbrio representados pela seguinte reacção:

$$Cu + HL \rightleftharpoons CuL + H$$

correspondendo CuL à molécula de cobre ligada ao ligando. Nesta representação as cargas foram omitidas para simplificação.

O valor da constante (logβ) de formação determinada a partir dos dados obtidos por titulação potenciométrica está apresentado na tabela 3.2. Os dados experimentais usados para a determinação da constante de formação abrangem um intervalo de 3,0-6,4 unidades de pH. A partir deste valor ocorre precipitação a qual é provavelmente devida à insolubilidade do complexo formado em solução aquosa, razão pela qual, no tratamento dos resultados foi usado um intervalo de pH muito estreito (correspondente aos pontos experimentais no intervalo de pH onde não ocorre precipitação).

Tabela 3.2. - Valores das constantes de formação (logβ) para o sistema binário cobre(II)/tirosol a 25ºC (força iónica de 0,10 mol dm^{-3}, ajustada com KNO_3).

Ligando	Ião	p	q	r	Espécie possível	ΔpH	logβ (Superquad)	logβ (Best)
Tirosol	Cu^{2+}	1	1	-1	$[CuL]^{+}$	3,1-6,4	-1,61±0,4	-1,59±0,5

Considerando o valor de logβ associado a este equilíbrio de –1,61, e como,

$$\frac{[CuL][H]}{[Cu][HL]} = \frac{[CuL]}{[Cu][L]} \times \frac{[H][L]}{[HL]}$$

o valor de $\log K_{CuL}^{Cu}$ será igual a 8,25

Na figura 3.6. está representado o diagrama de distribuição das espécies presentes em solução.

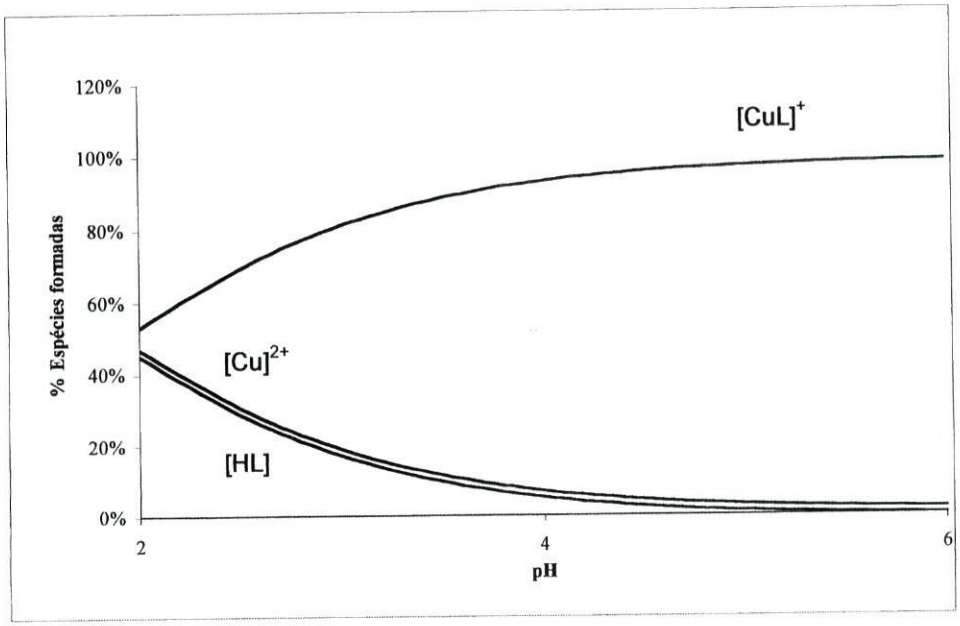


Figura 3.6. - Diagrama de distribuição das espécies presentes no sistema binário cobre (II)/tirosol a 25°C (força iónica de 0,10 mol dm^{-3}, ajustada com KNO_3).

Como se pode observar na figura 3.7., no intervalo 3,1-6,4 unidades de pH o modelo usado no tratamento dos resultados apresenta um bom ajuste aos dados experimentais. Desta forma para o cálculo da constante de complexação do tirosol com o ião cobre (II) apenas foram considerados os pontos antes da precipitação (Figura 3.7.).

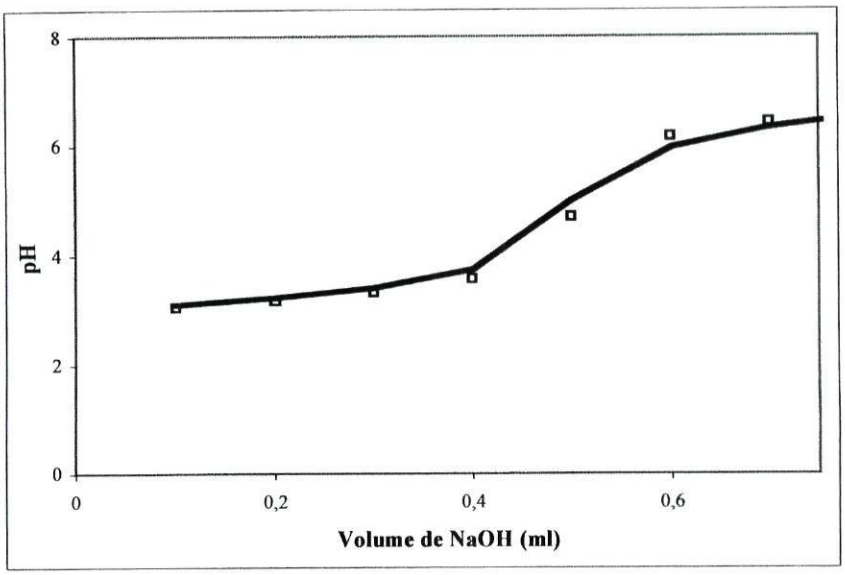


Figura 3.7. - Curvas de pH em função do volume de hidróxido de sódio adicionado a 20.00 mL de uma solução contendo tirosol ($\cong 1\times10^{-3}$ mol dm^{-3}), nitrato de potássio de concentração (0,10 mol dm^{-3}) e cobre (II) (1×10^{-3} mol dm^{-3}), obtidas experimentalmente (□) e simulada (——).

3.1.2. Constantes de equilíbrio do ácido 4-hidroxicinâmico

A estrutura química do ácido 4-hidroxicinâmico, ácido 3-(4-hidroxifenil) propenóico, está representada na figura 3.8.. Este composto apresenta dois grupos funcionais que contribuem para as propriedades ácido-base, o grupo carboxilico e o grupo fenólico.

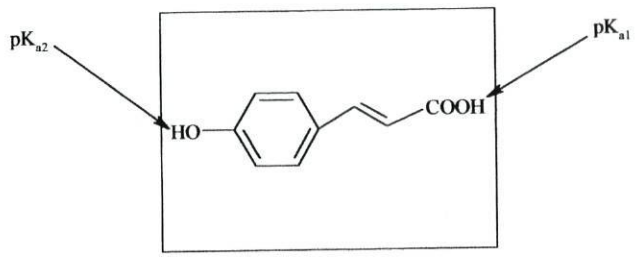


Figura 3.8. Estrutura química do ácido 4-hidroxicinâmico.

No tratamento matemático dos resultados obtidos para a determinação das constantes de acidez, o modelo que melhor se ajusta aos dados experimentais considera a existência de dois equilíbrios químicos representados pelas reacções:

$$H_2L \rightleftharpoons HL + H$$

$$HL \rightleftharpoons L + H$$

correspondendo H_2L ao ligando (ácido 4-hidroxicinâmico) completamente protonado (forma neutra) e L ao respectivo anião completamente desprotonado. Nesta representação as cargas foram omitidas para simplificação.

Os valores das constantes de acidez (logβ) do ácido 4-hidroxicinâmico determinados a partir dos dados experimentais, obtidos por titulação potenciométrica, estão apresentados na tabela 3.3.. Os cálculos dos valores das constantes de acidez foram efectuados com o programa Superquad [116] e Best [117] e os dados usados abrangem um intervalo de -logc_H entre aproximadamente 3,0-9,7. Para o cálculo dos valores de logβ foram usados os dados de seis titulações independentes, sendo os

resultados apresentados como médias±erro de seis ensaios independentes, calculados da mesma forma como referidos anteriormente para o tirosol.

Tabela 3.3.Valores das constantes de acidez (logβ) do ácido 4-hidroxicinâmico a 25ºC (força iónica de 0,10 moldm^{-3}, ajustada com KNO_3).

Ligando	ião	p	q	r	Espécie possível	ΔpH	logβ (Superquad)	logβ (Best)
Ácido 4-hidroxicinâmico	H^+	1	0	-1	$[HL]^-$	3,0-9,7	-4,49±0,02	-4,37±0,09
		1	0	-2	$[L]^{2-}$	3,0-9,7	-13,38±0,04	-13,11±0,20

Os valores obtidos neste trabalho para as constantes de acidez do ácido 4-hidroxicinâmico foram de pK_{a1} =4,49 e pK_{a2}=8,89, sendo os valores ligeiramente inferiores aos descritos na literatura (pK_{a1} =4,81 e pK_{a2}=9,15). O valor de pK_{a1} pode ser associado à desprotonação do grupo carboxílico [118-119] e o de pK_{a2} à desprotonação do grupo fenólico [119].

Na figura 3.9. está representado o diagrama de distribuição das espécies presentes neste sistema em função do valor de pH. Inicialmente existe em solução apenas o ligando na forma protonada, verificando-se com o aumento do pH a desprotonação do ácido 4-hidroxicinâmico, formando em primeiro lugar a espécie $[HL]^-$ e posteriormente a espécie $[L]^{2-}$.

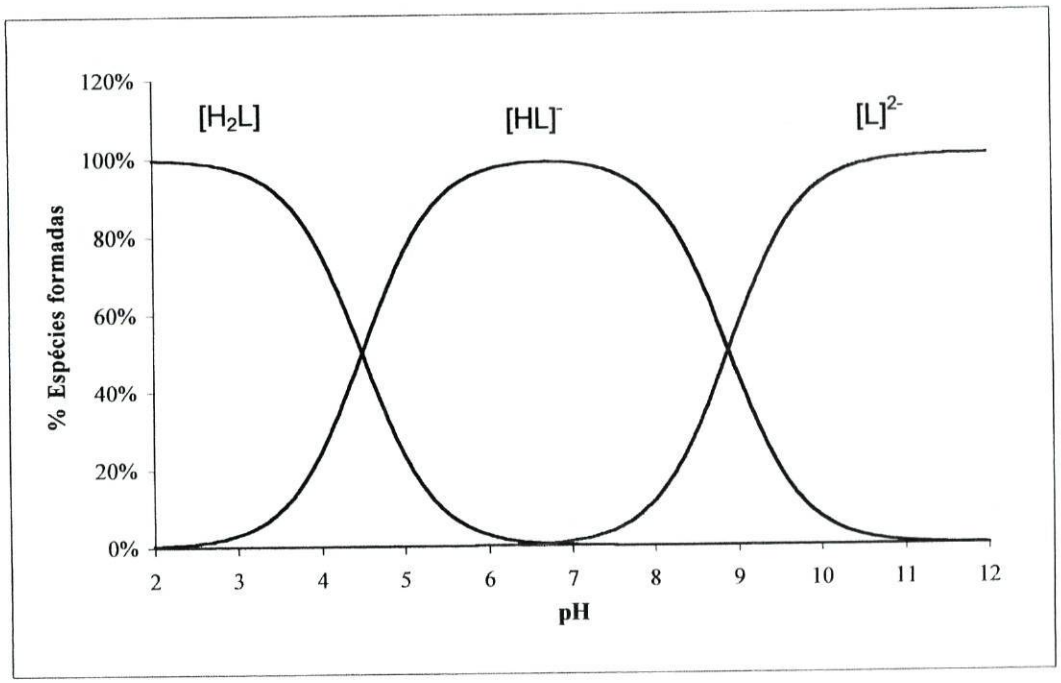


Figura 3.9. Diagrama de distribuição das espécies presentes em solução de ácido 4-hidroxicinâmico a 25°C (força iónica de 0,10 mol dm^{-3}, ajustada com KNO_3).

Na figura 3.10. apresentam-se os gráficos das curvas dos valores de pH em função do volume de hidróxido de sódio ($\cong 2\times10^{-2}$ mol dm^{-3}), adicionado a 20,00 mL de uma solução contendo ácido 4-hidroxicinâmico ($\cong 1\times10^{-3}$ mol dm^{-3}), obtidas a partir dos dados adquiridos experimentalmente e a curva simulada com os valores de pH calculados com o programa de cálculo Best. Considerou-se todos os valores de constantes de equilíbrio determinados para este sistema e apresentados na tabela 3.3. Nesta figura pode ser observado o bom ajustamento do modelo teórico aos resultados experimentais.

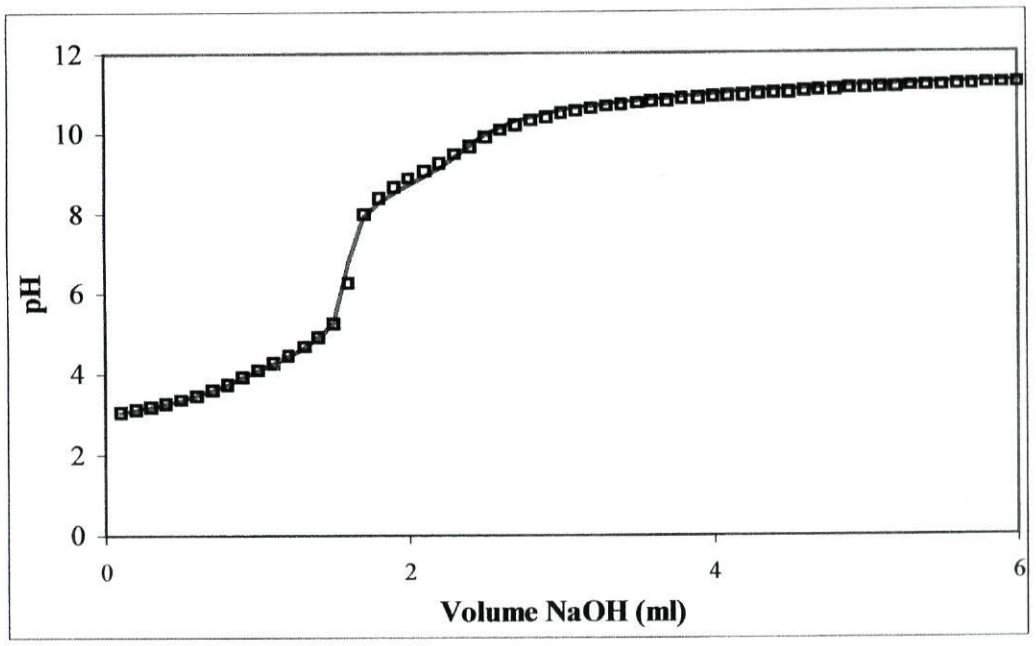


Figura 3.10. - Curvas de pH em função do volume de hidróxido de sódio adicionado a 20,00 mL de uma solução contendo ácido 4-hidroxicinâmico; curva experimental (□) e simulada (——).

Na figura 3.11 encontra-se a representação gráfica das curvas de titulação potenciométrica de 20,00 mL de uma solução de ácido 4-hidroxicinâmico ($\cong 1\times10^{-3}$ mol dm^{-3}), com hidróxido de sódio ($\cong 2\times10^{-2}$ mol dm^{-3}), e de uma solução constituída pelo mesmo ligando ($\cong 1\times10^{-3}$ mol dm^{-3}) e nitrato de cobre (1×10^{-3} mol dm^{-3}). Ambas as soluções tinham a força iónica ajustada (0,10 mol dm^{-3}) com KNO_3. A diferença existente nos valores de pH ao longo da titulação para as duas soluções deve-se à complexação do cobre (II) pelo ácido 4-hidroxicinâmico, verifica-se um incremento da concentração de iões H^+ que se traduz por uma diminuição dos valores de pH relativamente à curva correspondente à solução de ácido 4-hidroxicinâmico na ausência de cobre (II).

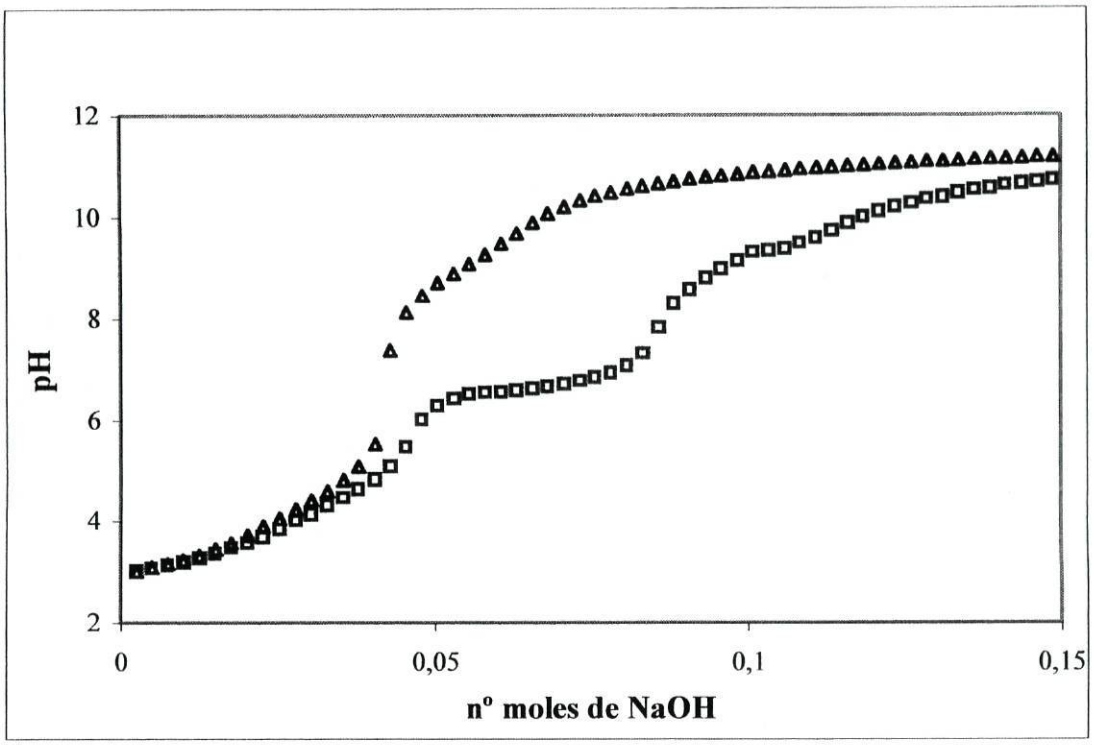


Figura 3.11. - Curvas de titulação de 20,00 mL de solução de ácido 4-hidroxicinâmico com hidróxido de sódio $\cong 2\times10^{-2}$ mol dm^{-3} na presença de cobre (II) (□) e na ausência de cobre (II) (△).

Os modelos matemáticos que melhor se ajustam aos dados experimentais nas condições ensaiadas consideram a existência dos seguintes equilíbrios representados pelas reacções:

$$Cu + H_2L \rightleftharpoons CuLH + H$$

$$Cu + H_2L \rightleftharpoons CuL + 2H$$

$$Cu + 2H_2L \rightleftharpoons CuL_2H_2 + 2H$$

$$Cu + 2H_2L \rightleftharpoons CuL_2H + 3H$$

$$Cu + 2H_2L \rightleftharpoons CuL_2 + 4H$$

Assim, o modelo químico que melhor se ajusta aos dados experimentais obtidos potenciometricamente considera a existência de cinco equilíbrios químicos correspondentes à formação das seguintes espécies: $[CuLH]^+$, $[CuL]$, $[CuL_2H_2]$, $[CuL_2H]^-$ e $[CuL_2]^{2-}$. Nestas fórmulas, H_2L representa o ligando neutro (protonado) e L o ligando completamente desprotonado. Nesta representação as cargas foram omitidas para simplificação.

Os valores das constantes de formação (logβ) calculados com os programas Superquad e Best, a partir dos dados por titulação potenciométrica estão apresentados na tabela 3.4.. Os valores apresentados são a média ± erro de seis titulações independentes, tendo em cada titulação sido utilizados no mínimo, 20 pontos experimentais. Estes foram calculados da mesma forma como foi referido anteriormente para o tirosol.

Tabela 3.4. Valores das constantes de formação (logβ) para o sistema binário cobre (II)/ácido 4-hidroxicinâmico a 25ºC (força iónica de 0,10 $moldm^{-3}$, ajustada com KNO_3).

Ligando	ião	p	q	r	Espécie possível	ΔpH	logβ (Superquad)	logβ(Best)
Ácido 4-hidroxicinâmico	Cu^{2+}	1	1	-1	$[CuLH]^+$	3,0-6,4	-1,58±0,4	-1,27±0,4
		1	1	-2	$[CuL]$	3,0-3,6	-5,12±0.9	-8,79±0,3
		2	1	-2	$[CuL_2H_2]$	3,0-3,6	-2,10±0.7	-3,56±0,5
		2	1	-3	$[CuL_2H]^-$	3,0-6,5	-8,79±0,3	-
		2	1	-4	$[CuL_2]^{2-}$	3,0-6,8	-15,49±0,8	-15,56±0,8

Os dados experimentais usados para a determinação das constantes de formação abrangem um intervalo de 3,0 e 6,4 unidades de pH para a espécie CuLH, de 3,0 a 3,6 unidades de pH para as espécies CuL e CuL_2H_2, de 3,0 a 6,5 unidades de pH para a espécie CuL_2H e de 3,0 a 6,8 para a espécie CuL_2.

Tendo em consideração que a formação da espécie [CuL] em solução pode ser representada pela seguinte reacção:

$$Cu + H_2L \rightleftharpoons CuL + 2H$$

e que neste caso, como o valor de logβ, associado a este equilíbrio, é de –5,12, então como:

$$\frac{[CuL][H]^2}{[Cu][H_2L]} = \frac{[CuL]}{[Cu][L]} \times \frac{[H]^2[L]}{[H_2L]}$$

o valor de $\log K_{CuL}^{Cu}$ será igual a 8,26.

O mesmo raciocínio pode ser efectuado no que se refere à espécie $[CuL_2]$. Neste caso a reacção que representa a sua formação em solução aquosa será:

$$Cu + 2H_2L \rightleftharpoons CuL_2 + 4H$$

à qual está associada um valor de logβ igual a –15,49. Então como:

$$\frac{[CuL_2][H]^4}{[Cu][H_2L]^2} = \frac{[CuL_2]}{[Cu][L]^2} \times \frac{[H]^4[L]^2}{[H_2L]^2}$$

o valor de $\log K_{CuL_2}^{Cu}$ será igual a 11,27.

Na figura 3.12. está representado o diagrama de distribuição das espécies presentes em solução. Neste diagrama de distribuição pode verificar-se que a espécie [CuL] está presente em grande percentagem aparecendo somente e só para valores de pH superiores a 8 a espécie $[L]^{2-}$e a espécie $[CuL_2]^{2-}$.

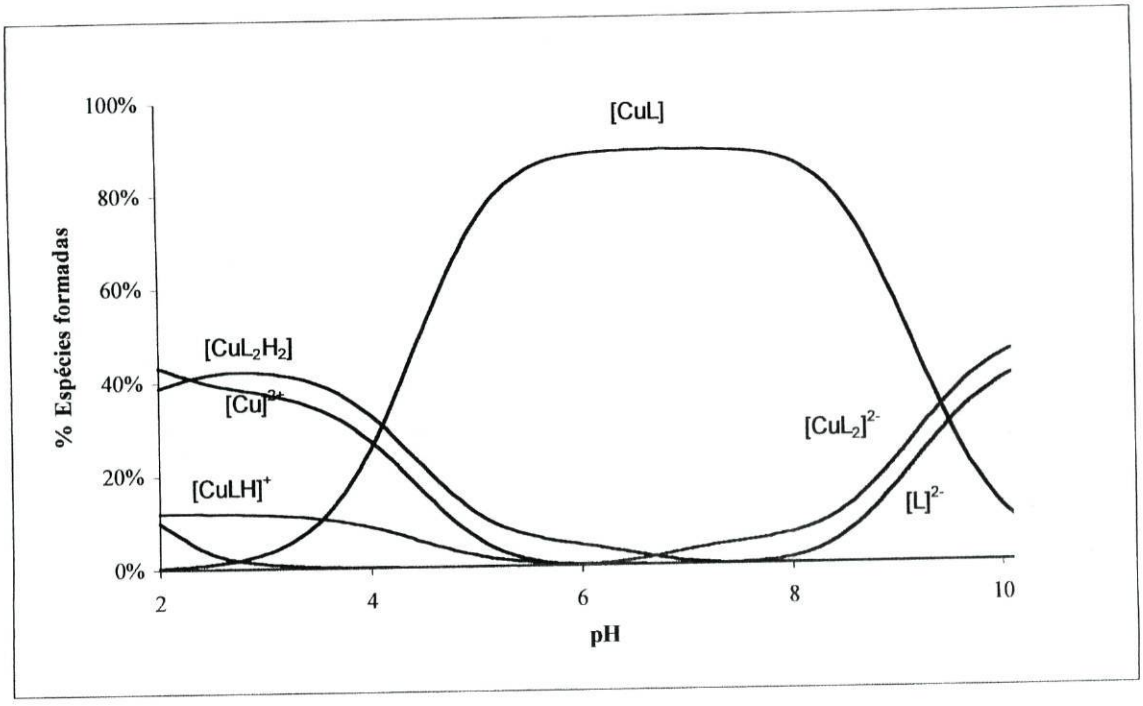


Figura 3.12. Diagrama de distribuição das espécies presentes no sistema binário cobre (II)/ ácido 4-hidroxicinâmico a 25°C (força iónica de 0,10 mol dm^{-3}, ajustada com KNO_3).

Na figura 3.13. apresentam-se os gráficos das curvas dos valores de pH em função do volume de hidróxido de sódio ($\cong 2\times10^{-2}$ mol dm^{-3}) adicionando a 20,00 mL de uma solução contendo ácido 4-hidroxicinâmico ($\cong 1\times10^{-3}$mol dm^{-3}) e cobre (II) (1×10^{-3} mol dm^{-3}), obtidas com os dados adquiridos experimentalmente, e a curva simulada com os valores de pH calculados com o programa de cálculo Best, considerando todos os valores das constantes de equilíbrio determinados para este sistema e apresentados na tabela 3.3. e 3.4.. Nesta figura pode ser observado o bom ajustamento do modelo teórico aos resultados experimentais.

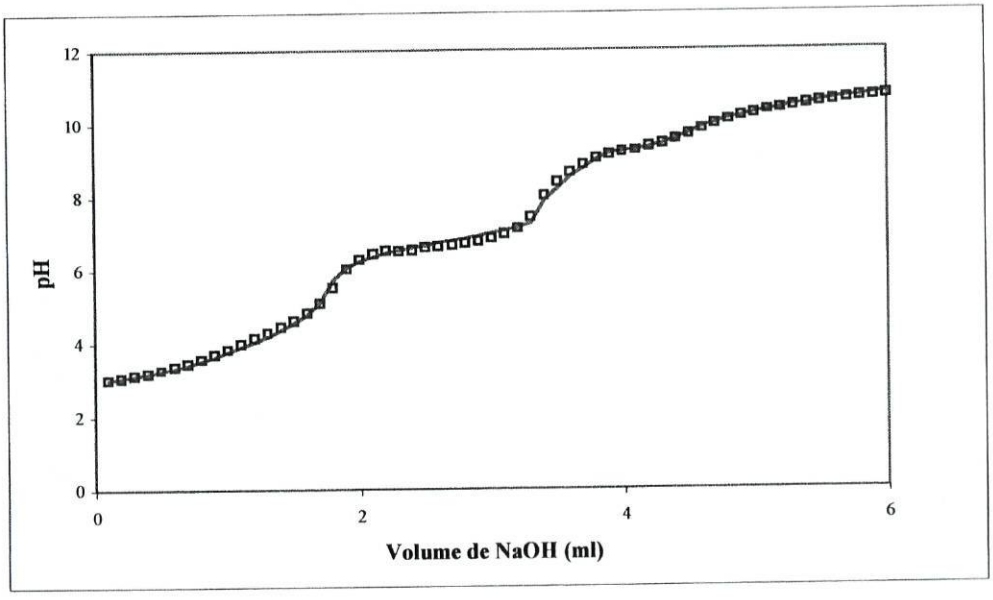


Figura 3.13.- Curvas de pH em função do volume de hidróxido de sódio adicionado a 20,00 mL de uma solução contendo ácido 4-hidroxicinâmico ($\cong 1\times10^{-3}$ mol dm^{-3}), nitrato de potássio de concentração (0,10 mol dm^{-3}) e cobre (II) (1×10^{-3} mol dm^{-3}), obtidas experimentalmente (□) e simulada (——).

3.1.3. Constantes de equilíbrio da catequina

A estrutura da catequina, (3',4'-di-hidroxifenil)-5,7-di-hidroxi-flavan-3-ol, representada na Figura 3.14, apresenta quatro grupos fenólicos os quais lhe conferem propriedades ácido/base, nas condições experimentais usadas neste trabalho.

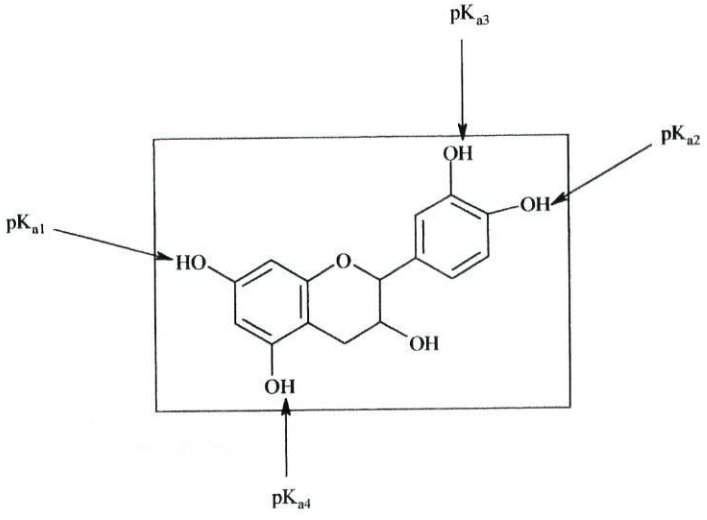


Figura 3.14. - Estrutura química da catequina.

No tratamento matemático dos dados experimentais obtidos para a determinação das constantes de acidez da catequina verifica-se que o modelo que melhor se ajusta aos dados experimentais considera a existência de quatro equilíbrios químicos representados pelas seguintes reacções:

$$H_4L \rightleftharpoons H_3L + H$$

$$H_3L \rightleftharpoons H_2L + H$$

$$H_2L \rightleftharpoons HL + H$$

$$HL \rightleftharpoons L + H$$

correspondendo H_4L à catequina na forma neutra e L à respectiva base completamente desprotonada. Nesta representação as cargas foram omitidas para simplificação.

Para o cálculo dos valores de logβ foram usados os dados de seis titulações independentes, sendo os resultados apresentados como médias±erro de seis ensaios independentes, calculados da mesma forma como referidos anteriormente para o tirosol.

As constantes de acidez determinadas neste trabalho encontram-se na tabela 3.5, onde foi usado o intervalo de 7,4-11,0 unidades de pH.

Tabela 3.5.- Valores das constantes de acidez (logβ) da catequina a 25ºC (força iónica de 0,10 $moldm^{-3}$, ajustada com KNO_3).

Ligando	ião	p	q	r	Espécie possível	ΔpH	logβ (Superquad)	logβ (Best)
Catequina	H^+	1	0	-1	$[H_3L]^-$	7,4-11,0	-8,16±0,07	-8,25±0,08
		1	0	-2	$[H_2L]^{2-}$	7,4-11,0	-17,36±0,09	-17,30±0,08
		1	0	-3	$[HL]^{3-}$	7,4-11,0	-28,22±0,07	-28,35±0,09
		1	0	-4	$[L]^{4-}$	7,4-11,0	-39,72±0,20	-38,53±0,40

Os valores de pK_a obtidos para a catequina foram de pK_{a1}=8,16, pK_{a2}=9,20, pK_{a3}=10,86 e pK_{a4}=11,50. Os valores de pK_a descritos na literatura para a catequina foram os seguintes: 8,64, 9,41, 11,26 e 13,26.

Na figura 3.15 está representado o diagrama de distribuição das espécies presentes neste sistema em função do valor de pH.

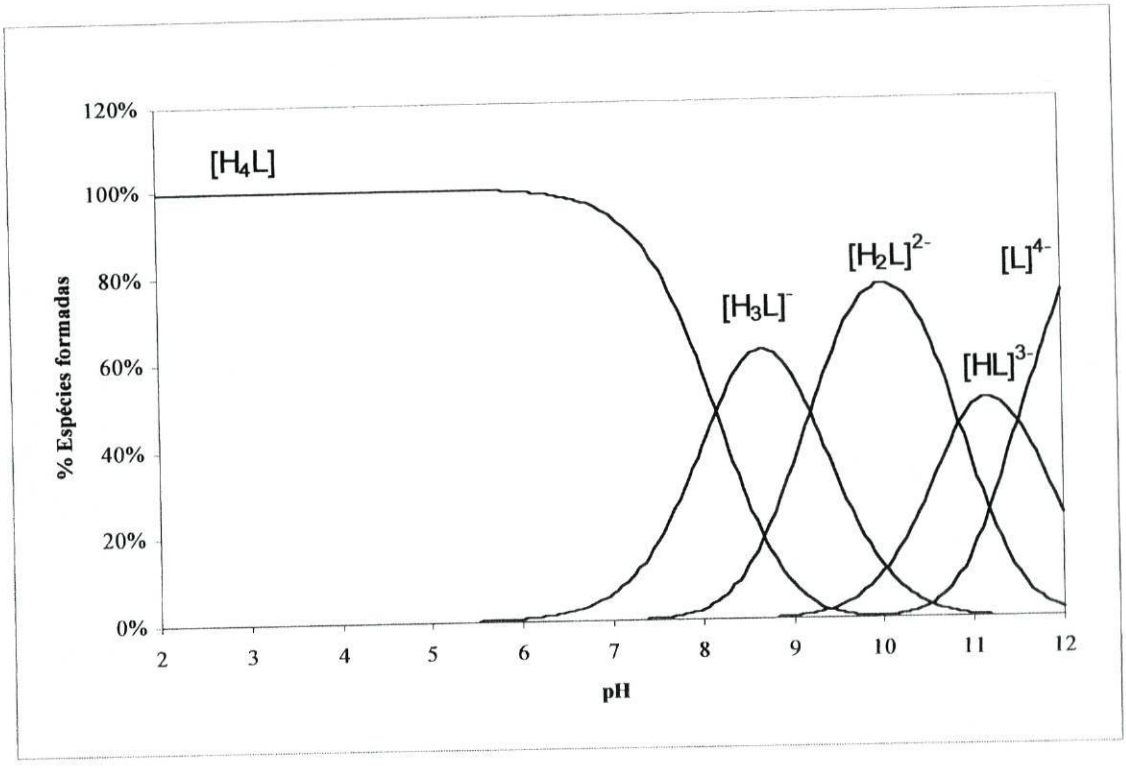


Figura 3.15 - Diagrama de distribuição das espécies presentes em solução aquosa de catequina a 25°C (força iónica de 0,10 mol dm^{-3}, ajustada com KNO_3).

Na Figura 3.16. está representado o gráfico das curvas dos valores de pH em função do volume de hidróxido de sódio ($\cong 2\times10^{-2}$ mol dm^{-3}), adicionado a 20.00ml de uma solução contendo catequina ($\cong 1\times10^{-3}$ mol dm^{-3}), obtidas com os dados adquiridos experimentalmente e a curva simulada com os valores de pH calculados com o programa de cálculo Best, considerando todos os valores de constantes de equilibrio determinados para este sistema e apresentados na tabela 3.5.. Nesta figura pode ser observado o bom ajustamento do modelo teórico aos resultados experimentais.

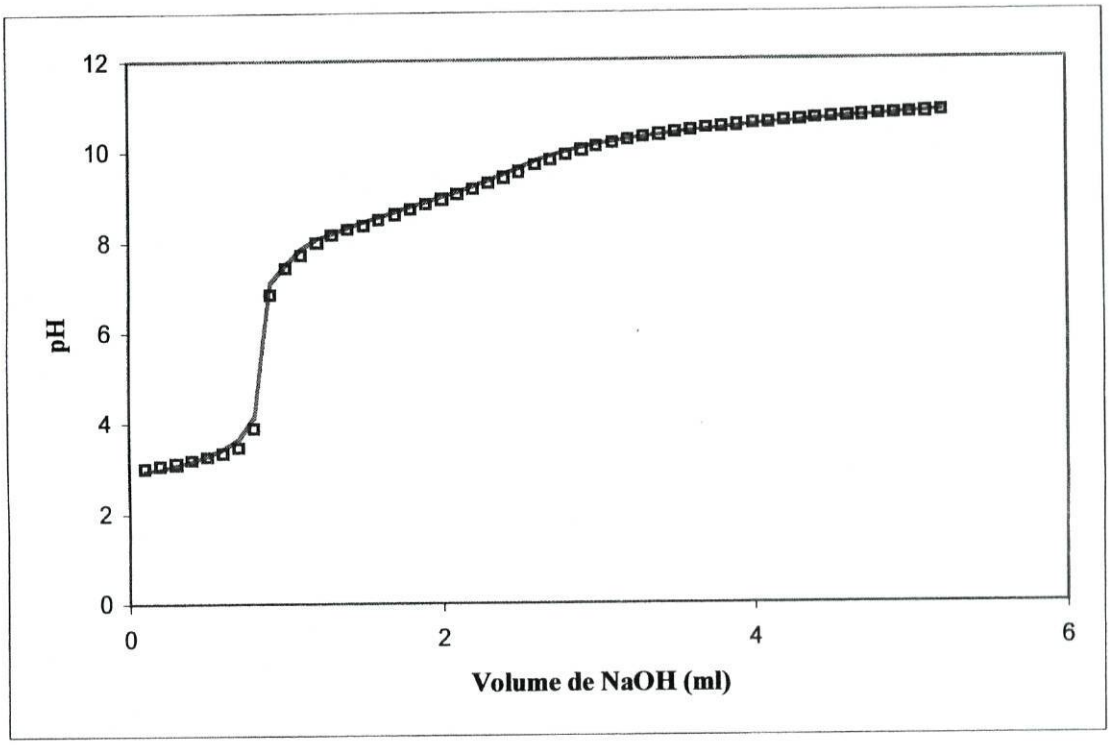


Figura 3.16 - Curvas de pH em função do volume de hidróxido de sódio adicionado a 20.00ml de uma solução contendo catequina curva experimental (□) e simulada (——).

Na Figura 3.17. encontra-se a representação gráfica das curvas de titulação potenciométrica, de 20,00 mL de uma solução de catequina ($\cong 1\times10^{-3}$ mol dm^{-3}) com hidróxido de sódio ($\cong 2\times10^{-2}$ mol dm^{-3}) e de uma solução constituída pelo mesmo ligando ($\cong 1\times10^{-3}$ mol dm^{-3}) e nitrato de cobre (1×10^{-3} mol dm^{-3}). Ambas as soluções tinham força iónica (0,10 mol dm^{-3}) ajustada com KNO_3. A diferença existente nos valores de pH ao longo da titulação, para as duas soluções, deve-se à formação de novas espécies em solução, resultantes da complexação do catião cobre (II) pela catequina, com a consequente libertação de iões H^+. Este incremento da concentração de iões leva à verificação de uma diminuição dos valores de pH relativamente à curva correspondente à solução de catequina na ausência de cobre (II) como se pode observar pela figura 3.17..

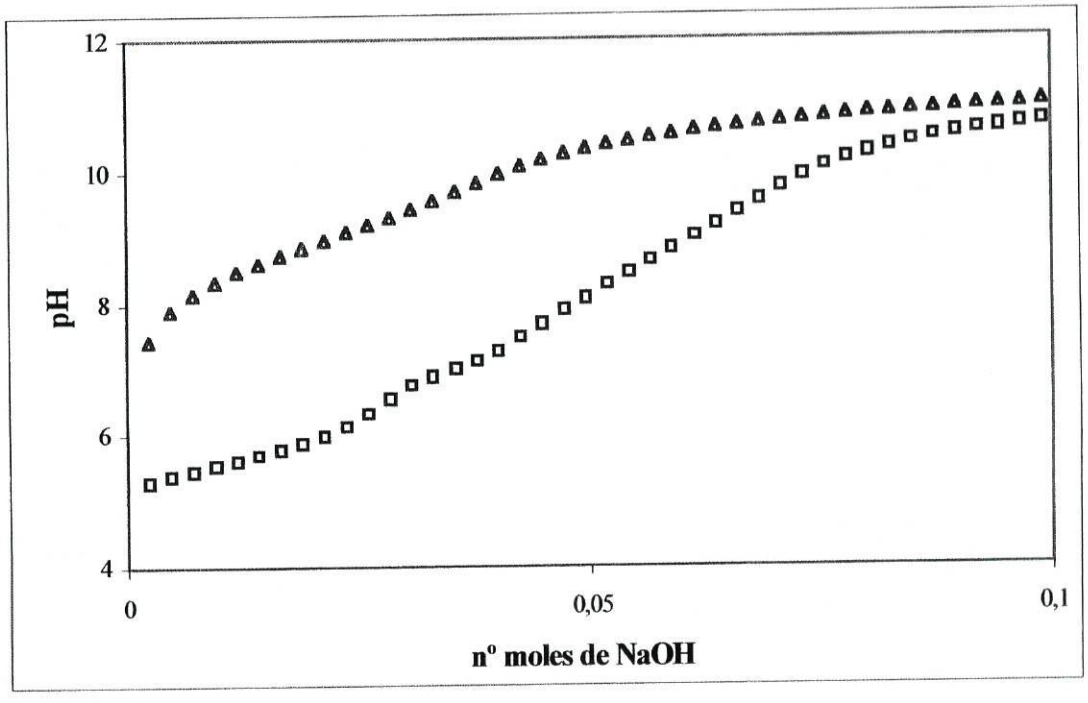


Figura 3.17- Curvas de titulação de 20,00 ml de solução de catequina com hidróxido de sódio a 2×10^{-2} moldm^{-3}, na presença de cobre (II) (□) e na ausência de cobre (II) (△).

Com os resultados obtidos os modelos matemáticos que melhor se ajustam aos dados experimentais obtidos nas condições ensaiadas considera a existência dos equilíbrios representados pelas seguintes reacções:

$$Cu + H_4L \rightleftharpoons CuLH_2 + 2H$$

$$Cu + H_4L \rightleftharpoons CuLH + 3H$$

$$Cu + H_4L \rightleftharpoons CuL + 4H$$

$$Cu + 2H_4L \rightleftharpoons CuL_2 + 8H$$

Assim, o modelo químico que melhor se ajusta aos dados experimentais obtidos potenciometricamente considera a exitência de quatro equilíbrios químicos correspondentes à formação das seguintes espécies: $[CuLH_2]$, $[CuLH]^-$, $[CuL]^{2-}$ e $[CuL_2]^{6-}$. Nesta representação as cargas foram omitidas para simplificação.

Os valores para as constantes de formação (logβ) determinados com os programas Superquad e Best para o sistema binário cobre (II)/catequina estão apresentados na tabela 3.6. Os valores apresentados são a média ± erro de pelo menos 6 titulações independentes. Em cada titulação utilizaram-se, no mínimo, 20 pontos experimentais. Os dados experimentais usados para a determinação da constantes de formação abrangem um intervalo de 3,0 a 10,6 unidades de pH.

Tabela 3.6.- Valores das constantes de formação (logβ) para o sistema binário cobre(II)/catequina a 25ºC (força iónica de 0.10 moldm^{-3}, ajustada com KNO_3).

Ligando	ião	p	q	r	Espécie possível	ΔpH	logβ (Superquad)	logβ (Best)
Catequina	Cu^{2+}	1	1	-2	$[CuLH_2]$	3,0-10,6	-7,91±0,2	-7,63±0,3
		1	1	-3	$[CuLH]^-$	3,0-10,6	-15,88±0,4	-15,58±0,5
		1	1	-4	$[CuL]^{2-}$	3,0-10,6	-25,27±0,4	-24,95±0,7
		2	1	-8	$[CuL_2]^{6-}$	3,0-10,6	-59,36±0,9	-58,60±0,9

A formação da espécie [CuL] em solução pode ser representada pela seguinte reacção:

$$Cu + H_4L \rightleftharpoons CuL + 4H$$

E o valor de logβ associado a este equilibrio é de –25,27. Como:

$$\frac{[CuL][H]^4}{[Cu][H_4L]} = \frac{[CuL]}{[Cu][L]} \frac{[H]^4[L]}{[H_4L]}$$

o valor de $\log K_{CuL}^{Cu}$ será igual a 14,45.

A formação da espécie $[CuL_2]$ em solução pode ser representada pela reacção:

$$Cu + 2H_4L \rightleftharpoons CuL + 8H$$

$$\frac{[CuL_2][H]^8}{[Cu][H_4L]^2} = \frac{[CuL_2]}{[Cu][L]^2} \times \frac{[H]^8[L]^2}{[H_4L]^2}$$

então o valor de $\log K_{CuL_2}^{Cu}$ será de 20,08.

Na figura 3.18. está representado o diagrama de distribuições das espécies presentes em solução. Neste diagrama de distribuição pode verificar-se que as espécies $[CuLH_2]$, $[CuLH]^-$, $[CuL]^{2-}$ e $[CuL_2]^{6-}$ estão presentes em maior percentagem.

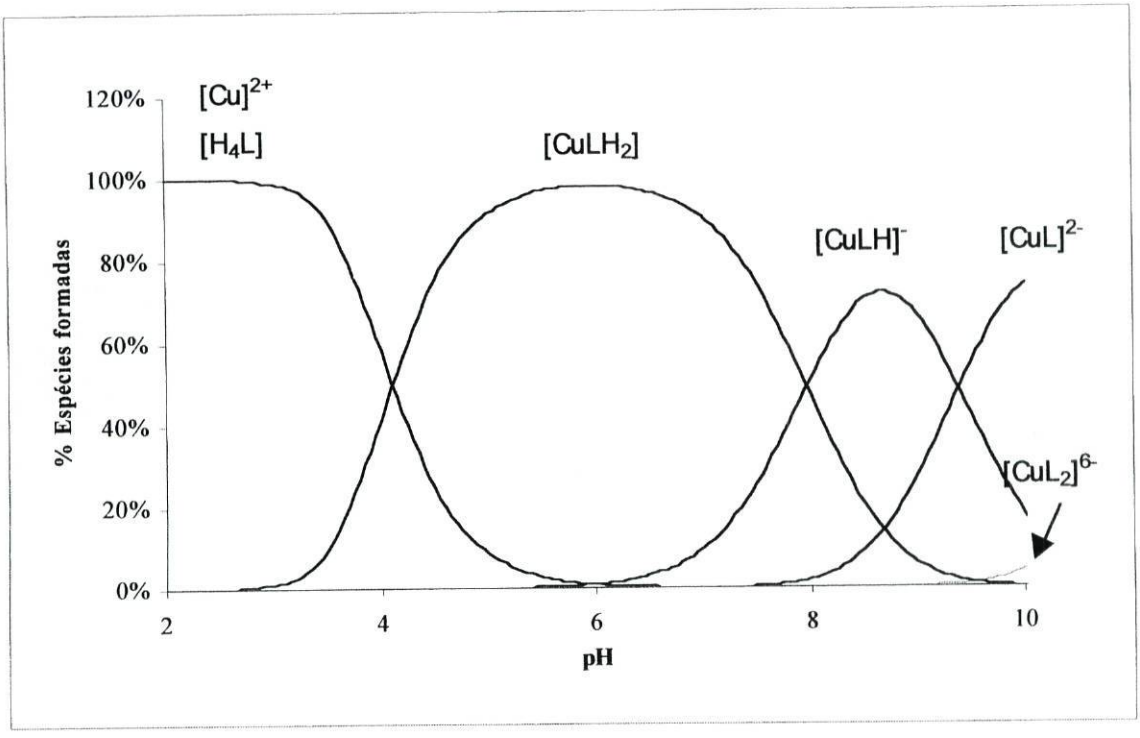


Figura 3.18. - Diagrama de distribuição das espécies presentes no sistema binário cobre (II)/catequina a 25°C (força iónica de 0,10 mol dm^{-3}, ajustada com KNO_3).

Na figura 3.19 apresentam-se os gráficos das curvas dos valores de pH em função do volume de hidróxido de sódio ($\cong 2\times10^{-2}$ mol dm^{-3}) adicionando a 20,00ml de uma solução contendo catequina ($\approx 1\times10^{-3}$mol dm^{-3}) e cobre(II) (1×10^{-3}mol dm^{-3}), obtidas com os dados adquiridos experimentalmente e a curva simulada com os valores de pH calculados com o programa de cálculo Best, considerando todos os valores das constantes de equilíbrio determinados para este sistema e apresentados na tabela 3.5. e 3.6.. Nesta figura pode ser observado o bom ajustamento do modelo teórico aos resultados experimentais [107].

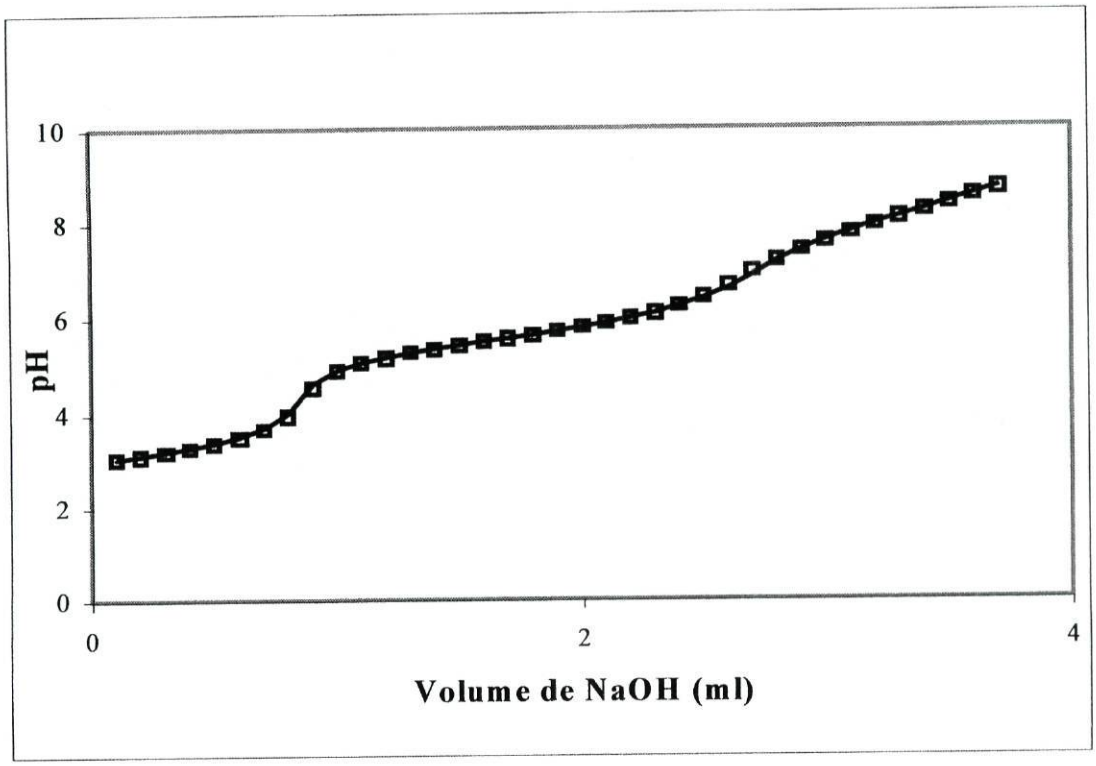


Figura.3.19.- Curvas de pH em função do volume de hidróxido de sódio adicionado a 20.00ml de uma solução contendo catequina ($\cong 1\times10^{-3}$ mol dm^{-3}), nitrato de potássio de concentração 0,10 mol dm^{-3} e cobre(II) (1×10^{-3} mol dm^{-3}), obtidas experimentalmente (□) e simulada (——).

3.1.4. Constantes de equilíbrio da taxifolina

A estrutura da taxifolina, (3',4'-di-hidroxifenil)-5,7-di-hidroxi-flavanon-3-ol, está representada na figura 3.20.

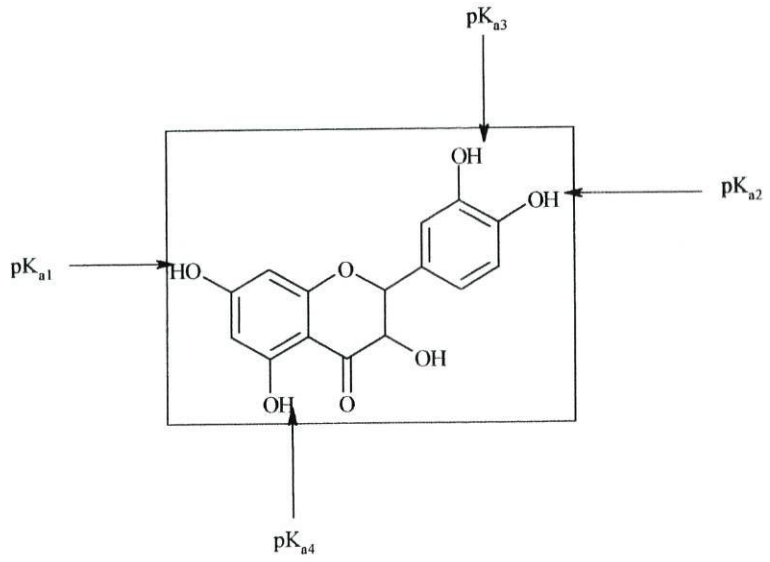


Figura 3.20.-Estrutura química da taxifolina.

A estrutura da taxifolina é semelhante à da catequina apresentando os mesmo grupos funcionais que lhe conferem características ácido-base nas condições experimentais descritas, apresentando um grupo carbonilo na posição 4.

No tratamento matemático dos resultados obtidos para a determinação das constantes de acidez, o modelo que melhor se ajusta aos dados experimentais considera a existência de quatro equilíbrios químicos representados pelas seguintes equações:

$$H_4L \rightleftharpoons H_3L + H$$

$$H_3L \rightleftharpoons H_2L + H$$

$$H_2L \rightleftharpoons HL + H$$

$$HL \rightleftharpoons H + L$$

correspondendo H_4L à taxifolina na forma neutra e L à taxifolina completamente desprotonada. Nesta representação as cargas foram omitidas para simplificação.

Os valores das constantes de acidez obtidos por titulação potenciométrica, a 25ºC e à força iónica de 0,10 mol dm^{-3}, ajustada com KNO_3, estão apresentados na tabela 3.7..

Para o cálculo dos valores de logβ foram usados os dados de seis titulações independentes, sendo os resultados apresentados como médias±erro de seis ensaios independentes, calculados da mesma forma como referidos anteriormente para o tirosol.

Os resultados experimentais usados para a determinação das constantes de acidez associadas aos equilíbrios atrás mencionados abrangem um intervalo entre 3,1-10,8 unidades de pH.

Tabela 3.7.- Valores das constantes de acidez (logβ) da taxifolina a 25ºC e à força iónica de 0,10 $moldm^{-3}$, ajustada com KNO_3.

Ligando	ião	p	q	r	Espécie possível	ΔpH	logβ (Superquad)	logβ (Best)
Taxifolina	H^+	1	0	-1	$[H_3L]^-$	3,1-10,8	-6,68±0,02	-6,50±0,02
		1	0	-2	$[H_2L]^{2-}$	3,1-10,8	-15,57±0,04	-15,15±0,07
		1	0	-3	$[HL]^{3-}$	3,1-10,8	-26,52±0,09	-26,47±0,09

Os valores das constantes de acidez da taxifolina obtidos experimentalmente foram de pK_{a1}=6,68, pK_{a2}=8,89 e pK_{a3}=10,95. Não se encontraram descritos na literatura os valores relativos a este composto.

Na figura 3.21. está representado o diagrama de distribuição das espécies presentes neste sistema em função do valor de pH. Inicialmente existe o ligando na forma H_4L, o qual é desprotonado ao longo da titulação potenciométrica pela adição do titulante.

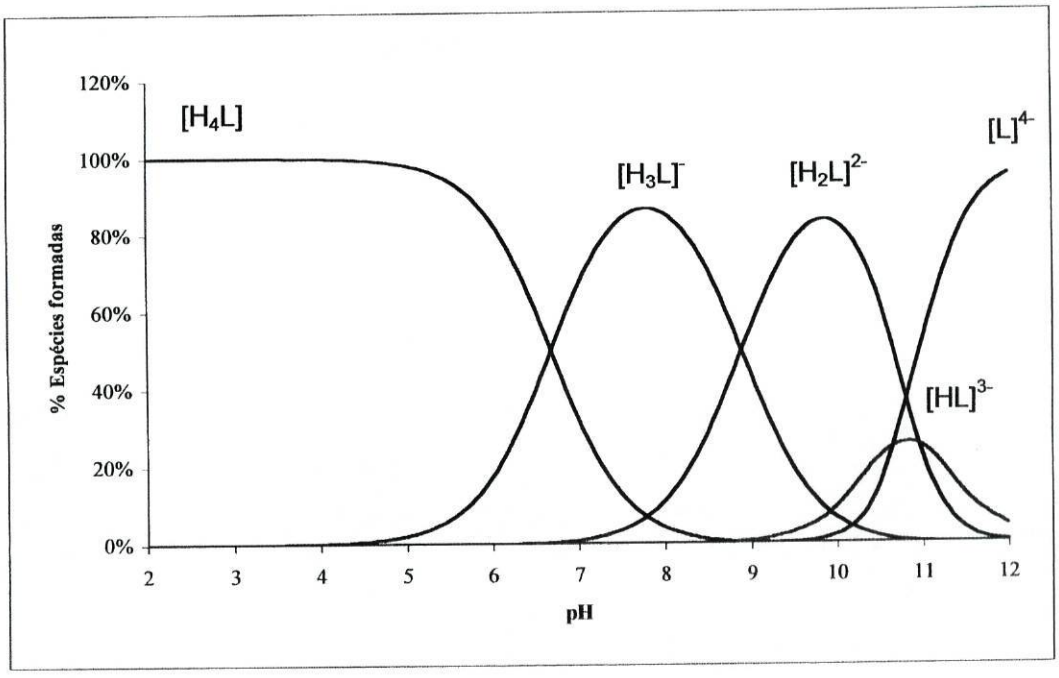


Figura 3.21. - Diagrama de distribuição das espécies presentes no sistema unitário taxifolina a 25°C (força iónica de 0,10 mol dm^{-3}, ajustada com KNO_3).

Na figura 3.22. está representado o gráfico das curvas dos valores de pH em função do volume de hidróxido de sódio ($\cong 2\times10^{-2}$ mol dm^{-3}), adicionado a 20.00mL de uma solução contendo taxifolina ($\cong 1\times10^{-3}$ mol dm^{-3}), obtidas com os dados adquiridos experimentalmente e a curva simulada com os valores de pH calculados com o programa de cálculo Best, considerando todos os valores de constantes de equilíbrio determinados para este sistema e apresentados na tabela 3.7.. Nesta figura pode ser observado o bom ajustamento do modelo teórico aos resultados experimentais.

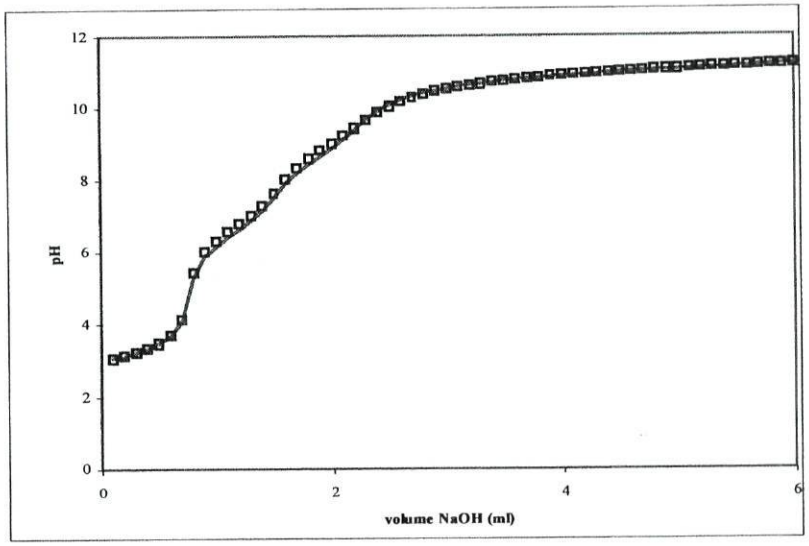


Figura 3.22. - Curvas de pH em função do volume de hidróxido de sódio adicionado a 20.00mL de uma solução contendo taxifolina curva experimental (□) e simulada (——).

Na Figura 3.23. encontra-se a representação gráfica das curvas de titulação potenciométrica de 20.00 mL de uma solução de taxifolina ($\cong 1\times10^{-3}$ mol dm^{-3}), com hidróxido de sódio ($\cong 2\times10^{-2}$ mol dm^{-3}) e de uma solução constituída pelo mesmo ligando ($\cong 1\times10^{-3}$ mol dm^{-3}) e nitrato de cobre (1×10^{-3} mol dm^{-3}). Ambas as soluções tinham força iónica (0,10 mol dm^{-3}) ajustada com KNO_3. A diferença existente nos valores de pH ao longo da titulação para as duas soluções deve-se à complexação do cobre (II) pela taxifolina.

Esta diferença começa a ser significativa para valores de pH próximos de 4 unidades, correspondendo portanto à formação de complexos entre o ligando e o catião cobre (II).

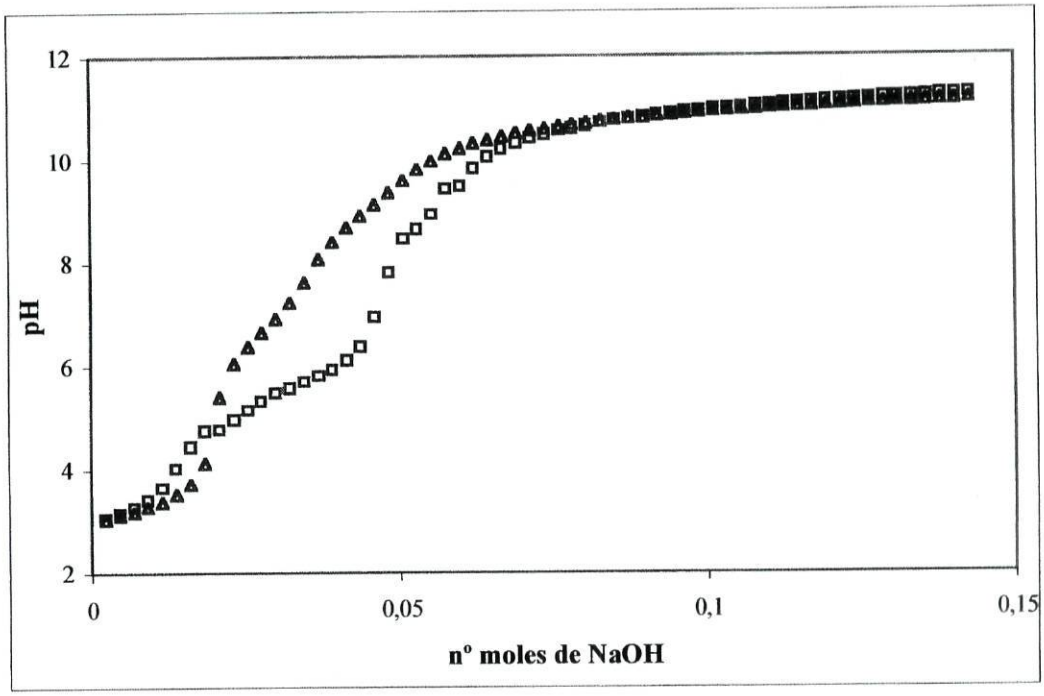


Figura 3.23. - Curvas de titulação de 20,00 mL de solução de taxifolina com hidróxido de sódio a 2×10^{-2} mol dm^{-3}, na presença de cobre (II) (1×10^{-3} mol dm^{-3}) (□) e na ausência de cobre (II) (Δ).

Com os resultados obtidos o modelo matemático que melhor se ajusta aos dados experimentais obtidos nas condições ensaiadas considera a existência dos equilíbrios representados pelas reacções:

$$Cu + H_4L \rightleftharpoons CuLH_3 + H$$

$$Cu + H_4L \rightleftharpoons CuLH_2 + 2H$$

$$Cu + H_4L \rightleftharpoons CuLH + 3H$$

$$Cu + H_4L \rightleftharpoons CuL + 4H$$

$$2Cu + H_4L \rightleftharpoons Cu_2L + 4H$$

$$Cu + 2H_4L \rightleftharpoons CuL_2H_4 + 4H$$

Assim, o modelo químico que melhor se ajusta aos dados experimentais obtidos potenciometricamente considera a existência de seis equilíbrios químicos correspondentes à formação das seguintes espécies: $[CuLH_3]^+$, $[CuLH_2]$, $[CuLH]^-$, $[CuL]^{2-}$, $[CuL]^{2-}$. e $[CuL_2H_4]^{2-}$. Nesta representação as cargas foram omitidas para simplificação.

Os valores para as constantes de formação (logβ) determinados com os programas Superquad e Best para o sistema binário cobre (II)/taxifolina estão apresentados na tabela 3.8. Os valores apresentados são a média ± erro de pelo menos 6 titulações independentes. Em cada titulação utilizaram-se, no mínimo, 20 pontos experimentais. Os dados experimentais usados para a determinação da constantes de formação abrangem um intervalo de 3,1 a. 6,0 unidades de pH.

Tabela 3.8. - Valores das constantes de formação (logβ) para o sistema binário cobre(II)/taxifolina a 25ºC (força iónica de 0.10 mol dm^{-3}, ajustada com KNO_3).

Ligando	ião	p	q	r	Espécie possível	ΔpH	logβ (Superquad)	logβ (Best)
Taxifolina	Cu^{2+}	1	1	-1	$[CuLH_3]^+$	3,1-5,6	-1,60±0,1	-1,54±0,1
		1	1	-2	$[CuLH_2]$	3,3-5,9	-7,07±0,1	-7,47±0,6
		1	1	-3	$[CuLH]^-$	3,3-5,9	-12,55±0,9	-12,89±0,9
		1	1	-4	$[CuL]^{2-}$	3,2-6,0	-19,48±0,3	-22,63±0,9
		1	2	-4	$[Cu_2L]^{2-}$	3,1-6,0	-14,51±0,3	-13,84±0,8
		2	1	-4	$[CuL_2H_4]^{2-}$	3,4-5,6	-14,10±0,3	-13,76±0,4

Na figura 3.24 está representado o diagrama de distribuições das espécies presentes em solução.

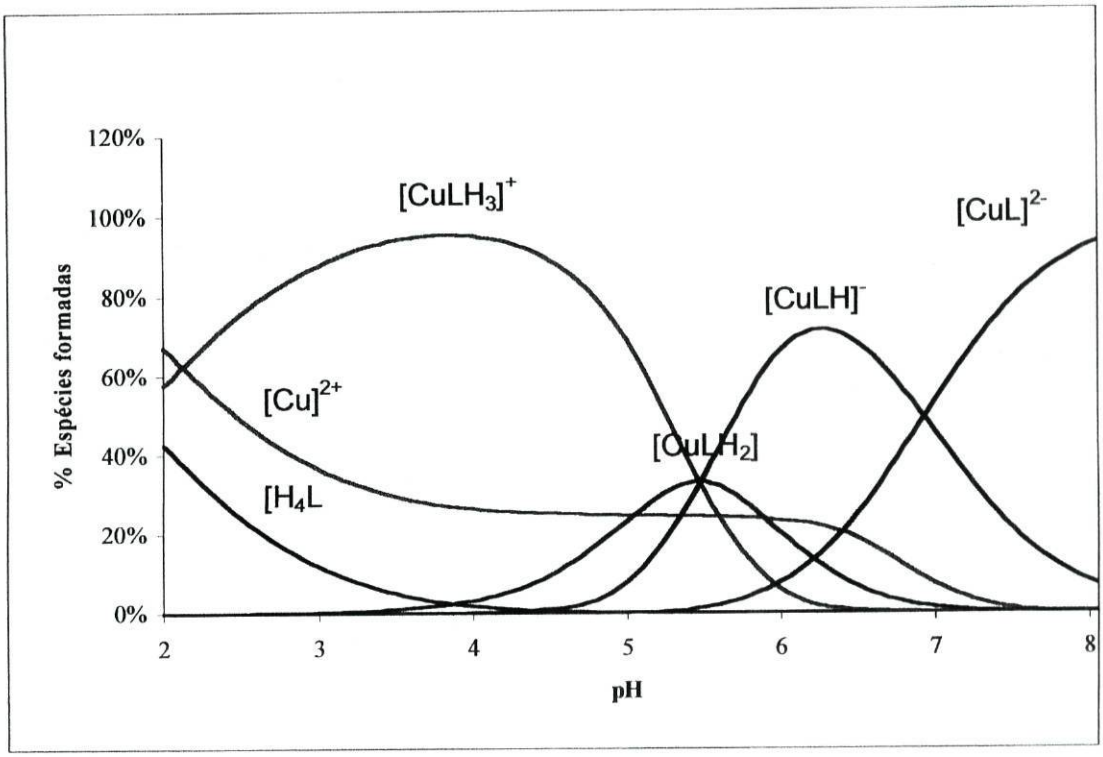


Figura 3.24.-Diagrama de distribuição das espécies presentes no sistema binário cobre (II)/ taxifolina a 25°C (força iónica de 0,10 mol dm^{-3}, ajustada com KNO_3).

Na figura 3.25 apresentam-se os gráficos das curvas dos valores de pH em função do volume de hidróxido de sódio ($\approx 2\times10^{-2}$ mol dm^{-3}) adicionando a 20,00mL de uma solução contendo taxifolina ($\approx1\times10^{-3}$mol dm^{-3}) e cobre(II) (1×10^{-3}mol dm^{-3}), obtidas com os dados adquiridos experimentalmente, e a curva simulada com os valores de pH calculados com o programa de cálculo Best, considerando todos os valores das constantes de equilíbrio determinados para este sistema e apresentados na tabela 3.7. e 3.8.. Nesta figura pode ser observado o bom ajustamento do modelo teórico aos resultados experimentais.

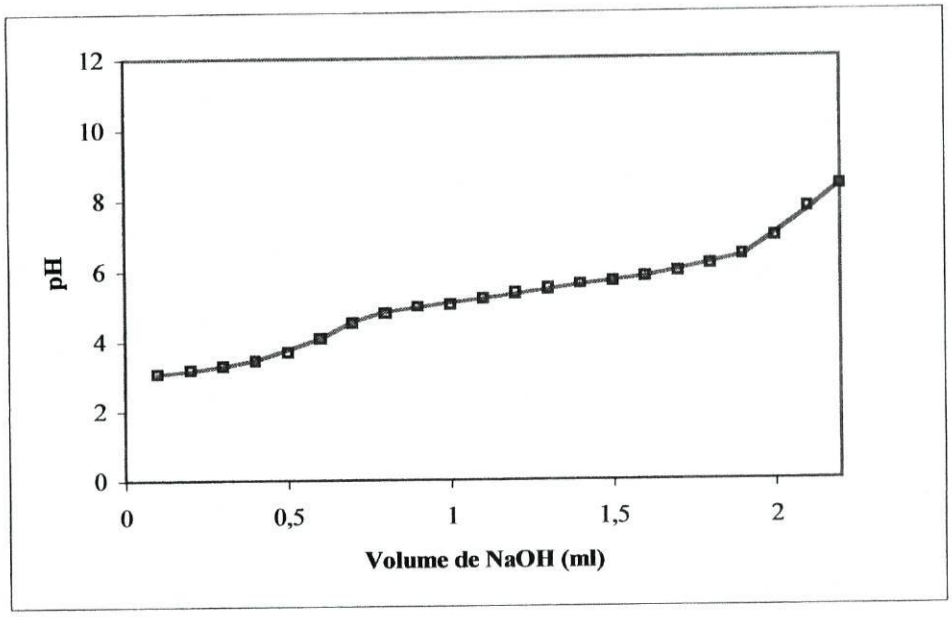


Figura 3.25. - Curvas de pH em função do volume de hidróxido de sódio adicionado a 20.00 mL de uma solução contendo taxifolina ($\cong 1\times10^{-3}$ mol dm^{-3}), nitrato de potássio (0,10 $moldm^{-3}$) e cobre (II) (1×10^{-3} mol dm^{-3}), obtidas experimentalmente (□) e simulada (——).

Capítulo IV

Conclusões

4. Conclusões

Os compostos fenólicos são actualmente considerados potenciais agentes antioxidantes [42, 63, 120-122]. Há no entanto, controvérsia acerca dos requisitos estruturais essenciais para a manifestação desta actividade. Diversos estudos revelaram ser fundamental a existência dos grupos fenólicos, sendo normalmente a actividade incrementada pela poli-hidroxilação. De facto, a presença de um grupo catecol nos ácidos fenólicos ou de um grupo catecol no anel B dos flavonóides tem sido referida como uma característica estrutural importante para a actividade antioxidante destes compostos, conforme o ilustrado nas figuras 4.1. e 4.2. [123-124].

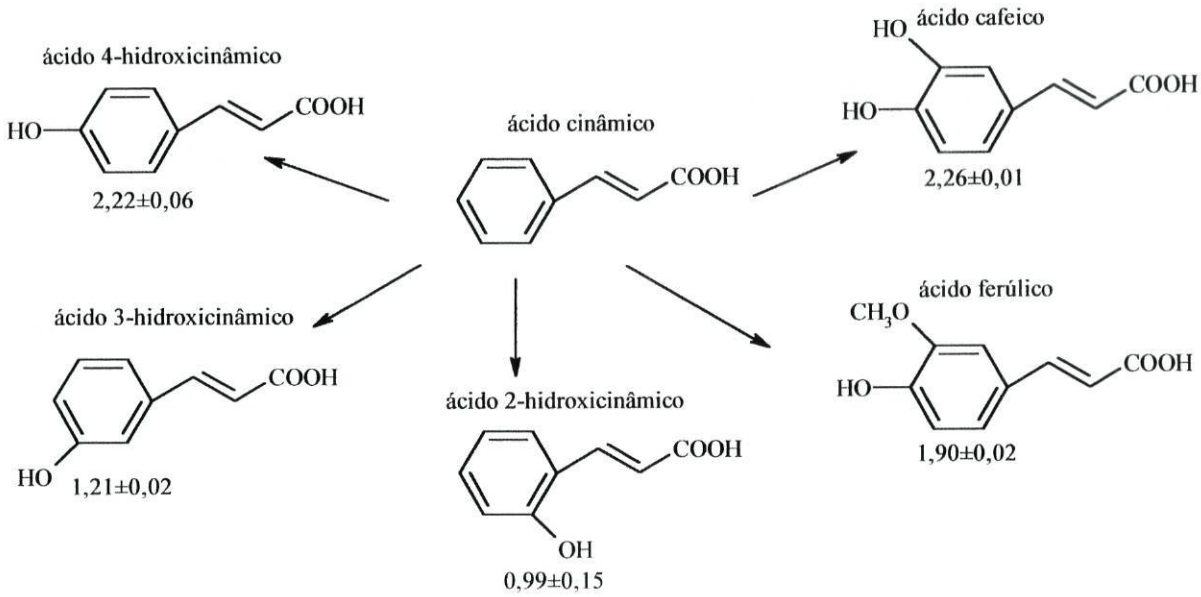


Figura 4.1. Dados relativos à actividade antioxidante de ácidos cinâmicos [125].

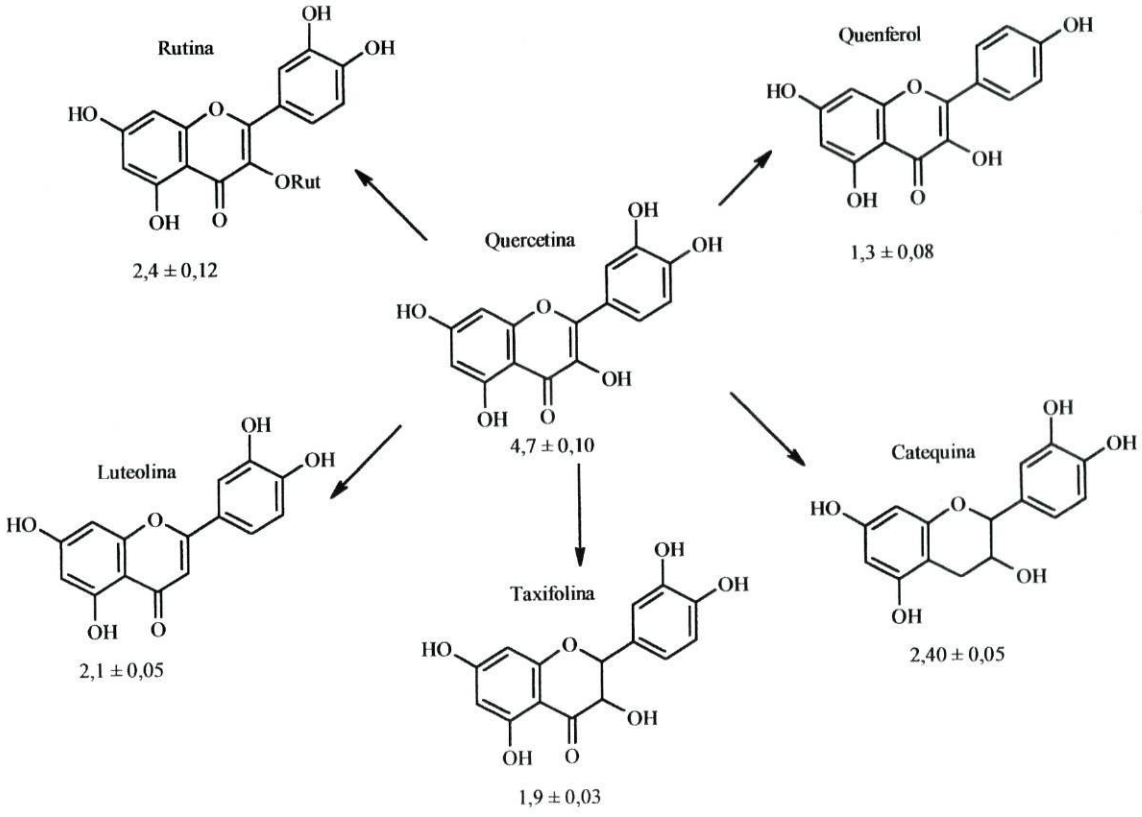


Figura 4.2. Dados relativos à actividade antioxidante de flavonóides [125].

Pelo exposto, pode deduzir-se que a actividade antioxidante, independentemente do mecanismo pelo qual opera, está intimamente relacionada com a estrutura química dos compostos. A relação estrutura–actividade (SAR) e o estudo do mecanismo de acção destes compostos são importantes nesta área de investigação.

Com o intuito de contribuir para o esclarecimento da relação estrutura-propriedades físico-químicas-actividade dos compostos fenólicos e para o mecanismo de acção *in situ,* foi efectuado o estudo da complexação do cobre (II) com diferentes tipos de ligandos existentes existentes na uva e no vinho. Os ligandos estudados foram um derivado do feniletanol, um ácido cinâmico e dois flavonóides, sobre os quais estão já efectuados ensaios de avaliação de actividade antioxidante. A escolha destes antioxidantes prende-se com o facto de estes estarem presentes não só no vinho como também noutros alimentos e produtos a partir deles processados.

Os estudos versaram a determinação das constantes de acidez em solução aquosa e a determinação das constantes de formação dos complexos cobre (II)/compostos

fenólicos. No futuro estes resultados poderão constituir uma importante base de trabalho para o estabelecimento da relação estrutura-actividade para estas famílias de compostos.

Tirosol

O valor do pk_{a1} do tirosol é de 9,86 correspondente à desprotonação do grupo fenólico. O valor da constante de estabilidade obtido neste trabalho foi de $\log K_{CuL}^{Cu} = 8,25$. Como não existem na literatura dados relativos a este composto não foi possível estabelecer uma base comparativa sendo no entanto de realçar o facto deste valor ser igual ao da constante estabilidade do ácido 4-hidroxicinâmico.

Ácido 4-hidroxicinâmico

Os valores das constantes de acidez do ácido 4-hidroxicinâmico obtidos experimentalmente (pk_{a1}=4,49 e pK_{a2}=8,89) são significativamente diferentes dos descritos na literatura para estes compostos (pk_{a1}=4, 81 e pK_{a2}=9,15). Este facto pode relacionar-se com o uso de diferentes concentrações de ligando e metal e/ou do tipo de ajuste da força iónica.

É também possível verificar que os valores das constantes de acidez do ácido 4-hidroxicinâmico são semelhantes aos valores encontrados para o ácido ferúlico (pk_{a1}=4,50 e pk_{a2}=8,92), permitindo concluir que a existência de um grupo metoxilo na estrutura não influencia significativamente o valor das constantes.

De igual modo, os valores de log β obtidos para estes compostos são semelhantes (Tabela 3.4. e [17]) o que pode levar a concluir que o grupo metoxilo do ácido ferúlico também não contribui para as propriedades de complexação.

Os valores das constantes de estabilidade para o ácido 4-hidroxicinâmico foram de $\log K_{CuL}^{Cu} = 8,26$ e de $\log K_{CuL_2}^{Cu} = 11,27$ e para o ácido ferúlico de $\log K_{CuL}^{Cu} = 5,12$ e de $\log K_{CuL_2}^{Cu} = 10,71$ [17].

Catequina

Os valores das constantes de acidez obtidos para a catequina foram de pK_{a1}=8.16, pK_{a2}=9.20, pK_{a3}=10.86 e pK_{a4}=11.50, sendo estes valores inferiores aos valores de pK_a descritos na literatura (8,64, 9,41, 11,26 e 13,26).

Tendo em conta a estrutura tridimensional da catequina (Figura 4.3.) e os dados das constantes de acidez obtidos para a taxifolina é possível atribuir com segurança os valores dos pK_a (Figura 3.14.) A sequência de desprotonação proposta é anel A, anel B, anel B e anel A [126].

Os valores das constantes de formação calculados são $\log K_{CuL}^{Cu} = 14{,}45$ e $\log K_{CuL_2}^{Cu} = 20{,}08$.

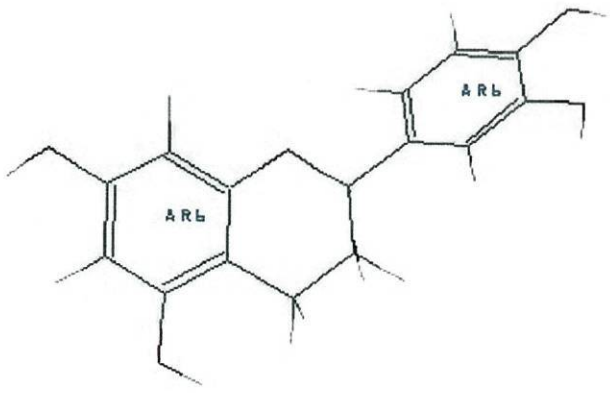


Figura 4.3. Estrutura da catequina

Taxifolina

Os valores das constantes de acidez obtidos para a taxifolina foram de pK_{a1}=6,68, pK_{a2}=8,89 e pK_{a3}=10,95 (Figura 3.20.). Por limitações da técnica utilizada não foi possível determinar o valor de pK_{a4}.

O valor de pK_{a1} é inferior ao da catequina devido à influência do grupo carbonilo na posição C4 o qual promove um deslocamento electrónico que afecta a ligação O-H em C7, originando um valor diferente de energia de dissociação. O valor de pk_{a4} é superior ao encontrado para a catequina, devido a este grupo, conforme o exposto na estrutura optimizada (Figura 4.4.), estabelecer uma ponte de hidrogénio levando a um incremento na força da ligação O-H e portanto a um valor mais elevado de pK_a. Devido à orientação espacial deste tipo de moléculas (Figura 4.3. e 4.4.) a estrutura catecólica praticamente não sofre variação no valor relativo das suas constantes de acidez.

Para este composto não foi possível determinar o valor de $\log K_{CuL}^{Cu}$, dado ser necessário o conhecimento do valor de pK_{a4}, o qual será calculado posteriormente recorrendo a técnicas espectrofotométricas.

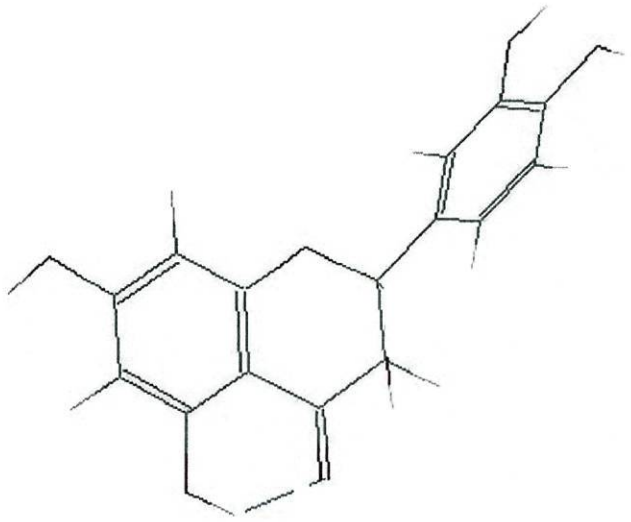
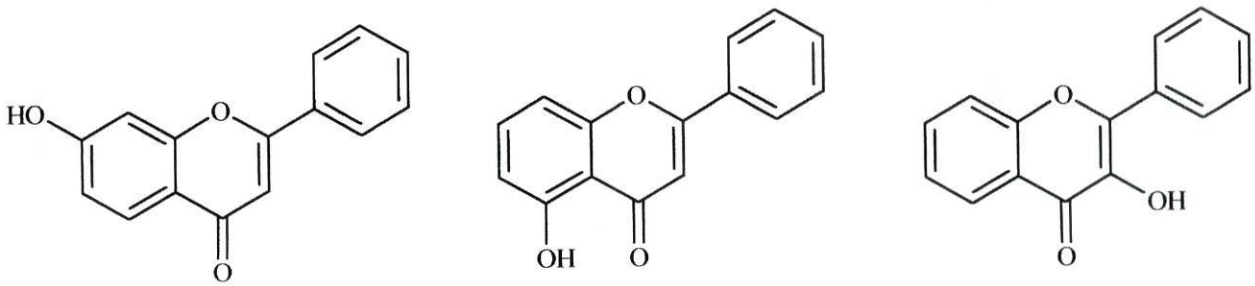


Figura 4.4. Estrutura da taxifolina

Os valores descritos na literatura para as constantes de acidez de derivados das flavonas corroboram as conclusões obtidas neste trabalho (Figura 4.5.).



7-Hidroxiflavona pKa=8,48

5-Hidroxiflavona pKa=11,44

3-Hidroxiflavona pKa=10,34

Figura 4.5. Valores de constantes de acidez de derivados de flavonas [124].

Podemos através deste trabalho ainda concluir que os flavonóides e os ácidos cinâmicos, dependendo da sua estrutura química, poderão ser antioxidantes que actuam por via de dois mecanismos: através da sua capacidade de sequestrar radicais livres e/ou através de complexação de metais pró-oxidantes.

A maior eficácia antioxidante da catequina em relação à taxifolina pode ser atribuída às suas propriedades de complexação com metais de transição, nomeadamente o cobre (II) [127-129].

Capítulo V

Bibliografia

5. Bibliografia

1. M. Tuan, T. Ferrano, Phenolic Compounds in Food and Cancer Prevention, Phenolic compounds in food and their effects on health II, 1992, II, pg 8-26.

2. Q. Chu, M. O'Dwyer, M. G. Zeece, Direct analysis of resveratrol in wine by micellar electrokinetic capillary electrophoresis, J. Agric. Food Chem., 1998, 46, 509-513.

3. J. Kanner, E. Frankel, R. Granit, B. German, J. E. Kinsella, Natural antioxidants in grapes and wines, J. Agric. Food Chem., 1994, 42, 64-69.

4. J. M. R. Silva, Anthocyanins and proanthocyanidins in grapes and wines. Their primordial role in enology, In Vino Analytica Scientia, 1997, 101-106.

5. G. Mazza, L. Fukumoto, P. Delaquis, B. Girard, B. Ewert, Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia, J. Agric. Food Chem., 1999, 47, 4009-4017.

6. C. Tang Ho, Phenolic compounds in food, Phenolic compounds in food and their effects on health II, 1992, Capítulo 1, 1-7.

7. M. I. .M. Spranger "Phenolic Compounds", in Les acquisitions Récentes en Chromatographie du Vin - Aplications à l'analyse sensorielle des vins, Les acquisitions, ed. Lavoisier Tec Doc, Bernard Doneche, 1992, pg 87-95.

8. M. S. McDonald, M. Hughes, J. Burns, M. E. J. Lean, D. Mathews, A. Crozier, Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins, J. Agric. Food Chem., 1998, 46, 368-375.

9. M. P. Kahkonen, A. I. Hopia, H. J. Vuorela, J. P Rauha, K. Phlaja, T. S. Kujala, M. Heinonen, Antioxidant activity of plant containing phenolic compounds, J. Agric. Food Chem., 1999, 47, 3954-3962.

10. A. A. E. Bertelli., Recent progress in research on wine and its components and their favorable effects on health, Drugs EXPTL. CLIN RES, 1999, 25, 51-52.

11. P. G. Vintani, Fragments of tradition: revisiting the virtues of wine, Drugs EXPTL. CLIN.RES, 1999, 25, 163-165.

12. R. M. Lamuela-Raventós, M. C. Torre-Boronat, Beneficial effects of white wines, Drugs EXPTL. CLIN.RES., 1999, 25, 121-124.

13. S. Miura, J. Watanable, M. Sano, T. Tomita, T. Osawa, Y. Hara, I. Tomita, Effects of various natural antioxidants on the Cu^{2+}-mediated oxidative modification of low-density lipoprotein, Bio. Pharm. Bull., 18:8, 1-4, 1995.

14. J. Laranjinha, L. Almeida, V. Madeira, V. Reduction of ferrylmyoglobin by dietary phenolic acid derivatives of cinnamic acid, Free radic. Biol. Med., 18:329-337; 1995.

15. B.C. Scott, J. Butler, B. Halliwell, Aruoma O. I. Evaluation of the antioxidant actions of ferulic acid and catechins. Free Rad. Res. Commms, 19:4, 241-253, 1993.

16. E. Graf, Antioxidant potential of ferulic acid, Free Radc Biol. Med., 13:435-448, 1992

17. F. Borges, J.L.F.C. Lima, I. Pinto, S. Reis, C. Siquet, Chelating activity of caffeic and ferulic acids towards copper (II), em publicação.

18. Methods in Plant Biochemistry "Plant Phenolics"- vol. 1, Ed. J.B. Harbor, Academic Press, 1989.

19. S. Teixeira., Composição fenólica não volátil da uva e do vinho., Trabalho de seminário do curso de Mestrado em Controlo de Qualidade da Faculdade de Farmácia do Porto, 2001.

20. D. Dubourdieu, Compostos Aromáticos, Techniques de séparation et d'isolement des diférents composés phénoliques présents dans le raisin et le vin blanc, Jornadas de Enologia, 1988, 1-8, 67-68.

21. U. Vrhovek, Extraction of hydroxycinnamoyltartaric acid from berries of different grape varieties, J. Agric. Food Chem., 1998, 46, 4203-4208.

22. B. F. Simón, J. Pérez-Ilzarbe, T. Hernández, C. Gómez-Cordovés, I. Estrella, Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juices, J. Agric. Food Chem., 40, 1992, 1531-1535.

23. T. C. Somers, E. Vérette, K. F. Pocock, Hydroxycinnamate esters of *Vitis vinifera*: changes during white vinification, and effects of exogenous enzymic hydrolysis, J. Sci. Food Agric., 1987, 40, 67-78.

24. K. Robards, P. D. Prenzler, G. Tucker, P. Swatsitang, W. Glover, Phenolic compounds and their role in oxidative process in fruits, Food Chemistry, 1999, 66, 401-436.

25. M.F. M. Borges, "Síntese de produtos naturais com potencial actividade biológica e obtenção de derivados", Tese de Doutoramento, Faculdade de Farmácia do Porto, 1994.

26. K. R. Markham S. J. Bloor, " Analysis and identification of flavonoids in pratice" in Flavonoids in Health and Disease edited by Catherine A. Rice-Evans, Lester Packer, 1998, 1-30.

27. E. Cadenas, L. Packer, Handbook of antioxidants, 1996, Marcel Dekker, New York, Flavonoids and polyphenols: chemistry and biology, 409-436.

28. M. T. Vasconcelos, M. Azenha, V Freitas, Role of polyphenols in copper complexation in red wines, J. Agric. Food Chem., 1999, 47, 2791-2796.

29. I. M. G. L. Hertog, P. C. H. Hollman, B. Van de Putte, Content of potencially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices, J. Agric. Food Chem., 1993, 41, 1242-1246.

30. B. W. Zoecklein, K. C. Fugelsang, B. H. Gump, F. S. Nury "Wine analysis and production" The Chapman & Hall Library, 1995, 115-151.

31. J. J. Macheix, A. Fleurirt, J. Billot, Fruit Phenolics, 1994, CRC Press, Inc, The main phenolics of fruits, 1-98.

32. J. J. Macheix, A. Fleurirt, J. Billot, Fruit Phenolics, 1994, CRC Press, Inc, Phenolic composition of individual fruits, 105-126.

33. J. C. Sapis, P. Ribereau-Gayon, Study in wine of tyrosol, tryptophol, phenethyl alcohol and gamma-butyrolactone, secondary products of alcoholic fermentation , Ann. Techn.Agric., 1969, 18 (3), 221-229.

34. M. Fabios, A Lopez-Toledano, M. Mayen, J. Merida, M. Medina, Phenolic compounds and browning in sherry wines subjected to oxidative and biological aging, J. Agric. Food Chem., 2000, 48, 2155-2159.

35. C. Yoneyama, T. Kushida, Composition of phenolic compounds in Koshu white wine, J. Jap. Soc. Food. Sci. Techn., 1980, 27(12), 623-626.

36. M. Fabios, A. Lopez-Toledano, M. Mayen, J. Merida, M. Medina, Phenolic compounds and browning in sherry wines subjected to oxidative and biological aging, J. Agric. Food Chem., 2000, 48, 2155-2159.

37. R. Di Stefano, Advances in the study of secondary metabolites occurring in grapes and wines, Drugs Exptl. Clin.Res, 1999, 25, 51-56.

38. P. Rapisarda, G. Carollo, B. Fallico, F. Tomaselli, E. Maccarone, Hydroxycinnamic acids as markers of Italian blood orange juices, J. Agric. Food Chem, 1998, 46, 464-470.

39. K. Robards, M. Antolovich, Analytical chemistry of fruit bioflavonoids, Analyst, 1997, 122, 11R-30R.

40. J. J. Macheix, A. Fleurirt, J. Billot, Fruit Phenolics, 1994, CRC Press, Inc, Changes and metabolism of phenolic compounds in fruits, 149-221.

41. L. Packer, M. Hiramatsu, T. Yoshikawa, Antioxidant food supplements in human health, Academic Press, 1999.

42. S. A. B. E. Van Acker, D.J. Van Den Berg, M. N. J. L. Tromp, et all, Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids, Free Radical Biology & Medicine, 1996, 20 No 3, 331-342.

43. T. Lapidot, S. Harel, R. Granit, J. Kanner, Bioavailability of red wine antocyanins as decteted in human urine, J. Agric. Food Chem., 1998, 46, 4297-4302.

44. H. Vuorinen, K. Maatta, R. Torronen, Content of the flavonols myrcetin, quercetin, and kaempferol in finnish Berry wines, J. Agric. Food Chem, 2000, 48, 2675-2680.

45. H. Wang, G. Cao, R. L. Prior, Total antioxidant capacity of fruits, J. Agric. Food Chem., 1996, 44, 701-705.

46. A. C. Douillet-Breuil, P. Jeandet, M. Adrian, R. Bessis, Changes in the phytoalexin content of various Vitis Spp. in response to ultraviolet C elicitation, J. Agric. Food Chem., 1999, 47, 4456-4461.

47. R. C. Ellison, Moderate consumption of wine: effects on health and implications for public health policy, Bulletin de l'O.I.V., 1998, 71, 803-804, 32-38.

48. D. M. Goldberg, B. Hoffman, J. Yang, G. J. Soleas, Phenolic constituents, furans, and total antioxidant status of distilled spirits, J. Agric. Food Chem., 1999, 47, 3978-3985.

49. M. T. R. Lima, P. Waffo-Téguo, P. L. Teissedre, A Pujolas, J. Vercauteren, J. C. Cabanis, J. M. Mérillon, Determination of stilbenes (*trans*-astringin, *cis*- and trans-piceid, and *cis*- and *trans*-resveratrol) in Portuguese wines, J. Agric. Food Chem., 1999, 47, 2666-2670.

50. D. K. Das. M. Sato, P.S. Ray, G. Maulik, R. M. Engelman, A. A. E. Bertelli, A. Bertelli, Cardioprotection of red wine: role of polyphenolic antioxidants, Drugs Exptl Clin Res, 1999, 25, 115-120.

51. A. Ghiselli, M. Nardini, A. Baldi, C. Scaccini, Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from Italian red wine, J. Agric. Food Chem., 1998, 46, 361-366.

52. I. M. Heinonen, P. J. Lehtonen, A. I. Hopia, Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors, J. Agric. Food Chem., 1998, 46, 25-31.

53. Q. Chu, M. O'Dwyer, M. G. Zeece, Direct analysis of resveratrol in wine by micellar electrokinetic capillary electrophoresis, J. Agric. Food Chem, 1998, 46, 509-513.

54. N. Pellegrini, P. Simonetti, C. Gardana, O. Brenna, F. Brighenti, P. Pietta, Polyphenol content and total antioxidant activity of V*ini novelli* (Young red wines) , J. Agric. Food Chem, 2000, 48, 732-735.

55. S. Bastianetto, W. H. Zheng, R. Quirion, Neuroprotective abilities of resveratrol and other red wine constituents against nitric oxiderelated toxicity in cultured hippocampal neurons, Br. J. Pharmacol, 2000, 131 (4), 711-720.

56. J. B. German, R. L Walzem, The health benefits of wine, Annu. Rev Nutr, 2000, 20, 561-593.

57. L. W. Morton, R. A. A. Cacceta, I. B. Puddey, K. D. Croft, Chemistry and biological effects of dietary phenolic compouds: relevance in cardiovascular disease, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol, 2000, 27 (3), 152-159.

58. J. Burns, P. T. Gardner, J. O'Neil, S. Crawford, I. Morecroft, D. B. McPhail, C. Lister, D. Matthews, M.R. MacLean, M.E. Lean, G. G. Duthie, A. Crozier, Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines, J. Agric. Food Chem., 2000, 48 (2), 220-230.

59. P. Jeandet, R. Bessis, B. F. Maume, P. Meunier, D. Peyron, P. Trollat, Effect of enological practices on the resveratrol isomer content of wine, J. Agric. Food Chem., 1995, 43, 316-319.

60. M. Saito, H. Hosoyama, T. Ariga, S. Kataoka, N. Yamaji, Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins, J. Agric. Food Chem., 1998, 46, 1460-1464.

61. J. B. German, "Nutricional Studies of Flavonoids in Wine" in Flavonoids in Health and Disease edited by Catherine A. Rice-Evans, Lester Packer, 1998, 343-353.

62. A. S. Meyer, J. L. Donovan, D. A. Pearson, A.L. Waterhouse, E. N. Frankel, Fruit hydroxycinnamic acids inhibit human low-density lipoprotein oxidation *in vitro*, J. Agric. Food Chem., 1998, 46, 1783-1787.

63. N. C. Cook, S. Samman, Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, J. Nutr. Biochem., 1996, 7, 66-76.

64. E. N. Frankel, A. L. Waterhouse, P. L. Teissedre, Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins, J. Agric. Food Chem., 1995, 43, 890-894.

65. O. Benavente-Garcia, J. Castillo, F. R. Marin, A. Ortuño, J. Del Rio, Uses and properties of citrus flavonóides, J. Agric. Food Chem, 1997, 45 (12), 4505-4515.

66. A.C. Douillet-Breuil, P. Jeandet, M. Adrian, R Bessis, Changes in the phytoalexin content of various Vitis Spp. in response to ultraviolet C elicitation, J. Agric. Food Chem., 1999, 47, 4456-4461.

67. N. Landrault, P. Poucheret, P. Ravel, F. Gasc, G. Cros, P. L. Teissedre, Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages, J. Agric. Food Chem., 2001, 49 (7), 3341-3348.

68. M. .J. Burkitt, J. Duncan, Effects of *trans* resveratrol on copper-dependent hydroxyl-radical formation and DNA damage: evidence for hydroxyl-radical scavenging and a novel glutathione-sparing mechanism of action, Arch. Biochem. Biophys., 2000, 15,381 (2), 253-263.

69. L. Fremont, Biological effects of resveratrol, Life Sci., 2000, 14,66 (8), 663-673.

70. I. Durak, A. Avci, M. Kacmaz, S. Buyukkocak, M. Y. Cimen, S. Elgun, H. S. Ozturk, Comparison of antioxidant potentials of red wine, white wine, grape juice and alcohol, Curr. Med. Res. Opin., 1999, 15 (4), 316-320.

71. M. A. Murcia, M. Martinez-Tome, Antioxidant activity of resveratrol compared with common food additives, J. Food Prot., 2001, 64 (3), 379-384.

72. J. B. German, "Nutricional Studies of Flavonoids in Wine" in Flavonoids in Health and Disease edited by Catherine A. Rice-Evans, Lester Packer, 1998, 343-353.

73. M. Jang, L. Cai, G. Udeani, K. V. Slowing, C. F. Thomas, C. W. W. Beecher, H H.S. Fong, N. R.Farnsworth, A. D. Kinghorn, R. G. Mehta, R. C. Moon, J. M. Pezzuto, Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes, Science 1997, 275, 218-220.

74. R. C. Ellison, Wine and cancer: the epidemiologic evidence, Bulletin de l'O.I.V., 1998, 71, 803-804, 20-30.

75. C.A. Rice-Evans, L. Packer, Flavonoids in health and disease, I. Morel, P. Cillard, J. Cillard, New York, 1998.

76. G. Galati, T. Chan, B. Wu, P. O'Brien, Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidase-catalysed redox cycling of flavonoids, Chem. Res. Toxicol., 1999, 12, 521-525.

77. A. M. S. Silva, "Síntese e caracterização estrutural de flavonóides e compostos afins", Universidade de Aveiro, 1993.

78. F. Visioli., L. Borsani., C. Galli., Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals, Cardiovascular Research, 2000, 47, 419-425.

79. C. Sanchez-Moreno., J. A. Larrauri., F. Saura-Calixto, Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents, Food Research International, 1999, 32, 407-412.

80. O. I. Aruoma, M. Deiana, A. Jenner, B. Halliwell et all., Effect of hydroxytyrosol found in extra virgin olive oil on oxidative DNA damage and on low-density lipoprotein oxidation, J. Agric. Food Chem, 1998, 46, 5181-5187.

81. A. Castera-Rossignol, F. Bosque, Nouvelle approche des anti-oxydants, , OCL, 1994, 1(2), 131-143.

82. E. R. Sherwin., Oxidation and antioxidants in fat and oil processing., J. Am. Oil Chem. Soc., 1978, 55(11), 809-814.

83. C. Berset., M-E. Cuvelier, Méthods d'évaluation du degré d'oxydation des lipides et de mesure du pouvoir antioxydant, Sciences des Aliments, 1996, 16 (3), 219-245.

84. E. N. Frankel, S-W. Huang, J. B. German, Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils *vs* emulsions, J. Agric. Food Chem., 1994, 42 (5), 1054-1059.

85. A J. St. Angelo, Lipid oxidation in foods, Crit. Ver. Food Sci. Nutr., 1996, 36(3), 175-224.

86. C.A. Rice-Evans, L. Packer., Flavonoids in health and disease, Marcel Dekker, New York, 1998.

87. A. Mora., M. Payá., J. L. Rios., M. J. Alcaraz, Struture-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation, Biochemical Pharmacology, 1990, 40 (4), 793-797.

88. B. Halliwell, R. Aeschbach., J. Loliger., O. I. Aruoma, The characterisation of antioxidants, Fd. Chem. Toxic., 1995, 33 (7), 601-617.

89. J. N. Coupland, D. J. McClements, Lipid oxidation in food emulsions, Trends Food Sci. Technol., 1996, 7 (3), 83-91.

90. A. M. Papas, Oil-soluble antioxidants in foods, Toxicology and industrial health, 1993, 9 (1-2), 123-149.

91. D. Rajalakshmi, S. Narasimhan, in Food antioxidants: technological, toxicological, and health prespectives, 1996, edited by D.L Madhavi, S.S. Deshpande., Marcel Dekker Inc., New York, 65-157.

92. G. Scott, Antioxidants in vitro and in vivo, Chemsitry in Britain, 1985, 7. 648-653.

93. L. Langseth, Oxidants, antioxidants, and disease prevention, 1995, ILSI, 1-3.

94. http://www.antioxidants.com.ar/12/Art125.htm

95. B Halliwell, J. C. Gutteridge, Free radicals in biology and medicine, Oxford Science Publications, 1999.

96. H. Esterbauer, J. Gebicki, H. Puhl, G. Jurgens, The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL, Free Radic. Biol. Med., 13:341, 1992.

97. B. Castro., P. Gameiro., JL.F.C. Lima., Anal. Chimi. Acta, 1993, 281, 53.

98. P. W. Dimmock, P. Warwick., R.A Robbins., Analyst, 1995, 120, 2159.

99. Y. Seok., K. Yang., S. Kang., Anal. Chim. Acta, 1995, 306, 351.

100. A E. Martell. R. J. Motekaitis., Determination and use of stability constants. VCH, Weinheim, 1998.

101. J. N. Butler, Ionic equilibrium. A. mathematical approach. Addison-Wesley Publishing Company Inc., London, 1964.

102. F. R. Hartley, C. Burgess, R. M. Alcock., Solution equiluibria., Ellis Horwood Limited., England, 1980.

103. A. Albert, E. P. Serjeant, The determination of ionization constants, Chapman & Hall, 2ª edition, London, 1971.

104. E. P. Serjeant, Potenciometry and potentiometric titrations, Wiley-Interscience, New York, 1984., The determination of ionization constants., Chapman & Hall, 2ª edition, London, 1971.

105. C. Guimarães, Interacção de espécies moleculares com sistemas anfifílicos organizados. Relação eda estrutura e propriedades fisico-químicas na partição de bloqueadores β e de benzodiazepinas em meios micelares, Tese de Doutoramento, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, 2001.

106. G. Gran, Analyst, 1952, 77, 66.

107. M. S. Reis, Ácidos Biliares e Actividade Biológica, Tese de Doutoramento, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, 1995.

108. D. Tasic, C. Klofutar, Analusis, 1998, 26, 25.

109. G. Gran. Analyst, 1952, 77, 661.

110. A. K. Covington., R.G. Bates., R.A. Durst., Pure Appl. Chem., 1983, 55, 1467.

111. H. Siegel., D. Zuberbuhler., Anal. Chim. Acta, 1991, 255, 63.

112. R.P. Buck, V.V. Cosofret, Pure Appl. Chem., 1993, 65, 1849.

113. L. G. Sillén, A E. Martel, Critical stability constants, Plenum, New York, 1976, vol 4.

114. P. Lubal, D. Siroky, D. Fetsch., J. Havel., The acidobase and complexation properties of humic acids study of complexation of Czech humic acids with metal ions, Talanta, 1998, 4010, 411.

115. J. Slavek, J. Wold., W. F. Pickering., Selective extraction of metal ions associated with humic acids, Talanta, 1982, 29, 743-749

116. P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, J. Chem. Soc. Dalton, 1985, 6, 1195.

117. A. Albert, E. P. Serjeant., The determination of ionization constants, Chapman and Hall, 2ª edição, London, 1971, 20-22.

118. "Handbook of tables for organic compound identification": third edition, CRC Press, 1967, 429.

119. Dados obtidos na pesquisa efectuada na base de dados Panoma 93b.

120. S. V. Jovanovic, S. Steenken, M. Tosic, B. Marjanovic, M. Simic, Flavonoids as antioxidants, J. Am. Chem. Soc., 1994, 116, 4846-4851.

121. J. Kanner, E. Frankel, R. Granit, B. German, J. KInsella, Natural Antioxidants in grapes and wines J. Agric. Food. Chem, 1994, 42, 64-69.

122. W. Bors, M. Saran, Radical scavenging by flavonoid antioxidants, Free Rad. Res. Comms., 1987, 2 No 4-6, 289-294.

123. G. Sichel, C. Corsaro, M. Scalia, A J. Di Bilio, R. P. Bonomo, In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against $O_2^{\cdot}$, Free Radical Biology & Medicine, 1991, 11, 1-8.

124. M. Thompson, C. R. Williams., Stability of flavonoid complexes of cooper (II) and flavonoid antioxidant activity, Analytica Chimica Acta, 1976, 85, 375-381.

125. C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, G. Paganga., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, Free Radical Biology & Medicine, 1996, (20) 7, 933-956.

126. J. A. Kennedy, M. H. G. Munro, H. K. J. Powell, L. J. Porter, L. Y. Foo, The protonation reactions of catechin, epicatechin, and related compounds, Australian Journal of Chemistry, 1984, 37, 885-892.

127. B. Halliwell, Role of free radicals in the neurodegenerative diseases, Drugs & Aging, 2001, 18(9), 685-716.

128. C.A. Rice-Evans, L. Packer., Flavonoids in health and disease, Marcel Dekker, New York, 1998., Strutural aspects of antioxidant activity of flavonoids, 221-251.

129. B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge., Free radicals in biology and medicine, third edition, Oxford University Press, 1999, 131, 176, 177, 183,184, 631-638.

Anexo

Anexo

Neste anexo apresenta-se de forma sucinta, através dos seus diagramas de fluxo, os dois programas utilizados no tratamento dos resultados experimentais obtidos neste trabalho, nomeadamente o programa Superquad [116] e o programa Best [100].

O objectivo consiste em determinar o conjunto de constantes de equilíbrio que conduza ao melhor ajustamento do modelo matemático aos dados experimentais. Sendo assim necessário estabelecer um modelo matemático que represente o comportamento químico do sistema de equilíbrio em solução. O sistema químico é constituido por um conjunto de espécies sendo cada uma definida pelos coeficientes estequiométricos p, q, r, ..., e pelas correspondentes constantes de estabilidade. Deve aqui referir-se que, nos casos em que há libertação de um protão o coeficiente estequiométrico que lhe corresponde é negativo (-1).

No tratamento matemático dos dados experimentais, os valores de algumas constantes de equilíbrio, consideradas no modelo proposto, são fixos enquanto que os valores de outras são parâmetros a refinar. Assim, para cada modelo inicialmente admitido, alguns programas nomeadamente o Superquad [116] podem rejeitar uma ou mais constantes de equilíbrio que correspondem à formação de espécies que não existem em solução ou que existem em concentrações muito baixas. Estas constantes de equilíbrio são retiradas do modelo proposto e rejeitadas as espécies a elas associadas. De seguida inicia-se uma nova iteracção com base no novo modelo.

O modelo escolhido será o que melhor se ajusta aos dados experimentais.

Superquad

O objectivo deste programa, consiste em identificar o modelo que conduz a um ajustamento satisfatório dos resultados experimentais. Para atingir este objectivo, o processo de refinamento constitui o fulcro de um procedimento de selecção do modelo e de determinação dos seus parâmetros. O refinamento está incorporado num procedimento mais lato que permite seleccionar o modelo que melhor se ajusta aos valores experimentais. O programa tem sido utilizado para determinar constantes de equilíbrio de espécies presentes em solução, a partir das medições das diferenças de potencial (E_i) em cada ponto da titulação (i).

Além da identificação e determinação automática das constantes de equilíbrio, através da minimização da soma de quadrados de desvios, baseada em medições de diferenças de potencial, o programa permite igualmente efectuar o refinamento da concentração de qualquer um dos reagentes presentes no sistema.

Um dos aspectos, que o distinge de outros programas similares, consiste na incorporação, no próprio programa, de alguns critérios de avaliação e selecção automáticos de modelos. Assim, se após o processo de refinamento de um determinado modelo, uma das constantes de equilíbrio identificada for inconsistente, o programa rejeita automaticamente esse modelo e estabelece um novo modelo que passa a refinar. Uma constante de equilíbrio é considerada inconsistente quando o desvio padrão associado é superior a 33% do seu valor, ou se o seu valor for negativo [116].

Para o programa calcular os valores das constantes de formação, assumem-se as seguintes hipóteses:

1) Para cada espécie A_a B_b em solução, a constante de formação é expressa como coeficiente de concentração em vez de coeficiente de actividade. Considera-se que a força iónica do meio é constante.

$$\beta = \frac{[A_a B_b]}{[A]^a [B]^b}$$

onde A e B são os reagentes e [A] e [B] correspondem às concentrações dos reagentes livres.

2) Assume-se que cada eléctrodo possui comportamento "pseudo-Nerstian",

$$E = \frac{RT}{nF}\log[A]$$

onde os valores K e $\frac{RT}{nF}$ são obtidos de calibrações anteriores.

3) Todos os testes estatísticos são levados a cabo assumindo que não existem erros sistemáticos. Estes erros devem ser minimizados por procedimentos experimentais meticulosos. Estão incluídos nestes erros, a calibração do eléctrodo, a pesagem da amostra, as diluições, a qualidade da água e dos reagentes e o controlo da temperatura.

4)Assume-se a distribuição normal nos erros da variável dependente.

A variável independente utilizada pelo algoritmo implementado neste programa é o volume do titulante, v_i, (i=1, 2,..., n) e a variável dependente é a diferença de potencial medida, E_i, (i=1, 2,...,n). Para calcular o erro das medidas do potencial é usada a fórmula padrão de propagação de erros que assenta no valor da variância σ^2_i da medição para cada ponto dada pela expressão seguinte:

$$\sigma_i^2 = \sigma_E^2 + \left(\frac{\sigma E}{\sigma v}\right)^2 \sigma_v^2$$

onde δ_E^2 e δ_v^2 são as variâncias estimadas das leituras do eléctrodo e do volume, consideradas individualmente, e $\left(\frac{\delta E}{\delta V}\right)_i$ é o declive da curva de titulação no ponto i.

Para atenuar a influência dos valores com maior variância, o peso a atribuir a cada ponto de titulação medido é definido como sendo inversamente proporcional à variância desse ponto,

$$W_i = \frac{1}{\delta^2_i}$$

deste modo, os valores correspondentes a pontos na vizinhança de pontos de inflexão, para os quais o declive $\left(\frac{\delta E}{\delta V}\right)_i$ é elevado, são afectados com pesos menores do que os outros pontos.

Na figura A.1 está representado um diagrama de fluxo simplificado do algoritmo utilizado pelo programa Superquad (na análise de um único sistema experimental). Na etapa (i) são lidas, de um ficheiro de dados, as condições experimentais relativas à titulação, os valores de volume de titulante adicionado e respectivas diferenças de potencial medidas. No final é lido um conjunto de valores de base estimados pelo utilizador para as constantes de equilíbrio β a identificar. A cada constante de equilíbrio β estão associados coeficientes estequimétricos p, q, r, ... e um código de refinamento ("refinement key"), que pode ser 1, 0 ou –1. Se o valor atribuído for 0 significa que o valor estimado para a respectiva constante de equilíbrio β mantém-se constante ou inalterado. Se o valor for 1, o valor estimado para a constante β será refinado, e se o valor for –1, significa que o valor estimado para a constante β não tem qualquer participação no programa devendo desta forma ser ignorada.

Quando o programa executa a etapa (ii), durante a qual adquire um novo modelo, os valores dos códigos de refinamento são alterados automaticamente de acordo com os resultados intermédios entretanto obtidos.

Deste modo, o programa examina uma sequência de modelos distintos que resultam de diferentes combinações das constantes de equilíbrio β que entretanto vão sendo mantidas inalteradas, (0), afinadas, (1), ou ignoradas, (-1). A cada modelo é atribuído um código de identificação de modo a que cada modelo distinto seja analisado uma só vez. A identificação de cada modelo processa-se na etapa (iii).

À medida que a análise da sequência de modelos prossegue, as constantes de equilíbrio β dos melhores modelos vão sendo memorizados na etapa (iv). O programa distingue o melhor modelo como sendo aquele que apresenta o menor desvio padrão para os resíduos e nenhuma constante de equilíbrio β inconsistente.

Na avaliação de cada modelo o programa utiliza, como estimativa das constantes de equilíbrio, as determinadas no melhor modelo entretanto analisado, (v), antes de prosseguir para o processo de refinamento (vi).

O processo de refinamento dos valores das constantes de equilíbrio dispõe de mecanismos de protecção contra eventuais bloqueios de computação devidos a erros numéricos. No caso de algum ocorrer, (vii), o programa estabelece um novo modelo e continua o processo de avaliação e selecção do modelo mais adequado.

Quando o refinamento convergir com sucesso, os valores determinados para os parâmetros e correspondentes erros e coeficientes de correlação são armazenados juntamente com o desvio padrão da amostra. De seguida na fase (ix) o programa verifica se alguma das constantes de equilíbrio é inconsistente. Se assim for, a constante é removida e um novo modelo gerado será usado no próximo modelo para refinamento (x). Se não forem determinadas constantes inconsistentes então o comando de programa é transferido para a saída de resultados, fase (xi), que incluem a representação gráfica dos resíduos e a distribuição das espécies.

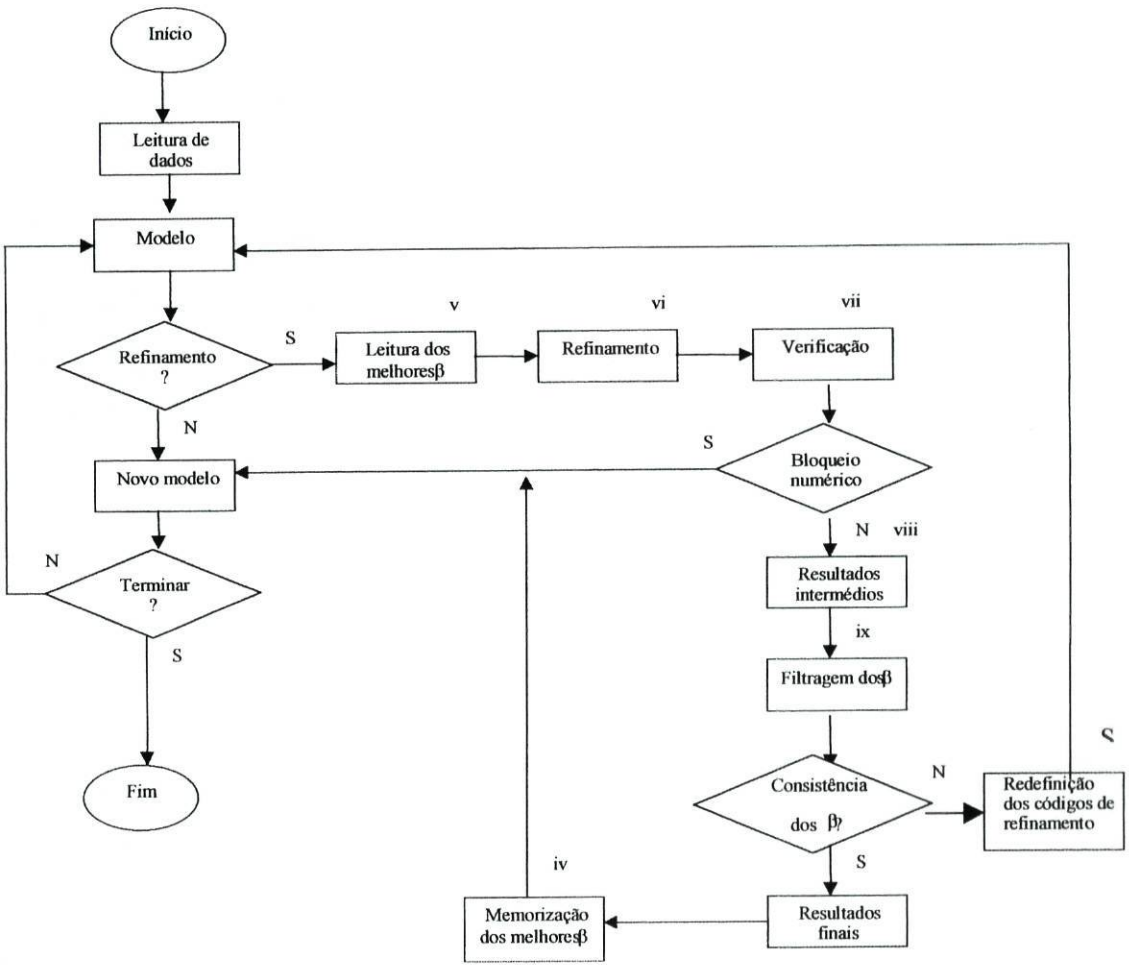


Figura A1- Diagrama de fluxo do programa Superquad.

Best

O objectivo do programa Best consiste em determinar, de forma iterativa e uma de cada vez, as constantes de equilíbrio de um modelo admitido que conduzam a um ajustamento satisfatório dos resultados experimentais.

Este programa, concebido para determinar um conjunto de constantes de equilíbrio correspondentes a um modelo admitido, assenta num algoritmo interactivo que transfere para o utilizador a tomada de decisões relativas ao ajustamento do modelo. Esta característica que lhe retira autonomia em relação ao processo de ajustamento, confere-lhe, por outro lado, uma flexibilidade que permite ao utilizador explorar diferentes variações do modelo.

A variável independente é o volume de titulante adicionado e a variável dependente é o pH obtido previamente a partir das medições das diferenças de potencial de acordo com a equação de Nernst, $pH_{exp,i}$ .Este aspecto distingue o programa Best da maioria dos programas disponíveis para a determinação das constantes de equilíbrio.

As constantes de equilíbrio do modelo admitido são ajustadas, de forma independente e sucessiva, por variação dos valores estimados, através da minimização da soma dos quadrados dos desvios entre os valores de pH obtidos experimentalmente, ($pH_{exp,i}$) e os valores de pH calculados, ($pH_{cal,i}$), em cada ponto de titulação.

Na figura A.2 apresenta-se um diagrama de fluxo simplificado do algoritmo utilizado pelo programa Best.

Na etapa (i) efectua-se a leitura das condições experimentais relativas à titulação, do conjunto de valores medidos de volume de titulante adicionado e respectivos valores de pH, e do modelo para ajustamento, constituído pelas diversas espécies e por uma estimativa dos valores para as constantes de equilíbrio desconhecidas β. Às constantes de equilíbrio estão ainda associados os coeficientes estequiométricos p, ,q, ,r....

Após leitura dos dados, e com base nos valores fornecidos para as constantes de equilíbrio, na etapa (ii) o programa estabelece um modelo e calcula para cada ponto da titulação as concentrações das espécies com os quais determina na etapa (iii), os valores de pH_{cal}. De seguida, na etapa (iv) calcula a soma pesada dos quadrados dos desvios de pH, diferença entre o pH experimental e o previsto. Na etapa (v) o programa solicita a

intervenção do utilizador para especificação do número e identificação das constantes de equilíbrio a refinar. As constantes de equilíbrio presentes no modelo e não identificadas permanecem fixas durante o processo de refinamento. O utilizador deve indicar o número de ciclos para o processo de refinamento e o valor de base do incremento de variação das constantes a ajustar.

Após o refinamento das constantes o programa actualiza o modelo e a soma dos quadrados dos desvios, transferindo de novo para o utilizador o controlo do processo, na etapa (vi), que deve decidir entre a aceitação do modelo, a continuação do refinamento, ou ainda a análise de um novo modelo a especificar. Se o modelo não for aceite o programa regressa a (v).

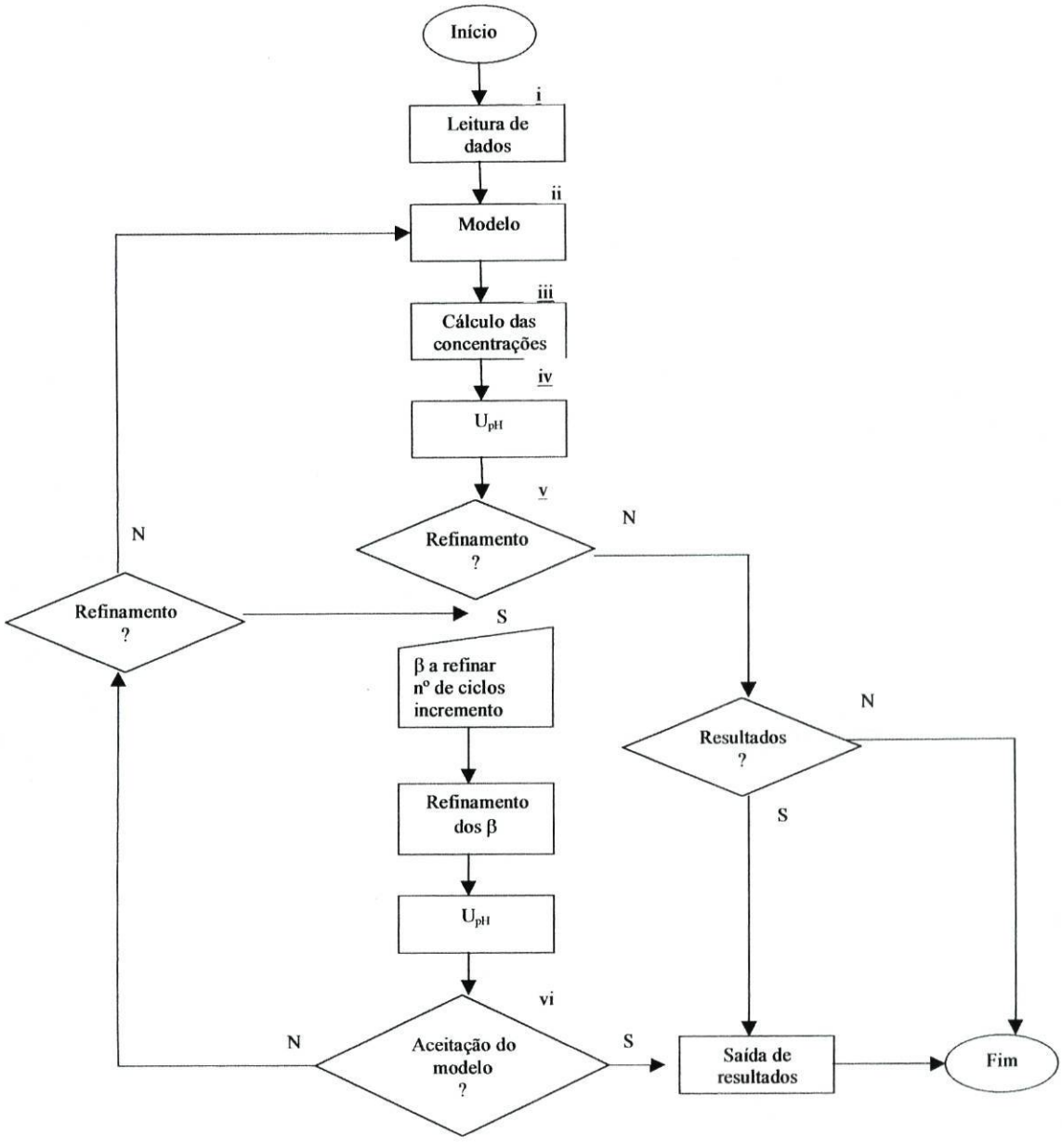


Figura A 2.- Diagrama de fluxo do programa Best.

FACULDADE DE FARMÁCIA DO PORTO BIBLIOTECA