

Ana Catarina Gomes Oliveira

Desenvolvimento de novos antioxidantes lipofílicos baseados no ácido benzoico



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO
2012

Ana Catarina Gomes Oliveira

Desenvolvimento de novos antioxidantes lipofílicos baseados no ácido benzoico



Relatório de Estágio submetido à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para a obtenção do grau de Mestre em Química

Composição do Júri

Maria Clara Ramalho Monteiro Pires Basto, Professora Auxiliar do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (Representante da Comissão Científica do 2º Ciclo de Estudos em Química) – Presidente;

Nuno Jorge da Silva Pereira Milhazes, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Ciências da Saúde-Norte;

Maria Fernanda Martins Borges, Professora Associada do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (Orientadora);

Nuno Filipe Mateus, Professor Associado do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Agradecimentos

Passados mais dois anos, chego agora ao fim do Mestrado, sendo mais uma etapa atingida na minha vida. Etapa esta que nunca seria possível de concluir sem o apoio de diversas pessoas. Por esta razão, os meus sinceros agradecimentos são destinados:

À minha orientadora, Professora Doutora Fernanda Borges, por todos os ensinamentos transmitidos, disponibilidade, incentivo e boa disposição demonstrada ao longo do Mestrado. Muito obrigada por me ajudar a progredir!

Ao Professor Doutor Eugenio Uriarte da Faculdade de Farmácia da Universidade de Santiago de Compostela, e à Professora Doutora Marta Teijeira da Faculdade de Química da Universidade de Vigo pela supervisão e apoio demonstrado.

Ao Professor Doutor Jorge Garrido por tornar possível a realização da parte eletroquímica do trabalho.

À estudante de Doutoramento Alexandra Gaspar por tudo o que me ensinou e por toda a ajuda e apoio transmitidos ao longo da tese.

Ao estudante de Doutoramento José Teixeira e aos meus colegas de Mestrado Sofia Benfeito e Pedro Soares, por toda a ajuda transmitida na realização deste trabalho, pelas palavras de incentivo e amizade.

A todos os meus colegas de laboratório pela amizade, apoio e união entre todos, contribuindo para um ótimo ambiente de trabalho no laboratório.

Aos meus pais, irmã e restante família, que sempre me apoiaram em tudo e acreditaram em mim.

A todos os meus amigos que direta ou indiretamente me ajudaram a atingir os meus objetivos.

Muito Obrigada a todos!

Resumo

As mitocôndrias são organelos celulares muito importantes para a sobrevivência das células estando a sua disfunção associada a várias doenças, denominadas por doenças mitocondriais, as quais envolvem, por exemplo, alterações a nível cardíaco, a obesidade, a diabetes, o cancro e as doenças neurodegenerativas, como a Parkinson, a Alzheimer e a esclerose lateral amiotrófica.

Além do fornecimento de energia celular (ATP), as mitocôndrias estão envolvidas noutros processos biológicos, tais como sinalização, diferenciação, crescimento e morte celular, e ainda no controlo do ciclo celular e produção de espécies reativas de oxigénio (ROS). De facto, estima-se uma produção diária de 10^{11} ROS dentro de uma célula aeróbica normal.

As doenças neurodegenerativas constituem um problema de saúde pública afetando milhões de pessoas em todo o mundo. O processo geral que está na génese das doenças do foro neurodegenerativo pode ser considerado antagónico ao que medeia o processo cancerígeno na medida em que no cancro ocorre a proliferação descontrolada de células e na neurodegeneração o resultado final é a morte celular. Em ambos os casos os mecanismos de necrose e/ou apoptose estão intrinsecamente envolvidos como também a disfunção mitocondrial.

Pelas razões enunciadas, é urgente encontrar uma forma de minimizar ou retardar a progressão dos processos neurodegenerativos e, conseqüentemente, os processos de envelhecimento associados. Neste contexto, a mitocôndria é atualmente considerada um alvo extremamente importante sendo a inibição seletiva dos danos oxidativos a nível mitocondrial considerada uma solução terapêutica promissora para este tipo de doenças.

De acordo com o referido, neste projeto efetuou-se o desenho e síntese de novos antioxidantes derivados de ácidos hidroxibenzoicos possuindo cargas positivas a pH fisiológico e, portanto, com capacidade de acumulação a nível mitocondrial.

Para atingir o objetivo, procedeu-se à modificação de antioxidantes fenólicos presentes na dieta (ácidos protocatecuico e gálico) introduzindo um espaçador constituído por uma cadeia de carbono alifática a um catião trifenilfosfónio (TPP⁺). Verificou-se ainda que os compostos sintetizados (brometo de 6-(3,4-di-hidroxibenzamido)hexiltrifenilfosfónio e brometo de 6-(3,4,5-tri-hidroxibenzamido)hexiltrifenilfosfónio) detêm atividade antioxidante, medida através dos métodos ABTS, DPPH e GO e do potencial redox, permitindo prosseguir os estudos da avaliação do seu desempenho em sistemas mitocondriais e neuronais. Esperamos que, num futuro próximo, esta nova abordagem terapêutica possa melhorar o estilo de vida de pessoas que sofrem de doenças relacionadas com *stress* oxidativo, nomeadamente as de natureza neurodegenerativa.

Os compostos, métodos de síntese e aplicação estão em processo de patenteamento.

Abstract

Mitochondria are cellular organelles fundamental for the survival of the cells, being its dysfunction associated with some diseases, named mitochondrial diseases which involve, for example, changes at a cardiac level, obesity, diabetes, cancer, neurodegenerative diseases, such as Parkinson and Alzheimer diseases, and amyotrophic lateral sclerosis.

Besides providing cellular energy (ATP), mitochondria are involved in other biological processes, such as signaling, differentiation, cell growth and death, control of the cell cycle and also in the production of reactive oxygen species (ROS). In fact, some estimates suggest a daily production of 10^{11} ROS in a typical aerobic cell.

The neurodegenerative diseases constitute a public health problem affecting millions of people worldwide. The overall process in the genesis of neurodegenerative diseases may be considered antagonistic to the one that mediates cancer since in cancer occurs uncontrolled proliferation of the cells and in neurodegeneration the final result is cell death. In both cases, mechanisms of necrosis and/or apoptosis as well as mitochondrial dysfunction are intrinsically involved.

Therefore, it is urgent to find an approach to reduce or delay the progression of neurodegenerative processes and, consequently, the associated ageing processes. In this context, mitochondria are currently considered an essential target and the selective inhibition of oxidative damage in the mitochondria is considered a promising therapeutic solution for this type of disorders.

Accordingly, in the present project we accomplished the design and synthesis of new hydroxybenzoic acid derivatives, presenting antioxidant activity, with positive charges at physiological pH, thus displaying the ability of accumulation inside mitochondria.

In order to achieve this goal, structural changes were performed in natural phenolic antioxidants present in human diet (protocatechuic and gallic acids) by inserting a spacer constituted by an aliphatic carbon chain linked to a triphenylphosphonium cation (TPP^+). The synthesized compounds (6-(3,4-dihydroxybenzamido)hexyltriphenylphosphonium bromide and 6-(3,4,5-trihydroxybenzamido)hexyltriphenylphosphonium bromide) depict antioxidant activity, measured by using ABTS, DPPH, and GO methods and also redox potential determinations, allowing future studies on the evaluation of their performance in mitochondrial and neuronal systems. There is the hope that, in a near future, this new therapeutic approach can improve the lifestyle of people who suffer from diseases related to oxidative *stress*, namely of neurodegenerative nature.

The synthesized compounds, methods of synthesis and applications are in process of patenting.

Résumé

Les mitochondries sont organelles cellulaires très importantes pour la survie des cellules étant son dysfonctionnement associé à diverses maladies, désignés par les maladies mitochondriales, qui impliquent, par exemple, des changements dans niveau cardiaque, l'obésité, le diabète, le cancer, les maladies neurodégénératives, comme Parkinson et Alzheimer et la sclérose latérale amyotrophique.

En plus de fournir de l'énergie cellulaire (ATP), les mitochondries sont impliquées d'autres processus biologiques, tels comme signalisation, différenciation, croissance et la mort cellulaire, et encore contrôle de cycle cellulaire et production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). De fait, s'estime une production quotidienne de 10^{11} ROS dans d'une cellule aérobie normale.

Les maladies neurodégénératives, constituent un problème de santé publique affectant des millions de personnes dans le monde. Le procédé général qui est en la genèse de maladies du for neurodégénératif peut être considéré antagonique dans qu'il médie le processus cancérigène dans la mesure où dans le cancer se produit la prolifération incontrôlée de cellules et dans la neurodégénération le résultat final est la mort cellulaire. En tous les deux cas, mécanismes de nécrose et/ou de apoptose sont intrinsèquement impliquée ainsi que le dysfonctionnement mitochondrial.

Pour les raisons exposées, il est urgent trouver une forme de minimiser ou retarder la progression des processus neurodégénératifs et, en conséquence, les processus de vieillissement associés. Dans ce contexte, mitochondries est actuellement considéré comme une cible extrêmement important étant l'inhibition sélective des dommages oxydatifs au niveau des mitochondries considéré comme une solution thérapeutique prometteuse pour ce type de maladies.

Conformément au référé, dans ce projet effectue le dessin et la synthèse de nouveaux antioxydants dérivés d'acides hydroxybenzoïque ayant des chargements positifs à pH physiologique et, donc, avec une capacité d'accumulation au niveau de la mitochondrie.

Pour atteindre l'objectif, procède à la modification de antioxydants phénoliques présents dans le diète humain (acides protocatéchine et gallique) introduisant un espaceur constituant une chaîne carbonée aliphatique à un triphénylphosphonium de cation (TPP^+). Il encore vérifiant que les composés synthétisés (bromure de 6-(3,4-dihydroxybenzamido)hexyltriphénylphosphonium et bromure de 6-(3,4-trihydroxybenzamido)hexyltriphénylphosphonium) ont une activité antioxydant, mesurée par les méthodes ABTS, DPPH et GO et le potentiel redox, permettant d'autres études évaluant sa performance dans les systèmes mitochondriaux et neuronale. Nous attendons que, dans un avenir proche, ce nouvel abordage thérapeutique puisse améliorer le style de vie de

personnes qui souffrent de maladies rapportées avec *stress oxydative*, notamment de nature neurodégénérative.

Les composés, des procédés de synthèse et l'application sont en cours de brevetage.

Índice

Agradecimentos	I
Resumo.....	II
Abstract.....	III
Résumé.....	IV
Índice	VI
Índice de tabelas.....	VIII
Índice de figuras.....	IX
Lista de abreviaturas e símbolos.....	XII
I - INTRODUÇÃO	1
1. Doenças neurodegenerativas	2
2. Mitocôndria.....	5
3. Stress oxidativo e espécies reativas de oxigénio (ROS)	7
II - O PROJETO	11
1. Antioxidantes.....	12
2. Antioxidantes mitocondriotrópicos	14
3. O projeto.....	17
4. Estratégias sintéticas delineadas para a obtenção dos antioxidantes	19
III - MATERIAIS E MÉTODOS	22
1. Reagentes e Solventes.....	23
2. Instrumentação.....	23
3. Cromatografia.....	24
4. Síntese de compostos hidroxilhexilbenzamídicos (i).....	24
4.1. Síntese da <i>N</i> -(6-hidroxi-hexil)-3,4-dimetoxibenzamida (3).....	24
4.2. Síntese da <i>N</i> -(6-hidroxi-hexil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (4).....	25
5. Síntese de álcoois primários ativados.....	26
5.1. Conversão do álcool em éster (ii).....	26
5.1.1. Síntese do 6-(3,4-dimetoxibenzamida)hexilmetanossulfonato (5).....	26
5.1.2. Síntese da 6-(3,4,5-trimetoxibenzamida)hexilmetanossulfonato (6).....	26
5.2. Conversão do álcool em halogeneto de alquilo (iii).....	27
5.2.1. Via tribrometo de fósforo (PBr ₃)	27
5.2.1.1. Síntese da <i>N</i> -(6-bromo-hexil)-3,4-dimetoxibenzamida (7).....	28
5.2.1.2. Síntese da <i>N</i> -(6-bromo-hexil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (8).....	28

5.2.2. Via complexo 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina/ <i>N,N</i> -Dimetilformamida (TCT/DMF).....	28
5.2.2.1. Síntese da <i>N</i> -(6-bromo-hexil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (8).....	29
5.2.3. Via Etilenobis(difenilfosfina) (diphos)	29
5.2.3.1. Síntese da <i>N</i> -(6-bromo-hexil)-3,4-dimetoxibenzamida (7).....	29
5.2.3.2. Síntese da <i>N</i> -(6-bromo-hexil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (8).....	30
5.3. Síntese de introdução do catião trifenilfosfónio (iv).....	30
5.3.1. Síntese <i>in situ</i> do sal de 6-(3,4,5-trimetoxibenzamido)hexiltrifenilfosfónio	31
5.3.1.1. Síntese do brometo de 6-(3,4-dimetoxibenzamido)hexiltrifenilfosfónio (9)	32
5.3.1.2. Síntese do brometo de 6-(3,4,5-trimetoxibenzamido)hexiltrifenilfosfónio (10)	32
5.4. Síntese dos antioxidantes mitocondriotrópicos (v).....	33
5.4.1. Síntese do brometo de 6-(3,4-di-hidroxibenzamido)hexiltrifenilfosfónio (11)	33
5.4.2. Síntese do brometo de 6-(3,4,5-tri-hidroxibenzamido)hexiltrifenilfosfónio (12)	34
6. Avaliação da atividade antioxidante	34
6.1. Método de ABTS	35
6.1.1. Condições experimentais.....	36
6.2. Método de DPPH	37
6.2.1. Condições experimentais.....	38
6.3. Método de Galvinoxilo (GO)	39
6.3.1. Condições experimentais.....	39
7. Avaliação do potencial redox	40
7.1. Voltametria cíclica	41
7.2. Voltametria de pulso diferencial.....	42
7.2.1. Condições experimentais.....	42
IV - DISCUSSÃO DE RESULTADOS	44
1. Síntese de antioxidantes mitocondriotrópicos	45
1.1. Elucidação estrutural dos compostos sintetizados.....	64
1.1.1. Ressonância magnética nuclear de ¹ H	64
1.1.2. Ressonância magnética nuclear de ¹³ C e DEPT	67
1.1.3. Espectrometria de massa de impacto eletrónico (EM-IE)	71
2. Avaliação da atividade antioxidante	73
3. Avaliação do potencial redox	74
V - CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....	78
VI - LISTA DE REFERÊNCIAS	81

Índice de tabelas

Tabela II. 1. Estruturas dos ácidos fenólicos mais proeminentes, em particular de ácidos benzoicos, de ocorrência natural [58].	14
Tabela IV. 1. Rendimentos obtidos nas diferentes vias de síntese realizadas para a obtenção dos compostos 7 e 8.	55
Tabela IV. 2. Dados de RMN de ^1H dos compostos 3, 4 e 7 a 12.	66
Tabela IV. 3. Dados de RMN de ^{13}C e DEPT dos compostos 3 e 4.	68
Tabela IV. 4. Dados de RMN de ^{13}C e DEPT dos compostos 7 e 8.	69
Tabela IV. 5. Dados de RMN de ^{13}C e DEPT dos compostos 9 e 10.	70
Tabela IV. 6. Atividade antioxidante dos ácidos protocatecuico e gálico e respetivos antioxidantes mitocondriotrópicos sintetizados (compostos 11 e 12) pelos métodos de ABTS, DPPH e GO.	73
Tabela IV. 7. Potencial redox dos ácidos protocatecuico e gálico e respetivos cátions lipofílicos (compostos 11 e 12).	74

Índice de figuras

Figura I. 1. Visão geral da produção de ROS mitocondrial. Adaptado de [41].....	4
Figura I. 2. Célula eucariótica animal.....	5
Figura I. 3. Estrutura simplificada de uma mitocôndria [42].....	6
Figura I. 4. Principais vias para a formação de espécies reativas. NADPHoxid - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidase; XO - xantina oxidase; COX - ciclooxigenase; LOX - lipoxigenase; NOS - óxido nítrico sintase. Adaptado de [48].	8
Figura I. 5. Doenças humanas, onde o <i>stress</i> oxidativo desempenha um papel direto ou indireto na fisiopatologia da doença [13].	10
Figura II. 1. Ácidos hidroxibenzoicos.	14
Figura II. 2. Absorção oral e distribuição de um antioxidante tendo a mitocôndria como alvo. Adaptado de [17].....	16
Figura II. 3. Movimento de catiões lipofílicos através das bicamadas fosfolipídicas. Na figura está representada a molécula MitoQ ₁₀ , desenvolvida por Murphy [17]. Este fica adsorvido à superfície interna da membrana interna, com a porção de TPP ⁺ atraída pela carga negativa da membrana e o radical alquilo Q inserido na membrana. Adaptado de [17]......	17
Figura II. 4. Ácido Protocatecuico.....	17
Figura II. 5. Ácido Gálico.	17
Figura II. 6. Obtenção dos antioxidantes catiónicos lipofílicos derivados do ácido benzoico, partindo dos ácidos protocatecuico e gálico, pela inserção de cadeias de carbono alifáticas (espaçador) contendo o catião trifenílfosfónio (TPP ⁺)......	18
Figura II. 7. Esquema geral dos antioxidantes lipofílicos seletivos para a mitocôndria.....	18
Figura II. 8. Representação esquemática da estratégia de síntese usada na obtenção de antioxidantes mitocondriotrópicos, partindo do ácido protocatecuico: i) NH ₂ (CH ₂) ₅ CH ₂ OH, r. t., 10 h; ii) CH ₃ SO ₂ Cl, r. t., 12 h; iii) C ₂ Br ₂ Cl ₄ , diphos, r.t., 20 h; iii) PPh ₃ , 100 °C, 48 h; iv) BBr ₃ , - 70 °C, 12 h.....	20
Figura II. 9. Representação esquemática da estratégia de síntese usada na obtenção de antioxidantes mitocondriotrópicos, partindo do ácido gálico: i) NH ₂ (CH ₂) ₅ CH ₂ OH, r. t., 10 h; iii) CH ₃ SO ₂ Cl, r. t., 12 h; iii) C ₂ Br ₂ Cl ₄ , diphos, r.t., 20 h; iii) PPh ₃ , 100 °C, 48 h; iv) BBr ₃ , - 70 °C, 12 h.....	21
Figura III. 1. Reação proposta para a formação do radical ABTS ^{•+} e posterior reação deste radical com um composto antioxidante (AH) [57].	36
Figura III. 2. Reação proposta do radical DPPH [•] com um composto antioxidante (AH) [89].	38
Figura III. 3. Reação química do radical GO [•] com um composto antioxidante [91].....	39

Figura III. 4. Representação esquemática de uma célula eletroquímica comum (ER - elétrodo de referência; ET - elétrodo de trabalho; EA - elétrodo auxiliar) [94].....	41
Figura III. 5. (a) Rampa de potencial utilizada em voltametria cíclica e (b) voltamograma cíclico simulado para uma transferência de carga de eletrões reversível: $E_{p,c}$ - potencial de pico catódico; $E_{p,a}$ - potencial de pico anódico; E_i - potencial inicial; E_f - potencial final; $I_{p,c}$ - corrente de pico catódica; $I_{p,a}$ - corrente de pico anódica [94].	41
Figura III. 6. (a) Forma de potencial e (b) voltamograma de simulação resultante em voltametria diferencial de pulso [94].	42
Figura IV. 1. Mecanismo de formação das amidas de ácidos benzoicos.	45
Figura IV. 2. Espectro de RMN de ^1H (a), RMN de ^{13}C (b) e DEPT (c), e EM-IE (d) do composto <i>N</i> -(6-hidroxi-hexil)-3,4-dimetoxibenzamida (3).....	47
Figura IV. 3. Espectro de RMN de ^1H (a), RMN de ^{13}C (b) e DEPT (c), e EM-IE (d) do composto <i>N</i> -(6-hidroxi-hexil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (4).	49
Figura IV. 4. Mecanismo proposto de formação dos metanossulfonatos.	50
Figura IV. 5. Mecanismo proposto de formação dos compostos halogenados via PBr_3	51
Figura IV. 6. Mecanismo de formação dos compostos halogenados via TCT/DMF.	52
Figura IV. 7. Mecanismo de formação dos compostos halogenados via diphos.	54
Figura IV. 8. Espectro de RMN de ^1H (a), RMN de ^{13}C (b) e DEPT (c), e EM-IE (d) do composto <i>N</i> -(6-bromo-hexil)-3,4-dimetoxibenzamida (7).....	57
Figura IV. 9. Espectro de RMN de ^1H (a), RMN de ^{13}C (b) e DEPT (c), e EM-IE (d) do composto <i>N</i> -(6-bromo-hexil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (8).....	59
Figura IV. 10. Mecanismo de formação dos sais de trifenilfosfónio.....	59
Figura IV. 11. Espectro de RMN de ^1H (a), RMN de ^{13}C (b) e DEPT (c), e EM-IE (d) do brometo de 6-(3,4-dimetoxibenzamido)hexiltrifenilfosfónio (9).....	61
Figura IV. 12. Espectro de RMN de ^1H (a), RMN de ^{13}C (b) e DEPT (c), e EM-IE (d) do brometo de 6-(3,4,5-trimetoxibenzamido)hexiltrifenilfosfónio (10).....	63
Figura IV. 13. Reação de <i>O</i> -desmetilação dos catiões lipofílicos.....	64
Figura IV. 14. Zonas de fragmentação principais dos compostos sintetizados.	72
Figura IV. 15. Voltamogramas de pulso diferencial de soluções com concentração de 0,1 mM dos compostos (—) ácido protocatecuico e (—) composto 11, numa solução tampão com pH 7,4. Velocidade de varrimento: $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$	75
Figura IV. 16. Voltamogramas de pulso diferencial de soluções com concentração de 0,1 mM dos compostos (—) ácido gálico e (—) composto 12 numa solução tampão com pH 7,4. Velocidade de varrimento: $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$	75

Figura IV. 17. Voltamogramas cíclicos de soluções com concentração de 0,1 mM dos compostos (—) ácido protocatecuico e (—) composto 11, numa solução tampão com pH 7,4. Velocidade de varrimento: $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$76

Figura IV. 18. Voltamogramas cíclicos de soluções com concentração de 0,1 mM dos compostos (—) ácido gálico e (—) composto 12 numa solução tampão com pH 7,4. Velocidade de varrimento: $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$77

Lista de abreviaturas e símbolos

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
CAT	Catalase
CCF	Cromatografia em camada fina
COX	Ciclooxigenase
δ	Desvio químico, em ppm
<i>d</i>	Dupleto
DA	Doença de Alzheimer
DCM	Diclorometano
<i>dd</i>	Duplo duplete
DEPT	do inglês “distortionless enhancement by polarization transfer”
Diphos	Etilenobis(difenilfosfina)
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ΔpH	Gradiente de pH
DP	Doença de Parkinson
DPPH[•]	Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo
ΔV	Gradiente de potencial de membrana
EM-IE	Espetrometria de massa por impacto eletrónico
Eq.	Equivalente
GO[•]	Radical galvinoxilo
G-Px	Glutaciona peroxidase
G-R	Glutaciona reductase
GSH	Glutaciona
HO[•]	Radical hidroxilo
HOO[•]	Radical hidroperóxido
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
J	Constante de acoplamento
λ	Comprimento de onda
LOX	Lipoxigenase
<i>m</i>	Multiplete
M⁺	lão molecular
m/v	Massa/Volume

<i>m/z</i>	Relação massa/carga
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
[•]NO	Óxido nítrico
NOS	NO sintase
O₂^{•-}	Anião radical superóxido
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹H	Ressonância magnética nuclear protónica
RNA	Ácido ribonucleico
RNS	Espécies reativas de azoto
ROO[•]	Radical peroxilo
ROS	Espécies reativas de oxigénio
s	Singuleto
SOD	Superóxido dismutase
<i>t</i>	Tripleto
TCT	Cloreto cianúrico ou 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina
THF	Tetra-hidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
TPP⁺	Catião trifenilfosfónio
r.t.	Temperatura ambiente
UV	Ultravioleta
XO	Xantina oxidase

I - INTRODUÇÃO

1. Doenças neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas afetam milhões de pessoas em todo o mundo. Estas têm sido referidas como consequência de mutações genéticas e/ou fatores ambientais [1, 2]. Nos últimos anos, a comunidade científica tem reconhecido o importante papel da mitocôndria, como organelo responsável pela produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), no aparecimento destas doenças em humanos [3, 4], uma vez que quando produzidas em excesso, as ROS conduzem ao *stress* oxidativo. Este processo tem sido associado ao envelhecimento e ao aparecimento de doenças neurodegenerativas, como por exemplo, a doença de Alzheimer (DA) e doença de Parkinson (DP) [1, 4-20].

A DA, a forma mais comum das doenças neurodegenerativas, tem um início tardio, sendo uma doença caracterizada pela perda de memória e de várias funções cognitivas. A incidência e prevalência da doença aumenta dramaticamente após os 60 anos. Um estudo recente evidencia uma prevalência da DA de 47 % para pacientes com idade acima de 85 [7].

A disfunção mitocondrial é atualmente apontada como uma razão subjacente para a perda neuronal a nível cerebral a qual é marcada por um aumento de ROS, como consequência da peroxidação lipídica e proteica, que são frequentemente fenómenos descritos em cérebros de pacientes com DA.

A DA é uma doença caracterizada pela deposição de placas amiloides, tendo como principal constituinte o péptido β -amiloide ($A\beta$). O qual também está envolvido no *stress* oxidativo e na disfunção mitocondrial observada em doentes com DA. Diversos estudos demonstraram que a redução do potencial de membrana está intensificada no cérebro de modelos animais com mais idade em comparação com animais jovens [1, 2, 5, 8, 10, 11, 13, 16, 21-26].

Por sua vez, a DP é caracterizada pela perda de neurónios dopaminérgicos da substância negra e pela deposição de corpos de inclusão intracelulares. Clinicamente, a DP é caracterizada, entre outros sinais ou sintomas, por uma rigidez progressiva, instabilidade postural, tremor e lentidão de movimentos [10, 27-30]. É a segunda forma mais comum de doença neurodegenerativa, afetando 3 % da população com idade superior a 65 anos [30, 31]. A suscetibilidade a esta doença pode ser devido a fatores genéticos, toxinas ambientais (incluindo a maioria dos pesticidas e herbicidas), ou uma combinação dos dois e ainda devido ao envelhecimento. Estes fatores podem causar défice nas funções mitocondriais e consequentemente um aumento nos níveis do *stress* oxidativo que pode ser um fator de suscetibilidade para a DP [1, 5, 10, 11, 13, 16, 21, 24, 27-30, 32].

Do que foi referido é interessante realçar que as disfunções mitocondriais cerebrais e o *stress* oxidativo são fatores que contribuem para a patogénese de ambas as doenças, e que muitas vezes acompanham o processo de envelhecimento do cérebro de seres humanos [33].

O envelhecimento e as doenças neurodegenerativas

Os estudos associados ao *stress* oxidativo, foram pela primeira vez ligados à teoria do envelhecimento por Denham Harman em 1956 [34]. A partir desta data considerou-se que as espécies reativas de oxigénio estão associadas ao envelhecimento, ou seja, que a acumulação dos danos oxidativos podem contribuir para o envelhecimento associado à idade e a doenças neurodegenerativas, uma vez que com a idade as defesas existentes no organismo têm tendência a diminuir [19, 35].

O significado intuitivo de envelhecimento é claramente compreensível, embora uma definição precisa seja difícil. O termo tem alguma conotação com a longevidade, a qual varia bastante de espécie para espécie. Simplificando, o envelhecimento refere-se a uma série de alterações dependentes do tempo a nível molecular e celular que conduzem a alterações fenotípicas características que comprometem a aptidão funcional do organismo. Por razões óbvias, o envelhecimento do cérebro é de extrema importância nos seres humanos, pois tem uma grande relevância social e médica, especialmente porque muitas doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Parkinson (DP) e doença de Alzheimer (DA) estão associadas ao envelhecimento do cérebro. O *stress* oxidativo, a disfunção mitocondrial, a resposta inflamatória, a sinalização celular e expressão de genes alterada são algumas das principais características do envelhecimento do cérebro que levam a alterações morfológicas e ultra-estruturais, juntamente com défices metabólicos e declínio cognitivo [10, 12, 21, 25, 33, 36], podendo desempenhar papéis importantes na morte lentamente progressiva das células neuronais (por processos de apoptose e/ou necrose) que é característica de doenças neurodegenerativas [5, 7, 8, 11, 19, 29, 37-39].

É atualmente reconhecido que nas doenças neurodegenerativas, há a morte neuronal que pode ocorrer por um de dois processos de necrose ou apoptose.

A necrose é caracterizada por um aumento a nível do volume celular, que pode conduzir a que o conteúdo citoplasmático seja libertado para os tecidos circundantes. Tendo em conta os mecanismos celulares associados e a rapidez com que o processo ocorre, a morte celular por necrose é considerado um processo tóxico e extremamente difícil de prevenir [7, 38, 40].

Por sua vez, a morte celular por apoptose, provoca uma cascata de eventos que levam à destruição da célula, sem lise nem libertação do conteúdo celular, através de uma alteração

do potencial da membrana, acidificação intracelular e/ou geração de radicais livres [29, 38]. A apoptose pode ser iniciada após a receção de sinais extracelulares ou intracelulares, incluindo fatores que impedem o crescimento, radiação UV, choques térmicos, privação de nutrientes, que ativam uma família de proteínas transmembranares denominadas de recetores da morte, sendo tal como a necrose também um processo difícil de prevenir [40].

Na Figura I.1. encontram-se representadas esquematicamente as consequências associadas, e enunciadas anteriormente, à produção excessiva de espécies reativas de oxigénio, por um dos organelos existentes nas células neuronais, a mitocôndria. Este conjunto de processos, podem levar a danos oxidativos a proteínas mitocondriais, membranas e DNA, prejudicando a capacidade da mitocôndria para sintetizar ATP e para realizar a sua vasta gama de funções metabólicas, que são centrais para o funcionamento normal da maioria das células. O dano oxidativo mitocondrial também pode aumentar a tendência da mitocôndria para libertar proteínas do espaço intermembranar, tais como o citocromo c (cit c) para o citosol, pela permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP), e, assim, ativar o mecanismo apoptótico da célula.

Do que foi referido, não é surpreendente que se considere que o dano oxidativo mitocondrial contribua para uma grande variedade de patologias [41].

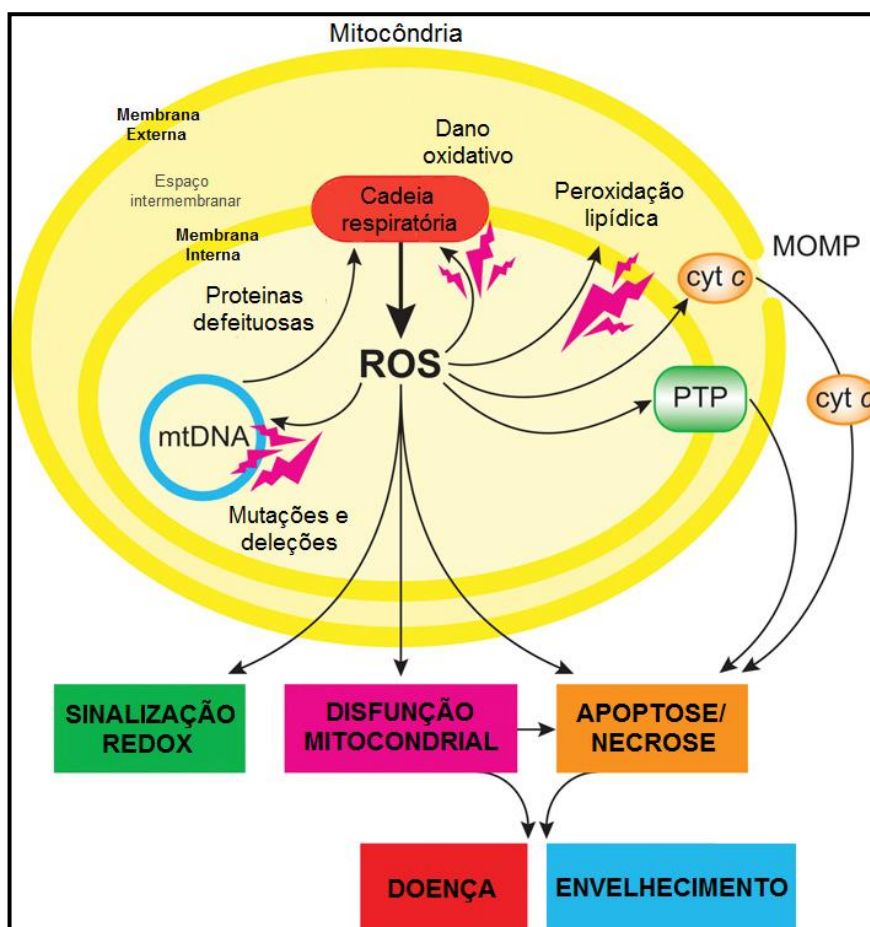


Figura I. 1. Visão geral da produção de ROS mitocondrial. Adaptado de [41].

2. Mitocôndria

As mitocôndrias são organelos celulares que foram identificados, pela primeira vez, durante o século dezanove e desde esse momento têm sido alvo de estudo [4, 14, 33, 36, 39, 42-44], sendo muito importantes para a sobrevivência e morte das células eucarióticas (Figura I.2) [10, 16, 17, 19, 21, 39]. Estes organelos desempenham algumas funções celulares essenciais, nomeadamente a formação de ATP (através da fosforilação oxidativa) e a homeostasia intracelular de Ca^{2+} , estando estes organelos presentes essencialmente em órgãos que necessitem de grandes consumos energéticos, tais como o cérebro, coração, fígado e músculos. São também responsáveis pela formação das espécies reativas de oxigénio (ROS) e por desencadear a resposta de morte celular programada, a apoptose [17, 26, 45, 46].

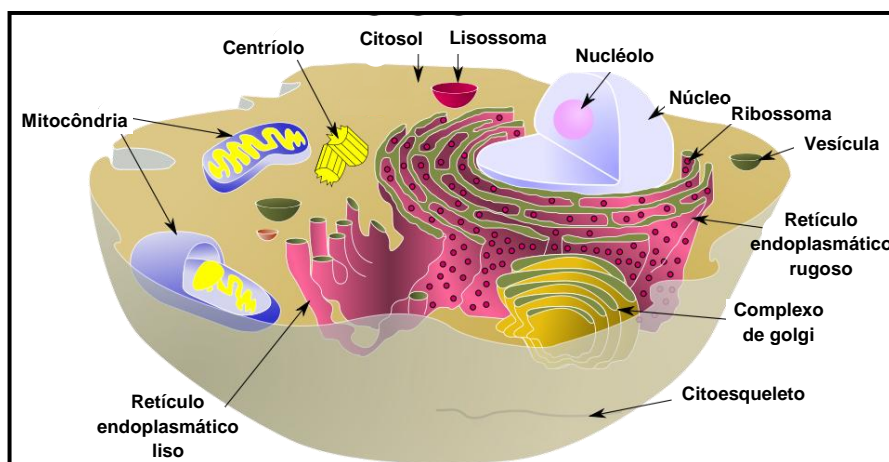


Figura I. 2. Célula eucariótica animal [42].

Estes organelos, em conjunto, podem ocupar cerca de 25 % do volume citoplasmático das células eucarióticas e, dentro das células, as mitocôndrias podem-se mover, fundir e dividir, consoante as necessidades das mesmas [39, 42].

Cada mitocôndria é delimitada por duas membranas altamente especializadas: a membrana interna e a membrana externa, com funções distintas, as quais criam dois compartimentos mitocondriais separados: a matriz mitocondrial e um espaço intermembranar (Figura I.3.) [4, 18, 19, 21, 35, 36, 42].

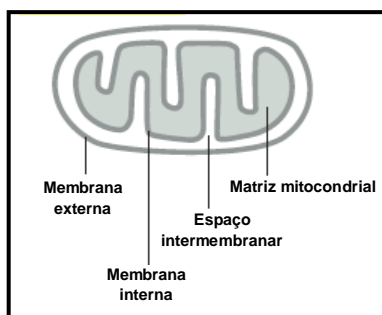


Figura I. 3. Estrutura simplificada de uma mitocôndria [42].

A membrana externa é rica em porinas, um tipo de proteína de transporte, que forma grandes canais aquosos através da bicamada lipídica. Esta membrana é permeável a todas as moléculas que apresentem uma massa molecular inferior a 5000 Da, incluindo pequenas proteínas. Tais moléculas podem entrar no espaço intermembranar, mas a maioria não pode atravessar a membrana interna, a qual é menos permeável, ficando, desta forma, na matriz mitocondrial com um conjunto mais seletivo de outras moléculas [19, 36, 42].

Sendo a membrana interna altamente especializada, a sua bicamada lipídica contém proteínas com diferentes tipos de funções. É nesta membrana que se encontram alocados os complexos enzimáticos (complexos I-V) responsáveis pelo transporte de elétrões ao longo da cadeia respiratória e consequente fosforilação oxidativa. Nestes complexos, sucessivas reações redox permitem que os elétrões sejam transferidos de uns complexos para os outros ao mesmo tempo que um gradiente eletroquímico de H^+ é estabelecido através da membrana interna, a partir da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar [4, 21, 36, 42, 47].

Este movimento de H^+ tem duas consequências principais:

- É gerado um gradiente de pH através da membrana mitocondrial interna, com o pH mais elevado na matriz do que no citosol, onde o pH é aproximadamente 7;
- É gerado um gradiente de potencial de membrana através da membrana mitocondrial interna, com o interior negativo e exterior positivo.

O gradiente de pH (ΔpH), conduz H^+ de volta para a matriz, favorecendo a produção de energia sob a forma de ATP [36, 42, 47].

A matriz mitocondrial contém uma mistura altamente concentrada de centenas de proteínas, incluindo as necessárias para a oxidação de ácidos gordos e de piruvato e para a realização do ciclo de Krebs. Os principais produtos desta oxidação são CO_2 , que é libertado a partir da célula como um resíduo, e o NADH, que funciona como a principal fonte de elétrões para o transporte ao longo da cadeia respiratória [4, 36, 42, 47].

Por sua vez, o espaço intermembranar contém várias enzimas que usam o ATP passando para fora da matriz para fosforilar outros nucleotídeos [42].

3. Stress oxidativo e espécies reativas de oxigénio (ROS)

Atualmente, estima-se que as mitocôndrias produzam cerca de 80 a 90 % da energia necessária a uma célula [4, 21, 39, 42]. Em particular, os neurónios, dependem muito da atividade mitocondrial por causa de seus elevados níveis de atividade e consequente necessidade energética [17, 26, 45, 46].

Contudo, as mitocôndrias são também responsáveis pela formação contínua de espécies reativas de oxigénio (ROS), um subproduto do metabolismo celular normal. Por dia, podem produzir cerca de 10^{11} ROS, sendo estas espécies particularmente reativas no cérebro e no tecido neuronal e agressivas para as células gliais e neurónios [5, 7, 20, 45, 48].

As ROS quantitativamente mais importantes são: o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), presente em quase todas as células aeróbicas, sendo produzido durante a redução de O_2 a água na cadeia de transporte de eletrões. Este pode ser rapidamente ou enzimaticamente, convertido a H_2O_2 . O peróxido de hidrogénio (H_2O_2), é um agente altamente reativo, apesar de não ser um radical livre, o qual pode conduzir à geração de radicais livres por meio intermédio de várias reações químicas com outros radicais, como o radical hidroxilo, sendo também capazes de gerar radicais HO^{\bullet} (reação de Haber-Weiss). Esta reação é particularmente importante na presença de ferro, que medeia a geração de radicais HO^{\bullet} a partir de H_2O_2 (reação de Fenton) (Figura I.4.). O radical hidroxilo (HO^{\bullet}), o mais reativo das ROS em sistemas biológicos, o que pode ser produzido através da decomposição de peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$) que é formado através de $O_2^{\bullet-}$ e óxido nítrico ($^{\bullet}NO$). Os radicais hidroxilo (HO^{\bullet}) são oxidantes mais potentes, do que radicais $O_2^{\bullet-}$, por exemplo, tendo um maior tempo de semi-vida [5, 7, 18, 21, 29, 33, 41, 45, 48, 49].

Para além das espécies reativas de oxigénio (ROS), existem também espécies reativas de azoto (RNS). As RNS incluem espécies radicais, mas também compostos não radicalares que, como as ROS são interconvertíveis. O óxido nítrico ($^{\bullet}NO$) é sintetizado enzimaticamente pela óxido nítrico sintase (NOS). O óxido nítrico é um radical livre altamente reativo envolvido no dano de proteínas, hidratos de carbono, nucleótidos e lípidos e, em conjunto com os mediadores inflamatórios, pode induzir danos em tecidos e células. Numa variedade de tecidos, o $^{\bullet}NO$ está ligado à regulação de uma vasta gama de processos fisiológicos, mas o seu excesso pode induzir efeitos tóxicos. Além disso, o $O_2^{\bullet-}$ reage prontamente com $^{\bullet}NO$ para formar peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$), que é instável a um pH fisiológico e se decompõe rapidamente para formar espécies potentes que conduzem ao *stress oxidativo* assim como ao *stress nitrativo* (Figura I.4.).

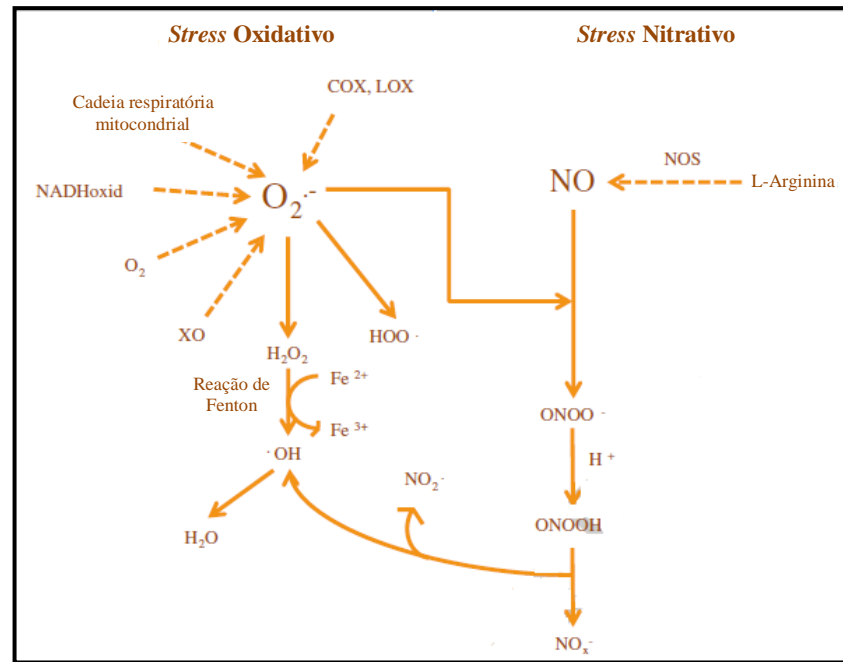


Figura I. 4. Principais vias para a formação de espécies reativas. NADPHoxid - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidase; XO - xantina oxidase; COX - ciclooxigenase; LOX - lipoxigenase; NOS - óxido nítrico sintase. Adaptado de [48].

Sendo as mitocôndrias uma das fontes de produção de espécies reativas de oxigênio, considerando situações em que esta produção excede a capacidade antioxidante a nível celular, ou seja, quando existe um desequilíbrio entre estes processos, podem desencadear-se processos do tipo oxidativo, denominados por *stress oxidativo*. Com o intuito de manter o equilíbrio redox, existem a nível celular antioxidantes endógenos, que desempenham um papel decisivo na prevenção/eliminação de danos provocados por radicais livres. Aquando de um desequilíbrio dos mecanismos de defesa antioxidante e/ou uma superprodução de radicais livres pode ocorrer um aumento das espécies radicalares, danos oxidativos e, eventualmente, morte celular neuronal.

As espécies radicalares presentes a nível mitocondrial podem ter duas fontes distintas: endógenas e exógenas [24]. Como possíveis fontes endógenas, são exemplo, a ocorrência de defeitos na respiração mitocondrial ou um défice na atividade dos complexos de transporte de eletrões, o qual é responsável pela produção excessiva de ROS. Outro exemplo, será o facto das mitocôndrias sofrerem ciclos contínuos de fusão e fissão, sendo que do equilíbrio destes processos opostos ocorre uma regulação da morfologia mitocondrial, o seu número e função. Com a inibição dos processos de fissão mitocondrial resulta um número reduzido de mitocôndrias individuais e de mitocôndrias de tamanho maior, bem como um aumento da produção de ROS, uma diminuição da taxa de fosforilação oxidativa e uma alteração do potencial de membrana mitocondrial alteradas [18, 21, 24, 41, 43, 45, 49, 50].

Como fontes exógenas podem referir-se hábitos sociais como drogas, tabaco, fumo e álcool, alimentação inadequada, excesso de radiação solar, a exposição a substâncias tóxicas (como fertilizantes e pesticidas), e uma alta tensão física ou psíquica [24, 50].

O sistema neuronal é particularmente suscetível às ROS devido ao seu elevado teor de ácidos gordos insaturados que são mais suscetíveis a danos oxidativos, denominados por peroxidação lipídica, e devido à grande dependência de fosforilação oxidativa para a obtenção de energia [5, 21, 33]. Uma vez que existem níveis elevados de metais a nível cerebral, tais como ferro, este também pode funcionar como um indutor do *stress* oxidativo. Portanto, qualquer aumento de ROS, proveniente de estímulos internos ou externos, tem como consequência que as mitocôndrias se tornem disfuncionais, produzindo cada vez mais ROS, e levando a um ciclo vicioso e prejudicial [5, 11, 51].

De salientar ainda dois fatores que podem ser também considerados como motores dos processos oxidativos a nível cerebral que é a quantidade que o cérebro consome (20 %) de oxigénio total e, não é particularmente enriquecido em defesas antioxidantes endógenas [5, 7, 11, 15, 20, 24, 29, 50, 51].

É importante referir que as ROS quando produzidas numa quantidade controlada, podem também desempenhar papéis fisiológicos importantes de sinalização em vários processos, incluindo a apoptose, a proliferação celular e hipoxia. No entanto, a sua produção em excesso pode causar graves danos em macromoléculas, com repercussões em funções celulares importantes [19, 37]. Lípidos, proteínas, DNA e RNA são suscetíveis de serem oxidados por parte das espécies reativas de oxigénio, resultando este processo na alteração das funções celulares e na formação de espécies tóxicas, tais como peróxidos, álcoois, aldeídos, cetonas e, por exemplo, de óxido de colesterol, sendo este último tóxico para linfócitos e macrófagos [8, 18, 21, 41, 43, 49].

Em suma pode-se dizer que o dano oxidativo para a mitocôndria é um fator crítico de muitas doenças neurodegenerativas, porque a cadeia respiratória é uma importante fonte de ROS e, porque o dano oxidativo mitocondrial interrompe a função das células [52]. E tendo a disfunção mitocondrial sido associada a uma variedade de distúrbios a nível humano, incluindo doenças neurodegenerativas e neuromusculares, obesidade e diabetes, cancro e doenças cardiovasculares (Figura I.5.) [26, 53].

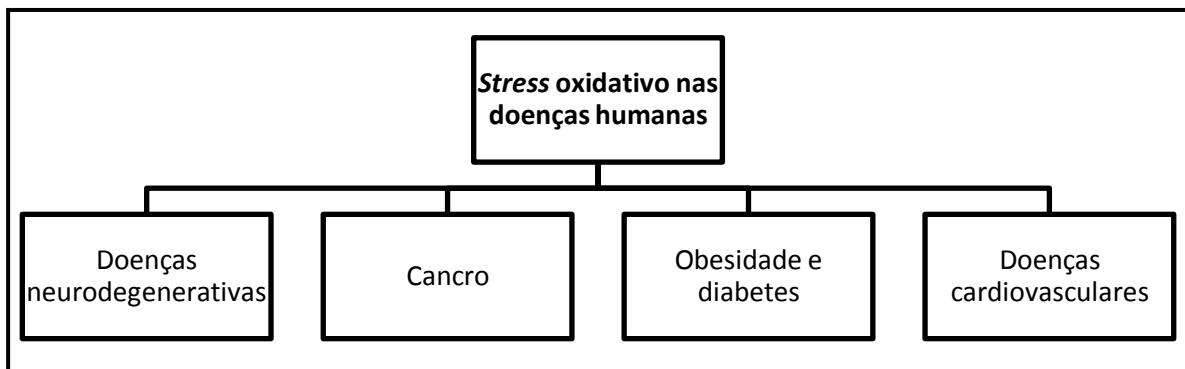


Figura I. 5. Doenças humanas, onde o *stress* oxidativo desempenha um papel direto ou indireto na fisiopatologia da doença [13].

II - O PROJETO

1. Antioxidantes

Uma vez que as disfunções mitocondriais produzem quantidades elevadas de espécies reativas de oxigénio, o que provoca *stress* oxidativo, os antioxidantes têm sido apontados com possível tratamento ou prevenção deste tipo de distúrbios, visando estabilizar a mitocôndria [5, 23, 33].

Os antioxidantes são definidos como moléculas que, em baixas concentrações e sob condições específicas, podem retardar ou prevenir a oxidação de um substrato oxidável. São moléculas que têm grande interesse devido ao seu potencial terapêutico visto reagirem preferencialmente com as ROS de forma a inibir a sua formação e/ou de inibir a oxidação de outras moléculas protegendo assim as células [8, 13, 48, 49, 54].

Deste modo, o melhor composto antioxidante é aquele que é capaz de prevenir o excesso de ROS e estimular antioxidantes endógenos para a reparação dos mecanismos celulares. Na atualidade, com a exposição contínua a fontes de espécies radicalares, que são comuns na vida da maioria das pessoas, é inevitável que o *stress* oxidativo surja com maior ou menor extensão [50]. Por esta razão, os antioxidantes são hoje em dia considerados uma abordagem terapêutica promissora no tratamento de uma ampla gama de doenças. Vários são os antioxidantes que fazem parte dos nossos hábitos regulares de dieta, como por exemplo, a vitamina C, ácido lipóico, ubiquinona, β -caroteno, creatina, melatonina, curcumina, diversos compostos fenólicos e flavonoides. Contudo, o interesse recente tem sido focado nos antioxidantes fenólicos presentes na dieta humana, como carotenoides, ácidos benzoicos, ácidos cinâmicos e flavonoides, como possíveis agentes terapêuticos em doenças neurodegenerativas. Quimicamente, todos estes compostos têm uma característica estrutural comum: um anel aromático com pelo menos um substituinte hidroxilo, ou seja, um grupo fenol [8, 13, 20, 37, 49, 55-58].

As propriedades farmacológicas, medicinais e bioquímicas dos compostos fenólicos têm sido extensivamente estudadas. Estes compostos apresentam atividades biológicas relevantes tais como, antioxidantes, anti-inflamatórias, antialérgicas, anticancerígenas e vasodilatadoras. Os antioxidantes fenólicos também são adicionados artificialmente aos alimentos há vários anos para evitar processos de oxidação e são amplamente utilizados nos dias de hoje para uma melhor preservação dos alimentos [15, 51, 55, 59].

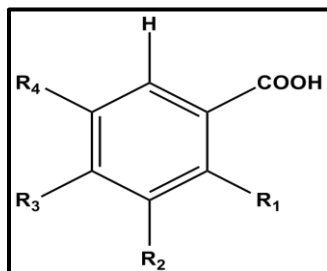
Em particular, os ácidos fenólicos (ácidos benzoicos e cinâmicos) e derivados têm sido estudados como potenciais modelos para o desenvolvimento de novos antioxidantes, para prevenir ou retardar processos de oxidação, nomeadamente na mitocôndria [13, 60, 61].

Muitos estudos têm sido realizados com a finalidade de se encontrarem antioxidantes realmente eficazes para o tratamento de doenças, como doenças neurodegenerativas, cancro, entre outras. A utilização de compostos fenólicos como antioxidantes naturais tem

atraído mais atenção devido à sua ocorrência relativamente abundante na natureza. De facto, existem mais de oito mil estruturas atualmente conhecidas pertencentes à categoria de compostos fenólicos, e estes estão presentes em plantas e frutas, nomeadamente frutos vermelhos, maçãs, frutas cítricas, cacau, uvas, azeitonas, tomates, cebolas, alface, brócolos, soja, grãos e cereais, chás verde e preto, café em grão, própolis e vinhos tinto e branco [13, 15, 51, 55, 57, 58]. Uma vez que os ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos estão presentes em alimentos de origem vegetal, os seres humanos consomem diariamente, ácidos fenólicos. Numa faixa de consumo estimada de 25 mg a 1 g por dia, dependendo do tipo de dieta [37, 50, 51, 55, 58, 62].

Nos últimos anos, a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos simples, ou seja, os derivados de ácidos benzoicos e cinâmicos tem sido muito estudada e sobejamente comprovada [37, 50, 62]. Todos os estudos efetuados, sistematicamente indicaram que a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos está relacionada com a sua estrutura: o tipo de substituintes no anel aromático (o número e configuração de grupos hidroxilo) e a estrutura da cadeia lateral [55, 57, 61, 62].

Os ácidos fenólicos, como o próprio nome indica, são fenóis que possuem uma funcionalidade adicional de ácido carboxílico. Estes compostos são geralmente divididos em dois grupos principais: os ácidos benzoicos, contendo sete átomos de carbono e com o grupo -COOH diretamente ligado ao anel aromático (Figura II.1. e Tabela II.1.), e ácidos cinâmicos, compreendendo nove átomos de carbono em que, pelo contrário o grupo -COOH não está diretamente ligado ao anel aromático, estando separados por dois átomos de carbono que formam uma ligação dupla entre eles. Estes compostos existem predominantemente na forma hidroxilada, portanto, são geralmente denominados por ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos, respetivamente. Embora o esqueleto carbonado básico seja o mesmo, o número e a posição dos grupos hidroxilo no anel aromático resultam na diferença e variedade de compostos [15, 58, 63].

Tabela II. 1. Estruturas dos ácidos fenólicos mais proeminentes, em particular de ácidos benzoicos, de ocorrência natural [58].**Figura II. 1.** Ácidos hidroxibenzoicos.

Nome	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Ácido Benzoico	H	H	H	H
Ácido <i>p</i> -Hidroxibenzoico	H	H	OH	H
Ácido Vanílico	H	OCH ₃	OH	H
Ácido Gálico	H	OH	OH	OH
Ácido Protocatecuico	H	OH	OH	H
Ácido Siríngico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Ácido Gentísico	OH	H	H	OH
Ácido Verátrico	H	OCH ₃	OCH ₃	H
Ácido Salicílico	OH	H	H	H

Os ácidos fenólicos apresentam uma série de benefícios para a saúde, que são de interesse atual, devido às suas propriedades biológicas e farmacológicas, especialmente propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anti-mutagénicas e anti-cancerígenas [58, 63]. No entanto, estes compostos naturais sendo ingeridos, são distribuídos por todo o organismo, não tendo a capacidade de se acumular no alvo pretendido que, principalmente no caso das doenças neurodegenerativas, é a mitocôndria. Adicionalmente, os compostos fenólicos apresentam uma solubilidade relativamente reduzida em meios apolares o que também pode ser visto como uma desvantagem, visto que a lipofilicidade de um composto parece ser um fator muito importante na sua eficácia como antioxidante em compartimentos lipofílicos, nomeadamente, para atravessar as membranas celulares e assim atingir o seu alvo. Portanto, propriedades como a lipofilicidade, a solubilidade, peso molecular e pKa têm uma influência notável sobre a permeabilidade e, conseqüentemente, na biodisponibilidade dos fármacos. Por estas razões têm sido efetuadas modificações em antioxidantes presentes na natureza, de modo a aumentar a sua lipofilia por exemplo, tornando possível que atinjam o alvo pretendido [20, 54, 60].

2. Antioxidantes mitocondriotrópicos

Uma abordagem possível para direcionar os antioxidantes para um alvo pretendido, neste caso a mitocôndria, passa por ligar quimicamente os compostos a moléculas lipofílicas catiónicas. Isso permite que os antioxidantes se concentrem na matriz mitocondrial carregada negativamente [23].

As mitocôndrias apresentam um potencial de membrana constante de cerca de -180 mV em toda a sua bicamada lipídica – seis vezes mais do que o potencial de uma célula comum e duas vezes mais do que o potencial de uma célula excitável. A natureza da membrana

mitocondrial é distinta dos restantes organelos precisamente por esta característica, o que oferece uma oportunidade única para obter compostos seletivos à mitocôndria [18, 19].

Para além de serem compostos catiónicos, deverão ser também lipofílicos para possuírem a capacidade de passar eficazmente as sucessivas membranas hidrofóbicas, e assim serem acumulados preferencialmente dentro da matriz mitocondrial. Esses compostos podem acumular-se na mitocôndria numa concentração cerca de cinco vezes superior à do citoplasma e cerca de 1000 vezes superior à do meio extracelular [19]. Com base nesta abordagem, a classe mais importante de moléculas foi desenvolvida inicialmente por Murphy e colaboradores através da ligação de diferentes moléculas de antioxidantes ao sal de trifenílfosfónio (TPP⁺) [17, 19].

Tendo as mitocôndrias como alvo, a proposta de Murphy foi desenvolver antioxidantes que possam concentrar-se especificamente no interior da sua matriz para atenuar a carga oxidativa e prevenir ou retardar a morte celular. A eficácia destes compostos *in vitro* foi demonstrada pela acumulação dos mesmos na mitocôndria de células vivas, devido ao potencial de membrana mitocondrial. Assim é possível aumentar o poder antioxidante do compartimento da matriz mitocondrial [47]. No entanto, apesar da sua eficiência na prevenção de danos mitocondriais, em elevadas concentrações os catiões lipofílicos apresentam como grande desvantagem a acumulação de carga na matriz que resulta numa despolarização da membrana mitocondrial, o que explica a toxicidade destes compostos em concentrações superiores a 10 mM [19, 64].

Na Figura II.2. está demonstrado o percurso de um composto antioxidante catiónico lipofílico até atingir o seu alvo. Preferencialmente, o composto seria biodisponível por via oral, sendo rapidamente absorvido para a corrente sanguínea a partir da parede intestinal. A partir daí, iria distribuir-se pelos órgãos, em particular aqueles ricos em mitocôndrias, tais como o coração, cérebro, fígado e músculos. Posteriormente, iria passar para as células dos tecidos afetados por lesões mitocondriais e, finalmente, o antioxidante acumular-se-ia então dentro da mitocôndria, protegendo-a contra o dano oxidativo [17].

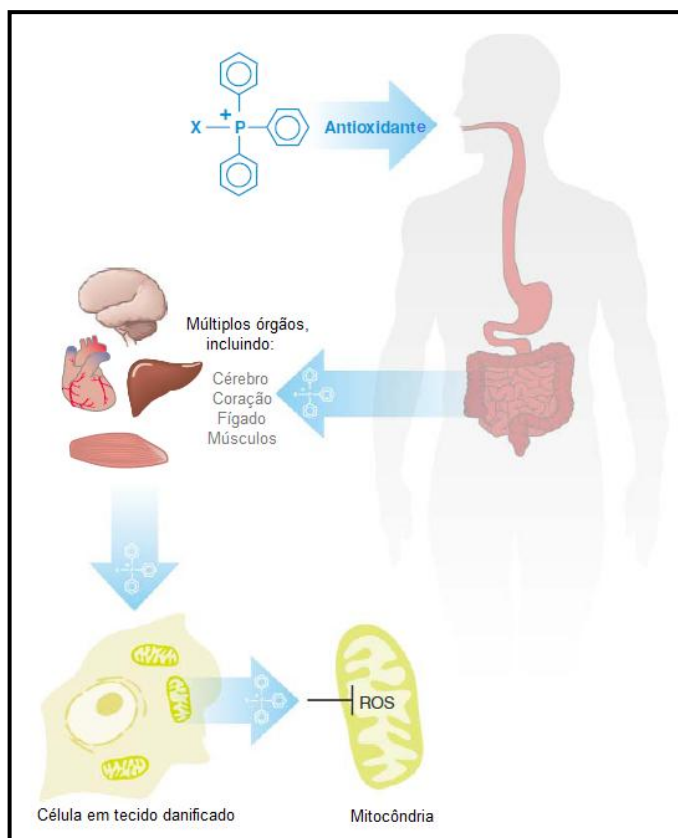


Figura II. 2. Absorção oral e distribuição de um antioxidante tendo a mitocôndria como alvo. Adaptado de [17].

Os antioxidantes catiónicos lipofílicos, como sais de alquiltrifenilfosfônio movem-se através das bicamadas fosfolipídicas de forma particular. O perfil de energia para o seu movimento característico é demonstrado na Figura II.3.. Para além da barreira de energia no centro da membrana, outra característica notável é a variação de energia potencial perto de cada uma das superfícies da membrana. Estas variações surgem porque a força atrativa hidrofóbica torna-se elevada, muito perto da superfície da membrana, enquanto que as forças de repulsão eletrostática aumentam mais gradualmente através da membrana. A ligação de catiões alquiltrifenilfosfônio dentro desta energia de potencial é feita no lado hidrofóbico da interface lípido/água da membrana. A entalpia de ligação é positiva (isto é, repulsiva), devido a forças eletrostáticas, e a ligação é acionada pelo aumento da entropia devido ao efeito hidrofóbico [17]. Os sais de alquiltrifenilfosfônio passam facilmente através das membranas biológicas devido à sua lipofilicidade, e acumulam-se preferencialmente, dentro da matriz mitocondrial carregada negativamente [19, 52].

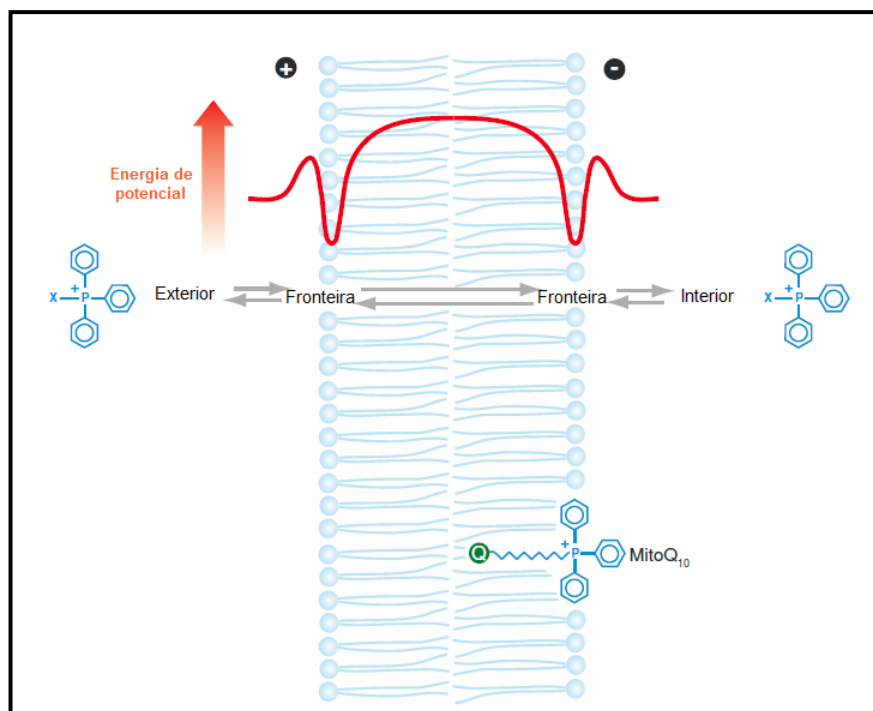


Figura II. 3. Movimento de catiões lipofílicos através das bicamadas fosfolipídicas. Na figura está representada a molécula MitoQ₁₀, desenvolvida por Murphy [17]. Este fica adsorvido à superfície interna da membrana interna, com a porção de TPP⁺ atraída pela carga negativa da membrana e o radical alquila Q inserido na membrana. Adaptado de [17].

Até à data, apenas catiões de TPP⁺ modificados têm sido preparados com sucesso e avaliados como antioxidantes mitocondriotrópicos [17].

3. O projeto

Tendo em conta o facto dos ácidos fenólicos estarem fortemente presentes na dieta humana e apresentarem várias características farmacológicas, o projeto a ser desenvolvido consistiu no desenho e síntese de novos antioxidantes catiónicos lipofílicos derivados de ácidos hidroxibenzoicos. Apesar de atualmente existirem bastantes compostos derivados de ácidos benzoicos, para se atingir o objetivo final, os ácidos protocatecuico e gálico (Figura II.4. e II.5., respetivamente), foram usados como material de partida.

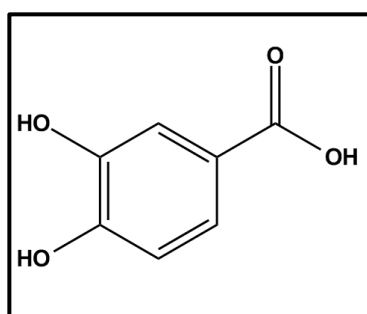


Figura II. 4. Ácido Protocatecuico.

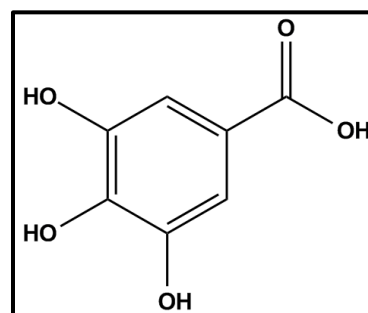


Figura II. 5. Ácido Gálico.

Estes compostos iniciais foram modificados pela introdução de cadeias de carbono alifáticas contendo o catião trifenilfosfônio (TPP⁺), para que assim possuam cargas positivas a pH fisiológico e, portanto, capazes de acumulação a nível mitocondrial, devido também ao aumento da lipofilicidade (Figura II.6.).

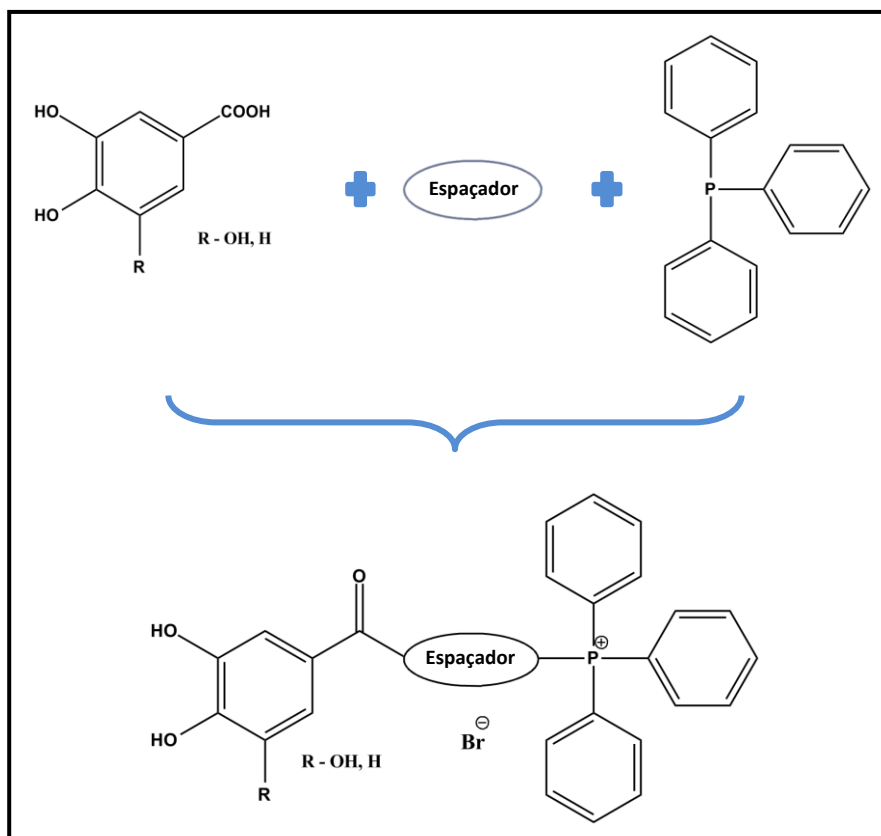


Figura II. 6. Obtenção dos antioxidantes catiónicos lipofílicos derivados do ácido benzoico, partindo dos ácidos protocatecuico e gálico, pela inserção de cadeias de carbono alifáticas (espaçador) contendo o catião trifenilfosfônio (TPP⁺).

Os compostos sintetizados poderão ser aplicados como agentes antioxidantes potentes e seletivos para um alvo específico: a mitocôndria (Figura II.7.).

Posteriormente, foi avaliada a atividade antioxidante e potencial redox de cada composto.

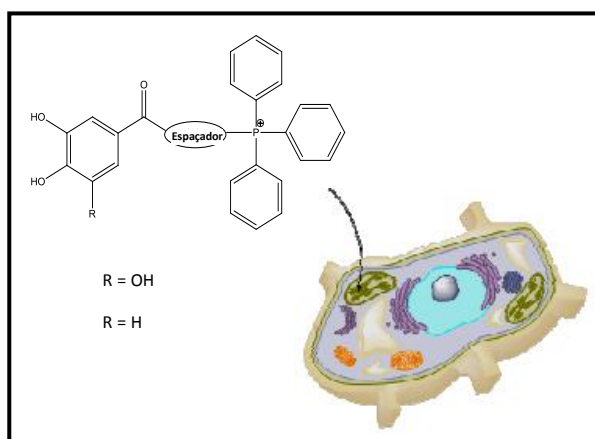


Figura II. 7. Esquema geral dos antioxidantes lipofílicos seletivos para a mitocôndria.

4. Estratégias sintéticas delineadas para a obtenção dos antioxidantes

Para ser atingido o objetivo do trabalho, ou seja, para serem obtidos os compostos pretendidos, derivados de ácidos benzoicos presentes na dieta – ácido protocatecuico (1) e gálico (2) – com a introdução de cadeias de carbono alifáticas contendo o catião trifenilfosfónio (TPP⁺), foram realizados vários passos de síntese, tentando otimizar cada passo, até chegar aos compostos finais. Nas figuras II.8. e II.9. estão representadas as estratégias de síntese realizadas neste trabalho para a obtenção de antioxidantes catiónicos. Os diferentes passos reacionais são numerados de i) a v) e os compostos numerados de 1 a 12.

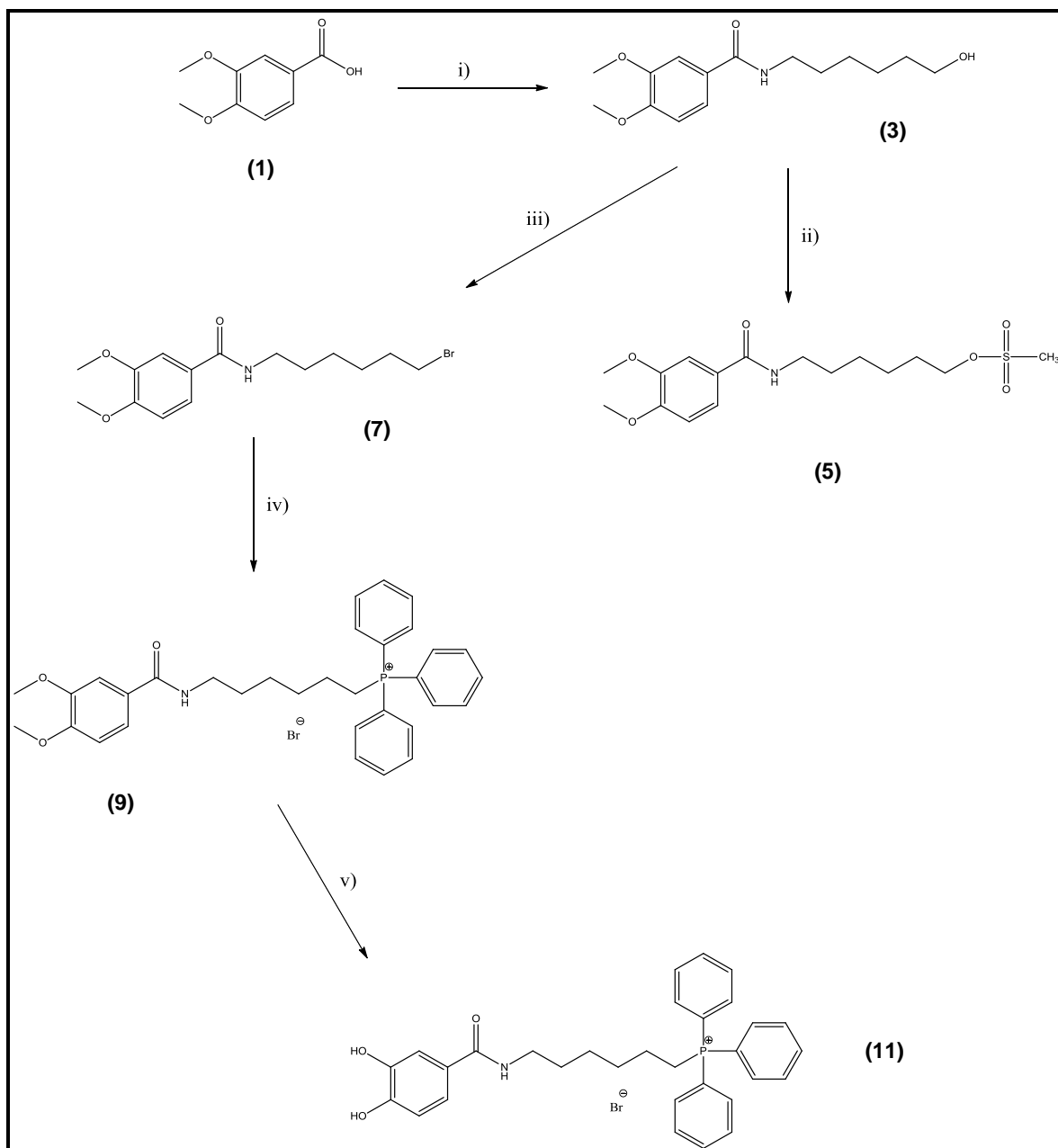


Figura II. 8. Representação esquemática da estratégia de síntese usada na obtenção de antioxidantes mitocondriotrópicos, partindo do ácido protocatecuico: i) $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2\text{OH}$, r. t., 10 h; ii) $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$, r. t., 12 h; iii) $\text{C}_2\text{Br}_2\text{Cl}_4$, diphos, r.t., 20 h; iv) PPh_3 , 100 °C, 48 h; v) BBr_3 , - 70 °C, 12 h.

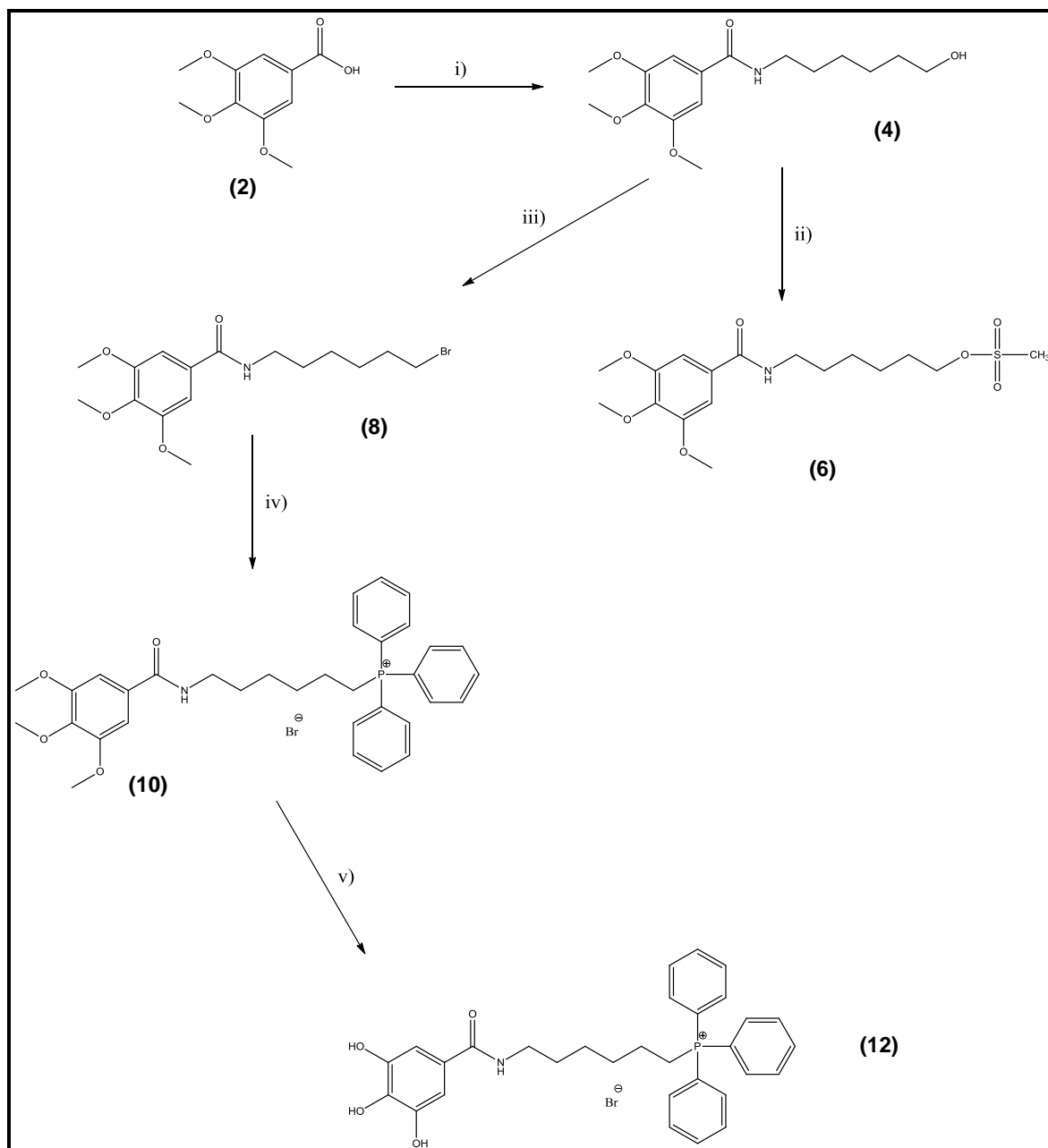


Figura II. 9. Representação esquemática da estratégia de síntese usada na obtenção de antioxidantes mitocondriotrópicos, partindo do ácido gálico: i) $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2\text{OH}$, r. t., 10 h; ii) $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$, r. t., 12 h; iii) $\text{C}_2\text{Br}_2\text{Cl}_4$, diphos, r.t., 20 h; iv) PPh_3 , 100 °C, 48 h; v) BBr_3 , - 70 °C, 12 h.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

1. Reagentes e Solventes

- Os solventes e reagentes utilizados foram todos de qualidade *pro analysis* ou “*para síntese*” das firmas Merck, Aldrich e Sigma.

2. Instrumentação

- As pesagens foram efetuadas em balanças *AND HF-1200G*, *Kern ABS* e *Mettler AE240*;
- Os solventes foram evaporados com auxílio de pressão reduzida, usando um evaporador rotativo *Büchi Rotavapor R-210*;
- Foram utilizados sistemas de ultra-sons *Fungilab* e *VWR (Ultrasonic cleaner) USC100TH*;
- As reações via micro-ondas foram realizadas num forno de micro-ondas *Biotage Initiator 2,5*;
- Os compostos foram secos numa estufa de vácuo *Vacuum Oven Mti Corporation*;
- Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT) foram obtidos num aparelho Bruker Avance III 400 no Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP), à temperatura ambiente, a partir de soluções em clorofórmio deuterado (CDCl_3), em metanol deuterado (CD_3OD) ou dimetilsulfóxido deuterado (DMSO), com grau de deuteração superior a 99,0 %. Como referência interna usou-se TMS. Os espectros de ressonância magnética nuclear de protão (RMN ^1H) e de ^{13}C foram registados a 400,15 MHz e 100,62 MHz, respetivamente, indicando-se o desvio químico (δ) em partes por milhão (ppm), o número de protões, a multiplicidade e a(s) constante(s) de acoplamento. Os dados de DEPT, também registados a 100,62 MHz, estão incluídos nos valores de ^{13}C (valores de δ sublinhados);
- Os espectros de massa (EM) foram registados num espectrómetro *Hewlett-Packard 5988A* de impacto eletrónico (IE) na Faculdade de Farmácia da Universidade de Santiago de Compostela e referidos em m/z (% relativa) dos fragmentos mais importantes, sendo M^{*+} relativo ao ião molecular;
- Para os ensaios de ABTS, DPPH e Galvinoxilo foi utilizado um leitor de microplacas *Powerwave XS Microplate Reader (Bio-Tek Instruments, Inc.)*;
- Os estudos voltamétricos foram realizados utilizando um Autolab PGSTAT 12 potenciostato/galvanostato (Eco-Chemie, Holanda), no Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP).

3. Cromatografia

- Na cromatografia em camada fina (CCF) usaram-se placas pré-revestidas de gele de sílica 60 F₂₅₄ (Merck) de espessura 0,2 mm; as fases móveis são referidas em cada síntese, mencionando no caso de misturas de solventes, a proporção volumétrica dos vários componentes. Os cromatogramas obtidos foram revelados num aparelho *Vilber Corporation* por ação da luz ultravioleta (UV) de comprimento de onda (λ) de 254 e/ou 366 nm, em câmara de iodo e/ou solução aquosa de cloreto férrico a 10 % (m/v).
- Na cromatografia em coluna usou-se como fase estacionária gele de sílica 60 (0,2-0,5 mm) ou gele de sílica 60 (0,040-0,063 mm); as fases móveis usadas no processo de purificação são referidas em cada síntese. Recolheram-se frações de aproximadamente 15 mL.

4. Síntese de compostos hidroxihexilbenzamídicos (i)

Procedimento geral: Dissolveram-se 0,5 eq. de ácido benzoico 1 ou 2 em 50 mL de diclorometano (DCM) e, de seguida, adicionou-se 1 eq. de trietilamina (Et₃N). A mistura reacional ficou em agitação durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Arrefeceu-se a solução num banho de gelo e adicionou-se lentamente 1 eq. de etilclorofornato, deixando em agitação durante 2–3 horas à temperatura ambiente. Arrefeceu-se novamente a solução num banho de gelo e adicionou-se 1 eq. de 6-aminohexan-1-ol. Deixou-se em agitação durante 10 horas à temperatura ambiente. A fase orgânica foi lavada com H₂O (3 × 20 mL), intercalando com NaHCO₃, a 5 % (20 mL) e HCl, 1 M (20 mL), medindo-se seguidamente o pH para confirmar se a mistura reacional se encontrava neutralizada e a mistura foi extraída com DCM (3 × 20 mL). Secou-se a fase orgânica com Na₂SO₄ anidro e evaporou-se o solvente até à secura. A reação foi acompanhada por CCF (gele de sílica, com a fase móvel acetato de etilo).

O procedimento foi adaptado da literatura [65].

4.1. Síntese da *N*-(6-hidroxi-hexil)-3,4-dimetoxibenzamida (3)

O composto 3 foi obtido pelo procedimento geral referido na seção 4., usando as seguintes condições: dissolução do ácido 3,4-dimetoxibenzoico (3,0 g; $1,6 \times 10^{-2}$ mol) em DCM (50 mL) e por adição de Et₃N (4,6 mL; $3,3 \times 10^{-2}$ mol), etilclorofornato (3,1 mL; $3,3 \times 10^{-2}$ mol) e 6-aminohexan-1-ol (3,9 g; $3,3 \times 10^{-2}$ mol). Obteve-se um sólido de coloração esbranquiçada.

Rendimento: 74 %

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,39 – 1,41 (4H, *m*, (CH₂)₂(CH₂)₂OH), 1,55 – 1,63 (4H, *m*, NCH₂CH₂(CH₂)₂CH₂), 1,99 (1H, *s*, OH), 3,40 – 3,45 (2H, *m*, NCH₂), 3,63 (2H, *t*, J = 6,5 Hz, CH₂OH), 3,91 (6H, *s*, 2 × OCH₃), 6,38 (1H, *t*, J = 5,2 Hz, CONH), 6,85 (1H, *d*, J = 8,4 Hz, H(5)), 7,29 (1H, *dd*, J = 2,1 Hz, J = 8,3 Hz, H(6)), 7,43 (1H, *d*, J = 2,0 Hz, H(2)).

¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ = 25,4 (CH₂(CH₂)₂OH), 26,7 (N(CH₂)₂CH₂), 29,8 (NCH₂CH₂), 32,6 (CH₂CH₂OH), 40,0 (NCH₂), 56,1 (2 × OCH₃), 62,7 (CH₂OH), 110,4 (C(5)), 110,7 (C(2)), 119,4 (C(6)), 127,5 (C(1)), 149,0 (C(3)), 151,7 (C(4)), 167,3 (CONH).

EM-IE *m/z* (%): 281 (M⁺), 208 (16), 195 (21), 194 (100), 180 (16), 165 (75), 164 (55), 121 (15).

4.2. Síntese da *N*-(6-hidroxi-hexil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (4)

O composto 4 foi obtido pelo procedimento geral referido na seção 4., usando as seguintes condições: dissolução do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico (3,0 g; $1,4 \times 10^{-2}$ mol) em DCM (50 mL) e por adição de Et₃N (3,9 mL; $2,8 \times 10^{-2}$ mol), etilclorofornato (2,7 mL; $2,8 \times 10^{-2}$ mol) e 6-aminohexan-1-ol (3,3 g; $2,8 \times 10^{-2}$ mol). Obteve-se um sólido de coloração esbranquiçada.

Rendimento: 82 %

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,40 – 1,43 (4H, *m*, (CH₂)₂(CH₂)₂OH), 1,54 – 1,66 (4H, *m*, NCH₂CH₂(CH₂)₂CH₂), 1,81 (1H, *s*, OH), 3,41 – 3,46 (2H, *m*, NCH₂), 3,64 (2H, *t*, J = 6,4 Hz, CH₂OH), 3,87 (3H, *s*, OCH₃), 3,89 (6H, *s*, 2x OCH₃), 6,28 (1H, *t*, J = 5,1 Hz, CONH), 7,00 (2H, *s*, H(2) e H(6)).

¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ = 25,4 (CH₂(CH₂)₂OH), 26,7 (NCH₂CH₂CH₂), 29,8 (NCH₂CH₂), 32,6 (CH₂CH₂OH), 40,1 (NCH₂), 56,4 (2x OCH₃), 61,0 (OCH₃), 62,8 (CH₂OH), 104,5 (C(2) e C(6)), 130,4 (C(1)), 140,9 (C(4)), 153,3 (C(3) e C(5)), 167,5 (CONH).

EM-IE *m/z* (%): 312 (M⁺), 225 (38), 224 (34), 211 (59), 196 (49), 195 (100).

5. Síntese de álcoois primários ativados

Foram testadas quatro vias sintéticas para a ativação da função álcool dos compostos sintetizados anteriormente (3 e 4), para transformar num bom grupo de saída, e proceder posteriormente para reação de substituição nucleofílica. Estas vias são descritas seguidamente.

5.1. Conversão do álcool em éster (ii)

Procedimento geral: Dissolveu-se 1 eq. de composto 3 ou 4 em 15 mL de diclorometano e adicionou-se 0,5 eq. de trietilamina. Deixou-se em agitação durante 10 minutos à temperatura ambiente. Seguidamente, efetuou-se a adição gota a gota de uma solução de 0,52 eq. de cloreto de mesilo em 10 mL de diclorometano. O meio reacional foi deixado em agitação durante 12 horas à temperatura ambiente. A fase orgânica foi lavada com H₂O (3 × 20 mL), intercalando com NaHCO₃, a 5 % (20 mL) e HCl, 1 M (20 mL), medindo-se seguidamente o pH para confirmar se a mistura reacional se encontrava neutralizada e a mistura foi extraída com DCM (3 x 20 mL). Secou-se a fase orgânica com Na₂SO₄ anidro e evaporou-se até à secura. A reação foi acompanhada por CCF (gele de sílica, com a fase móvel diclorometano:metanol (9:1)).

O procedimento foi adaptado da literatura [52].

5.1.1. Síntese do 6-(3,4-dimetoxibenzamida)hexilmetanossulfonato (5)

De acordo com o procedimento geral descrito na seção 5.1., o composto 3 (500 mg; 1,8 mmol) foi dissolvido em DCM (15 mL), tendo-se adicionado, de seguida, Et₃N (500 µL; 3,6 mmol) e uma solução de cloreto de mesilo (140 µL; 1,9 mmol) em DCM (10 mL). Obteve-se um óleo de coloração amarela, mas após várias tentativas de purificação do produto bruto não se conseguiu isolar o pretendido.

5.1.2. Síntese da 6-(3,4,5-trimetoxibenzamida)hexilmetanossulfonato (6)

De acordo com o procedimento geral descrito na seção 5.1., o composto 4 (500 mg; 1,6 mmol) foi dissolvido em DCM (15 mL), tendo-se adicionado, de seguida, Et₃N (450 µL; 3,2 mmol) e uma solução de cloreto de mesilo (130 µL; 1,7 mmol) em DCM (10 mL). Obteve-se

um óleo de coloração amarela, mas após várias tentativas de purificação do produto bruto não se conseguiu isolar o pretendido.

5.2. Conversão do álcool em halogeneto de alquila (iii)

5.2.1. Via tribrometo de fósforo (PBr₃)

Para obtenção dos compostos 7 e 8 foram testadas duas vias sintéticas: por via clássica e outra por micro-ondas.

Procedimento geral A (síntese clássica): Dissolveu-se 1 eq. de composto 3 ou 4 em 20 mL diclorometano anidro. Adicionou-se gota a gota uma solução de 1 eq. de PBr₃ em 25 mL de diclorometano anidro a uma temperatura de 0 °C, mantendo-se em agitação cerca de 2 horas. Prolongando-se a agitação por mais 18 horas à temperatura ambiente. A fase orgânica foi lavada com H₂O (2 × 15 mL) e com NaHCO₃, a 5 % (15 mL) e a mistura foi extraída com DCM (3 × 20 mL). Secou-se com Na₂SO₄ anidro e evaporou-se o solvente. A reação foi acompanhada por CCF (gele de sílica, com a fase móvel acetato de etilo). O resíduo foi purificado numa coluna de gel de sílica usando acetato de etilo como sistema de eluição. As frações contendo o composto pretendido foram recolhidas, evaporou-se o solvente e recristalizou-se com *n*-hexano.

O procedimento foi adaptado da literatura [66, 67].

Procedimento geral B (síntese por micro-ondas): Adicionou-se 0,5 eq. do composto 4 num vial e adicionou-se 1 eq. de PBr₃ em 2 mL de THF anidro. A mistura ficou em agitação durante 2 minutos à temperatura ambiente, para permitir a homogeneização completa do meio reacional. De seguida, o vial foi aquecido durante 25 minutos a 120 °C, por micro-ondas. Depois de arrefecer até à temperatura ambiente, à mistura foi adicionado 20 mL de água fria. A solução resultante foi neutralizada com NaOH 1M, mantendo-se em agitação durante 20 minutos. De seguida, procedeu-se à lavagem da fase aquosa com diclorometano (2 × 10 mL). Secou-se com Na₂SO₄ anidro e evaporou-se o solvente. A reação foi acompanhada por CCF (gele de sílica, com a fase móvel acetato de etilo). O resíduo foi purificado numa coluna de gel de sílica usando acetato de etilo como sistema de eluição. As frações contendo o composto pretendido foram recolhidas, evaporou-se o solvente e recristalizou-se com *n*-hexano.

O procedimento foi adaptado da literatura [68].

5.2.1.1. Síntese da *N*-(6-bromo-hexil)-3,4-dimetoxibenzamida (7)

A - Síntese clássica: Conforme o procedimento descrito na secção 5.2.1., o composto 3 foi dissolvido (3,29 g; $1,2 \times 10^{-2}$ mol) em DCM anidro (20 mL), adicionando-se de seguida uma solução de PBr_3 (1,11 mL; $1,2 \times 10^{-2}$ mol) em DCM anidro (25 mL). Obteve-se um sólido esbranquiçado.

Rendimento: 19 %

5.2.1.2. Síntese da *N*-(6-bromo-hexil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (8)

A - Síntese clássica: Conforme o procedimento descrito na secção 5.2.1., o composto 4 foi dissolvido (3,59 g; $1,2 \times 10^{-2}$ mol) em DCM anidro (20 mL), adicionando-se de seguida uma solução de PBr_3 (1,09 mL; $1,2 \times 10^{-2}$ mol) em DCM anidro (25 mL). Obteve-se um sólido esbranquiçado.

Rendimento: 28 %

B- Síntese por micro-ondas: De acordo com o procedimento descrito na secção 5.2.1., o composto 4 foi adicionado num vial (250 mg; 8,0 mmol), juntamente com PBr_3 (150 μL ; 1,6 mmol) em 2 mL de THF. Obteve-se um sólido esbranquiçado.

Rendimento: 33 %

5.2.2. Via complexo 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina/*N,N*-Dimetilformamida (TCT/DMF)

Procedimento geral: Foi adicionado 1 eq. de cloreto cianúrico (2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina, TCT) a 2,6 eq. de DMF, a 25 °C. Após a formação de um sólido branco, a reação foi controlada por CCF até se observar o completo desaparecimento de TCT. De seguida, adicionaram-se 10 mL de diclorometano, seguidamente 0,95 eq. de composto 4 e 5 eq. de NaBr em 10 mL de DMF. Deixou-se o meio reacional em agitação à temperatura ambiente durante cerca de 5 horas. A fase orgânica foi lavada com água (3 \times 5 mL), secou-se com Na_2SO_4 anidro, e evaporou-se o solvente. A reação foi acompanhada por CCF (gele de sílica, com a fase móvel acetato de etilo). O resíduo foi purificado numa coluna de gel de sílica usando acetato de etilo como sistema de eluição. As frações contendo o composto

pretendido foram recolhidas, evaporou-se o solvente e ainda se tentou recrystalizar com *n*-hexano.

O procedimento foi adaptado da literatura [69-72].

5.2.2.1. Síntese da *N*-(6-bromo-hexil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (8)

Conforme o procedimento geral descrito em 5.2.2. foi adicionado TCT (185 mg; 1,0 mmol) a DMF (0,2 mL; 2,6 mmol). Seguindo-se da adição de 10 mL de DCM e do composto 4 (297 mg; 0,95 mmol) e NaBr (516 mg; 5,0 mmol) em 10 mL de DMF. Obteve-se um sólido de coloração amarelada, mas após várias tentativas de purificação do produto bruto não se conseguiu isolar o pretendido.

5.2.3. Via Etilenobis(difenilfosfina) (diphos)

Procedimento geral: Dissolveu-se 1 eq. de composto 3 ou 4, 1 eq. de 1,2-dibromotetracloroetano em 20 mL de THF. Adicionou-se seguidamente 0,5 eq. de 1,2-bis(difenilfosfino)etano (diphos). A reação foi mantida com agitação à temperatura ambiente durante 20 horas. Após a reação, a mistura reacional foi filtrada com Celite. Após evaporação do filtrado, obteve-se um óleo que foi purificado numa coluna de gel de sílica usando acetato de etilo como sistema de eluição. As frações contendo o composto pretendido foram recolhidas, evaporou-se o solvente e recrystalizou-se com *n*-hexano. A reação foi acompanhada por CCF (gele de sílica, com a fase móvel acetato de etilo).

O procedimento foi adaptado da literatura [73].

5.2.3.1. Síntese da *N*-(6-bromo-hexil)-3,4-dimetoxibenzamida (7)

De acordo com o procedimento geral descrito na secção 5.2.3., dissolveu-se o composto 3 (2,34 g; 8,3 mmol), 1,2-dibromotetracloroetano (2,71 g; 8,3 mmol) em 20 mL de THF. De seguida, adicionou-se diphos (1,66 g; 4,2 mmol). Obteve-se um sólido esbranquiçado.

Rendimento: 66 %

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,38 – 1,53 (4H, *m*, (CH₂)₂(CH₂)₂Br), 1,59 – 1,67 (2H, *m*, NCH₂CH₂), 1,83 – 1,90 (2H, *m*, CH₂CH₂Br), 3,39 – 3,46 (4H, *m*, NCH₂(CH₂)₄CH₂Br), 3,92 (6H, *s*, 2 × OCH₃), 6,25 (1H, *t*, J = 5,4 Hz, CONH), 6,85 (1H, *d*, J = 8,4 Hz, H(5)), 7,27 (1H, *dd*, J = 2,1 Hz, J = 8,3 Hz, H(6)), 7,43 (1H, *d*, J = 2,0 Hz, H(2)).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 26,2$ ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), $28,0$ ($\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{Br}$), $29,7$ (NCH_2CH_2), $32,7$ ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$), $33,9$ (CH_2Br), $40,0$ (NCH_2), $56,1$ ($\text{OCH}_3 \times 2$), $110,3$ (C(5)), $110,7$ (C(2)), $119,2$ (C(6)), $127,5$ (C(1)), $149,1$ (C(3)), $151,7$ (C(4)), $167,2$ (CONH).

EM-IE m/z (%): 345 (M^+), 343 (24), 264 (36), 195 (34), 194 (19), 181 (40), 166 (24), 165 (100).

5.2.3.2. Síntese da *N*-(6-bromo-hexil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (8)

De acordo com o procedimento geral descrito na secção 5.2.3., dissolveu-se o composto 4 (2,33 g; 7,5 mmol), 1,2-dibromotetracloroetano (2,44 g; 7,5 mmol) em 20 mL de THF. De seguida, adicionou-se diphos (1,49 g; 3,7 mmol). Obteve-se um sólido esbranquiado.

Rendimento: 87 %

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,37 - 1,52$ (4H, *m*, $(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_2\text{Br}$), $1,59 - 1,66$ (2H, *m*, NCH_2CH_2), $1,83 - 1,90$ (2H, *m*, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$), $3,39 - 3,45$ (4H, *m*, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{Br}$), $3,87$ (3H, *s*, OCH_3), $3,88$ (6H, *s*, $2 \times \text{OCH}_3$), $6,40$ (1H, *t*, $J = 5,3$ Hz, CONH), $7,01$ (2H, *s*, H(2) e H(6)).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 26,2$ ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), $27,9$ ($\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{Br}$), $29,6$ (NCH_2CH_2), $32,6$ ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$), $33,9$ (CH_2Br), $40,1$ (NCH_2), $56,4$ ($2 \times \text{OCH}_3$), $61,0$ (OCH_3), $104,4$ (C(2) e C(6)), $130,3$ (C(1)), $140,8$ (C(4)), $153,2$ (C(3) e C(5)), $167,3$ (CONH).

EM/EI m/z (%): 374 (M^+), 372 (15), 225 (18), 224 (100), 210 (18), 195 (32), 194 (48).

5.3. Síntese de introdução do catião trifenilfosfónio (iv)

Para obtenção dos sais de trifenilfosfónio foram testadas duas vias sintéticas: por via clássica e outra por micro-ondas.

Procedimento geral A (síntese clássica): Adicionou-se 1 eq. de composto 7 ou 8 e 1 eq. de trifenilfosfina (PPh_3)⁽¹⁾, sendo aquecidos a uma temperatura de aproximadamente 100 °C, durante 48 horas. O resíduo foi purificado numa coluna de gel de sílica usando a mistura de diclorometano:metanol como sistema de eluição com aumento progressivo da polaridade.

⁽¹⁾ Inicialmente, juntou-se 0.5 eq. de composto 7 ou 8 e 1 eq. de trifenilfosfina, mas verificou-se que resultava num excesso de trifenilfosfina, o que dificultava bastante a purificação do composto pretendido.

As frações contendo o composto pretendido foram recolhidas e evaporou-se o solvente à secura com auxílio de pressão reduzida. A reação foi acompanhada por CCF (gele de sílica, com a fase móvel diclorometano:metanol (9:1)).

O procedimento foi adaptado da literatura [52].

Procedimento geral B (síntese por micro-ondas): Adicionou-se 1 eq. de composto 7 ou 8 e 1 eq. de trifenilfosfina (PPh_3)⁽²⁾, num vial, e foram aquecidos a uma temperatura de aproximadamente 120 °C, durante 45 minutos.

O resíduo foi purificado numa coluna de gel de sílica usando a mistura de acetato de etilo:metanol como sistema de eluição com aumento progressivo da polaridade. As frações contendo o composto pretendido foram recolhidas e evaporou-se o solvente à secura com auxílio de pressão reduzida. A reação foi acompanhada por CCF (gele de sílica, com a fase móvel acetato de etilo:metanol (9:1)), observando-se a formação do composto pretendido.

O procedimento foi adaptado da literatura [74].

5.3.1. Síntese *in situ* do sal de 6-(3,4,5-trimetoxibenzamido)hexiltrifenilfosfónio

Adicionaram-se 500 mg de trifenilfosfina e 5 mL de ácido brómico, a 50 °C com refluxo. Depois da homogeneização completa adicionaram-se 500 mg de composto 4. Passadas 3 horas foram retirados 2,5 mL do meio reacional, ficando o restante no balão para dar continuidade à reação. À quantidade retirada adicionou-se água fria e, de seguida, procedeu-se à lavagem da fase aquosa com diclorometano ($2 \times 1,5$ mL). Secou-se com Na_2SO_4 anidro e evaporou-se até à secura. Colocou-se num banho de gelo e verificou-se a formação de um sólido branco. O controlo desta reação foi feito por CCF, com o auxílio de vapores de iodo para a revelação da existência do produto pretendido e como se verificava a presença de trifenilfosfina e, possivelmente, do composto desejado, procedeu-se à tentativa de recristalização com *n*-hexano e lavagens com diclorometano. Mas por RMN foi possível concluir que o composto desejado não se formou. Com o restante que ficou a reagir por mais 12 horas, procedeu-se da mesma forma, mas igualmente se verificou que o composto desejado não se formou. A reação foi acompanhada por CCF (gele de sílica, com a fase móvel diclorometano:metanol (9:1)).

O procedimento foi adaptado da literatura [66, 75-78].

⁽²⁾ Inicialmente, juntou-se 0.5 eq. de composto 7 ou 8 e 1 eq. de trifenilfosfina, mas verificou-se que resultava num excesso de trifenilfosfina, o que dificultava bastante a purificação do composto pretendido.

5.3.1.1. Síntese do brometo de 6-(3,4-dimetoxibenzamido)hexiltrifenilfosfónio (9)

A - Síntese clássica: O composto 7 (1,86 g; 5,4 mmol) foi adicionado à PPh₃ (1,42 g; 5,4 mmol), tendo-se obtido um sal de trifenilfosfónio de coloração amarelada.

Rendimento: 65 %

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ = 1,40 – 1,72 (8H, *m*, NCH₂(CH₂)₄), 3,33 – 3,37 (2H, *m*, CH₂P⁺Ph₃), 3,42 – 3,49 (2H, *m*, NCH₂), 3,83 (6H, *s*, 2 × OCH₃), 6,98 (1H, *d*, J = 8,5 Hz, H(5)), 7,46 (1H, *d*, J = 2,1 Hz, H(2)), 7,49 (1H, *dd*, J = 2,1 Hz, J = 8,4 Hz, H(6)), 7,73 – 7,89 (15H, *m*, PPh₃).

¹³C RMN (100 MHz, CD₃OD): δ = 22,7 (*d*, J_{CP} = 50,7 Hz, CH₂P⁺Ph₃), 23,5 (CH₂CH₂P⁺Ph₃), 27,2 (CH₂(CH₂)₂P⁺Ph₃), 30,3 (N(CH₂)₂CH₂), 31,2 (NCH₂CH₂), 40,8 (NCH₂), 56,7 (2 × OCH₃), 112,0 (C(5)), 112,2 (C(2)), 120,0 (*d*, J_{CP} = 85,7 Hz, C(1')), 122,0 (C(6)), 128,1 (C(1)), 131,6 (*d*, J_{CP} = 12,5 Hz, C(3')), 134,9 (*d*, J_{CP} = 9,9 Hz, C(2')), 136,3 (*d*, J_{CP} = 3,0 Hz, C(4')), 150,2 (C(3)), 153,4 (C(4)), 169,5 (CONH).

EM-IE *m/z* (%): 511 (M⁺), 305 (17), 278 (17), 277 (37), 263 (40), 262 (100), 261 (24), 199 (15), 185 (27), 184 (29), 183 (87), 181 (15), 165 (47), 152 (25), 151 (35), 137 (19), 108 (44), 107 (29), 96 (18), 94 (20), 77 (26), 52 (26).

5.3.1.2. Síntese do brometo de 6-(3,4,5-trimetoxibenzamido)hexiltrifenilfosfónio (10)

A - Síntese clássica: O composto 8 (2,44 g; 6,5 mmol) foi adicionado à PPh₃ (1,71 g; 6,5 mmol), tendo-se obtido um sal de trifenilfosfónio de coloração amarelada.

Rendimento: 79 %

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ = 1,41 – 1,73 (8H, *m*, NCH₂(CH₂)₄), 3,37 – 3,40 (2H, *m*, CH₂P⁺Ph₃), 3,50 – 3,56 (2H, *m*, NCH₂), 3,94 (3H, *s*, OCH₃), 3,95 (9H, *s*, 2 × OCH₃), 7,28 (2H, *s*, H(2) e H(6)), 7,75 – 7,90 (15H, *m*, PPh₃).

^{13}C RMN (100 MHz, CD_3OD): $\delta = 22,4$ (*d*, $J_{\text{CP}} = 50,7$ Hz, $\text{C}\text{H}_2\text{P}^+\text{Ph}_3$), $23,3$ ($\text{C}\text{H}_2\text{CH}_2\text{P}^+\text{Ph}_3$), $27,1$ ($\text{C}\text{H}_2(\text{CH}_2)_2\text{P}^+\text{Ph}_3$), $30,0$ ($\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{C}\text{H}_2$), $30,9$ ($\text{NCH}_2\text{C}\text{H}_2$), $40,6$ (NCH_2), $57,0$ ($2\times \text{OCH}_3$), $61,1$ (OCH_3), $106,0$ ($\text{C}(2)$ e $\text{C}(6)$), $119,7$ (*d*, $J_{\text{CP}} = 85,6$ Hz, $\text{C}(1')$), $130,7$ ($\text{C}(1)$), $131,4$ (*d*, $J_{\text{CP}} = 12,4$ Hz, $\text{C}(3')$), $134,6$ (*d*, $J_{\text{CP}} = 9,9$ Hz, $\text{C}(2')$), $136,0$ (*d*, $J_{\text{CP}} = 2,9$ Hz, $\text{C}(4')$), $141,6$ ($\text{C}(4)$), $154,1$ ($\text{C}(3)$ e $\text{C}(5)$), $168,7$ (CONH).

EM-IE m/z (%): 448 (M^{+}), 446 (41), 289 (23), 278 (35), 277 (81), 276 (27), 275 (58), 263 (29), 262 (100), 261 (19), 199 (16), 185 (31), 184 (25), 183 (94), 152 (21), 108 (36), 107 (20), 96 (53), 94 (54), 77 (24), 58 (41), 57 (20), 55 (20), 51 (18).

5.4. Síntese dos antioxidantes mitocondriotrópicos (v)

Procedimento geral: Dissolveu-se 1 eq. do composto 9 ou 10 em 15 mL de diclorometano anidro e colocou-se em atmosfera inerte (árgon), mantendo-se a mistura reacional num banho de acetona. Diminuiu-se a temperatura da mistura reacional até -70 °C com azoto líquido, e juntando-se 2 eq. ou 3 eq. de tribrometo de boro 1 M, respetivamente. Após ser atingida a temperatura ambiente, a reação foi mantida durante 12 horas. Posteriormente, adicionou-se 20 mL de metanol e deixou-se em agitação durante 2 horas. Evaporou-se o solvente até à secura. A reação foi acompanhada por CCF (gele de sílica, com a fase móvel diclorometano:metanol (9:1)).

5.4.1. Síntese do brometo de 6-(3,4-dihidroxibenzamido)hexiltrifenilfosfónio (11)

O sal de trifenilfosfónio 9 (1,0 g; 1,6 mmol) foi dissolvido em 15 mL de DCM anidro, adicionando-se seguidamente BBr_3 (3,3 mL; 3,3 mmol). Obteve-se um óleo de coloração alaranjada.

^1H RMN (400 MHz, DMSO): $\delta = 1,18 - 1,35$ (4H, *m*, H(alq)), $1,41 - 1,49$ (4H, *m*, H(alq)), $3,53 - 3,64$ (4H, *m*, H(alq)), $6,74$ (1H, *d*, $J = 8,2$ Hz, H(AR)), $7,17$ (1H, *d*, $J = 7,8$ Hz, H(AR)), $7,73 - 7,83$ (15H, *m*, PPh_3), $8,09$ (1H, *s*, H(AR)).

^{13}C RMN (100 MHz, DMSO): em aquisição.

EM-IE m/z (%): em aquisição.

5.4.2. Síntese do brometo de 6-(3,4,5-tri-hidroxibenzamido)hexiltrifenilfosfónio (12)

O sal de trifenilfosfónio 10 (900 mg; 1,4 mmol) foi dissolvido em 15 mL de DCM anidro, adicionando-se seguidamente BBr_3 (4,2 mL; 4,2 mmol). Obteve-se um óleo de coloração alaranjada.

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO): $\delta = 1,26 - 1,36$ (2H, *m*, H(alq)), 1,38 – 1,59 (6H, *m*, H(alq)), 3,54 – 3,63 (2H, *m*, H(alq)), 6,81 (1H, *s*, H(AR)), 6,99 (1H, *s*, H(AR)), 7,75 – 7,86 (15H, *m*, PPh_3), 8,99 (1H, *m*, CONH).

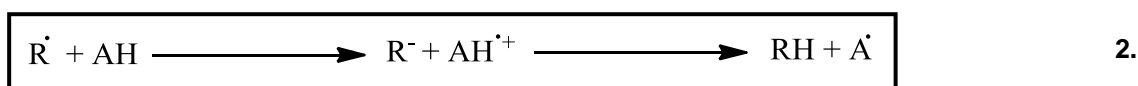
$^{13}\text{C RMN}$ (100 MHz, DMSO): em aquisição.

EM-IE *m/z* (%): em aquisição.

6. Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante é atualmente realizada através de ensaios de natureza diversa os quais se podem realizar em diferentes matrizes. Uma série de ensaios foram introduzidos para a medição da atividade antioxidante total de fluidos corporais, extratos de alimentos, e compostos puros. Em cada método com a geração de um radical diferente, agindo através de uma variedade de mecanismos, a medição é feita, num ponto de tempo fixo ou ao longo de um intervalo [79].

Genericamente, a atividade antioxidante pode ser classificada segundo dois processos diferentes: por transferência de um átomo de hidrogénio (equação 1.) ou de um eletrão (equação 2.), do antioxidante (AH) para o radical livre (R^\bullet) [80].



Neste trabalho, a atividade antioxidante dos compostos sintetizados foi avaliada através da avaliação da capacidade antioxidante total baseados nos métodos espectralométricos de ABTS, DPPH e GO, sendo os respetivos radicais relativamente estáveis à temperatura ambiente. A vitamina E, um antioxidante lipossolúvel, e o Trolox, um análogo da vitamina E solúvel em água, foram usados como antioxidantes padrão [81, 82].

Geralmente, os resultados deste tipo de ensaios são expressos em percentagem de inibição, segundo a equação 3.:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(Abs_{\text{controlo}} - Abs_{\text{branco}}) - (Abs_{\text{amostra}} - Abs_{\text{branco}})}{Abs_{\text{controlo}} - Abs_{\text{branco}}} \times 100 = \left[1 - \frac{Abs_{\text{amostra}} - Abs_{\text{branco}}}{Abs_{\text{controlo}} - Abs_{\text{branco}}} \right] \times 100 \quad 3.$$

onde Abs_{controlo} é a absorvância da solução do radical ABTS^{•+}/DPPH[•]/GO em etanol, Abs_{amostra} é a absorvância dos potenciais compostos antioxidantes e Abs_{branco} é a absorvância do etanol.

Uma vez que as percentagens de inibição são representadas graficamente em função das concentrações dos antioxidantes sintetizados neste trabalho, pode ser obtido o valor dos respetivos IC₅₀, ou seja, a concentração mínima de cada amostra necessária para inibir 50 % do radical.

6.1. Método de ABTS

O método do ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) foi desenvolvido por Rice-Evans e Miller em 1994 [83] e modificado em 1999 [79]. Este é um método, amplamente usado, o qual consiste na obtenção de um cromóforo do radical ABTS^{•+} azul/esverdeado formado *in situ* através de uma reação de oxidação do ABTS pelo persulfato de potássio (K₂S₂O₈) (Figura III.1.) [84].

Por doação de um átomo de hidrogénio ou de um eletrão, provenientes do antioxidante (AH), será possível observar a diminuição da quantidade do radical ABTS^{•+}. Esta reação é acompanhada de descoloração da solução de ABTS (verde para incolor), e a percentagem de inibição de catião radical ABTS^{•+} é um fator que depende da atividade antioxidante dos compostos em estudo, das respetivas concentrações e da duração da reação (Figura III.1.). As medições da quantidade de radical em função do tempo foram realizadas a 734 nm [79, 82, 85, 86].

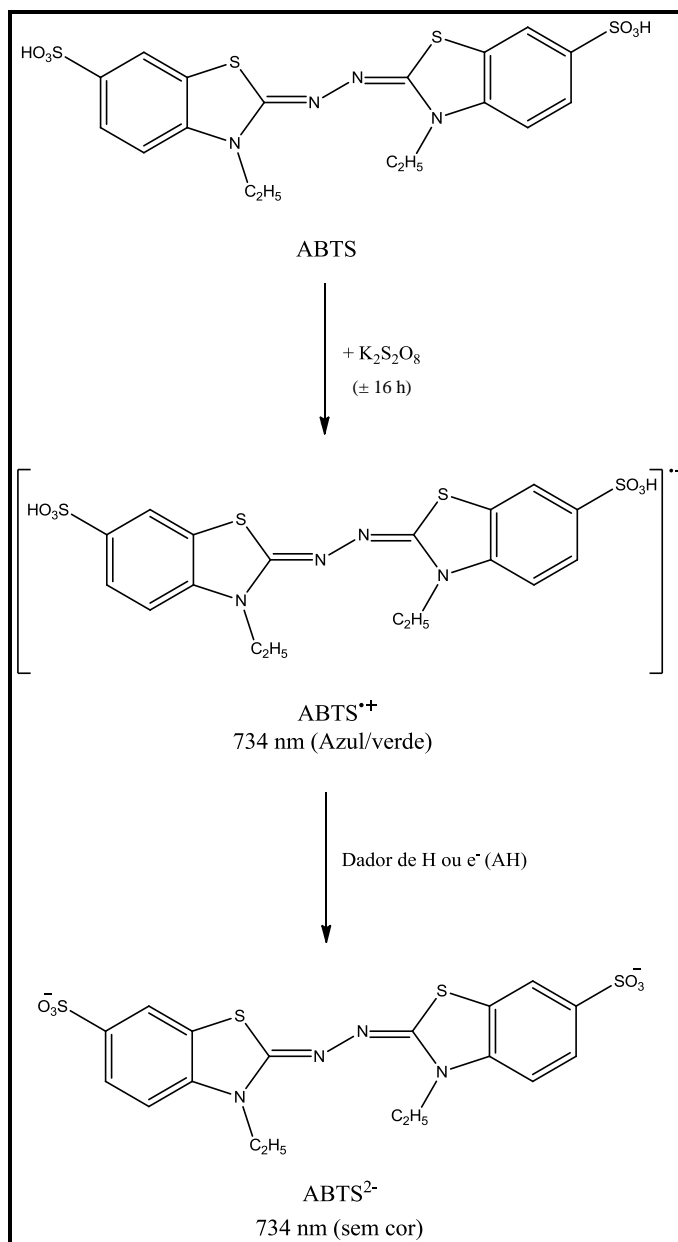


Figura III. 1. Reação proposta para a formação do radical $ABTS^{\bullet+}$ e posterior reação deste radical com um composto antioxidante (AH) [57].

6.1.1. Condições experimentais

Inicialmente, foi preparada uma solução aquosa de ABTS com concentração de 7 mM em 10 mL e de persulfato de potássio com concentração de 150 mM. A solução de $ABTS^{\bullet+}$ foi preparada através da reação da solução aquosa de ABTS, 7 mM, pela adição de 163 μL da solução aquosa de persulfato de potássio. Em seguida, a solução de $ABTS^{\bullet+}$ foi armazenada ao abrigo da luz durante um período mínimo de 16 horas. Antes da utilização desta solução nos ensaios de avaliação da atividade antioxidante procedeu-se à sua agitação por ultras-sons durante 10 minutos a 50 °C. De seguida, a solução de $ABTS^{\bullet+}$ foi diluída em etanol, de

modo a que o volume de 180 μL de solução apresentasse uma absorvância aproximada de 0,72 a 734 nm e à temperatura de 37 °C.

Soluções etanólicas dos compostos 11 e 12, e respetivos precursores (ácidos protocatecuico 1 e gálico 2) foram preparadas (5 mM, 5 mL), procedendo-se, de seguida, à sua diluição (1 mM, 1 mL).

A partir da solução de 1 mM, prepararam-se cinco soluções etanólicas de cada antioxidante, tendo-se retirado alíquotas entre 50 a 500 μL completando-se o volume de 1000 μL com etanol, de forma a serem obtidas as concentrações pretendidas (50 a 500 mM).

Em cada poço de uma microplaca adicionou-se 20 μL de cada solução etanólica dos compostos em estudo e 180 μL de solução de radical. Foi efetuado um ensaio de controlo (20 μL de etanol e 180 μL de solução de radical) sendo a absorvância obtida definida como 100 % de radical. Por fim, utilizou-se como branco 20 μL de etanol. Todas as determinações foram feitas em duplicado.

As absorvâncias foram medidas espectrofotometricamente num leitor de microplacas num comprimento de onda de 734 nm e à temperatura de 37 °C durante 15 minutos com intervalos de medição de 1 minuto.

Os resultados encontram-se expressos em valores de IC_{50} .

O procedimento foi adaptado da literatura [79].

6.2. Método de DPPH

O método de radical livre de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) foi descrito pela primeira vez por Blois em 1958 [87] e mais tarde modificado [88]. DPPH é um radical livre estável que reage com compostos que podem doar um átomo de hidrogénio ou de um eletrão. Este método baseia-se na inibição do radical DPPH (que apresenta uma coloração púrpura intensa) através da adição de um antioxidante (AH) que provoca a mudança de cor na solução de DPPH (para amarelo claro), ou seja, ocorre a sua redução, ocorrendo a formação da forma não radicalar DPPH-H (Figura III.2.). Assim, as interações de um antioxidante com o radical DPPH mostram a capacidade do antioxidante em doar o(s) seu(s) átomo(s) de hidrogénio para o radical centrado no azoto da molécula de DPPH [82, 85, 86]. As medições da quantidade de radical em função do tempo foram realizadas a 515 nm.

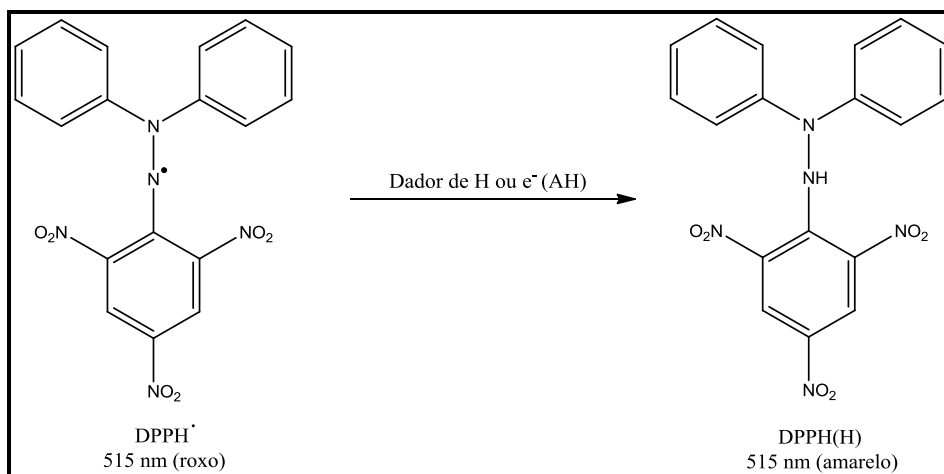


Figura III. 2. Reação proposta do radical DPPH[•] com um composto antioxidante (AH) [89].

6.2.1. Condições experimentais

Foi preparada uma solução etanólica de DPPH com concentração de (6,85 mM, 5 mL), com cor arroxeadada, e antes de ser utilizada procedeu-se à sua agitação por ultra-sons durante 10 minutos a 50 °C. De seguida, a solução foi diluída em etanol, e foram feitas medições espectrofotométricas, de modo a que o volume de 180 µL de solução apresentasse uma absorvância aproximada de ± 0,72 a 515 nm.

Foram preparadas soluções etanólicas dos compostos 11 e 12, e respetivos precursores (ácidos protocatecuico 1 e gálico 2) (5 mM, 5 mL), procedendo-se, de seguida, à sua diluição (1 mM, 1 mL).

A partir da solução de 1 mM, prepararam-se cinco soluções etanólicas de cada antioxidante, tendo-se retirado alíquotas entre 50 a 500 µL completando-se o volume de 1000 µL com etanol, de forma a serem obtidas as concentrações pretendidas (50 a 500 mM).

Em cada poço de uma microplaca adicionou-se 20 µL de cada solução etanólica dos compostos em estudo e 180 µL de solução de radical. Foi efetuado um ensaio de controlo (20 µL de etanol e 180 µL de solução de radical) sendo a absorvância obtida definida como 100 % de radical. Por fim, utilizou-se como branco 20 µL de etanol. Todas as determinações foram feitas em duplicado.

As absorvâncias foram medidas espectrofotometricamente num leitor de microplacas num comprimento de onda de 515 nm e à temperatura de 37 °C durante 45 minutos com intervalos de medição de 1 minuto.

Os resultados encontram-se expressos em valores de IC₅₀.

O procedimento foi adaptado da literatura [89].

6.3. Método de Galvinoxilo (GO)

O radical Galvinoxilo (2,6-di-*terc*-butil- α -(3,5-di-*terc*-butil-4-oxo-2,5-ciclo-hexadieno-1-ilideno)) é aplicado desde 1962 [90]. Este é um radical fenoxil estável na ausência de antioxidantes. Quando está na presença de antioxidantes (AH) a reação destes com o radical GO mostram a capacidade do antioxidante em doar o(s) seu(s) átomo(s) de hidrogénio para o radical centrado no oxigénio da molécula de galvinoxilo. Assim, este método baseia-se na medição da capacidade de eliminação do radical galvinoxilo por parte de antioxidantes (Figura III.3.) [81, 82, 85, 86, 91-93]. As medições da quantidade de radical em função do tempo são realizadas a 428 nm.

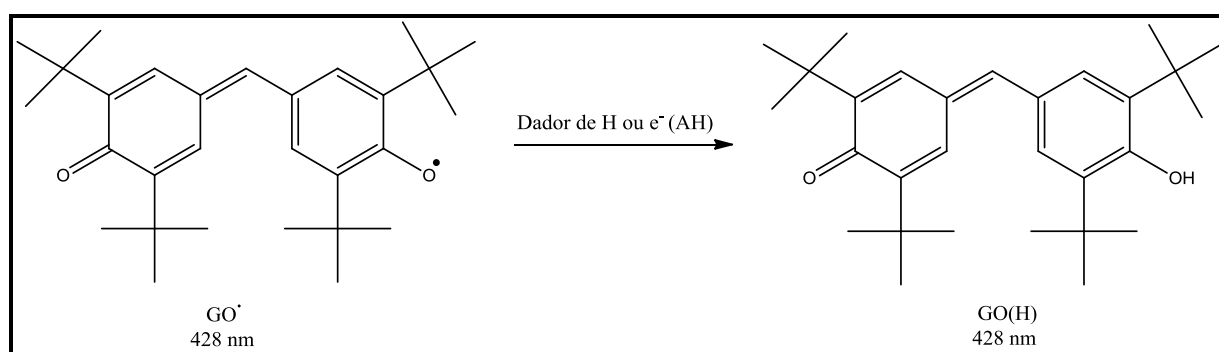


Figura III. 3. Reação proposta do radical GO^{\bullet} com um composto antioxidante (AH) [91].

6.3.1. Condições experimentais

Foi preparada uma solução etanólica de radical galvinoxilo com concentração de (5 mM, 5 mL). De seguida, a solução foi diluída em etanol, e foram feitas medições espectralfotometricamente, de modo a que o volume de 180 μ L de solução apresentasse uma absorvância aproximada de $\pm 1,00$ a 428 nm.

Foram preparadas soluções etanólicas (5 mM, 5 mL) dos compostos 11 e 12, e respetivos precursores (ácido protocatecuico e gálico) procedendo-se, de seguida, à sua diluição (1 mM, 1 mL).

Da mesma forma que descrito nos métodos anteriores, a partir da solução de 1 mM, prepararam-se cinco soluções etanólicas de cada antioxidante, tendo-se retirado alíquotas entre 50 a 500 μ L completando-se o volume de 1000 μ L com etanol, de forma a serem obtidas as concentrações pretendidas (50 a 500 mM).

Em cada poço de uma microplaca adicionou-se 20 μ L de cada solução etanólica dos compostos em estudo e 180 μ L de solução de radical. Foi efetuado um ensaio de controlo (20 μ L de etanol e 180 μ L de solução de radical) sendo a absorvância obtida definida como

100 % de radical. Por fim, utilizou-se como branco 20 μL de etanol. Todas as determinações foram feitas em duplicado.

As absorvâncias foram medidas espectrofotometricamente num leitor de microplacas num comprimento de onda de 428 nm e à temperatura de 37 °C durante 30 minutos com intervalos de medição de 1 minuto.

Os resultados encontram-se expressos em valores de IC_{50} .

7. Avaliação do potencial redox

As técnicas eletroquímicas são ferramentas importantes quer na área da química como da bioquímica. Sendo uma das técnicas potenciostáticas mais utilizadas a voltametria. A sua ampla aplicação é atribuída à instrumentação relativamente barata, sensibilidade, aos tempos rápidos de análise, e à possibilidade de determinação simultânea de vários analitos [94].

Os ensaios de voltametria são normalmente realizados em células eletroquímicas, cuja representação esquemática está indicada na Figura III.4.. Uma célula eletroquímica normalmente é composta por um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência e, geralmente, um eletrodo auxiliar. Na célula eletroquímica, aplica-se uma diferença de potencial, representada por E , e monitoriza-se a corrente resultante, I . Na presença de uma espécie eletroativa na célula eletroquímica, o potencial aplicado irá provocar uma alteração na concentração desta à superfície do eletrodo de trabalho, uma vez que irá ocorrer a sua oxidação ou redução, dependendo do tipo de eletrodo usado. A variação da concentração dessa espécie na superfície do eletrodo de trabalho irá originar o transporte de massa em direção ao eletrodo, sendo o fluxo da corrente no eletrodo diretamente proporcional à concentração do analito [94].

A dependência entre a medição de corrente e concentração do analito permite que as técnicas voltamétricas sejam aplicadas em ensaios de rotina para a determinação quantitativa de uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos [94].

Neste trabalho, a avaliação do potencial redox dos compostos antioxidantes 11 e 12 foi realizada por voltametria cíclica e por voltametria de pulso diferencial.

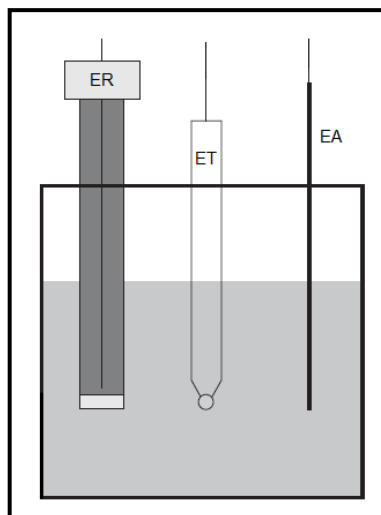


Figura III. 4. Representação esquemática de uma célula eletroquímica comum (ER - eletrodo de referência; ET - eletrodo de trabalho; EA - eletrodo auxiliar) [94].

7.1. Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é uma técnica eletroquímica, nomeadamente usada para fins qualitativos, mas também pode ser utilizada em análises quantitativas.

A técnica consiste em variar o potencial elétrico de forma linear entre dois limites: o potencial elétrico inicial, E_i , e o potencial elétrico final, E_f , de forma a estudar as reações de um sistema eletroquímico. Quando é atingido um potencial definido a rampa do potencial do eletrodo de trabalho é invertida, ou seja, quando alcançado o valor de E_f o sentido do varrimento de potencial é invertido e, sem haver alteração da velocidade de varrimento, o potencial volta ao valor inicial, E_i , (Figura III.5.(a)). Esta inversão pode ocorrer várias vezes durante uma única experiência. Mas variando a velocidade de varrimento, pode-se estudar também a cinética das reações e/ou o processo de transferência de massa [95].

Um voltamograma cíclico é caracterizado pela representação gráfica da corrente do eletrodo de trabalho em função do potencial aplicado (Figura III.5.(b)) [95].

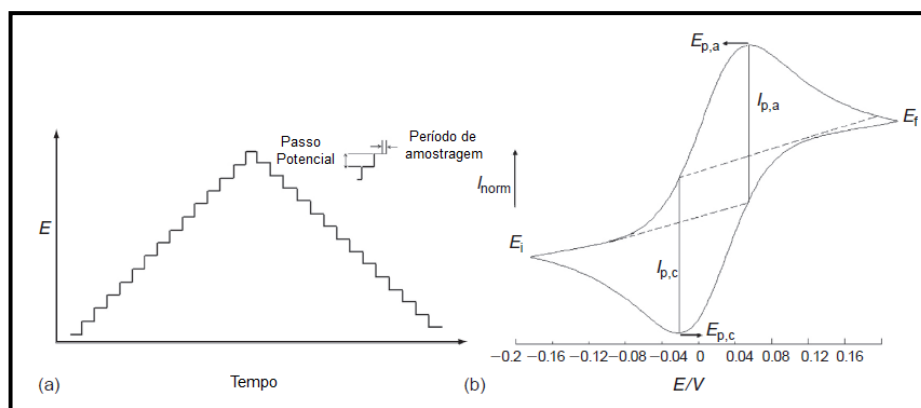


Figura III. 5. (a) Rampa de potencial utilizada em voltametria cíclica e (b) voltamograma cíclico simulado para uma transferência de carga de elétrons reversível: $E_{p,c}$ - potencial de pico catódico; $E_{p,a}$ - potencial de pico anódico; E_i - potencial inicial; E_f - potencial final; $I_{p,c}$ - corrente de pico catódica; $I_{p,a}$ - corrente de pico anódica [94].

7.2. Voltametria de pulso diferencial

A voltametria de pulso diferencial está inserida no grupo de técnicas voltamétricas de pulso. Os parâmetros mais importantes das técnicas voltamétricas de pulso são: (1) a amplitude de pulso, que é a altura do pulso de potencial, (2) a largura de impulso, que é a duração do impulso de potencial, e (3) o período de amostragem, o qual é definido como um tempo no final do impulso de potencial na qual a corrente é medida [94].

A aquisição de potencial na voltametria de pulso diferencial consiste em pequenos impulsos de amplitude constante (10–100 mV) sobrepostos em forma de onda em escada (Figura III.6.(a)). Nesta técnica, a corrente é medida duas vezes em cada período de impulso: primeiro, no início do impulso aplicado e, em segundo, no fim do mesmo pulso (Figura III.6.(a)). A corrente medida na saída instrumental, referido como voltamograma de pulso diferencial (Figura III.6.(b)), é na realidade a diferença entre as correntes medidas para cada impulso [94].

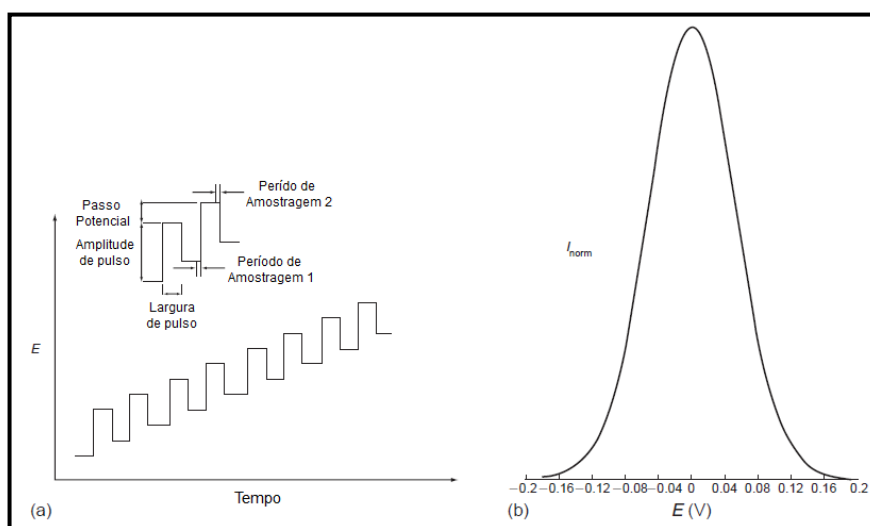


Figura III. 6. (a) Forma de potencial e (b) voltamograma de simulação resultante em voltametria diferencial de pulso [94].

7.2.1. Condições experimentais

Os estudos voltamétricos foram realizados numa célula eletroquímica em compartimento de vidro e as curvas voltamétricas foram registadas à temperatura ambiente utilizando um sistema de três elétrodos (elétrodo de referência – Ag/AgCl, elétrodo auxiliar – fio de platina e elétrodo de trabalho – carbono vítreo).

Soluções etanólicas dos ácidos protocatecuico e gálico, e dos compostos finais 11 e 12 com concentração de 10 mM em 5 mL foram preparadas. Em, seguida, para as medições voltamétricas, as soluções foram diluídas na célula eletroquímica, de modo a obter uma

concentração final de 0,1 mM numa solução tampão com pH 7,4. Esta solução tampão de pH 7,4 utilizada nos estudos voltamétricos foi preparada por diluição de 6,2 mL de 0,2 M de hidrogenofosfato dipotássico e 43,8 mL de 0,2 M de dihidrogenofosfato de potássio perfazendo um volume final de 100 mL.

Entre cada análise foi efetuado um branco utilizando 10 mL de solução tampão. Todas as determinações foram realizadas em duplicado.

Os voltamogramas obtidos por voltametria de impulso diferencial e por voltametria cíclica foram adquiridos no intervalo de potencial [-0,25; 1,25] V e com a velocidade de varrimento de $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ e de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, respetivamente.

O procedimento experimental efetuado foi adaptado da literatura [53].

IV - DISCUSSÃO DE RESULTADOS

1. Síntese de antioxidantes mitocondriotrópicos

Os compostos 11 e 12 foram obtidos através de uma estratégia sintética de quatro passos reacionais (Figuras II.8. e II.9., respetivamente), usando como material de partida os ácidos 3,4-dimetoxibenzoico e 3,4,5-trimetoxibenzoico, respetivamente (Figura IV.1.). O primeiro passo consistiu numa reação de amidação dos ácidos referidos com o espaçador 6-aminohexan-1-ol, sendo utilizado o etilcloroformato como reagente de acoplamento para a formação da ligação peptídica.

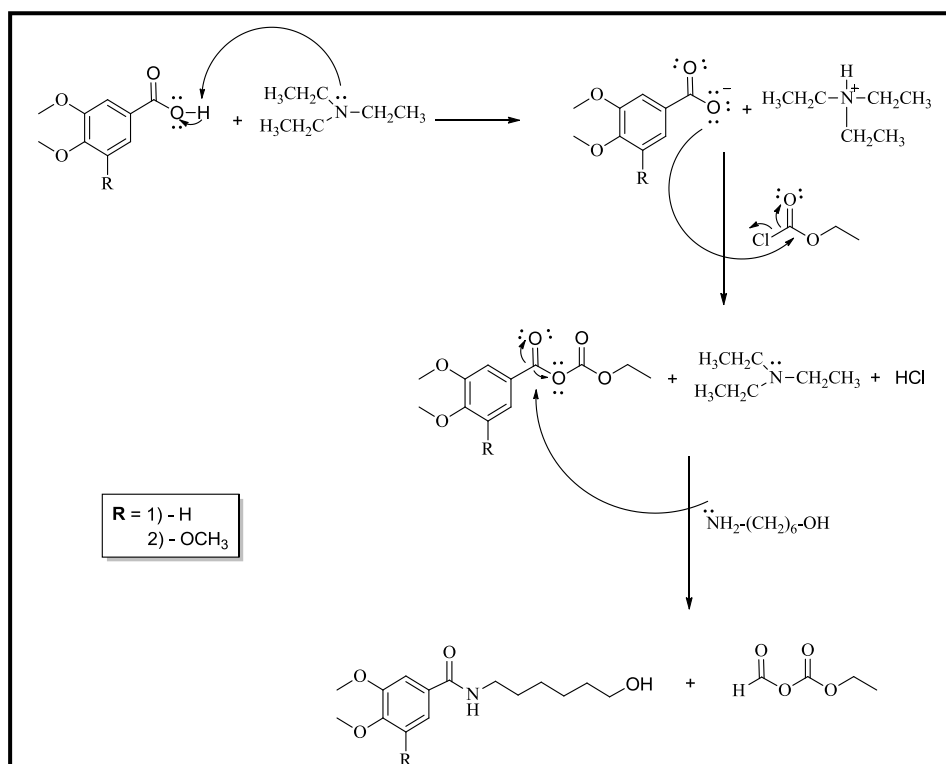
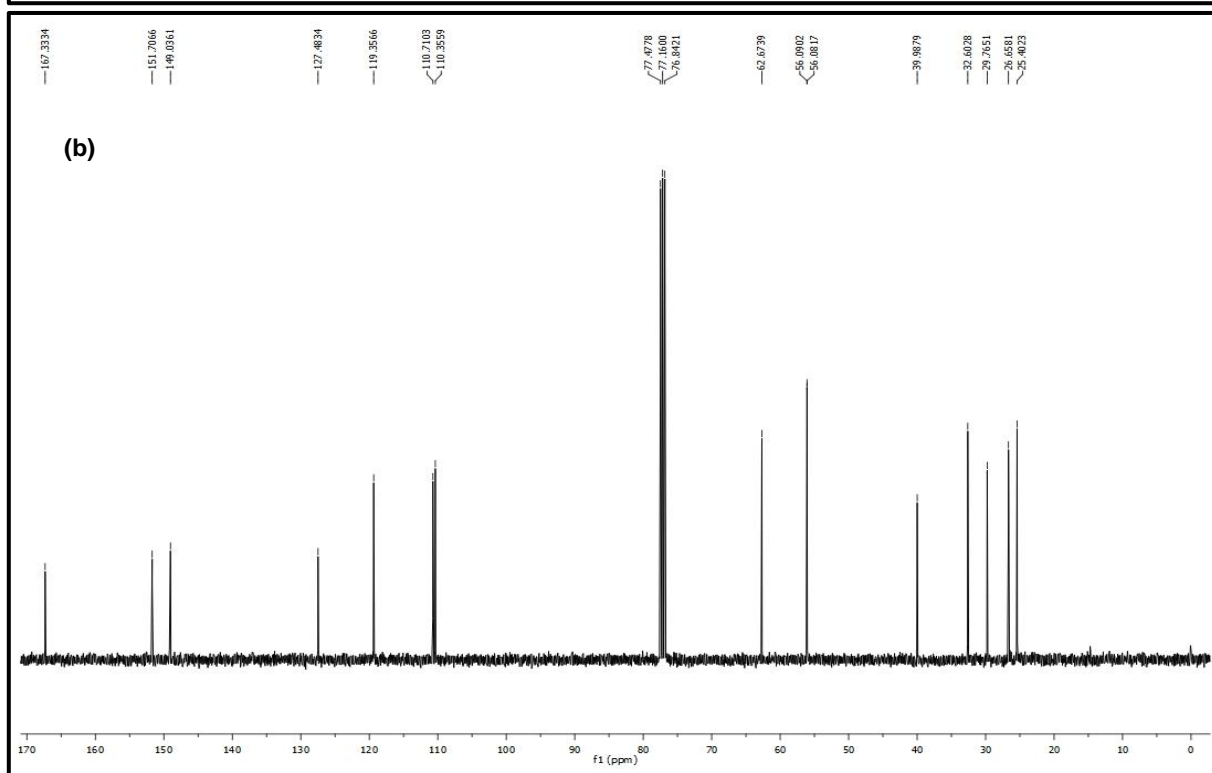
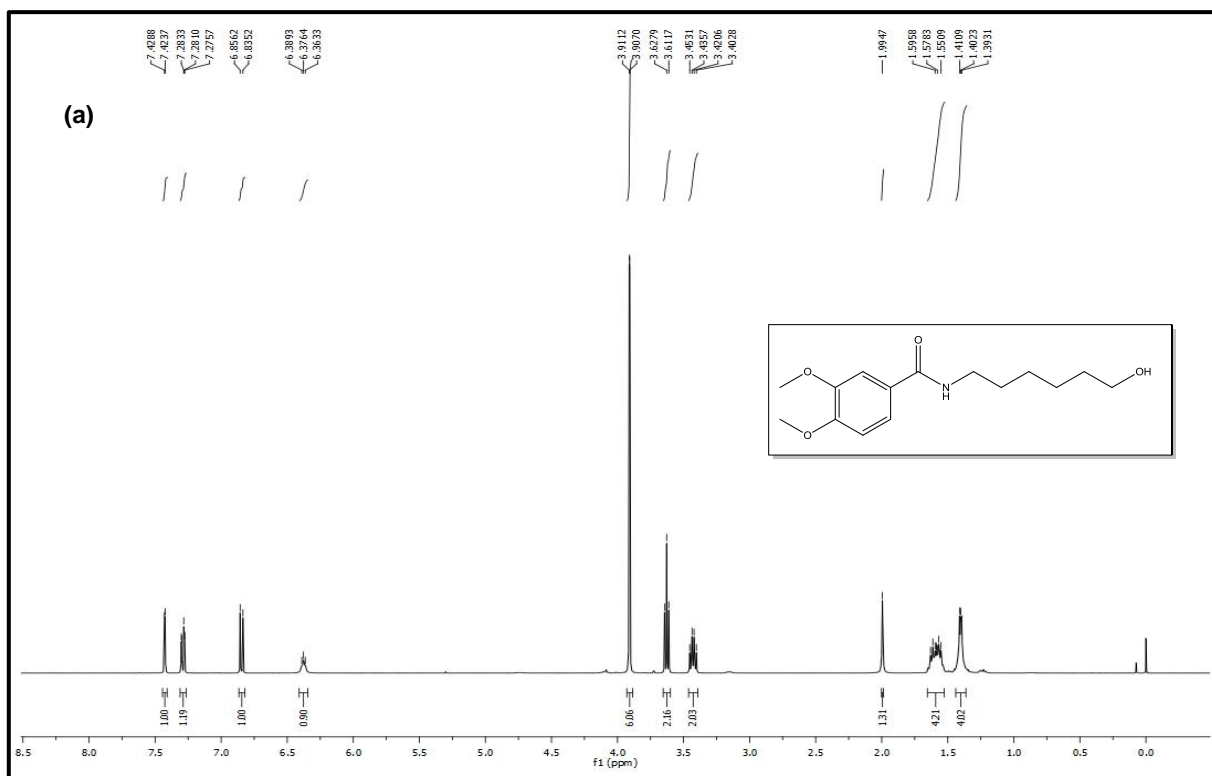


Figura IV. 1. Mecanismo de formação das amidas de ácidos benzoicos.

Os compostos pretendidos foram obtidos, sendo a sua estrutura elucidada por RMN e por EM-IE (Figuras IV.2. e IV.3.). Os rendimentos das reações foram satisfatórios, sendo de 74 % e 82 %, respetivamente.



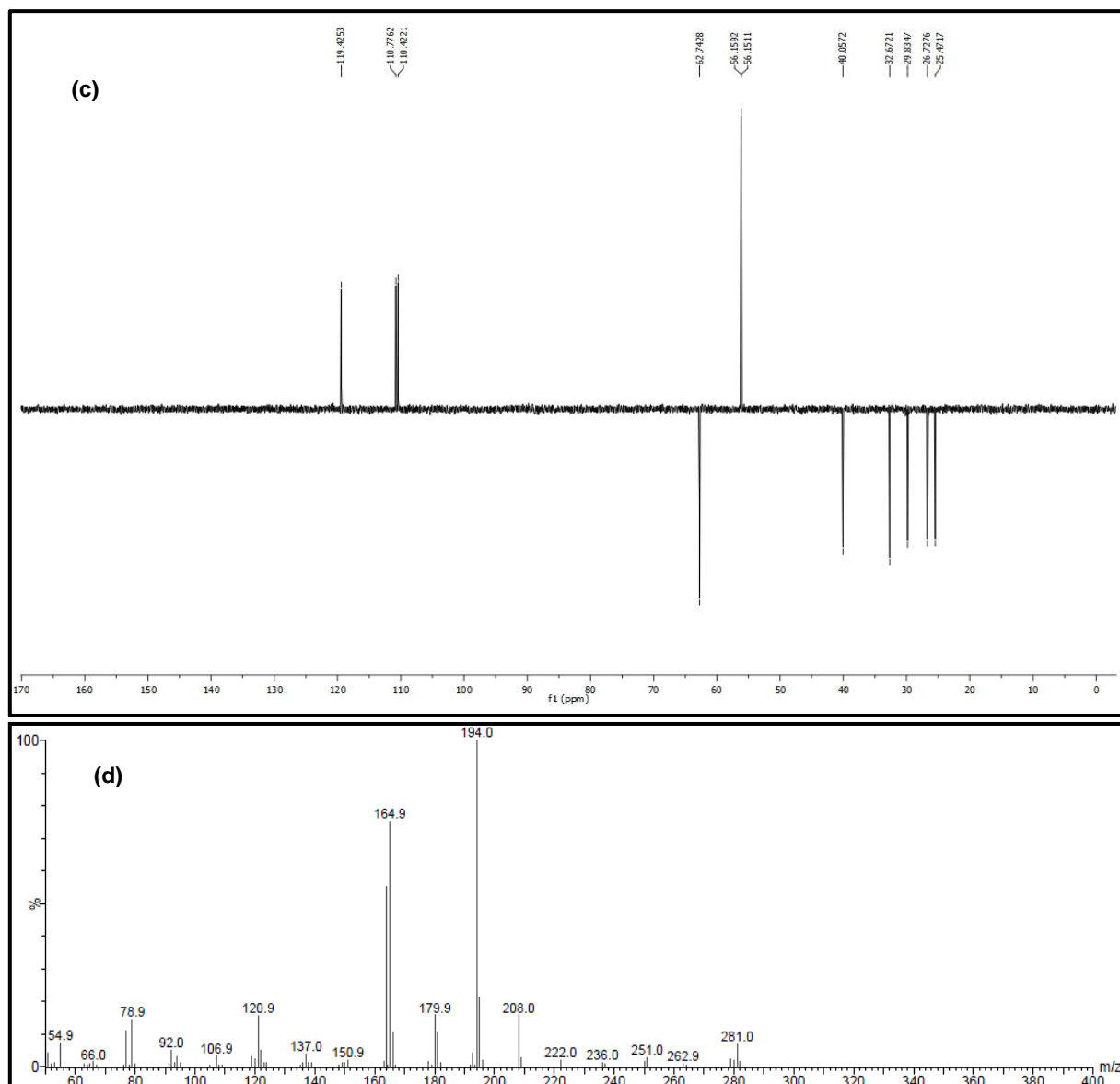
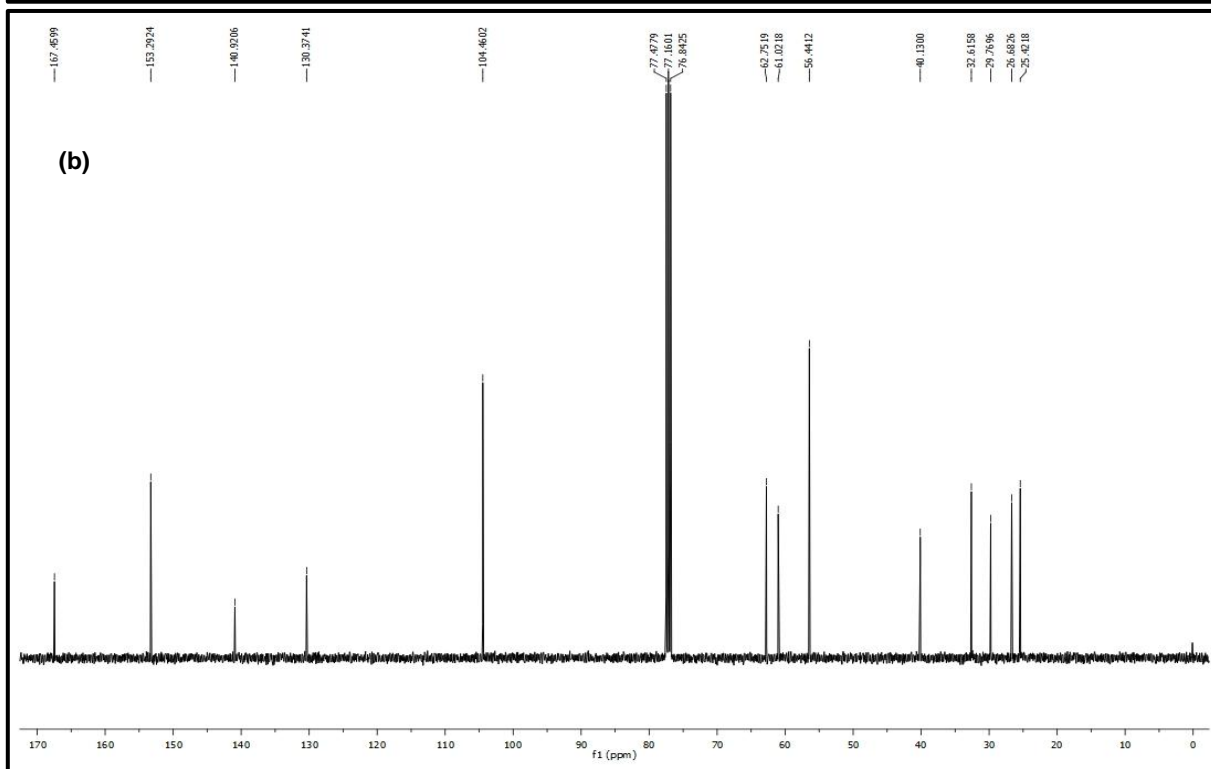
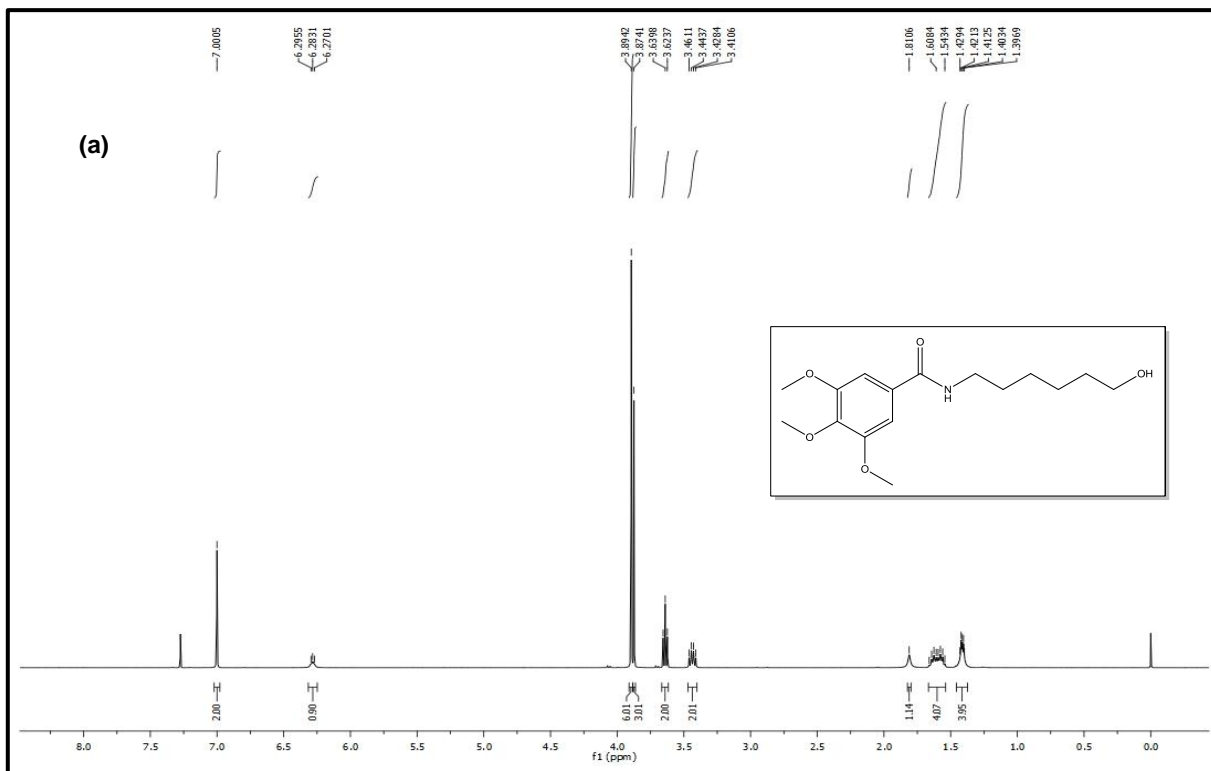


Figura IV. 2. Espectro de RMN de ^1H (a), RMN de ^{13}C (b) e DEPT (c), e EM-IE (d) do composto *N*-(6-hidroxi-hexil)-3,4-dimetoxibenzamida (3).



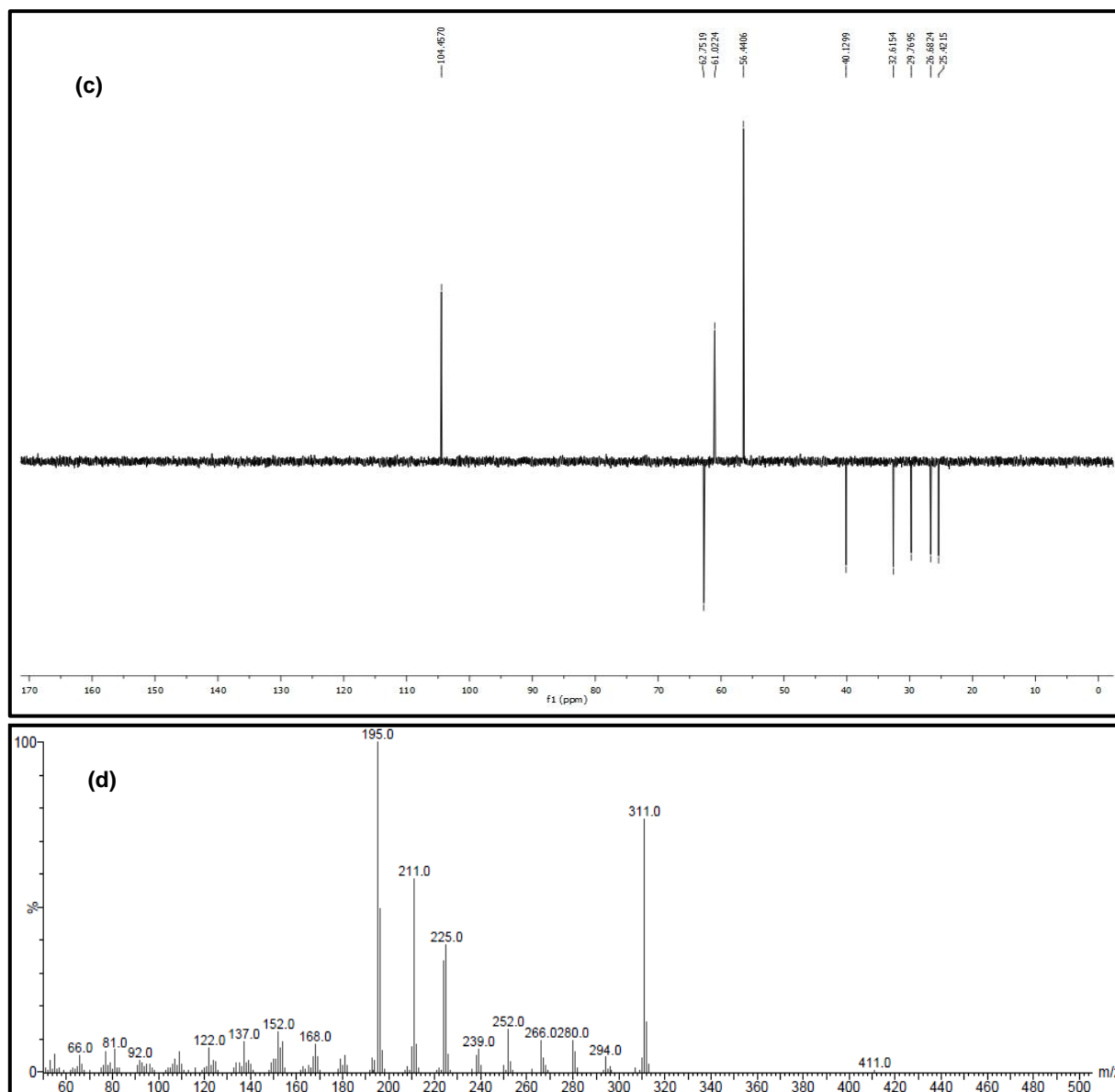


Figura IV. 3. Espectro de RMN de ^1H (a), RMN de ^{13}C (b) e DEPT (c), e EM-IE (d) do composto *N*-(6-hidroxi-hexil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (4).

O segundo passo reacional teve como finalidade transformar o grupo álcool num bom grupo de saída (Figuras II.8. e II.9.). Para atingir este objetivo foi inicialmente efetuada uma reação de mesilação com cloreto de mesilo, cuja proposta mecanística da reação está indicada na Figura IV.4..

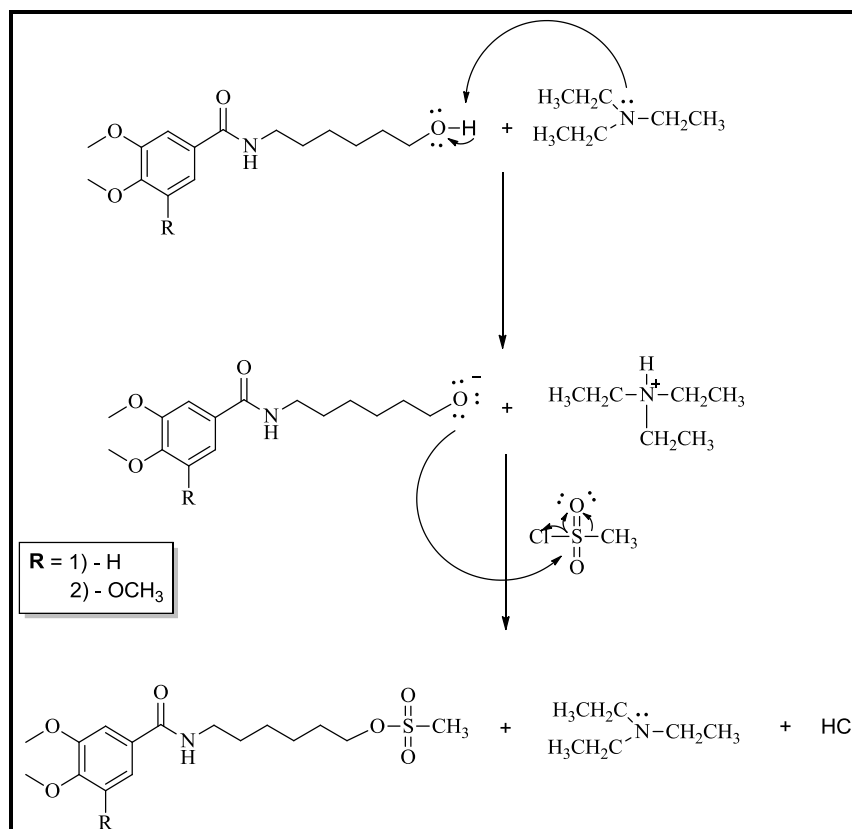


Figura IV. 4. Mecanismo proposto de formação dos metanossulfonatos.

No entanto verificou-se que o objetivo não foi atingido, uma vez que não foi possível isolar o composto sintetizado devido à quantidade de impurezas presentes no meio reacional. Por esta razão, procedeu-se à seleção de um processo alternativo o qual consistiu na transformação do grupo álcool num bom grupo de saída através de uma reação de halogenação. Através de pesquisa bibliográfica, verificou-se a existência de diversos processos de se proceder à reação de halogenação, pois a reação de conversão de álcoois em halogenetos é uma transformação muito estudada. Por isso, procedeu-se ao estudo da reação usando diversas vias: via PBr_3 com e sem o auxílio da reação por micro-ondas, via complexo TCT/DMF e via diphos. De salientar, que todos estes processos tinham um denominador comum: substituição do grupo OH por Br.

Pela reação via PBr_3 os compostos pretendidos foram obtidos, mas com baixos rendimentos (cerca de 20 – 30 %). Perante os resultados obtidos tentou-se incrementar o processo através de uma reação por micro-ondas tendo-se verificado que o aumento de rendimento não foi significativo. De acordo com a literatura, é referido que os álcoois primários reagem com tribrometo de fósforo para formar bromo-alcanos, pela transferência dos três átomos de bromo para os grupos alquilo [96] tendo sido a base para a proposta mecanística para a reação indicada na Figura IV. 5.

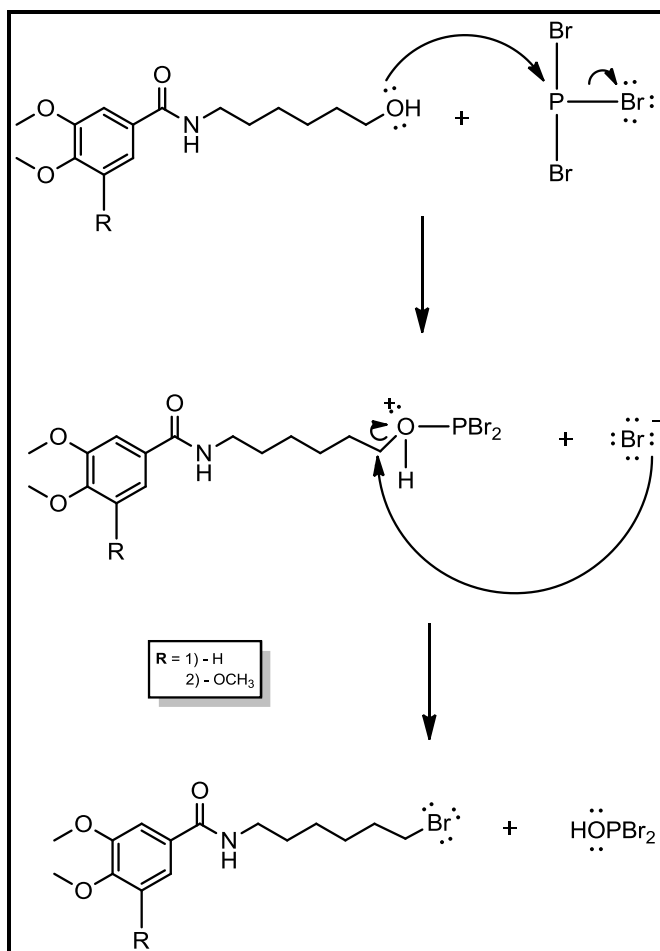


Figura IV. 5. Mecanismo proposto de formação dos compostos halogenados via PBr_3 .

No entanto, apesar de se ter efetuado várias tentativas verificou-se que o meio reacional continha sempre os compostos pretendidos, impurezas e ainda vestígios de produto inicial. Também foi possível verificar que durante o processo de purificação por cromatografia em coluna havia perdas do composto final, tendo como consequência uma diminuição do rendimento das reações.

A segunda via de halogenação selecionada para atingir o objetivo foi através do uso do complexo TCT/DMF [69-72]. A proposta mecanística está indicada na Figura IV. 6. Neste tipo de reação é formado um complexo do tipo Vilmeier-Haack que é resultado da junção de 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina (TCT) com dimetilformamida (DMF). A reação é do tipo $\text{S}_{\text{N}}2$ e ocorre pela adição do composto com o grupo álcool e de NaBr com o complexo originando a formação do composto pretendido com o bromo. No entanto, pela reação via complexo TCT/DMF, também não foi possível isolar os compostos pretendidos devido à quantidade de impurezas existentes no meio reacional.

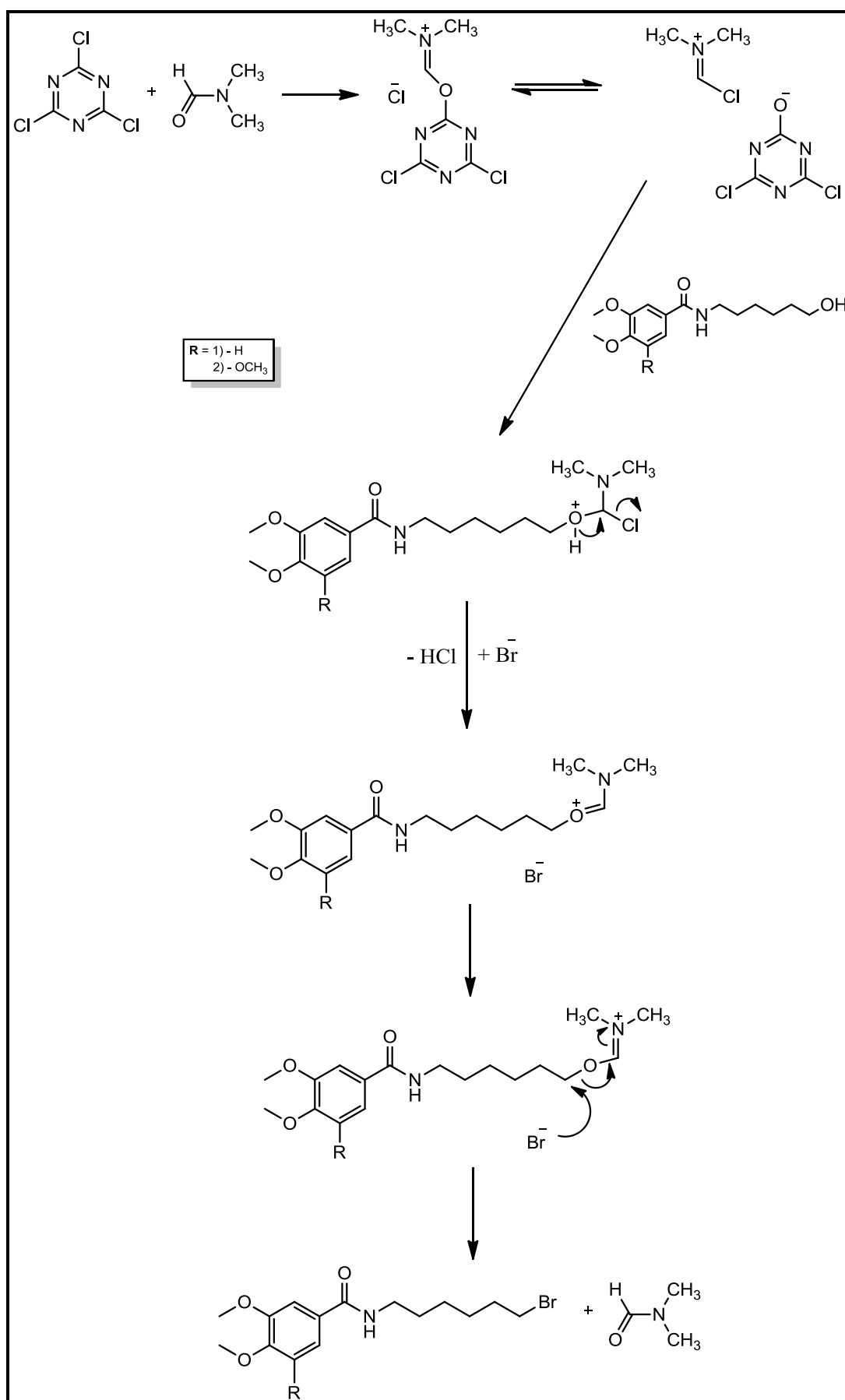


Figura IV. 6. Mecanismo de formação dos compostos halogenados via TCT/DMF.

Numa tentativa de obter derivados halogenados a partir dos álcoois primários referidos anteriormente foi efetuada a reação de Appel modificada. A reação de Appel é caracterizada pela reação entre a trifenilfosfina e um haloalcano (CBr_4 , CCl_4 , C_2Cl_6 , entre outros) sendo muito utilizada para a conversão de álcoois em halogenetos. No entanto, uma desvantagem da trifenilfosfina é a formação estequiométrica do óxido de fosfina como subproduto, o que, por vezes, torna difícil a purificação do produto final [73].

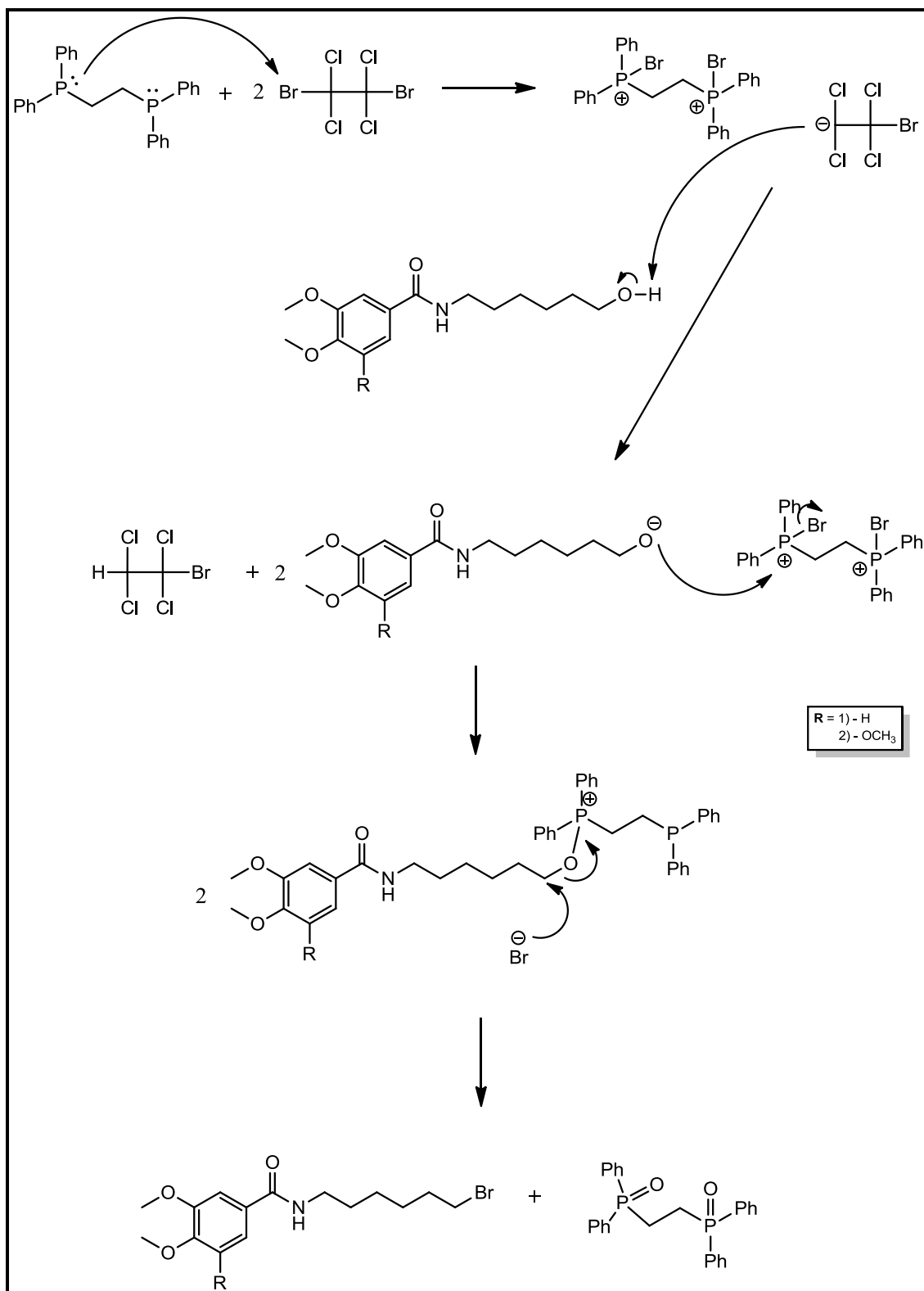


Figura IV. 7. Mecanismo de formação dos compostos halogenados via diphos.

Para contornar esta limitação foram desenvolvidos vários derivados da trifenilfosfina. O uso de 1,2-bis(difenilfosfina)etano (diphos) funciona como um substituto da trifenilfosfina em reações deste tipo e, desta forma, o óxido de fosfina resultante é facilmente removido por filtração. O mecanismo proposto para esta reação com os álcoois está indicada na Figura

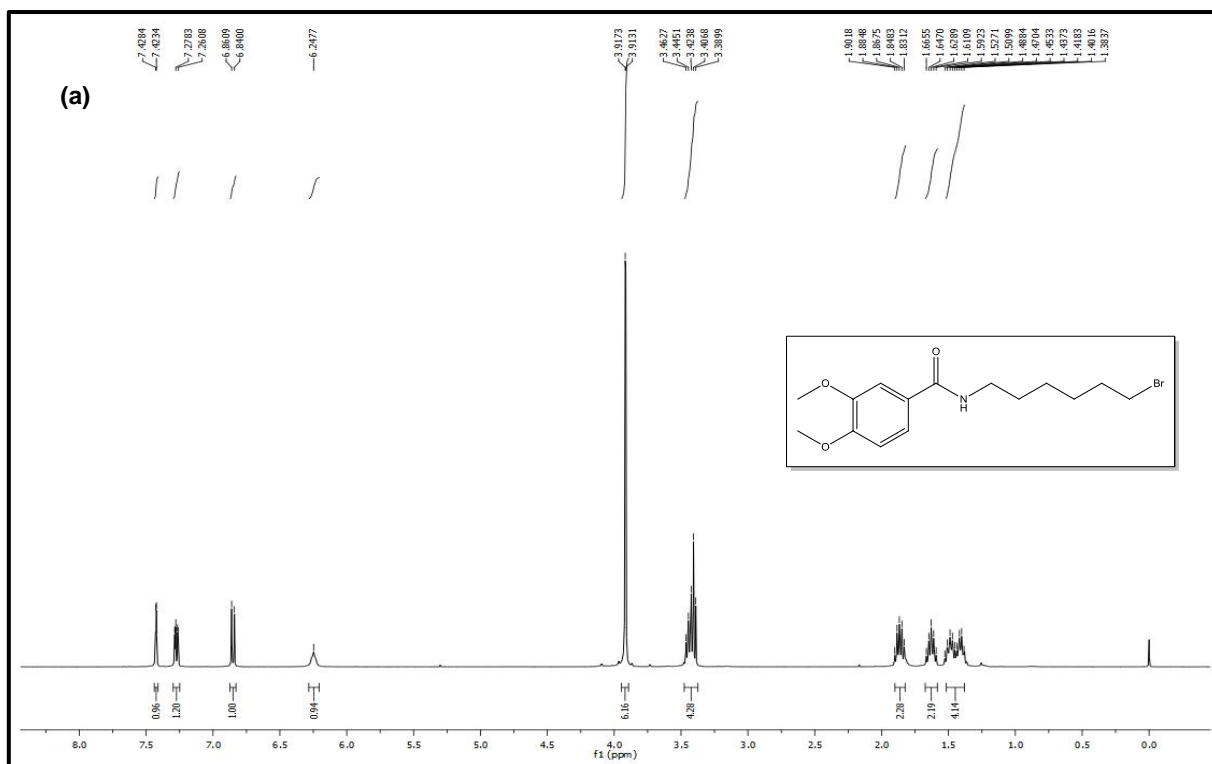
IV. 7.. Para além de se ter formado os compostos pretendidos verificou-se que o emprego deste reagente permitiu obter os compostos pretendidos em rendimentos da ordem dos 70 – 90 %.

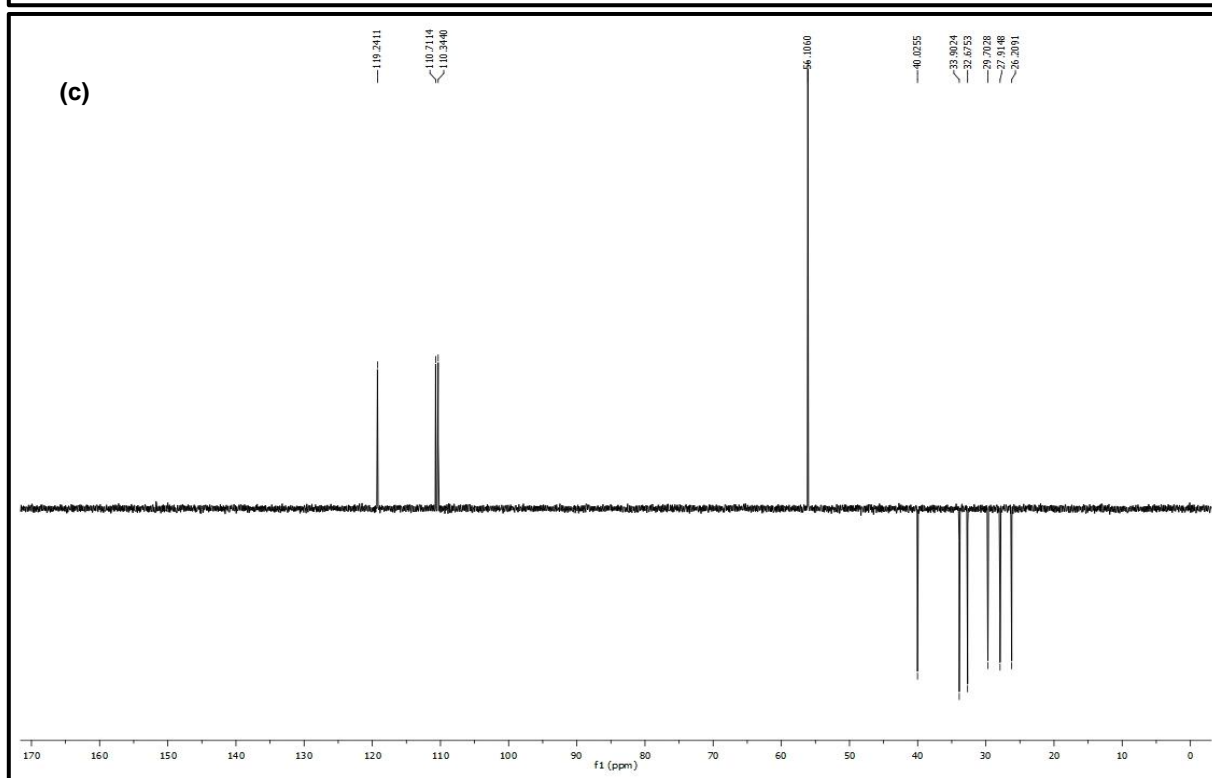
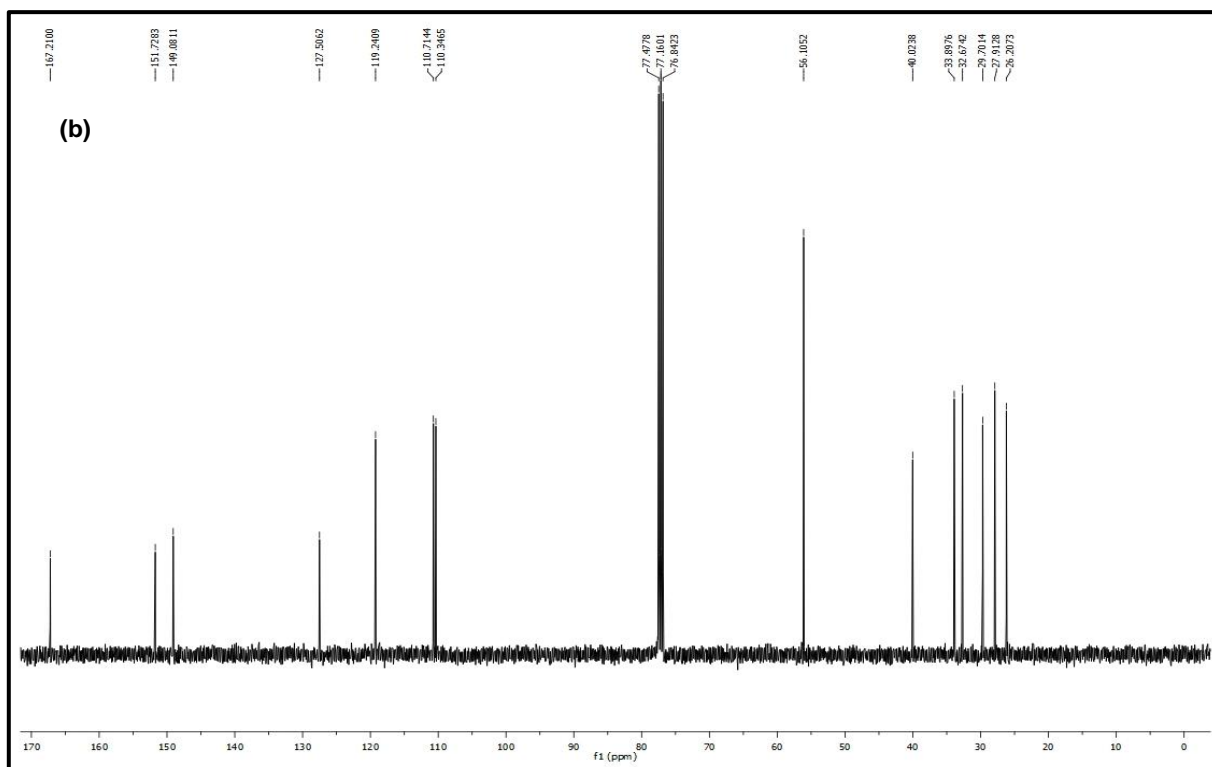
Na Tabela IV.1. encontram-se os rendimentos obtidos nas reações realizadas por diferentes vias relativamente à síntese dos compostos 7 e 8, respetivamente, onde se pode verificar o aumento significativo do rendimento da reação obtido através do uso do reagente diphos. Nas Figuras IV.8. e IV.9., encontram-se os espetros de RMN e EM-IE dos compostos obtidos.

Tabela IV. 1. Rendimentos obtidos nas diferentes vias de síntese realizadas para a obtenção dos compostos 7 e 8.

Síntese	Composto 7 (Rendimento)	Composto 8 (Rendimento)
Via PBr_3 (via clássica)	19 %	28 %
Via PBr_3 (via por micro-ondas)	n/e	33 %
Via TCT/DMF	n/e	–
Via diphos	66 %	87 %

* n/e – não efetuado





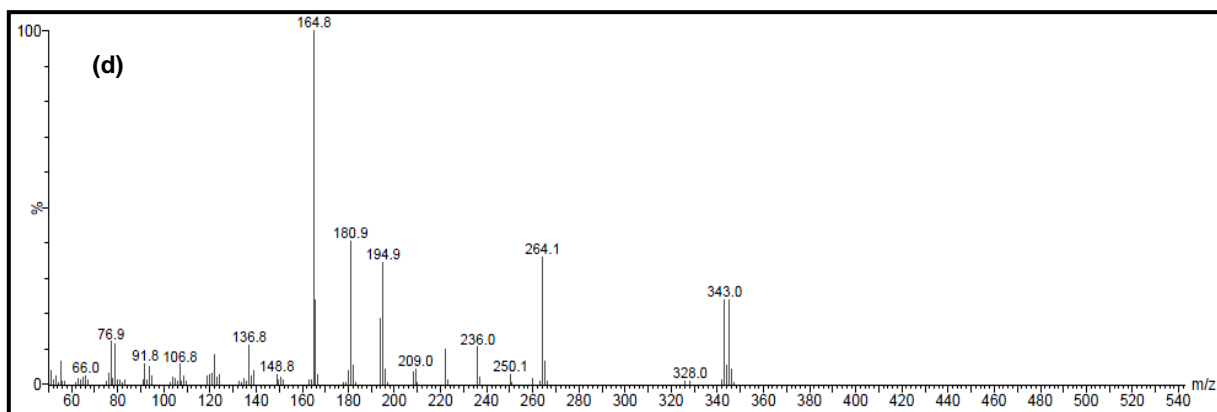
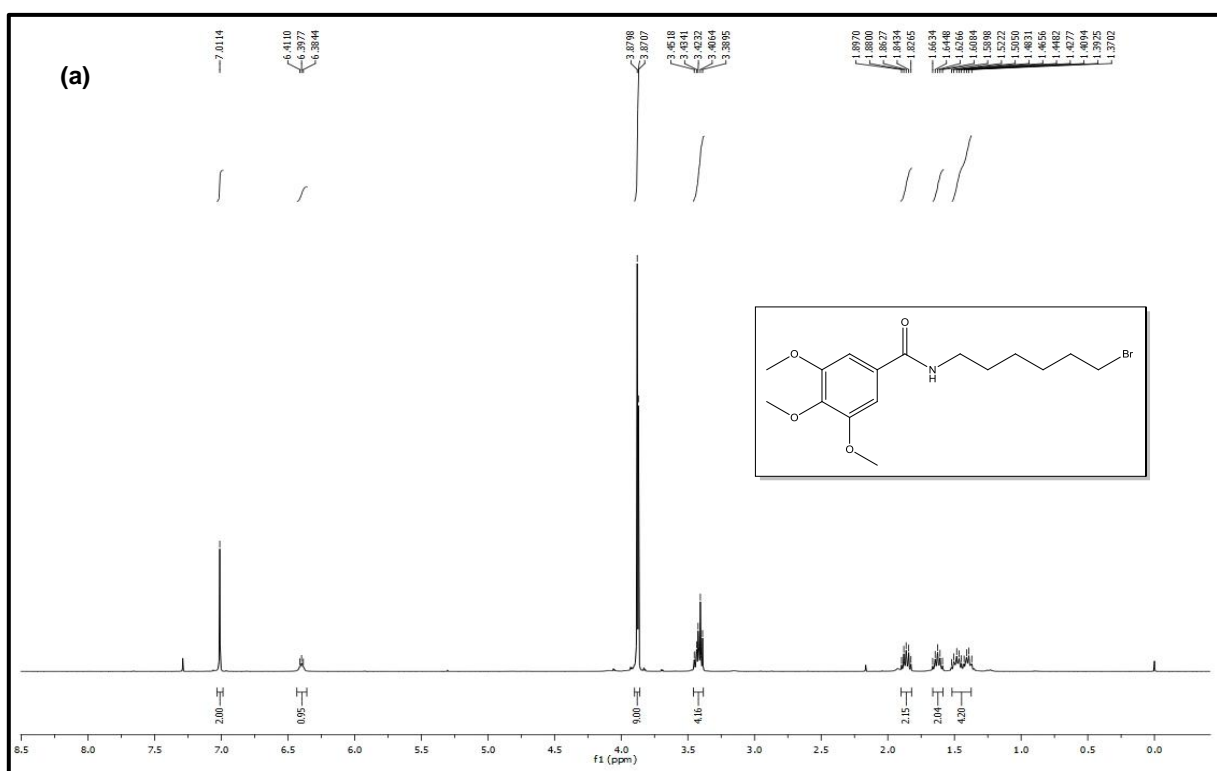
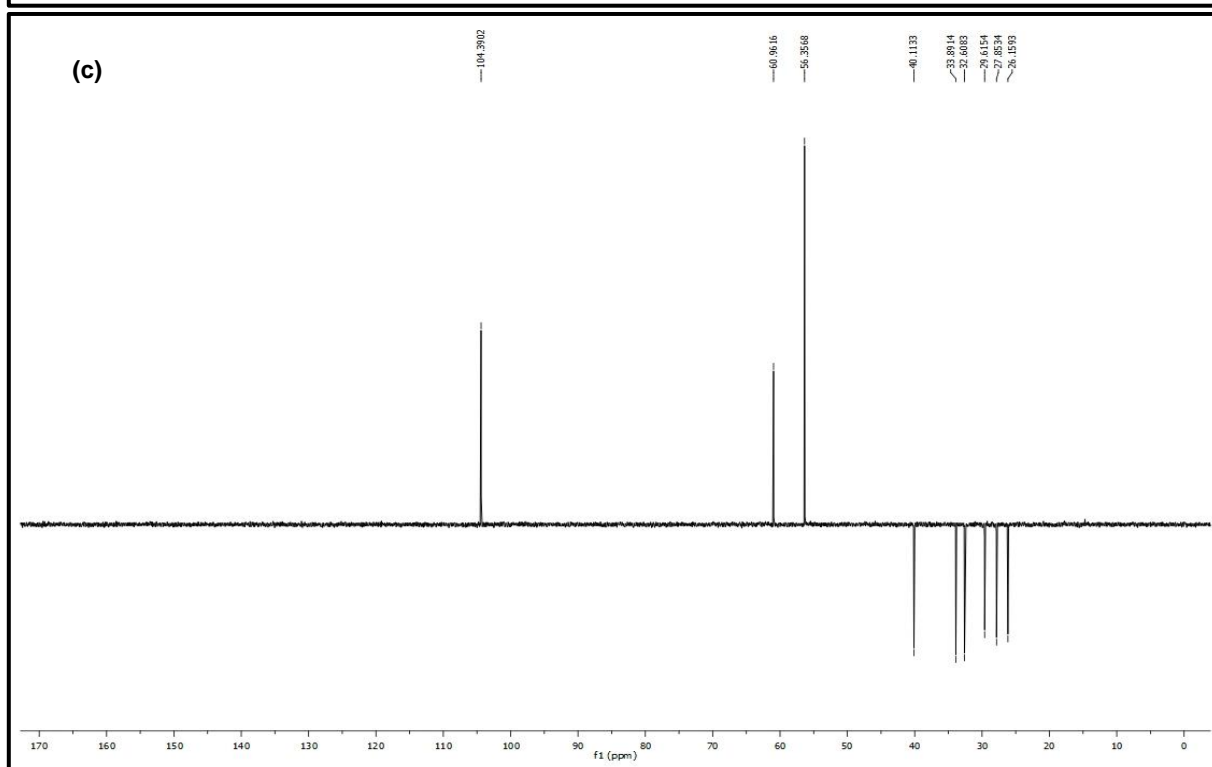
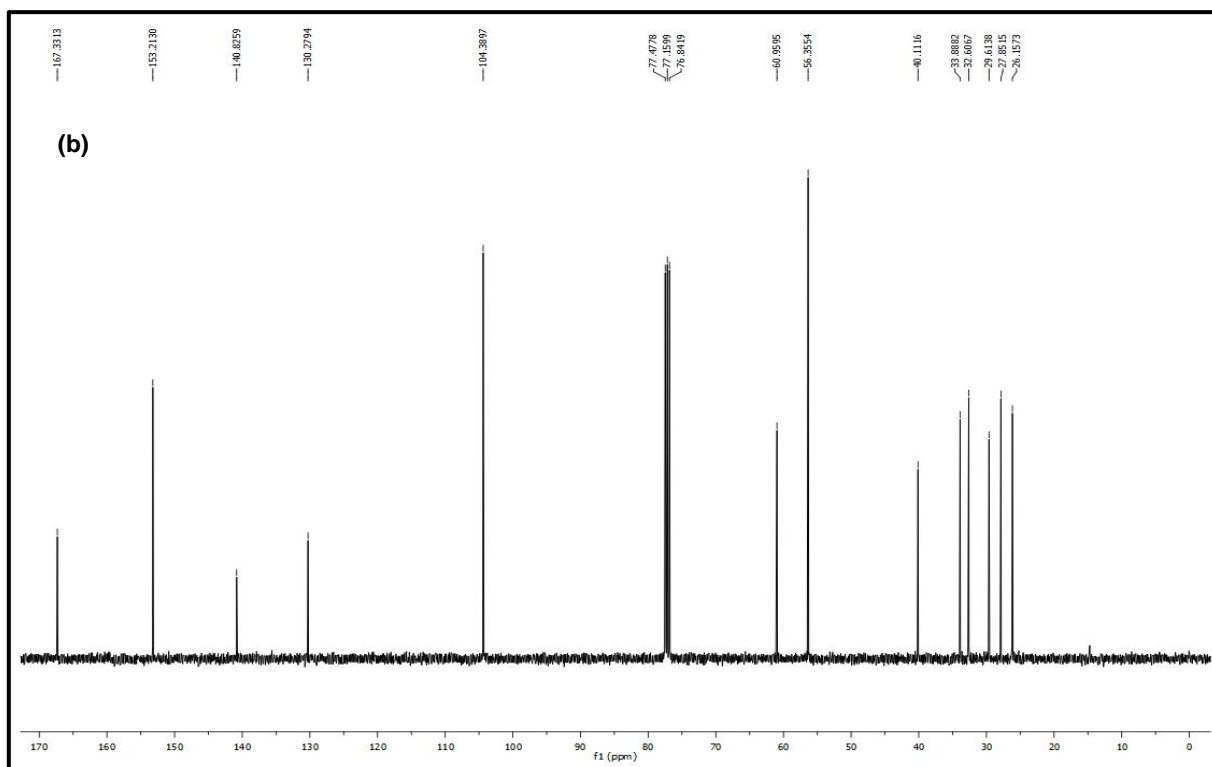


Figura IV. 8. Espectro de RMN de ^1H (a), RMN de ^{13}C (b) e DEPT (c), e EM-IE (d) do composto *N*-(6-bromo-hexil)-3,4-dimetoxibenzoamida (7).





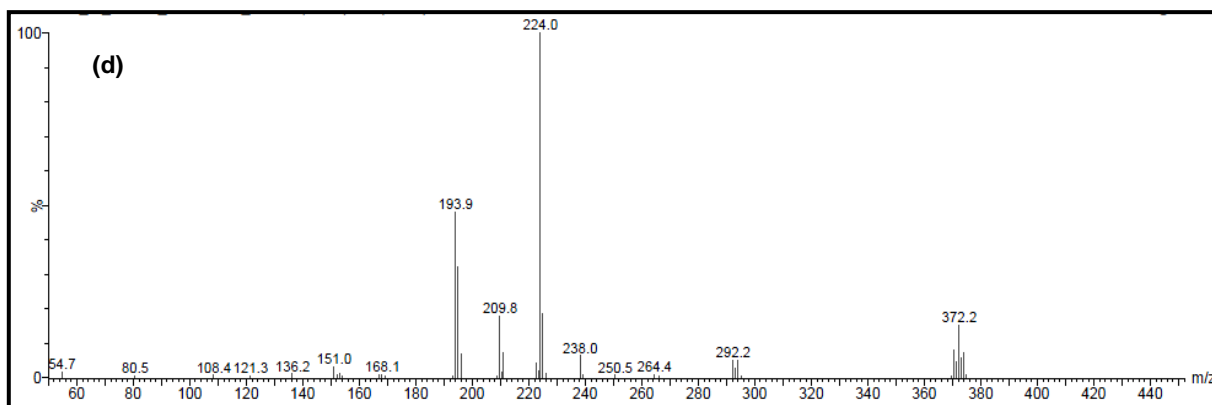


Figura IV. 9. Espectro de RMN de ^1H (a), RMN de ^{13}C (b) e DEPT (c), e EM-IE (d) do composto *N*-(6-bromo-hexil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (8).

Num terceiro passo reacional procedeu-se à inserção da trifetilfosfina e consequente obtenção de um sal de trifetilfosfónio, via reação $\text{S}_{\text{N}}2$ [52]. O mecanismo proposto está representado na Figura IV.10.. Esta reação é realizada sem solvente, pois caracteriza-se por ser uma reação de fusão entre dois sólidos, e em atmosfera inerte de forma a evitar a formação de quantidades elevadas de óxido de trifetilfosfina, um produto de decomposição da trifetilfosfina, que é difícil de remover.

Adicionalmente, tentou-se realizar a síntese *in situ* dos sais de trifetilfosfónio, através da formação de hidrobrometo de trifetilfosfina, pela junção de ácido brómico com trifetilfosfina e subsequente adição do composto com função álcool, ocorrendo a formação do sal de trifetilfosfónio desejado. Apesar de se ter verificado a formação dos compostos pretendido por CCF, o resultado não foi satisfatório devido à quantidade de impurezas presentes.

A caracterização dos compostos pretendidos foi realizada por RMN e por EM-IE.

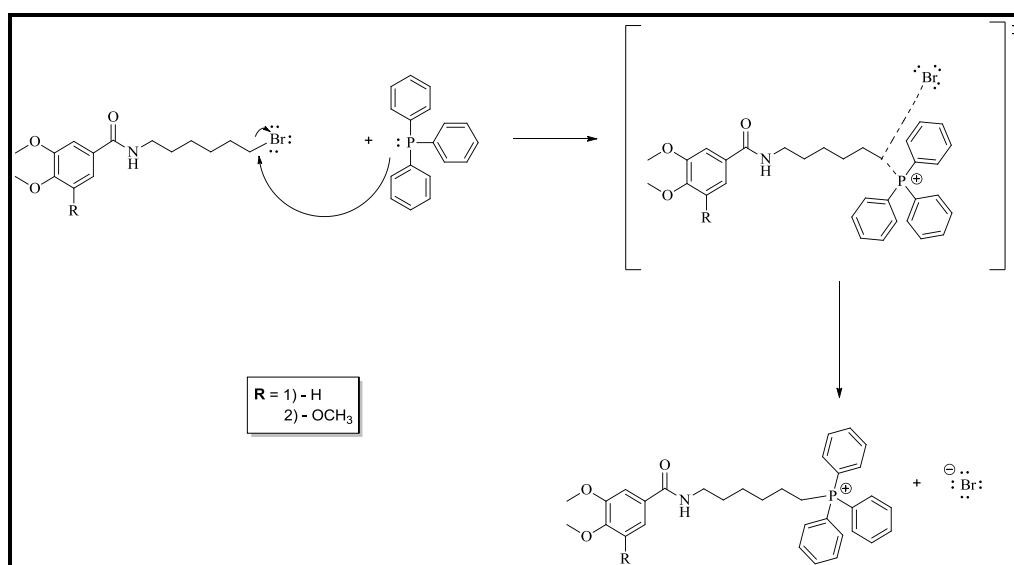
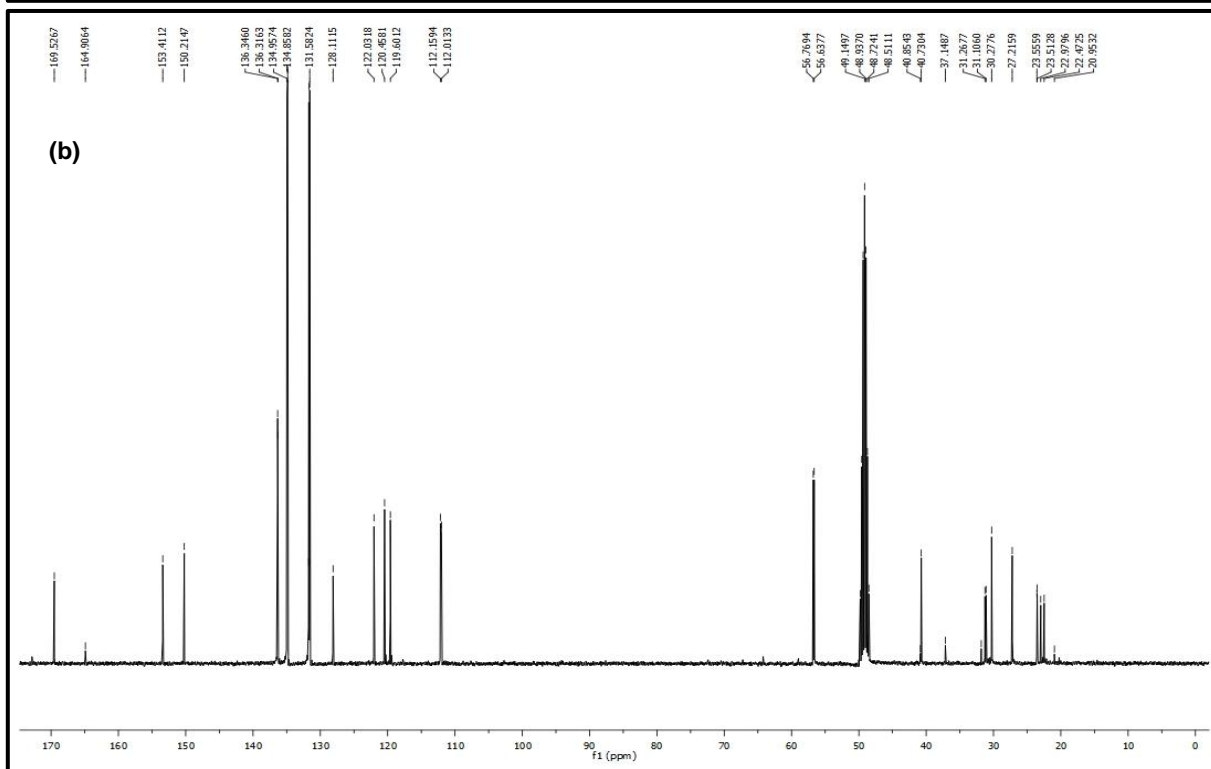
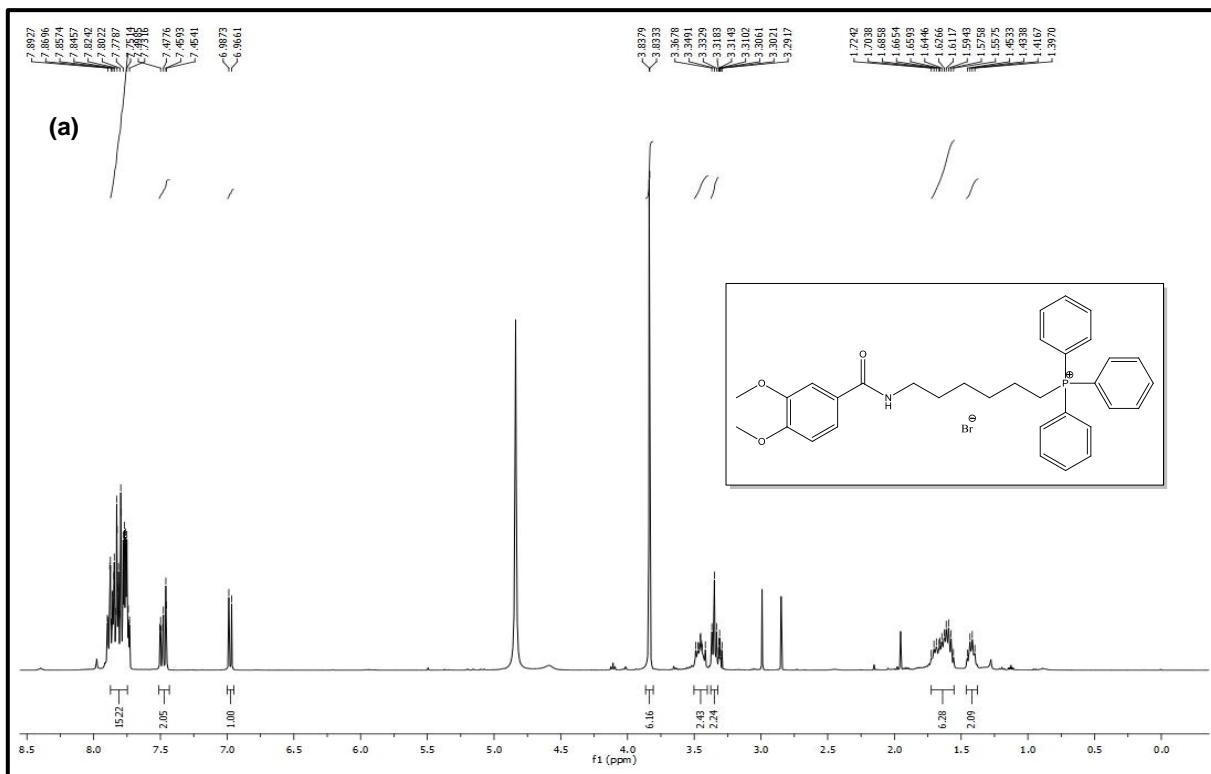


Figura IV. 10. Mecanismo de formação dos sais de trifetilfosfónio.



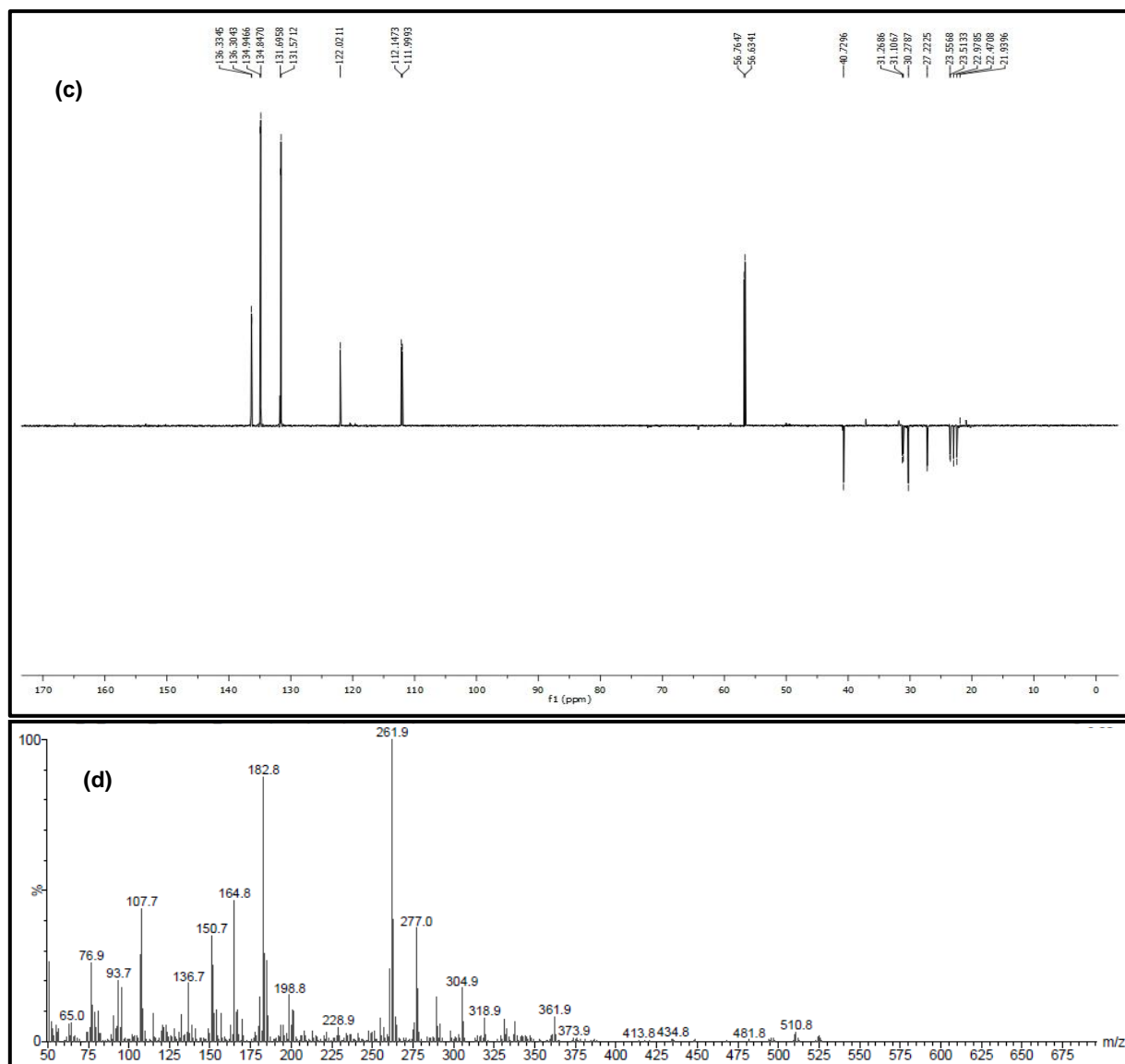
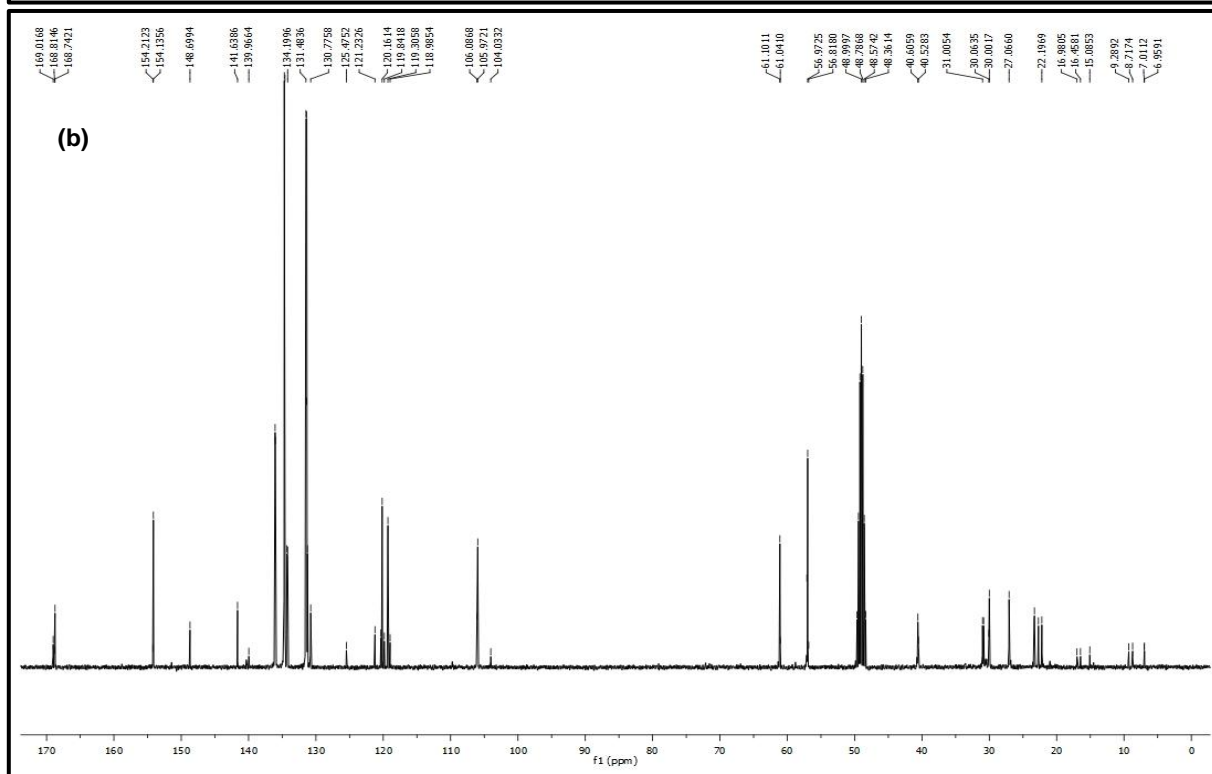
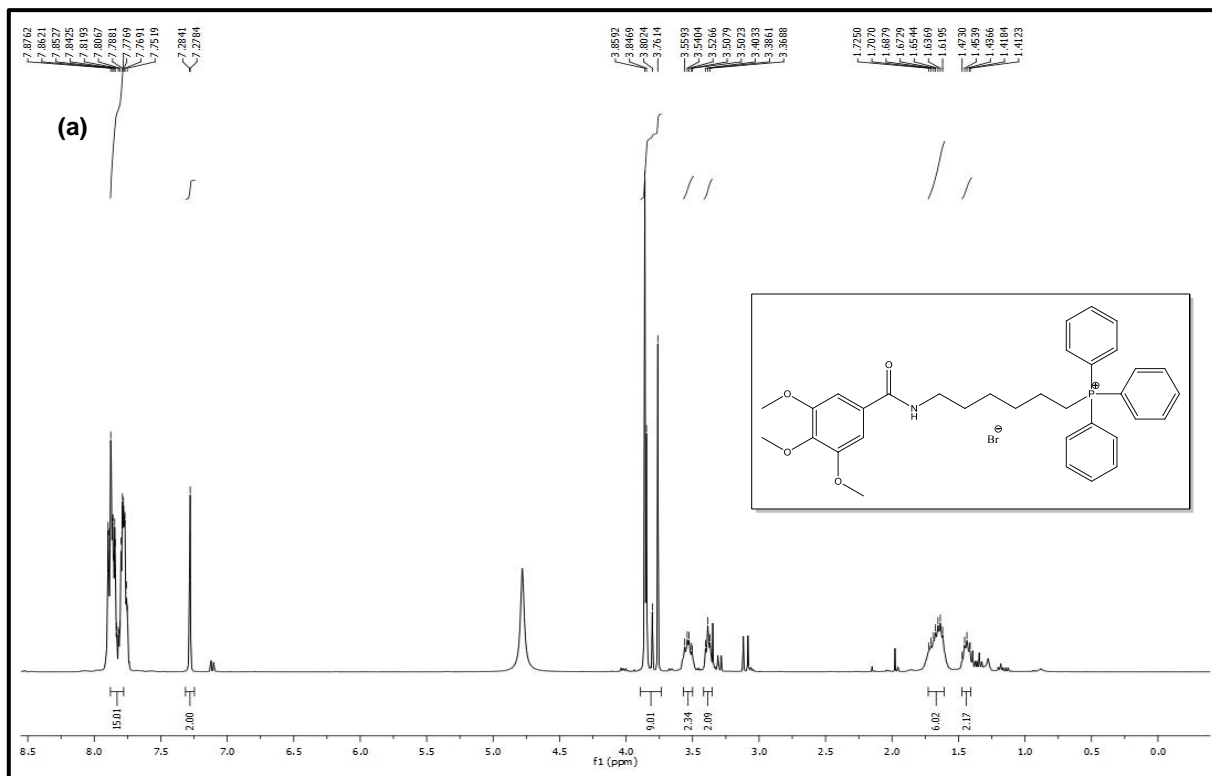


Figura IV. 11. Espetro de RMN de ^1H (a), RMN de ^{13}C (b) e DEPT (c), e EM-IE (d) do brometo de 6-(3,4-dimetoxibenzamido)hexiltripenilfosfónio (9).



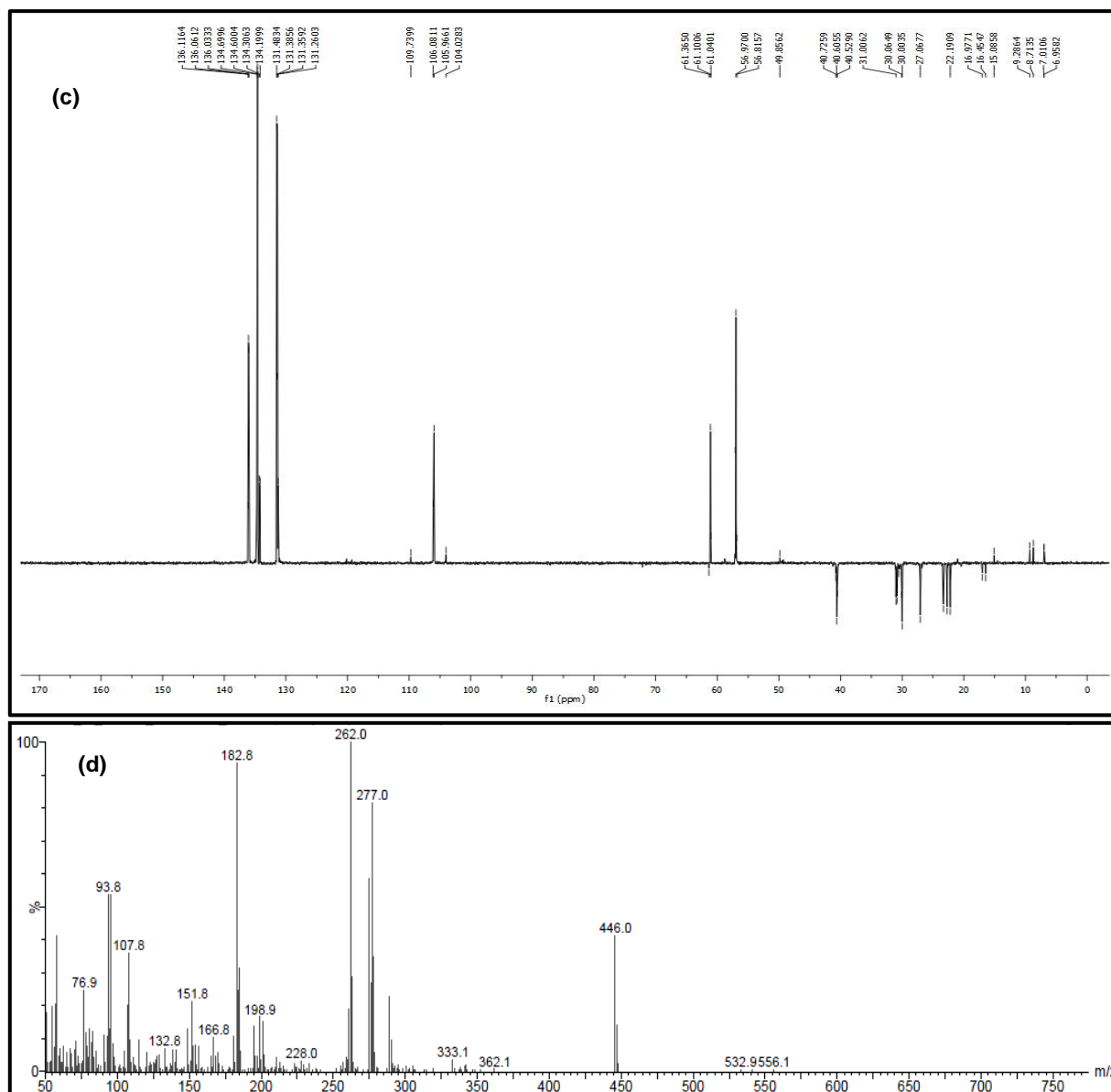


Figura IV. 12. Espectro de RMN de ^1H (a), RMN de ^{13}C (b) e DEPT (c), e EM-IE (d) do brometo de 6-(3,4,5-trimetoxibenzoato)hexiltriphenilfosfônio (10).

Como passo final, procedeu-se à reação de O-desmetilação, ou seja, a remoção dos grupos metoxilo presentes nos compostos e conseqüente formação dos grupos hidroxilo, obtendo desta forma os antioxidantes lipofílicos pretendidos. Por RMN e EM-IE foi possível comprovar a formação dos compostos ao longo das várias sínteses.

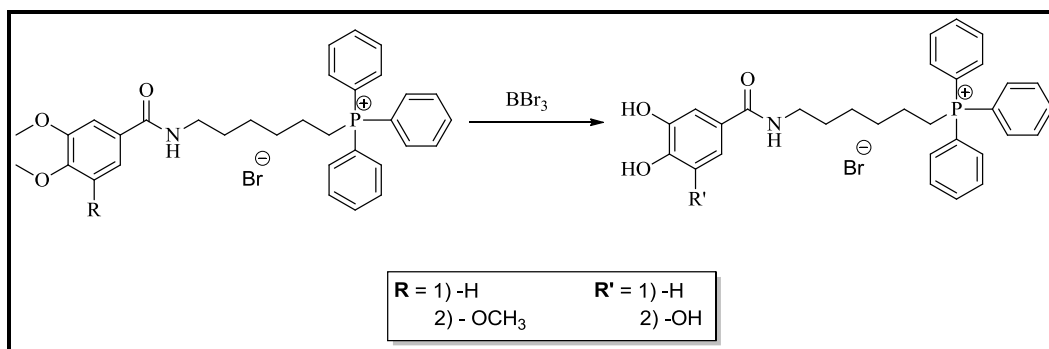


Figura IV. 13. Reação de O-desmetilação dos cátions lipofílicos.

Por RMN e EM-IE comprovou-se a obtenção dos compostos ao longo das várias sínteses. Os dados obtidos a partir dos espectros de EM-IE dos compostos sintetizados, encontram-se sumariados na Figura IV.14., e permitem verificar quais as principais vias de fragmentação dos compostos.

1.1. Elucidação estrutural dos compostos sintetizados

A elucidação estrutural dos compostos sintetizados foi estabelecida através dos estudos dos dados de Ressonância Magnética Nuclear Protónica (RMN de ^1H) e de Carbono (RMN de ^{13}C), DEPT (do inglês “distortionless enhancement by polarization transfer”) e espectroscopia de massa de impacto eletrónico (EM-IE).

Neste ponto da dissertação discutem-se os resultados da análise espectroscópica relativos aos compostos sintetizados neste trabalho.

1.1.1. Ressonância magnética nuclear de ^1H

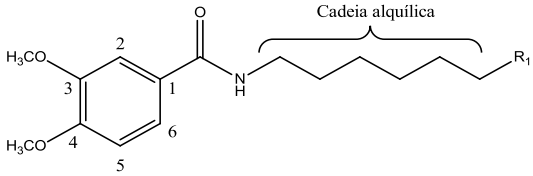
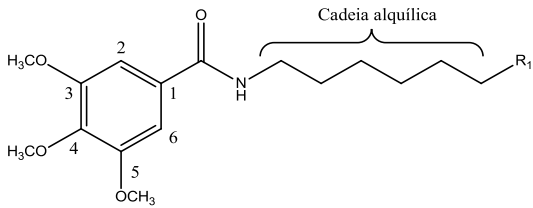
Os dados de RMN de ^1H dos compostos sintetizados evidenciados na Tabela IV.2., foram assinalados, sempre que possível, com base nos desvios químicos, multiplicidade dos sinais e constantes de acoplamento. Para se poder efetuar uma análise comparativa os compostos foram agrupados em função da similaridade do padrão de substituição do anel aromático,

A análise comparativa dos dados de RMN de ^1H dos compostos sintetizados permitiu efetuar as seguintes conclusões:

- A reação de amidação (compostos 3 e 4) ocorreu com sucesso, facto evidenciado pela presença do próton correspondente ao grupo CONH, de 12 hidrogénios alquílicos correspondentes à presença de uma cadeia alifática constituída por seis átomos de carbono, assim como a presença do sinal correspondente ao próton do grupo OH. Estes dados corroboram o sucesso da reação e portanto da introdução do espaçador 6-aminohexan-1-ol;

- A deteção de 12 hidrogénios alquílicos nos compostos posteriormente sintetizados (compostos 7 e 8), sugere que a cadeia alifática introduzida, não foi afetada pelas reações subseqüentemente realizadas. No entanto é de referir que no composto 12 só foi possível detetar a presença de 10 protões, muito provavelmente porque o desvio químico de dois protões se encontram mascarados pela presença de sinais correspondentes aos solventes utilizados durante a purificação do composto;
- Os sinais característicos correspondentes aos protões do núcleo aromático foram detetados em todos os compostos sintetizados, e na maioria dos casos, foi possível a sua atribuição inequívoca com base na sua multiplicidade e constantes de acoplamento;
- A presença dos grupos metoxilo no anel aromático foi confirmada em todos os compostos sintetizados, exceto nos compostos 11 e 12, quer pela deteção de sinais característicos a desvios químicos entre 3,95-3,83 quer pela integração e multiplicidade do sinal;
- A presença de 15 protões na zona característica de hidrogénios aromáticos permitiu concluir que ocorreu a reação de substituição do halogéneo pela trifenilfosfina (compostos 9 e 10);
- O desaparecimento dos sinais correspondentes aos grupos metoxilos permite concluir que a reação de O-desmetilação foi realizada com sucesso (compostos 11 e 12).

Tabela IV. 2. Dados de RMN de ^1H dos compostos 3, 4 e 7 a 12.

								
	Composto 3 ^{a)}	Composto 7 ^{a)}	Composto 9 ^{b)}	Composto 11 ^{c)}	Composto 4 ^{a)}	Composto 8 ^{a)}	Composto 10 ^{b)}	Composto 12 ^{c)}
H alquílicos	1,39-1,41 (4H, m) 1,55-1,41 (4H, m) 3,40-3,45 (2H, m) 3,63 (2H,t,J=6,5 Hz)	1,38-1,53 (4H, m) 1,59-1,67 (2H, m) 1,83-1,90 (2H, m) 3,39-3,46 (4H,m)	1,40-1,72 (8H, m) 3,33-3,37 (2H,m) 3,42-3,49 (2H,m)	1,18-1,35 (4H, m) 1,38-1,48 (4H, m) 3,53-3,65 (4H,m)	1,40-1,43 (4H, m) 1,54-1,66 (4H, m) 3,41-3,46 (2H, m) 3,64 (2H,t,J=6,5 Hz)	1,37-1,52 (4H, m) 1,59-1,66 (2H, m) 1,83-1,90 (2H, m) 3,39-3,45 (4H, m)	1,41-1,73 (8H, m) 3,37-3,40 (2H, m) 3,50-3,56 (2H,m)	1,26-1,36 (2H, m) 1,38-1,59 (6H, m) 3,54-3,63 (2H,m)
OH	1,99 (s)	n/a*	n/a*	n/a*	1,81 (s)	n/a*	n/a*	n/a*
OCH ₃	3,91 (6H, s)	3,92 (6H, s)	3,83 (6H, s)	n/a*	3,87 (3H, s) 3,89 (6H, s)	3,87 (3H, s) 3,88 (6H, s)	3,90 (3H, s) 3,95 (6H, s)	n/a*
CONH	6,38 (t, J=5,2 Hz)	6,25 (t, J=5,4 Hz)	n/d**	n/d**	6,28 (t, J=5,1 Hz)	6,40 (t, J=5,3 Hz)	n/d**	8,99 (s)
H-2	7,43 (d, J=2,0 Hz)	7,43 (d, J=2,0 Hz)	7,46 (d, J=2,1 Hz)	8,09 (1H, s)	7,00 (2H, s)	7,01 (2H, s)	7,28 (2H, s)	6,81 ou 6,99 (1H, s)
H-5	6,85 (d, J= 8,4 Hz)	6,85 (d, J= 8,3 Hz)	6,98 (d, J= 8,5 Hz)	6,98 (d, J= 8,2 Hz)	n/a*	n/a*	n/a*	n/a*
H-6	7,29 (dd,J=2,1; 8,4 Hz)	7,27 (dd,J=2,1; 8,3 Hz)	7,49 (dd,J=2,1; 8,5 Hz)	7,17 (d, J= 7,8 Hz)	7,00 (2H, s)	7,01 (2H, s)	7,28 (2H, s)	6,81 ou 6,99 (1H, s)
PPh ₃	n/a*	n/a*	7,73-7,89 (15H,m)	7,73 – 7,83 (15H,m)	n/a*	n/a*	7,75 – 7,90 (15H,m)	7,75 – 7,86 (15H,m)

^{a)} Solvente=CDCl₃; ^{b)} Solvente=MeOD; ^{c)} Solvente=DMSO*; n/a= não aplicável; ** n/d= não detetado, possivelmente devido à troca do próton do grupo NH com os prótons do solvente deuterado.

1.1.2. Ressonância magnética nuclear de ^{13}C e DEPT

Os dados de RMN de ^{13}C dos compostos sintetizados evidenciados nas Tabelas IV.3. a IV.5.. Os valores obtidos através do espectro de DEPT encontram-se sublinhados nas tabelas. Estes dados conjuntamente com os dados de ^1H RMN permitiram confirmar a identidade dos compostos sintetizados. De salientar que a caracterização exaustiva relativa aos compostos 11 e 12 não foi realizada, devido a problemas relacionados com a quantidade de composto obtida tendo-se optado por realizar os ensaios de avaliação da atividade antioxidante, em detrimento de uma caracterização mais detalhada destes dois compostos. A aquisição completa destes dados será efetuada posteriormente.

Como evidenciado na Tabela IV.3. a presença do grupo $\text{C}=\text{O}$ da função amida nos compostos 3 e 4 permite confirmar a presença da função pretendida nos dois compostos hidroxil-benzamídicos sintetizados. A atribuição inequívoca deste sinal foi comprovada pela sua ausência no espectro de DEPT. Acresce-se que a introdução do espaçador 6-amino-hexan-1-ol foi confirmada por DEPT, o qual evidencia a presença de 6 carbonos do tipo CH_2 . Por comparação dos dados obtidos por RMN de ^{13}C e DEPT foi ainda possível identificar os sinais correspondentes aos carbonos quaternários aromáticos, tendo sido efetuada a sua atribuição tendo com base a influência dos substituintes nos respetivos desvios químicos. É ainda de salientar que os carbonos ligados diretamente a átomos eletronegativos, nomeadamente o N e O, encontram-se deslocados para valores de desvios químicos superiores, devido a efeitos de desproteção. Os carbonos correspondentes aos grupos OCH_3 foram igualmente atribuídos tendo em conta quer os desvios químicos característicos deste grupo quer por comparação dos dados obtidos em DEPT.

Devido à analogia estrutural o mesmo tipo de conclusões se podem inferir para os compostos 7 e 8 (Tabela IV.4.) ocorrendo uma variação nítida no sinal correspondente à alteração efetuada (CH_2OH vs CH_2Br)

No que se refere aos compostos 9 e 10 (Tabela IV.5.), salienta-se que para além da presença dos sinais referidos anteriormente, os quais foram atribuídos por analogia foi detetada a presença de sinais característicos de um grupo organofosforado do tipo $\text{R}_4\text{P}^+\text{X}^-$, uma vez que se observa o desdobramento do sinal de alguns carbonos devido a um acoplamento fósforo/carbono (J_{CP}). Os valores obtidos para as constantes de acoplamento permitiram a identificação inequívoca dos carbonos referentes ao núcleo aromático da trifenilfosfina assim como a atribuição inequívoca do carbono alifático diretamente ligado ao fósforo.

Tabela IV. 3. Dados de RMN de ^{13}C e DEPT dos compostos 3 e 4.

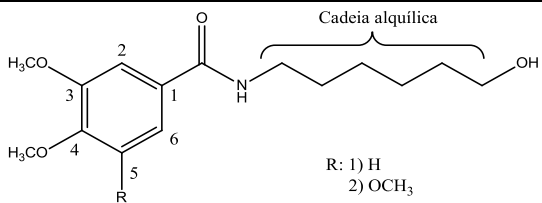
C		
	Composto 3 ^{a)}	Composto 4 ^{a)}
$\underline{\text{C}}\text{H}_2(\text{CH}_2)_2\text{OH}$	<u>25,4</u>	<u>25,4</u>
$\text{N}(\text{CH}_2)_2\underline{\text{C}}\text{H}_2$	<u>26,7</u>	<u>26,7</u>
$\text{NCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2$	<u>29,8</u>	<u>29,8</u>
$\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{OH}$	<u>32,6</u>	<u>32,6</u>
CH_2OH	<u>62,7</u>	<u>62,8</u>
NCH_2	<u>40,0</u>	<u>40,1</u>
C-1	127,5	130,4
C-2	<u>110,7</u>	<u>104,5</u>
C-3	149,0	153,3
C-4	151,7	140,9
C-5	<u>110,4</u>	153,3
C-6	<u>119,4</u>	<u>104,6</u>
OCH_3	<u>2 x 56,1</u>	<u>2 x 56,4</u> <u>61,0</u>
CONH	167,3	167,5

Tabela IV. 4. Dados de RMN de ^{13}C e DEPT dos compostos 7 e 8.

C	Composto 7 ^{a)}	Composto 8 ^{a)}
$\underline{\text{C}}\text{H}_2(\text{CH}_2)_2\text{Br}$	<u>28,0</u>	<u>27,9</u>
$\text{N}(\text{CH}_2)_2\underline{\text{C}}\text{H}_2$	<u>26,2</u>	<u>26,2</u>
$\text{NCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2$	<u>29,7</u>	<u>29,6</u>
$\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{Br}$	<u>32,7</u>	<u>32,6</u>
CH_2Br	<u>33,9</u>	<u>33,9</u>
NCH_2	<u>40,0</u>	<u>40,1</u>
C-1	127,5	130,3
C-2	<u>110,7</u>	<u>104,4</u>
C-3	149,1	153,2
C-4	151,7	140,8
C-5	<u>110,3</u>	153,2
C-6	<u>119,2</u>	<u>104,4</u>
OCH_3	<u>2 x 56,1</u>	<u>2 x 56,4</u> <u>61,0</u>
CONH	167,2	167,3

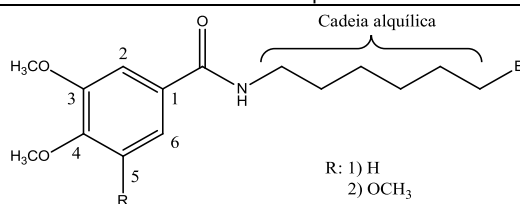
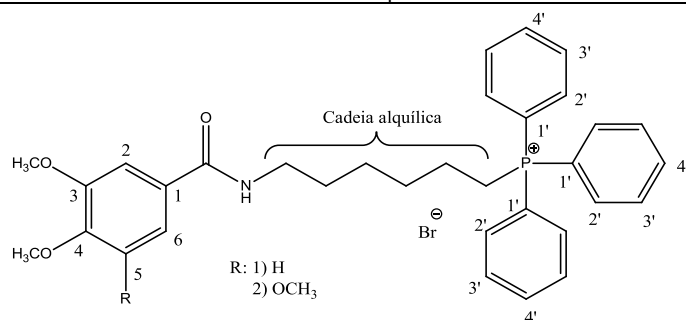


Tabela IV. 5. Dados de RMN de ^{13}C e DEPT dos compostos 9 e 10.

C	Composto 9 ^{a)}	Composto 10 ^{a)}
$\underline{\text{C}}\text{H}_2(\text{CH}_2)_2\text{P}^+\text{Ph}_3$	<u>27,2</u>	<u>27,1</u>
$\text{N}(\text{CH}_2)_2\underline{\text{C}}\text{H}_2$	<u>30,3</u>	<u>30,0</u>
$\text{NCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2$	<u>31,2</u>	<u>30,9</u>
$\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{P}^+\text{Ph}_3$	<u>23,5</u>	<u>23,3</u>
$\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{P}^+\text{Ph}_3$	<u>22,7</u> ($d, J_{\text{CP}} = 50,7 \text{ Hz}$)	<u>22,4</u> ($d, J_{\text{CP}} = 50,7 \text{ Hz}$)
NCH_2	<u>40,8</u>	<u>40,6</u>
C-1	128,1	130,7
C-2	<u>112,2</u>	<u>106,0</u>
C-3	150,2	154,1
C-4	153,4	141,6
C-5	<u>112,0</u>	154,1
C-6	<u>122,0</u>	<u>106,0</u>
C-1'	120,0 ($d, J_{\text{CP}} = 85,7 \text{ Hz}$)	119,7 ($d, J_{\text{CP}} = 85,6 \text{ Hz}$)
C-2'	<u>134,9</u> ($d, J_{\text{CP}} = 9,9 \text{ Hz}$)	<u>134,6</u> ($d, J_{\text{CP}} = 9,9 \text{ Hz}$)
C-3'	<u>131,6</u> ($d, J_{\text{CP}} = 12,5 \text{ Hz}$)	<u>131,4</u> ($d, J_{\text{CP}} = 12,4 \text{ Hz}$)
C-4'	<u>136,3</u> ($d, J_{\text{CP}} = 3,0 \text{ Hz}$)	<u>136,0</u> ($d, J_{\text{CP}} = 2,9 \text{ Hz}$)
OCH_3	<u>2 x 56,7</u>	<u>2 x 57,0</u> <u>61,1</u>
CONH	169,5	168,7

1.1.3. Espectrometria de massa de impacto eletrónico (EM-IE)

Os dados obtidos a partir dos espectros de EM-IE dos compostos sintetizados encontram-se descritos no capítulo III - Materiais e métodos. Neste ponto do trabalho apenas será efetuada a análise de fragmentação dos espectros EM-IE dos sais metoxilados de trifenilfosfónio que se encontra esquematizada na Figura IV.14..

A presença no espectro de massa dos iões $[\text{Ph}_3\text{PCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2]^+$ (m/z 304), $[\text{Ph}_3\text{PCH}_2]^+$ (m/z 276), $[\text{Ph}_3\text{P}]^+$ (m/z 262), $[\text{Ph}_2\text{P}]^+$ (m/z 185), $[\text{PhP}]^+$ (m/z 108) e $[\text{Ph}]^+$ (m/z 77) assim como os picos correspondentes à fragmentação característica da função amida permitiram corroborar a elucidação estrutural dos compostos 9 e 10.

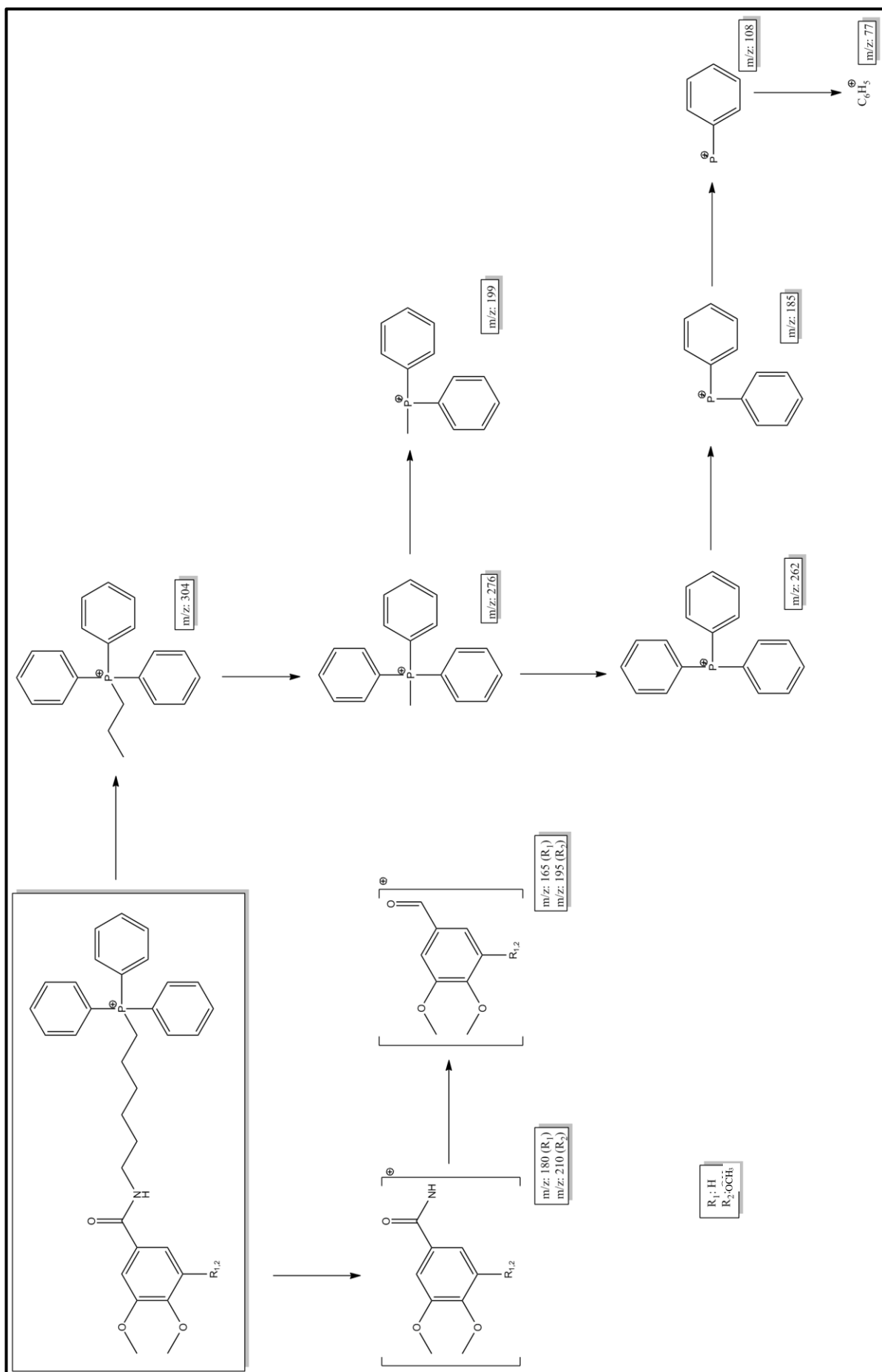


Figura IV. 14. Zonas de fragmentação principais dos compostos sintetizados.

2. Avaliação da atividade antioxidante

Os ensaios de avaliação da capacidade antioxidante total têm sido frequentemente usados para determinar a hierarquia da atividade de potenciais compostos antioxidantes. Neste contexto foram usados os métodos de avaliação da capacidade antioxidante total (ABTS, DPPH e GO), a fim de avaliar a capacidade anti-radicalar dos novos compostos (11 e 12) e dos seus precursores (ácidos protocatecuico e gálico, respetivamente). Como antioxidantes de referência foram usados a Vitamina E e Trolox.

A comparação da atividade antioxidante exibida pelos compostos avaliados foi efetuada após a determinação dos valores de IC₅₀ (Tabela IV.6.).

Tabela IV. 6. Atividade antioxidante dos ácidos protocatecuico e gálico e respetivos antioxidantes mitocondriotrópicos sintetizados (compostos 11 e 12) pelos métodos de ABTS, DPPH e GO.

Composto	IC ₅₀ (µM)		
	ABTS	DPPH	GO
Ácido Protocatecuico	26,1	42,0	- ⁽³⁾
Ácido Gálico	7,8	9,9	2,5
Composto 11	43,5	47,3	6,5
Composto 12	15,2	23,4	4,0
Vitamina E	26,3	30,9	5,8
Trolox	26,8	31,1	4,5

A atividade antioxidante é tanto maior quanto menor for o valor de IC₅₀. Assim, pelos resultados obtidos, verificou-se que os antioxidantes mitocondriotrópicos apresentam uma atividade antioxidante inferior à dos antioxidantes naturais (ácidos protocatecuico e gálico). Portanto, estes resultados sugerem que as modificações estruturais relativas à introdução da cadeia alquílica e à inserção do catião trifenílfosfónio influenciam a capacidade antioxidante deste tipo de antioxidantes mitocondriotrópicos.

Foi também possível verificar que os compostos que possuem três grupos hidroxilos apresentam valores mais baixos de IC₅₀ e, por isso, apresentam maior capacidade antioxidante. Estes compostos correspondem ao ácido gálico e o composto 12, sendo esta correlação coerente para todos os ensaios anti-radicalares efetuados (Tabela IV.6.).

Do que foi referido podemos concluir que o número de grupos hidroxilo presentes no anel aromático influencia a atividade antioxidante. Assim, o ácido protocatecuico e composto 11 possuem uma menor capacidade antioxidante, pois têm na sua constituição apenas dois

⁽³⁾ Não foi possível apresentar o valor de IC₅₀ do ácido protocatecuico, uma vez que quando foram efetuados os ensaios de GO se verificou pelos valores elevados referentes a este composto que este estaria degradado.

grupos hidroxilos, ou seja, têm menos um grupo hidroxilo que os anteriormente referidos com capacidade de doar hidrogénios ao radical usado/formado nos testes efetuados.

De salientar ainda que apesar do valor de IC_{50} do antioxidante 12 ser maior do que o seu precursor (ácido gálico), este apresenta um valor de atividade superior ao dos antioxidantes de referência padrões utilizados (Vitamina E e Trolox) possuindo por conseguinte uma maior capacidade antioxidante.

3. Avaliação do potencial redox

A atividade antioxidante de diferentes espécies químicas está relacionada com as suas propriedades redox. Por esta razão, os métodos voltamétricos têm sido muito utilizados de forma avaliar a atividade antioxidante fornecendo ainda informações sobre os mecanismos de oxidação.

O potencial redox (E_p) dos novos antioxidantes mitocondriotrópicos, compostos 11 e 12, foi avaliado e os valores obtidos foram comparados com os dos antioxidantes naturais que lhes deram origem, os ácidos protocatecuico e gálico, respetivamente. Estes valores estão descritos na Tabela IV.7..

O comportamento oxidativo dos compostos testados foi estudado a pH 7,4, por voltametria diferencial de pulso e voltametria cíclica, usando como elétrodo de trabalho um elétrodo de carbono vítreo.

Tabela IV. 7. Potencial redox dos ácidos protocatecuico e gálico e respetivos catiões lipofílicos (compostos 11 e 12).

Composto	E_p (V)
Ácido Protocatecuico	0,257
Ácido Gálico	0,163; 0,546
Composto 11	0,224
Composto 12	0,168
Trolox	0,099

Pelos dados obtidos nos voltamogramas de pulso diferencial, pode-se observar que o ácido protocatecuico e o composto 11 apresentam um potencial de oxidação com $E_p = 0,257$ V e $E_p = 0,224$ V, respetivamente. Este potencial está relacionado com a oxidação do grupo catecol presente na estrutura dos compostos (Figura IV.15.).

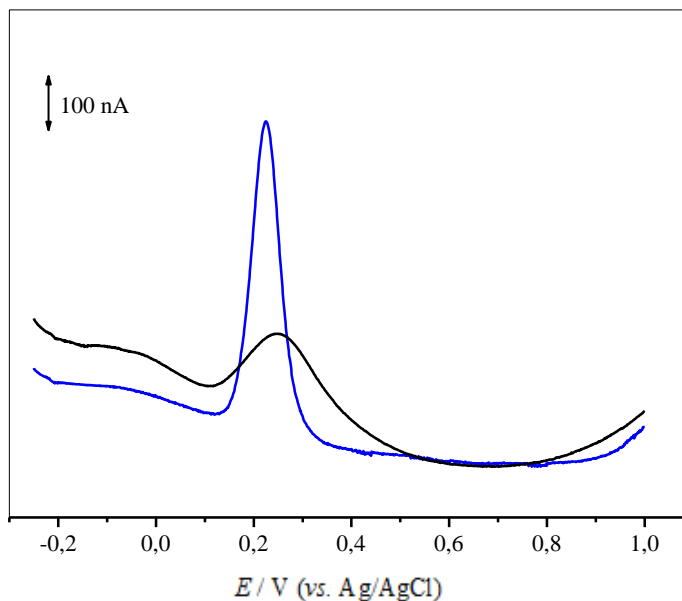


Figura IV. 15. Voltamogramas de pulso diferencial de soluções com concentração de 0,1 mM dos compostos (—) ácido protocatecuico e (—) composto 11, numa solução tampão com pH 7,4. Velocidade de varrimento: 5 mV·s⁻¹.

Para o ácido gálico verificou-se a presença no voltamograma de dois potenciais de oxidação ($E_p = 0,163$ V e $E_p = 0,546$ V), que podem estar relacionados com o facto deste composto ter na sua constituição três grupos hidroxilos, ou seja, com a oxidação do grupo pirogalhol presente na sua estrutura.

O voltamograma do seu análogo, composto 12, apresenta um potencial a $E_p = 0,168$ V. De salientar que o valor de potencial obtido é similar ao primeiro potencial obtido para o ácido gálico, podendo estar também relacionado com a oxidação do grupo pirogalhol presente na sua estrutura (Figura IV.16.).

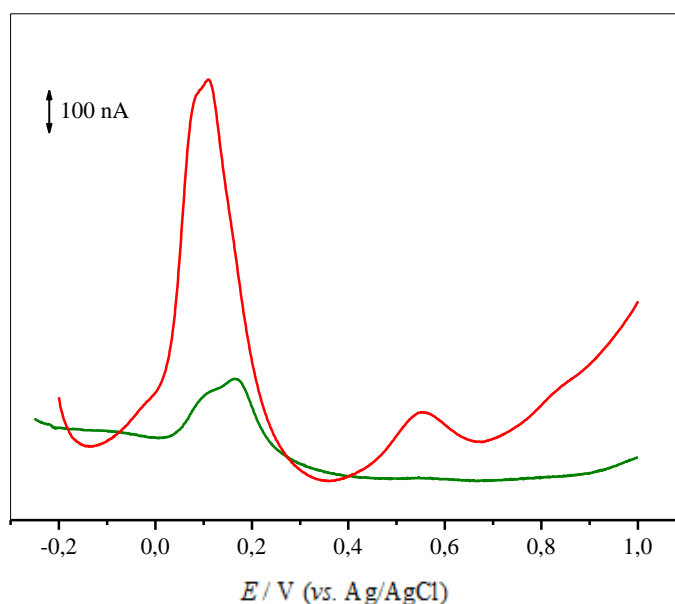


Figura IV. 16. Voltamogramas de pulso diferencial de soluções com concentração de 0,1 mM dos compostos (—) ácido gálico e (—) composto 12 numa solução tampão com pH 7,4. Velocidade de varrimento: 5 mV·s⁻¹.

Pelos voltamogramas apresentados nas figuras anteriores, e pelos valores de potencial obtidos quer para os antioxidantes mitocondriotrópicos sintetizados (compostos 11 e 12) quer para os respetivos precursores (ácidos protocatecuico e gálico), podemos concluir que a introdução da cadeia alquílica e do catião trifenilfosfónio não têm uma influência direta nos potenciais de oxidação.

O voltamograma cíclico obtido para o ácido protocatecuico mostra dois picos anódicos convolvidos correspondentes à formação de uma *o*-quinona em solução (Figura IV.17.) tendo-se observado no varrimento de forma reversa a formação de dois picos de redução. Os dados obtidos evidenciam a ocorrência de uma reação redox.

Os voltamogramas cíclicos para o derivado do ácido protocatecuico (composto 11) mostram um pico anódico simples, sem qualquer onda de redução distinta no varrimento de forma inversa, o que demonstra que o composto 11 é irreversivelmente oxidado no elétrodo de carbono vítreo. Este resultado pode também indicar que a reação pode ocorrer de forma muito rápida e que conseqüentemente que o tempo da experiência não seja o suficiente para se observar o pico correspondente de redução.

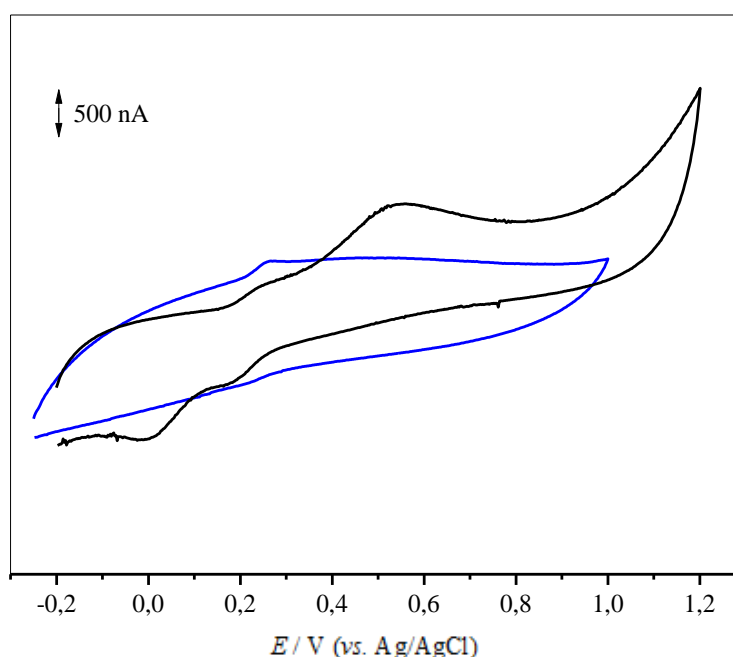


Figura IV. 17. Voltamogramas cíclicos de soluções com concentração de 0,1 mM dos compostos (—) ácido protocatecuico e (—) composto 11, numa solução tampão com pH 7,4. Velocidade de varrimento: 50 mV·s⁻¹.

Os ensaios de voltametria cíclica efetuados para o ácido gálico e composto 12, mostraram a presença de um único pico de oxidação e ausência de uma onda de redução no varrimento de forma inversa. Os dados permitem concluir que o ácido gálico e o seu análogo são irreversivelmente oxidados no elétrodo de carbono vítreo (Figura IV.18.), pois não são observados picos catódicos no sentido inverso.

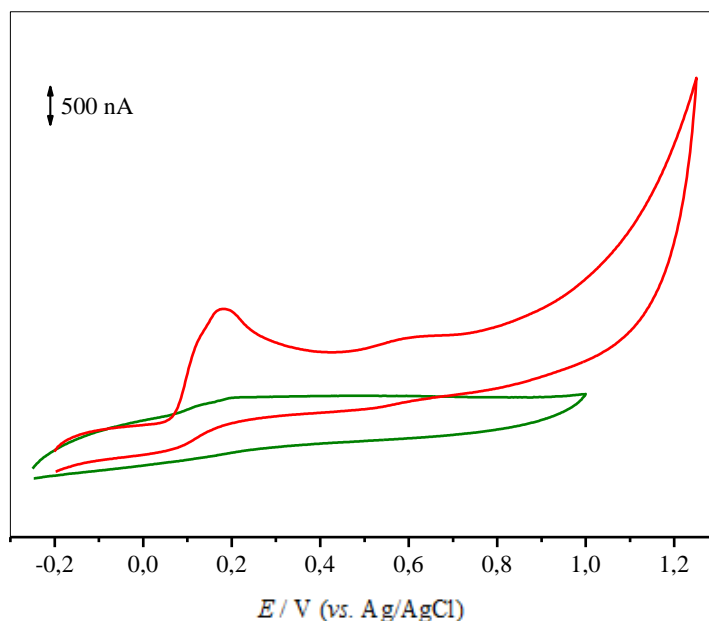


Figura IV. 18. Voltamogramas cíclicos de soluções com concentração de 0,1 mM dos compostos (—) ácido gálico e (—) composto 12 numa solução tampão com pH 7,4. Velocidade de varrimento: $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Dados obtidos pelo nosso grupo, em relação à avaliação das propriedades redox de diversos compostos fenólicos, permitiram concluir que a atividade antioxidante é tanto maior quanto menor for o respetivo valor de E_p .

Desta forma podemos inferir que os potenciais redox obtidos para o ácido gálico e o seu derivado (composto 12), podem ser relacionados com a atividade antioxidante observada para estes compostos. Mais uma vez se conclui que quanto menor for o potencial de oxidação maior é atividade antioxidante, o que está de acordo com dados obtidos através de ensaios de ABTS, DPPH e GO. Também através dos dados eletroquímicos é possível concluir que a existência de um grupo hidroxilo (OH) adicional no anel aromático contribui para um aumento da atividade antioxidante.

Os dados obtidos neste trabalho corroboram a hipótese proposta de que existe uma correlação da atividade antioxidante e o potencial redox, permitindo propor a avaliação deste tipo de parâmetros como uma forma simples, económica e rápida de avaliação da atividade antioxidante.

V - CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Neste trabalho, foram sintetizados novos antioxidantes mitocondriotrópicos (compostos 11 e 12) derivados de ácidos benzoicos, nomeadamente os ácidos protocatecuico e gálico, respetivamente. A sua síntese foi efetuada através de uma estratégia sintética que envolveu quatro passos. De realçar que durante este projeto foi efetuada a otimização de algumas reações de forma a melhorar o rendimento de reação. Os compostos finais e intermediários de reação foram caracterizados por RMN e EM-IE.

Posteriormente, procedeu-se à avaliação da atividade antioxidante dos compostos sintetizados, pelos métodos ABTS, DPPH e GO de forma a averiguar as repercussões das modificações estruturais na atividade. A atividade obtida foi comparada com a dos antioxidantes naturais (ácidos protocatecuico e gálico) e com antioxidantes de referência (vitamina E e trolox). Através de métodos eletroquímicos, nomeadamente a voltametria diferencial de pulso e voltametria cíclica, foram também avaliados os respetivos potenciais redox.

De uma forma geral, os antioxidantes 11 e 12 apresentam uma atividade antioxidante na ordem de grandeza dos seus precursores. Verificou-se que o composto 12 é um antioxidante mais potente do que o composto 11, e do que com os antioxidantes de referência utilizados, devido à presença de um sistema pirogalhol no anel aromático.

Os potenciais redox obtidos para o composto 11 e o composto 12 permitem reforçar as conclusões acima referidas relativamente à avaliação da atividade antioxidante. Os antioxidantes 11 e 12 apresentam valores de potencial redox similares aos seus precursores apresentando o composto 12 um potencial de oxidação mais baixo que o composto 11, o que está de acordo com a sua diferença estrutural. Os resultados obtidos permitem concluir que quanto menor for o valor de potencial redox, maior será a sua atividade antioxidante, pois a propensão do compostos para ser oxidado é maior e que a introdução de uma cadeia alifática lipofílica contendo o catião trifenilfosfónio não tem influência significativa na capacidade antioxidante dos compostos.

Os resultados obtidos até à data permitem concluir que os objetivos propostos inicialmente neste projeto foram abrangidos, ou seja, que a atividade dos precursores, ácidos protocatecuico e gálico se mantêm com as modificações efetuadas e que o aumento da lipofilia e introdução de um catião trifenilfosfónio conseguidos poderão conduzir à sua acumulação no alvo pretendido, a mitocôndria.

Como perspetivas futuras para complementar o trabalho realizado até ao momento, será necessário avaliar a estabilidade e pureza dos compostos por HPLC, assim como a sua lipofilicidade, através da avaliação dos seus coeficientes de partilha assim como avaliar o desempenho destes novos antioxidantes em mitocôndrias isoladas (fígado, coração e cérebro) e em sistemas celulares neuronais.

Num futuro próximo, espera-se que esta nova abordagem terapêutica possa melhorar o

estilo de vida de muitas pessoas que sofrem de doenças relacionadas com *stress* oxidativo, nomeadamente as de natureza neurodegenerativa.

VI - LISTA DE REFERÊNCIAS

1. de Moura, M.B., L.S. dos Santos, and B. Van Houten, *Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and cancer*. Environ. Mol. Mutagen., 2010. **51**(5): p. 391-405.
2. Park, S.Y., *Potential therapeutic agents against Alzheimer's disease from natural sources*. Arch. Pharm. Res., 2010. **33**(10): p. 1589-609.
3. Schapira, A.H., *Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases*. Neurochem. Res., 2008. **33**(12): p. 2502-2509.
4. Modica-Napolitano, J.S. and K.K. Singh, *Mitochondria as targets for detection and treatment of cancer*. Expert. Rev. Mol. Med., 2002. **4**(9): p. 1-19.
5. Facecchia, K., et al., *Oxidative toxicity in neurodegenerative diseases: Role of mitochondrial dysfunction and therapeutic strategies*. J. Toxicol., 2011, p. 1-12.
6. Hinerfeld, D., et al., *Endogenous mitochondrial oxidative stress: Neurodegeneration, proteomic analysis, specific respiratory chain defects, and efficacious antioxidant therapy in superoxide dismutase 2 null mice*. J. Neurochem., 2004. **88**(3): p. 657-667.
7. Esposito, E., et al., *A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes*. Neurobiol. Aging, 2002. **23**(5): p. 719-735.
8. Barnham, K.J., C.L. Masters, and A.I. Bush, *Neurodegenerative diseases and oxidative stress*. Nat. Rev. Drug Discov., 2004. **3**(3): p. 205-14.
9. DiMauro, S., *Mitochondrial diseases*. Biochim. Biophys. Acta, 2004. **1658**(1-2): p. 80-8.
10. Lin, M.T. and M.F. Beal, *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases*. Nature, 2006. **443**(7113): p. 787-95.
11. DiMauro, S. and E.A. Schon, *Mitochondrial disorders in the nervous system*. Annu. Rev. Neurosci., 2008. **31**: p. 91-123.
12. Nunomura, A., et al., *RNA oxidation in Alzheimer disease and related neurodegenerative disorders*. Acta Neuropathol., 2009. **118**(1): p. 151-66.
13. Uttara, B., et al., *Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options*. Curr. Neuropharmacol., 2009. **7**(1): p. 65-74.
14. DiMauro, S. and C. Garone, *Historical perspective on mitochondrial medicine*. Dev. Disabil. Res. Rev., 2010. **16**(2): p. 106-13.

15. Leopoldini, M., N. Russo, and M. Toscano, *The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants*. Food Chem., 2011. **125**(2): p. 288-306.
16. Corrado, M., L. Scorrano, and S. Campello, *Mitochondrial Dynamics in Cancer and Neurodegenerative and Neuroinflammatory Diseases*. Int. J. Cell Biol., 2012. p. 729290.
17. Murphy, M.P. and R.A. Smith, *Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 2007. **47**: p. 629-56.
18. Hoye, A.T., et al., *Targeting mitochondria*. Acc. Chem. Res., 2008. **41**(1): p. 87-97.
19. Frantz, M.C. and P. Wipf, *Mitochondria as a target in treatment*. Environ. Mol. Mutagen., 2010. **51**(5): p. 462-475.
20. Roleira, F.M.F., et al., *Lipophilic phenolic antioxidants: Correlation between antioxidant profile, partition coefficients and redox properties*. Bioorgan. Med. Chem., 2010. **18**(16): p. 5816-5825.
21. Huang, H. and K.G. Manton, *The role of oxidative damage in mitochondria during aging: a review*. Front. Biosci., 2004. **9**: p. 1100-17.
22. Anekonda, T.S. and P.H. Reddy, *Neuronal protection by sirtuins in Alzheimer's disease*. J. Neurochem., 2006. **96**(2): p. 305-13.
23. Swerdlow, R.H., *Mitochondrial Medicine and the Neurodegenerative Mitochondriopathies*. Pharmaceuticals (Basel), 2009. **2**(3): p. 150-167.
24. Gonfloni, S., et al., *Oxidative stress, DNA damage, and c-Abl signaling: At the crossroad in neurodegenerative diseases?* Int. J. Cell. Biol., 2012.
25. Cardinali, D.P., A.M. Furio, and L.I. Brusco, *Clinical aspects of melatonin intervention in Alzheimer's disease progression*. Curr. Neuropharmacol., 2010. **8**(3): p. 218-27.
26. Yamada, Y., et al., *Mitochondrial drug delivery and mitochondrial disease therapy--an approach to liposome-based delivery targeted to mitochondria*. Mitochondrion, 2007. **7**(1-2): p. 63-71.
27. Savitt, J.M., V.L. Dawson, and T.M. Dawson, *Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine*. J. Clin. Invest., 2006. **116**(7): p. 1744-54.
28. Davie, C.A., *A review of Parkinson's disease*. Br. Med. Bull., 2008. **86**: p. 109-27.
29. De Araujo, D.P., et al., *The contributions of antioxidant activity of lipoic acid in reducing neurogenerative progression of Parkinson's disease: a review*. Int. J. Neurosci., 2011. **121**(2): p. 51-7.

30. Orr, C.F., D.B. Rowe, and G.M. Halliday, *An inflammatory review of Parkinson's disease*. Prog. Neurobiol., 2002. **68**(5): p. 325-40.
31. Schapira, A.H., *Science, medicine, and the future: Parkinson's disease*. BMJ, 1999. **318**(7179): p. 311-4.
32. Baron, M., A.P. Kudin, and W.S. Kunz, *Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders*. Biochem. Soc. Trans., 2007. **35**(Pt 5): p. 1228-31.
33. Chakrabarti, S., et al., *Mitochondrial Dysfunction during Brain Aging: Role of Oxidative Stress and Modulation by Antioxidant Supplementation*. Aging and disease, 2011. **2**(3): p. 242-256.
34. Harman, D., *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J. Gerontol., 1956. **11**(3): p. 298-300.
35. Van Remmen, H. and A. Richardson, *Oxidative damage to mitochondria and aging*. Exp. Gerontol., 2001. **36**(7): p. 957-68.
36. Jarovsky, D., Shiozawa, P., Rosalino, U. A. C., Barros, M. D., *Mitochondrial diseases: a review*. Einstein, 2006. **4**(4): p. 343-350.
37. Siquet, C., et al., *Antioxidant profile of dihydroxy- and trihydroxyphenolic acids--a structure-activity relationship study*. Free Radic. Res., 2006. **40**(4): p. 433-42.
38. Friedlander, R.M., *Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases*. N. Engl. J. Med., 2003. **348**(14): p. 1365-75.
39. Ballard, J.W. and M.C. Whitlock, *The incomplete natural history of mitochondria*. Mol. Ecol., 2004. **13**(4): p. 729-44.
40. Fresco, P., et al., *The anticancer properties of dietary polyphenols and its relation with apoptosis*. Curr. Pharm. Des., 2010. **16**(1): p. 114-34.
41. Murphy, M.P., *How mitochondria produce reactive oxygen species*. Biochem. J., 2009. **417**(1): p. 1-13.
42. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., *Energy Conversion: Mitochondria and Chloroplasts*, in Molecular Biology of the Cell 2007, Garland science, Taylor & Francis Group, LLC. p. 813-878.
43. Scheffler, I.E., *A century of mitochondrial research: achievements and perspectives*. Mitochondrion, 2001. **1**(1): p. 3-31.
44. Ernster, L. and G. Schatz, *Mitochondria: A historical review*. J. Cell Biol., 1981. **91**(3 II): p. 227s-255s.

45. Keating, D.J., *Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, regulation of exocytosis and their relevance to neurodegenerative diseases*. J. Neurochem., 2008. **104**(2): p. 298-305.
46. Trushina, E. and C.T. McMurray, *Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases*. Neuroscience, 2007. **145**(4): p. 1233-48.
47. Dessolin, J., et al., *Selective targeting of synthetic antioxidants to mitochondria: towards a mitochondrial medicine for neurodegenerative diseases?* Eur. J. Pharmacol., 2002. **447**(2-3): p. 155-61.
48. Roleira, F.M.F., et al., *Antioxidants and Stroke: Success and Pitfalls Translational Stroke Research*, P.A. Lapchak and J.H. Zhang, Editors. 2012, Springer New York. p. 117-143.
49. Wang, S., et al., *How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health*. Food Res. Int., 2011. **44**(1): p. 14-22.
50. Núñez-Sellés, A.J., *Antioxidant therapy: Myth or reality?* J. Brazil. Chem. Soc., 2005. **16**(4): p. 699-710.
51. Lipinski, B., *Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease*. Oxid. Med. Cell Longev., 2011. p. 809696.
52. Brown, S.E., et al., *Targeting lipoic acid to mitochondria: Synthesis and characterization of a triphenylphosphonium-conjugated α -lipoyl derivative*. Free Radical Bio. Med., 2007. **42**(12): p. 1766-1780.
53. Teixeira, J., et al., *Rational discovery and development of a mitochondria-targeted antioxidant based on cinnamic acid scaffold*. Free Radic. Res., 2012. **46**(5): p. 600-11.
54. Garrido, J., et al., *Alkyl esters of hydroxycinnamic acids with improved antioxidant activity and lipophilicity protect PC12 cells against oxidative stress*. Biochimie, 2012. **94**(4): p. 961-7.
55. Soobrattee, M.A., et al., *Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions*. Mutat. Res. - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2005. **579**(1-2): p. 200-213.
56. Gaspar, A., et al., *New insights into the antioxidant activity of hydroxycinnamic acids: Synthesis and physicochemical characterization of novel halogenated derivatives*. Eur. J. Med. Chem., 2009. **44**(5): p. 2092-2099.
57. Apak, R., et al., *Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay*. Molecules, 2007. **12**(7): p. 1496-1547.

58. Stalikas, C.D., *Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids*. J. Sep. Sci., 2007. **30**(18): p. 3268-95.
59. Gaspar, A., et al., *Dietary Phenolic Acids and Derivatives. Evaluation of the Antioxidant Activity of Sinapic Acid and Its Alkyl Esters*. J. Agric. Food Chem., 2010.
60. Reis, B., et al., *Structure-Property-Activity Relationship of Phenolic Acids and Derivatives. Protocatechuic Acid Alkyl Esters*. J. Agr. Food Chem., 2010. **58**(11): p. 6986-6993.
61. Silva, F.A.M., et al., *Phenolic acids and derivatives: Studies on the relationship among structure, radical scavenging activity, and physicochemical parameters*. J. Agr. Food Chem., 2000. **48**(6): p. 2122-2126.
62. Natella, F., et al., *Benzoic and Cinnamic Acid Derivatives as Antioxidants: Structure-Activity Relation*. J. Agr. Food Chem., 1999. **47**(4): p. 1453-1459.
63. Fresco, P., et al., *New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols*. Med. Res. Rev., 2006. **26**(6): p. 747-66.
64. Murphy, M.P., *Selective targeting of bioactive compounds to mitochondria*. Trends. Biotechnol., 1997. **15**(8): p. 326-30.
65. Guan, L.P., et al., *Synthesis and anticonvulsant activity of N-(2-hydroxyethyl) cinnamamide derivatives*. Eur. J. Med. Chem., 2009. **44**(9): p. 3654-3657.
66. Christofi, A.M., et al., *Synthesis and structures of chromium tricarbonyl complexes of benzylic halides and benzylic alcohols*. J. Chem. Soc., Dalton Transactions, 2000 (13): p. 2137-2144.
67. Roy, A.K., B. Rajaraman, and S. Batra, *Insights into the bromination of 3-aryl-5-methyl-isoxazole-4-carboxylate: Synthesis of 3-aryl-5-bromomethyl-isoxazole-4-carboxylate as precursor to 3-aryl-5-formyl-isoxazole-4-carboxylate*. Tetrahedron, 2004. **60**(10): p. 2301-2310.
68. Glasnov, T.N., W. Stadlbauer, and C.O. Kappe, *Microwave-assisted multistep synthesis of functionalized 4-arylquinolin-2(1H)-ones using palladium-catalyzed cross-coupling chemistry*. J. Org. Chem., 2005. **70**(10): p. 3864-3870.
69. De Luca, L., G. Giacomelli, and A. Porcheddu, *An efficient route to alkyl chlorides from alcohols using the complex TCT/DMF*. Org. Lett., 2002. **4**(4): p. 553-555.
70. Mokhtari, B., R. Azadi, and A. Azhdari, *2,4,6-Trichloro-1,3,5-triazine/dimethylformamide as an efficient reagent for one-pot conversion of alcohols into N-alkylphthalimides*. Chinese Chem. Lett., 2010. **21**(2): p. 171-174.

71. Pandit, S.S., V.U. Pandit, and B.P. Bandgar, *Rapid and efficient synthesis of sulfonamides from sulfonic acid and amines using cyanuric chloride-DMF adduct*. J. Sulfur Chem., 2008. **29**(6): p. 619-622.
72. De Luca, L., G. Giacomelli, and G. Nieddu, *Synthesis of substituted benzofurans via microwave-enhanced catch and release strategy*. J. Combi. Chem., 2008. **10**(4): p. 517-520.
73. Pollastri, M.P., J.F. Sagal, and G. Chang, *The conversion of alcohols to halides using a filterable phosphine source*. Tetrahedron Lett., 2001. **42**(13): p. 2459-2460.
74. Kiddle, J.J., *Microwave irradiation in organophosphorus chemistry. Part 2: Synthesis of phosphonium salts*. Tetrahedron Lett., 2000. **41**(9): p. 1339-1341.
75. Lee, K.Y. and J.N. Kim, *Facile synthesis of phosphonium salts from alcohols*. B. Kor. Chem. Soc., 2000. **21**(8): p. 763-764.
76. Hernández, P., et al., *One-pot synthesis of benzyltriphenylphosphonium acetates from the corresponding activated benzyl alcohols*. Arkivoc, 2006. **2006**(11): p. 128-136.
77. Klein, S.M., C. Zhang, and Y.L. Jiang, *Simple synthesis of fresh alkyl iodides using alcohols and hydriodic acid*. Tetrahedron Lett., 2008. **49**(16): p. 2638-2641.
78. McNulty, J., P. Das, and D. McLeod, *Microwave-Assisted, Aqueous Wittig Reactions: Organic-Solvent- and Protecting-Group-Free Chemoselective Synthesis of Functionalized Alkenes*. Chem. – Eur. J., 2010. **16**(23): p. 6756-6760.
79. Re, R., et al., *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free Radical Bio. Med., 1999. **26**(9–10): p. 1231-1237.
80. Niki, E., *Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo*. Free Radic. Biol. Med., 2010. **49**(4): p. 503-15.
81. Bridi, R., et al., *Distribution and reactivity of gallates toward galvinoxyl radicals in SDS micellar solutions — Effect of the alkyl chain length*. Can. J. Chemistry, 2011. **89**(2): p. 181-185.
82. Yang, Y., Z.G. Song, and Z.Q. Liu, *Synthesis and antioxidant capacities of hydroxyl derivatives of cinnamoylphenethylamine in protecting DNA and scavenging radicals*. Free Radic. Res., 2011. **45**(4): p. 445-53.
83. Rice-Evans, C. and N.J. Miller, *Total antioxidant status in plasma and body fluids*. Methods Enzymol., 1994. **234**: p. 279-93.

84. Krishnaiah, D., R. Sarbatly, and R. Nithyanandam, *A review of the antioxidant potential of medicinal plant species*. Food Bioprod. Process., 2011. **89**(3): p. 217-233.
85. Feng, J.Y. and Z.Q. Liu, *Phenolic and enolic hydroxyl groups in curcumin: which plays the major role in scavenging radicals?* J. Agric. Food Chem., 2009. **57**(22): p. 11041-6.
86. Li, Y.F., Z.Q. Liu, and X.Y. Luo, *Properties of synthetic homoisoflavonoids to reduce oxidants and to protect linoleic acid and dna against oxidation*. J. Agric. Food Chem., 2010. **58**(7): p. 4126-31.
87. Blois, M.S., *Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical*. Nature, 1958. **181**(4617): p. 1199-1200.
88. Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier, and C. Berset, *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. LWT - Food Sci. Technol., 1995. **28**(1): p. 25-30.
89. Son, S. and B.A. Lewis, *Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: Structure-activity relationship*. Journal Agr. Food Chem., 2002. **50**(3): p. 468-472.
90. Bartlett, P.D. and T. Funahashi, *Galvinoxyl (2,6-Di-tert-butyl- α -(3,5-di-tert-butyl-4-oxo-2,5-cyclohexadiene-1-ylidene)-p-tolyloxy) as a Scavenger of Shorter-lived Free Radicals*. J. Am. Chem. Soc., 1962. **84**(13): p. 2596-2601.
91. Wu, W.-M., et al., *Free radical scavenging and antioxidative activities of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and its related compounds in solution and membranes: A structure-activity insight*. Food Chem., 2007. **105**(1): p. 107-115.
92. Shimakawa, S., Y. Yoshida, and E. Niki, *Antioxidant action of a lipophilic nitroxyl radical, cyclohexane-1-spiro-2'-(4'-oxyimidazolidine-1'-oxyl) -5'-spiro-1"-cyclohexane, against lipid peroxidation under hypoxic conditions*. Lipids, 2003. **38**(3): p. 225-31.
93. Barzegar, A. and A.A. Moosavi-Movahedi, *Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of curcumin*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26012.
94. Carlos, P. and G. Rubin, *Electroanalytical Techniques and Instrumentation in Food Analysis*, in Handbook of Food Analysis Instruments, 2008, CRC Press.
95. *Cyclic Voltammetry*, in Analytical and Physical Electrochemistry 2004, EFPL Press. p. 375-409.
96. Vollhardt, K.P.C.S., N. E. , *Organic Chemistry - Structure and Function*. 4th ed., 2002.

