

**Francisco António Mendes da Silva**

**SÍNTESE DE DERIVADOS DE ÁCIDOS CINÂMICOS**

**DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE  
ANTI-RADICALAR E ANTIOXIDANTE**

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

**1998**

**Francisco António Mendes da Silva**

**SÍNTESE DE DERIVADOS DE ÁCIDOS CINÂMICOS**

**DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE  
ANTI-RADICALAR E ANTIOXIDANTE**

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

**1998**

---

**Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Controlo de  
Qualidade (área de especialização: Água e Alimentos) apresentada à  
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto**

**Orientador:**

**Professora Doutora Maria Fernanda Martins Borges de Mesquita**

**Co-orientador:**

**Professora Doutora Margarida Alice Ferreira**

---

---

*À Rita,  
pelo apoio incondicional nos bons e maus momentos.*

---

---

*Aos meus pais,  
por tudo quanto fizeram por mim.*

---

---

Alguns dos resultados apresentados nesta dissertação constam das seguintes comunicações:

- Francisco A. M. Silva, M. Fernanda M. Borges (1997), "Cinnamic Acid Derivatives: Synthesis and Evaluation of Radical Scavenging Activity", 2º Encontro Nacional de Química Orgânica, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, 17-19 de Setembro de 1997 (comunicação em painel);
- Francisco A. M. Silva, M. Fernanda M. Borges, Carla Guimarães, José L. F. C. Lima, Carla Matos, Salette Reis (1997), "Determinação das constantes de ionização e da actividade anti-radicalar de ácidos cinâmicos e derivados", XI Encontro Galego-Português de Química, Universidad de la Coruña, Espanha, 26-28 de Novembro de 1997 (comunicação em painel);
- Francisco A. M. Silva, M. Fernanda M. Borges, Carla Guimarães, José L. F. C. Lima, Carla Matos, Salette Reis (1998), "Determination of dissociation constants and radical scavenger activity of ethyl esters of phenolic acids", (comunicação oral aceite para o XXIII Congresso Mundial da OIV, Lisboa, 22-27 de Junho de 1998).
- Francisco A. M. Silva, M. Fernanda M. Borges, Margarida A. Ferreira (1998), "Studies on Antioxidant and Antiradical Activities of Cinnamates", (comunicação aceite para a XIX<sup>th</sup> International Conference on Polyphenols, Lille, França, 1-4 de Setembro de 1998).

# Índice Geral

	<b>Pág.</b>
<b>Agradecimentos</b> .....	ix
<b>Resumo</b> .....	xi
<b>Abreviaturas / Símbolos</b> .....	xiii
<b>Estrutura e Apresentação</b> .....	1

## Introdução Geral

<b>1. Aspectos gerais da oxidação lipídica</b> .....	4
<b>2. Aspectos gerais da acção dos antioxidantes</b> .....	9
<b>3. Pesquisa e desenvolvimento de novos compostos antioxidantes ...</b>	12
<b>4. Bibliografia</b> .....	13

## Parte A - Síntese de Derivados de Ácidos Cinâmicos

<b>1. Introdução</b> .....	21
<b>1.1. Nomenclatura de ácidos cinâmicos e derivados</b> .....	21
<b>1.2. Processos gerais de esterificação de ácidos</b> <b>carboxílicos</b> .....	23
<b>1.3. Obtenção de ésteres de ácidos cinâmicos</b> .....	26
<b>2. Condições Experimentais</b> .....	28
<b>2.1. Instrumentação</b> .....	28
<b>2.2. Cromatografia</b> .....	29
<b>2.3. Reagentes e solventes</b> .....	30

	Pág.
2.4. Generalidades .....	30
2.5. Síntese de ésteres metílicos e propílicos de ácidos	
<i>trans</i> -cinâmicos .....	31
2.5.1. Síntese do <i>trans</i> -cafeiato de metilo .....	32
2.5.2. Síntese do <i>trans</i> -ferulato de metilo .....	33
2.5.3. Síntese do <i>trans</i> -isoferulato de metilo .....	34
2.5.4. Síntese do <i>trans</i> -hidrocafeiato de metilo .....	35
2.5.5. Síntese do <i>trans</i> -cafeiato de propilo .....	36
2.5.6. Síntese do <i>trans</i> -ferulato de propilo .....	37
2.5.7. Síntese do <i>trans</i> -isoferulato de propilo .....	38
2.5.8. Síntese do <i>trans</i> -hidrocafeiato de propilo .....	39
3. Elucidação estrutural dos ésteres sintetizados .....	40
4. Bibliografia .....	51

## Parte B – Determinação da Actividade Anti-radicalar

1. Introdução .....	56
2. Condições Experimentais .....	60
2.1. Instrumentação .....	60
2.2. Reagentes e solventes .....	60
2.3. Preparação da solução de DPPH <sup>•</sup> .....	61
2.4. Determinação da actividade anti-radicalar (Método do DPPH <sup>•</sup> ) .....	61
2.5. Descrição e análise estatística dos resultados .....	62
3. Resultados e discussão .....	63
4. Conclusão .....	89
5. Bibliografia .....	91

**Parte C – Determinação da Actividade Antioxidante**

<b>1. Introdução .....</b>	<b>98</b>
<b>2. Condições Experimentais .....</b>	<b>100</b>
<b>2.1. Instrumentação .....</b>	<b>100</b>
<b>2.2. Reagentes e solventes .....</b>	<b>101</b>
<b>2.3. Preparação das amostras .....</b>	<b>102</b>
<b>2.3.1. Estudo das condições de solubilidade do</b> <b>galhato de propilo no óleo de girassol refinado ...</b>	<b>102</b>
<b>2.3.2. Método geral de preparação das amostras .....</b>	<b>104</b>
<b>2.4. Determinação da resistência à oxidação</b> <b>(Método Rancimat) .....</b>	<b>104</b>
<b>2.5. Descrição e análise estatística dos resultados .....</b>	<b>106</b>
<b>3. Resultados e discussão .....</b>	<b>107</b>
<b>4. Conclusão .....</b>	<b>117</b>
<b>5. Bibliografia .....</b>	<b>119</b>

## Agradecimentos

À Prof. Doutora Maria Fernanda M. B. de Mesquita manifesto a minha profunda admiração e o sincero reconhecimento pelos ensinamentos ministrados, pela sua dedicação, apoio, compreensão e, sobretudo, pela amizade que em todos os momentos me dispensou. Este trabalho, embora de carácter individual, é também fruto da sua persistência e perseverança.

À Prof. Doutora Margarida A. Ferreira expresso o meu agradecimento pelos valiosos conhecimentos científicos que me transmitiu, pelas palavras de estímulo que me dirigiu e pela disponibilidade manifestada ao longo deste trabalho.

Ao Laboratório de Química Orgânica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto e ao Centro de Estudos de Química Orgânica, Fitoquímica e Farmacologia da Universidade do Porto, na pessoa da Prof. Doutora Madalena M. M. Pinto, agradeço todos os meios materiais disponibilizados para a realização deste trabalho.

À ALCO - Indústria de Óleos Alimentares, S.A., na pessoa da Eng. Maria Virgínia G. C. Moreira, agradeço a colaboração prestada ao disponibilizar instalações, aparelhagem e material, e pela cedência do óleo de girassol refinado.

Ao PRODEP II agradeço a comparticipação financeira para a realização do Curso de Mestrado.

Ao Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, na pessoa da Prof. Doutora Maria de Lourdes Bastos, agradeço toda a colaboração prestada.

Ao Prof. Doutor Artur M. S. Silva, do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, agradeço o contributo para a realização dos estudos de Ressonância Magnética Nuclear.

Ao serviço de Iconografia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, na pessoa da D. Conceição Poiães, o meu agradecimento pela colaboração na digitalização de imagens.

Aos amigos Félix Carvalho, Eduarda Fernandes e Fernando Remião, por terem estado sempre presentes e me terem incentivado, o meu sincero obrigado.

A todos quantos durante a execução deste trabalho me apoiaram ou comigo colaboraram deixo expresso o meu reconhecimento.

## Resumo

A oxidação lipídica constitui a principal causa de deterioração dos corpos gordos (lípidos e matérias gordas) e de todos os produtos que a partir deles são formulados (*e.g.* alimentos, medicamentos), contribuindo quer para uma diminuição da sua qualidade sensorial e nutricional, quer para a redução do seu tempo de vida. Para retardar o fenómeno de oxidação, recorre-se frequentemente à adição de compostos antioxidantes, de origem natural ou sintética. A insatisfação quanto à segurança toxicológica e à eficácia dos compostos actualmente usados, tem motivado um interesse crescente pela procura de novos antioxidantes a partir de compostos modelo amplamente presentes no reino vegetal (*e.g.* ácidos benzóicos e cinâmicos).

Neste trabalho procedeu-se à síntese e elucidação estrutural de derivados de ácidos cinâmicos (ésteres metílicos e propílicos dos ácidos cafeico, ferúlico, isoferúlico e hidrocafeico) (**Parte A**) e à avaliação das potenciais actividades anti-radicalar (**Parte B**) e antioxidante (**Parte C**).

Os referidos compostos foram obtidos por esterificação ácido-catalisada e a caracterização das respectivas estruturas foi efectuada por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , IV e EM-IE.

Para a determinação da actividade anti-radicalar dos compostos sintetizados, dos seus ácidos precursores, do ( $\pm$ )- $\alpha$ -tocoferol e do ácido gálhico e seus ésteres metílico e propílico, foi seleccionado um método não enzimático do tipo colorimétrico, tendo por base a reactividade dos compostos com o radical estável 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH $^\bullet$ ). Os resultados obtidos permitiram concluir que a eficácia anti-radicalar é determinada por alguns aspectos da estrutura molecular dos compostos. A esterificação parece influenciar de modo diferente o comportamento dos cinamatos e dos galhatos.

A determinação da resistência à oxidação do óleo de girassol refinado pelo método Rancimat (Metrohm), permitiu avaliar e comparar a eficácia antioxidante dos ésteres propílicos sintetizados e dos compostos antioxidantes galhato de propilo e ( $\pm$ )- $\alpha$ -

---

tocoferol. O trabalho experimental realizado permitiu estabelecer, para as condições experimentais usadas, uma ordem relativa de poder antioxidante: galhato de propilo > hidrocafeiato de propilo > cafeiato de propilo >> ( $\pm$ )- $\alpha$ -tocoferol > isoferulato de propilo > ferulato de propilo. Em termos de estabilidade oxidativa, parece não haver qualquer vantagem na adição ao óleo de girassol quer dos derivados dos ácidos ferúlico e isoferúlico, quer de um suplemento de ( $\pm$ )- $\alpha$ -tocoferol.

---

## Abreviaturas

- % Inib.** - Percentagem de inibição do DPPH<sup>•</sup>
- α-TOH** - (±)-α-Tocoferol
- A** - Absorvência
- AH** - Antioxidante primário
- AOM** - Método do oxigénio activo
- Aprox.** - Aproximadamente
- ArO<sup>•</sup>** - Radical fenoxilo
- A<sup>•</sup>** - Espécie radicalar obtida a partir de um antioxidante primário
- BHA** - Butil-hidroxianisol
- BHT** - Butil-hidroxitolueno
- B<sup>•</sup>** - Espécie radicalar
- C** - Ácido cafeico
- CC** - Cromatografia em coluna
- CCF** - Cromatografia em camada fina
- CM** - Cafeiato de metilo
- Conc.** - Concentração
- CP** - Cafeiato de propilo
- CV%** - Coeficiente de variação
- DCC** - N,N-Diciclo-hexilcarbodiimida
- DMSO-d<sub>6</sub>** - Dimetilsulfóxido hexadeuterado
- DPPH-H** - 1,1-Difenil-2-picril-hidrazina
- DPPH<sup>•</sup>** - Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo
- EHL** - Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
- EM-IE** - Espectrometria de massa por impacto electrónico
- ESR** - Ressonância electrónica de *spin*
- F** - Ácido ferúlico
- Fig.** - Figura

- FM** - Ferulato de metilo  
**FP** - Ferulato de propilo  
**FTIR** - "Fourier transform infrared"  
**G** - Ácido gálgico  
**GM** - Galhato de metilo  
**GP** - Galhato de propilo  
**HC** - Ácido hidrocafeico  
**HCM** - Hidrocafeiato de metilo  
**HCP** - Hidrocafeiato de propilo  
**HOO<sup>•</sup>** - Radical hidroperóxido  
**HO<sup>•</sup>** - Radical hidroxilo  
**I** - Ácido isoferúlico  
**IC<sub>50</sub>** - Concentração necessária para reduzir 50% da quantidade inicial de DPPH<sup>•</sup>  
**IM** - Isoferulato de metilo  
**IP** - Isoferulato de propilo  
**IUPAC** - "International Union of Pure and Applied Chemistry"  
**IV** - Infravermelho  
**lit.** - Literatura  
**M<sup>•</sup>** - Ião molecular  
**N.D.** - Não determinado  
**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** - Anião radical superóxido  
**Pág.** - Página  
**PAO** - Poder antioxidante  
**PAR** - Poder anti-radicalar  
**PF** - Ponto de fusão  
**RH** - Ácido gordo insaturado  
**RMN** - Ressonância magnética nuclear  
**RMN <sup>13</sup>C** - Ressonância magnética nuclear de carbono treze  
**RMN <sup>1</sup>H** - Ressonância magnética nuclear protónica  
**RO** - Resistência à oxidação

**ROOH** - Hidroperóxido lipídico  
**ROO<sup>•</sup>** - Radical peroxilo  
**ROS** - Espécies reactivas de oxigénio  
**RO<sup>•</sup>** - Radical alcoxilo  
**R<sup>•</sup>** - Radical alquilo  
**SAR** - Relação estrutura-actividade  
**Sens** - Fotossensibilizador no estado fundamental  
**Sens\*** - Fotossensibilizador no estado excitado  
**T amb.** - Temperatura ambiente  
**TMS** - Tetrametilsilano  
**UV** - Ultravioleta  
**UV/Vis** - Ultravioleta e visível

## Símbolos

$\lambda$  - Comprimento de onda, em nm  
 $\delta$  - Desvio químico, em ppm  
 $\nu$  - Número de onda,  $\text{cm}^{-1}$   
*d* - Duplete  
*dd* - Duplo duplete  
*J* - Constante de acoplamento, em Hz  
*m* - Multiplete  
*m/z* - Relação massa/carga  
*s* - Singuleto  
*t* - Tripleto  
*t* - Tempo  
**u.m.a.** - Unidades de massa atómica

## **Estrutura e Apresentação**

A presente dissertação encontra-se subdividida em quatro capítulos:

### **Introdução Geral**

Versa aspectos gerais da oxidação lipídica, da acção dos antioxidantes e da pesquisa e desenvolvimento de novos compostos com actividade antioxidante.

### **Parte A - Síntese de Derivados de Ácidos Cinâmicos**

Consiste na abordagem de aspectos gerais da nomenclatura de ácidos cinâmicos e derivados, e dos processos de esterificação de ácidos carboxílicos em geral e de ácidos cinâmicos em particular. É feita uma descrição das sínteses efectuadas e da elucidação estrutural dos ésteres obtidos.

### **Parte B - Determinação da Actividade Anti-radicalar**

Inclui uma abordagem geral da actuação dos antioxidantes fenólicos e a descrição do fundamento do método usado (método do DPPH<sup>•</sup>) e do trabalho experimental efectuado. Os resultados obtidos são apresentados e discutidos.

### **Parte C - Determinação da Actividade Antioxidante**

Refere aspectos gerais dos ensaios de estabilidade dos lípidos e do tipo de substrato lipídico usado. Descreve o fundamento do método utilizado (método do Rancimat), o trabalho experimental realizado e os resultados obtidos. Inclui ainda a sua interpretação e respectiva conclusão.

A bibliografia usada encontra-se indicada no final de cada um dos capítulos.

## **Introdução Geral**

## Índice

	<b>Pág.</b>
<b>1. Aspectos gerais da oxidação lipídica .....</b>	<b>4</b>
<b>2. Aspectos gerais da acção dos antioxidantes .....</b>	<b>9</b>
<b>3. Pesquisa e desenvolvimento de novos compostos antioxidantes ...</b>	<b>12</b>
<b>4. Bibliografia .....</b>	<b>13</b>

## 1. Aspectos gerais da oxidação lipídica

Os lípidos desempenham um importante papel no que respeita à qualidade de certos produtos alimentares, particularmente em relação às propriedades organolépticas que os tornam desejáveis (*e.g. flavour, côr, textura*). Por outro lado, conferem valor nutritivo aos alimentos, constituindo uma fonte de energia metabólica, de vitaminas lipossolúveis (*e.g. A, D, E e K*) e de ácidos gordos essenciais (*e.g. ácidos linoleico, linolénico e araquidónico*) [1]. Alguns destes aspectos aplicam-se igualmente a outros tipos de produtos como os cosméticos e os medicamentos.

A oxidação lipídica é um fenómeno espontâneo e inevitável, constituindo a principal causa de deterioração dos corpos gordos (lípidos e matérias gordas) e todos os produtos que a partir deles são formulados (*e.g. alimentos, cosméticos, medicamentos*). Afastados do seu contexto de protecção natural, os corpos gordos sofrem alterações do tipo oxidativo, no decurso de processos de transformação e armazenamento, as quais têm uma implicação directa na qualidade sensorial e nutricional, na segurança, no tempo de vida e no valor comercial dos produtos. O ranço representa, para o consumidor ou para o transformador industrial, uma importante causa de depreciação ou rejeição dos produtos, razão pela qual o controlo da estabilidade oxidativa dos produtos lipídicos se revela um aspecto essencial [2-9].

Os fenómenos de oxidação dos corpos gordos dependem de mecanismos reaccionais diversos e extremamente complexos, os quais estão relacionados com o tipo de estrutura lipídica e o meio onde esta se encontra. O número e a natureza das insaturações presentes, o tipo de interface entre os lípidos e o oxigénio (fase lipídica contínua, dispersa ou em emulsão), a exposição à luz, o calor, a presença de agentes pró-oxidantes (*e.g. iões metálicos de transição*) ou antioxidantes, são factores determinantes da estabilidade oxidativa dos lípidos [10-12].

Os ácidos gordos insaturados são o principal alvo da degradação oxidativa, a qual pode ocorrer por várias vias, em função do meio e dos agentes catalisadores (**fig. 1**).

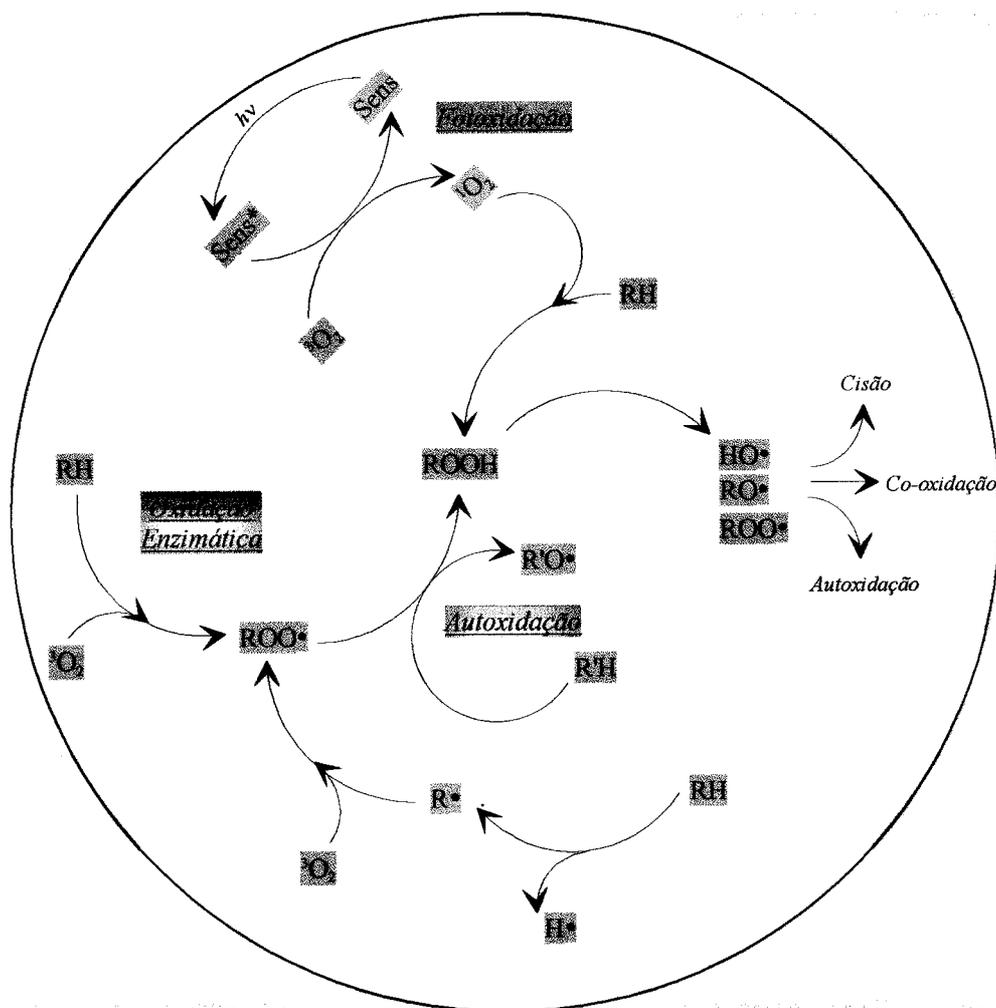


Fig. 1 - Diversidade dos mecanismos de oxidação (adaptado de [10]).

### Fotoxidação:

O mecanismo de fotoxidação de gorduras insaturadas é promovido essencialmente pela radiação UV em presença de sensibilizadores (*e.g.* clorofila, mioglobina), e envolve a participação de oxigénio singuleto ( ${}^1O_2$ ) como intermediário reactivo [10, 13, 14].

O processo envolve reacções radiculares, cujo resultado é a formação de hidroperóxidos diferentes dos que se observam na ausência da luz e de sensibilizadores, e que por degradação posterior originam aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos [8, 15].

**Autoxidação:**

A autoxidação é um processo dinâmico que evolui ao longo do tempo.

Trata-se de um fenómeno puramente químico e bastante complexo, envolvendo reacções radicalares capazes de auto-propagação, e que dependem do tipo de acção catalítica (temperatura, iões metálicos, radicais livres, pH) [10].

A sequência reaccional é classicamente dividida em três etapas (**fig. 2**) [1]:

- **Iniciação**, durante a qual ocorre a formação de um radical lipídico (**2**) após abstracção de um átomo de hidrogénio alílico a partir de uma molécula de ácido gordo insaturado (**1**) por acção de um iniciador.
- **Propagação**, desencadeada pela reacção rápida dos radicais lipídicos com o oxigénio molecular originando a formação de radicais peroxilo (**3**). Estes podem por sua vez reagir com novas moléculas de ácido gordo insaturado, com conseqüente formação de novos radicais lipídicos e de hidroperóxidos (**4**). A quebra homolítica da ligação O-O dos hidroperóxidos pode igualmente originar a formação de outras espécies radicalares, nomeadamente radicais alcoxilo (**5**) e hidroxilo (**6**), ajudando a propagar a cadeia reaccional.
- **Terminação**, a qual envolve a reacção entre dois radicais com formação de produtos não radicalares estáveis. Desta forma ocorre a interrupção da etapa de propagação.

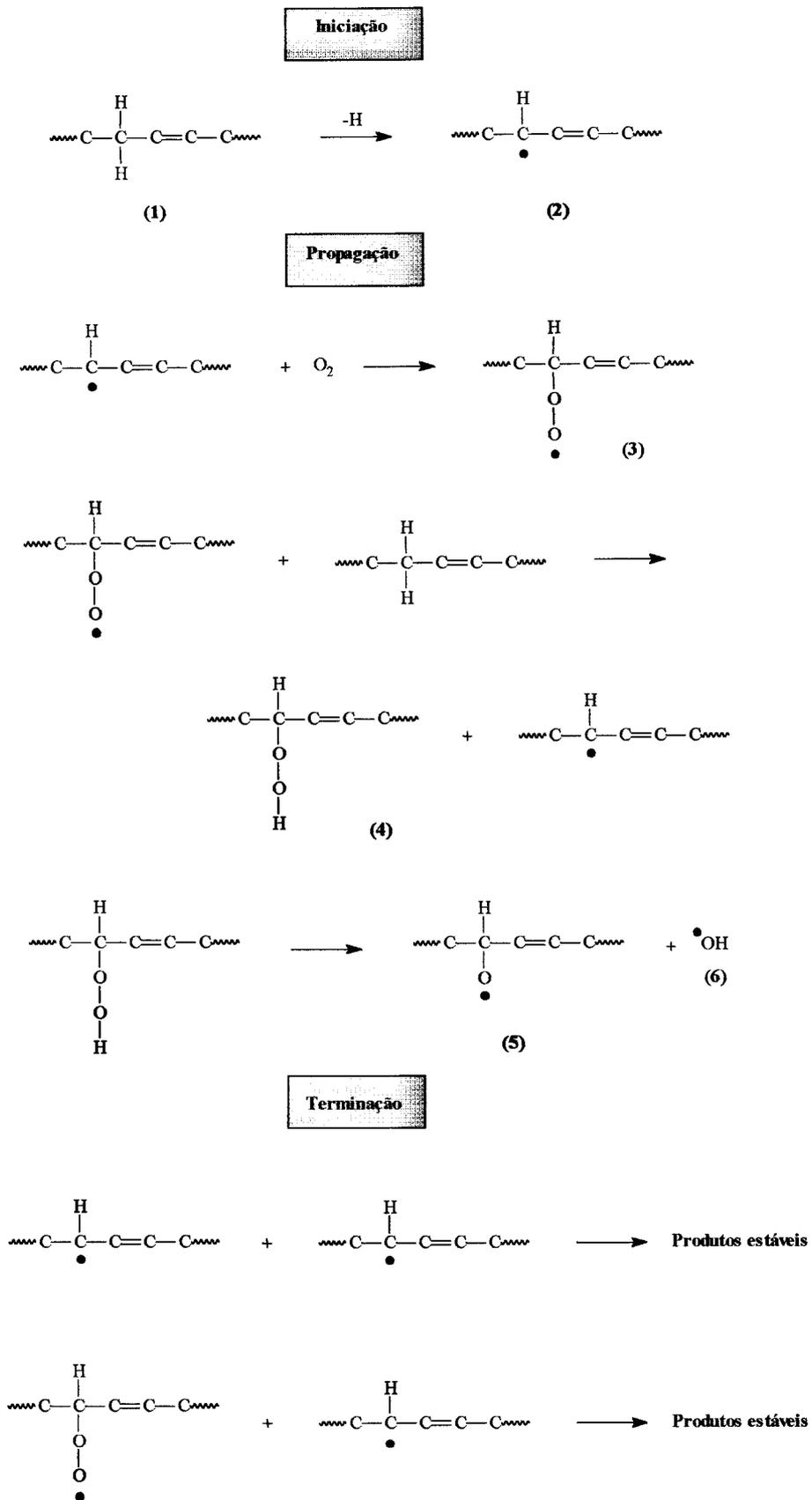


Fig. 2 – Etapas do processo de autoxidação.

A evolução oxidativa de uma matéria gorda compreende três estágios sequenciais (fig. 3) [2, 10, 11, 15, 16]:

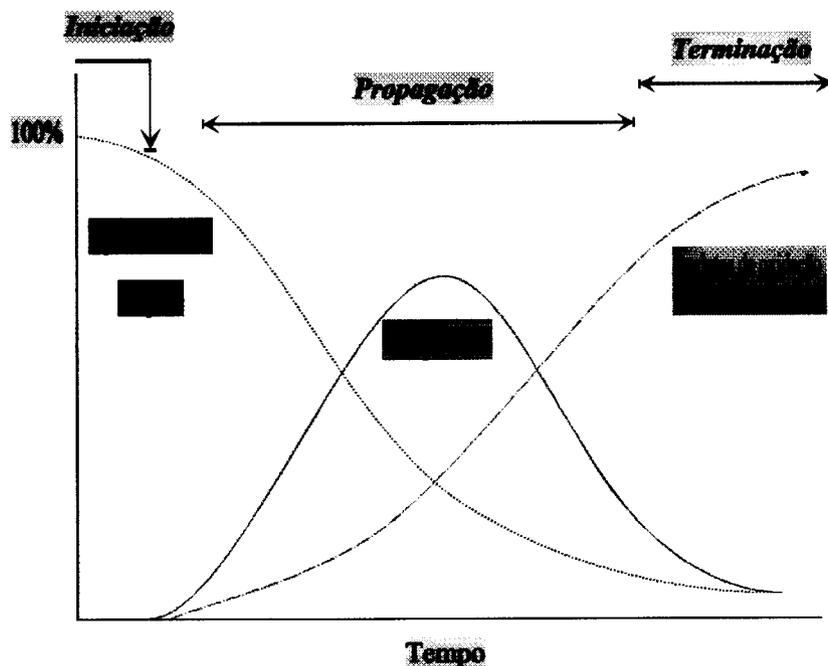


Fig. 3 - Evolução oxidativa de uma matéria gorda [10].

1. Desaparecimento dos substratos de oxidação (oxigênio, lipídio insaturado).
2. Aparecimento dos produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos instáveis), cuja estrutura depende da natureza dos ácidos gordos presentes.
3. Aparecimento dos produtos secundários de oxidação (compostos voláteis e não voláteis) obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos e cuja natureza e proporção dependem de diversos parâmetros. A formação deste tipo de produtos (*e.g.* aldeídos, cetonas, álcoois, e hidrocarbonetos) está directamente relacionada com as alterações das propriedades sensoriais (*e.g.* aparecimento de *off flavours* e *off odors*) e físico-químicas dos produtos oxidados [11].

A extensão do processo de autoxidação é determinada pela quantidade e tipo de substratos de oxidação e pela interacção entre as espécies radicalares envolvidas.

### **Oxidação Enzimática:**

A oxidação lipídica pode ocorrer por catálise enzimática, nomeadamente por acção da lipoxigenase. Esta enzima actua sobre os ácidos gordos poliinsaturados (*e.g.* ácidos linoleico e linolénico, e seus ésteres), catalisando a adição de oxigénio à cadeia hidrocarbonada poliinsaturada. O resultado é a formação de peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas, os quais podem envolver-se em diferentes reacções degradativas, semelhantes às observadas para os processos de autoxidação, originando diversos produtos [17]. O processo de catálise enzimática decorre com maior especificidade, em termos de substrato e de produtos finais, do que o processo de autoxidação [15].

Um aspecto importante da actuação da lipoxigenase é o que se relaciona com a sua capacidade para co-oxidar substratos (carotenóides, tocoferóis, clorofila, proteínas, etc.), sendo responsável pela iniciação de novos processos oxidativos [15].

## **2. Aspectos gerais da acção dos antioxidantes**

Nos últimos anos, a preocupação constante de proporcionar aos consumidores produtos de alta qualidade levou à adopção de medidas que permitem reduzir ou limitar o fenómeno de oxidação durante as fases de processamento, manuseamento e armazenagem dos produtos [2, 18, 19]:

- escolha de processos que limitem as operações de arejamento e os tratamentos térmicos;

- utilização de matérias-primas refinadas, de boa qualidade, com baixos teores de água e isentas de agentes pró-oxidantes;
- armazenamento a baixas temperaturas e em atmosfera inerte;
- adição de antioxidantes;
- utilização de embalagens estanques e opacas à radiação UV;
- etc.

Deste conjunto de acções, a adição de compostos antioxidantes é, sem dúvida, uma das práticas mais frequentes [11].

Os antioxidantes podem definir-se como substâncias que, numa concentração consideravelmente menor que a do substrato oxidável, retardam o processo oxidativo, diminuindo a velocidade inicial da reacção ou prolongando o seu período de indução. Contudo, não suprimem de forma definitiva o fenómeno da oxidação lipídica [2, 10, 20].

O seu uso está sujeito a legislação positiva (natureza, domínio e dose de aplicação). Baixo custo de obtenção, facilidade de emprego, eficácia, termorresistência, “neutralidade” organoléptica e ausência reconhecida de toxicidade, são algumas das premissas para a sua utilização a nível industrial [2, 21, 22].

De acordo com a sua função, os antioxidantes podem subdividir-se em primários ou terminadores de cadeia (*chain-breaking*), preventivos e secundários [23, 24].

Os antioxidantes primários ou terminadores de cadeia actuam ao nível das etapas de iniciação ou de propagação do processo de autooxidação, promovendo o bloqueio da cadeia reaccional radicalar (**fig. 4**). O mecanismo de acção geralmente aceite para este tipo de compostos envolve a cedência de electrões ou átomos de hidrogénio aos radicais presentes (*e.g.* radicais alquilo ( $R^\bullet$ ), peroxilo ( $ROO^\bullet$ ) e alcoxilo ( $RO^\bullet$ )), os quais são convertidos em produtos mais estáveis (*e.g.* RH, ROH, ROOH). Paralelamente ocorre a formação de novas espécies radicalares ( $A^\bullet$ ) a partir das moléculas do antioxidante (AH), as quais são suficientemente estáveis e incapazes de iniciar e/ou propagar a cadeia reaccional [23-25].



- Regeneração de antioxidantes primários através da cedência de átomos de H aos radicais formados após a sua actuação;
- *Quenching* de oxigénio singuleto ( $^1\text{O}_2$ ) (*e.g.*  $\beta$ -caroteno);
- Funções múltiplas conjugando algumas das formas de actuação anteriormente descritas.

Encontram-se descritos alguns efeitos sinérgicos entre compostos antioxidantes primários e preventivos. A acção sinergista resulta da combinação dos respectivos mecanismos de actuação e permite, em algumas situações, reduzir a dose eficaz dos antioxidantes primários e alargar o seu campo de aplicação [23, 24].

É importante referir que em certas situações (*e.g.* concentrações elevadas) os antioxidantes podem exercer um efeito pró-oxidante, favorecendo os processos de degradação oxidativa [23, 24].

### 3. Pesquisa e desenvolvimento de novos compostos antioxidantes

A maior parte dos antioxidantes usados comercialmente são compostos fenólicos de origem natural (*e.g.* tocoferóis) ou sintética (*e.g.* alquilgalhatos, BHT, BHA), os quais actuam de uma forma geral como antioxidantes primários.

Os antioxidantes de origem sintética têm revelado maior capacidade de protecção contra os fenómenos oxidativos. No entanto, questões que se relacionam directamente com a toxicidade de alguns desses compostos (*e.g.* suspeita de actuação do BHT como promotor da carcinogénese) conduziram à sua rejeição generalizada, independentemente das sua alta estabilidade, baixo custo e outras vantagens tecnológicas [26-29].

A realização de diversos trabalhos com extractos de plantas tem permitido isolar e identificar novos compostos com propriedades antioxidantes, a maior parte dos quais apresenta estruturas fenólicas (*e.g.* ácidos fenólicos, flavonoides) [6, 30-32]. Porém, esses compostos de origem natural têm demonstrado na maior parte dos casos uma

menor eficácia de acção quando comparados com os antioxidantes sintéticos legalmente permitidos, facto para o qual contribui sobretudo a sua menor estabilidade nas condições normais de processamento e manuseamento dos produtos [3].

A insatisfação quanto à eficácia e segurança dos compostos antioxidantes actualmente usados em produtos alimentares, cosméticos ou medicamentos, motiva a realização de estudos de pesquisa e desenvolvimento de novos antioxidantes, obtidos não só a partir de fontes naturais, mas também por síntese química total ou por modificação molecular.

Os ácidos fenólicos do tipo benzóico e cinâmico encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal, fazendo parte do sistema antioxidante endógeno [33]. Estes compostos encontram-se sobretudo na forma de ésteres de ácidos orgânicos ou de glicosídeos, e raramente como ácidos livres [34-39]. Como consequência dessa ubiquidade encontram-se também presentes em muitos alimentos, influenciando de modo significativo algumas das suas propriedades, nomeadamente as características organolépticas, a estabilidade e o valor nutricional [34, 40-42].

Os diferentes tipos de actividades biológicas associadas a este grupo de compostos (*e.g.* anti-inflamatória, antiviral, antitrombótica, anticarcinogénica, antimutagénica, antioxidante) justificam o potencial interesse da sua aplicação em diferentes áreas, nomeadamente alimentar e farmacêutica [34, 40, 42-51].

Os resultados promissores de alguns estudos de determinação da potencial actividade anti-radicalar e/ou antioxidante de derivados de ácidos benzóicos e cinâmicos, sugerem a escolha deste grupo de compostos como modelo para a obtenção de novos antioxidantes [34, 42, 45, 46, 49, 50].

O tipo de metodologias a usar para a avaliação da actividade anti-radicalar e/ou antioxidante foram já revistas num trabalho anteriormente apresentado [33].

#### 4. Bibliografia

- [1] St. Angelo A.J. (1996). Lipid Oxidation in Foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 36 (3), 175-224.

- 
- [2] Castera-Rossignol A., Bosque F. (1994). Nouvelle approche des anti-oxydants. *OCL*, 1 (2), 131-143.
- [3] Alaiz M., Zamora R., Hidalgo F.J. (1995). Natural Antioxidants Produced in Oxidized Lipid/Amino Acid Browning Reactions. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72 (12), 1571-1575.
- [4] Reynhout G. (1991). The Effect of Temperature on the Induction Time of a Stabilized Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68 (12), 983-984.
- [5] Nwosu C.V., Boyd L.C., Sheldon B. (1997). Effect of Fatty Acid Composition of Phospholipids on Their Antioxidant Properties and Activity Index. *J. Am Oil Chem. Soc.*, 74 (3), 293-297.
- [6] Madsen H.L., Bertelsen G. (1995). Spices as antioxidants. *Trends Food Sci. Technol.*, 6, 271-277.
- [7] Frankel E.N. (1993). In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends Food Sci. Technol.*, 4 (7), 220-225.
- [8] Madhavi D.L., Deshpande S.S., Salunkhe D.K., Jadhav S.J., Nimbalkar S.S., Kulkarni A.D. (1996), in *Food Antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Perspectives*. Edited by Madhavi D.L., Deshpande S.S., Salunkhe D.K., Marcel Dekker Inc., New York, pp 5-63.
- [9] Sherwin E.R. (1978). Oxidation and Antioxidants in Fat and Oil Processing. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 55 (11), 809-814.
- [10] Berset C., Cuvelier M.-E. (1996). Méthodes d'évaluation du degré d'oxydation des lipides et de mesure du pouvoir antioxydant. *Sciences des Aliments*, 16 (3), 219-245.
- [11] Coupland J.N., McClements D.J. (1996). Lipid oxidation in food emulsions. *Trends Food Sci. Technol.*, 7 (3), 83-91.
- [12] Frankel E.N., Huang S.-W., Kanner J., German J.B. (1994). Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants: Bulk Oils vs Emulsions. *J. Agric. Food Chem.*, 42 (5), 1054-1059.
- [13] Sims R.J., Fioriti J.A. (1980). Antioxidants as Stabilizers for Fats, Oils, and Lipid-Containing Foods, in *CRC Handbook of Food Additives*, Edited by Furia T.E., CRC Press Inc., 2<sup>nd</sup> edition, vol. II, pp 13-56.
- [14] Chen C.-W., Lee T.C., Ho C.T. (1997). Antioxidative Effect and Kinetics Study of Capsanthin on the Chlorophyll-Sensitized Photooxidation of Soybean Oil and Selected Flavor Compounds, in *ACS*

Symposium Series 660: Spices: Flavor Chemistry and Antioxidant Properties. Edited by Sara J. Risch, Chi-Tang Ho, ACS, Washington, pp 188-198.

[15] Hamilton R.J., Rossell J.B., Hudson B.J.F., Lölinger J. (1983), in Rancidity in Foods. Edited by Allen J.C., Hamilton R.J., Applied Science Publishers LTD., London, pp 1-107.

[16] Ladikos D., Lougovois V. (1990). Lipid Oxidation in Muscle Foods: A Review. *Fd Chem.*, 35, 295-314.

[17] Halliwell B., Murcia M.A., Chirico S., Aruoma O.I. (1995). Free Radicals and Antioxidants in Food and *In Vivo*: What They Do and How They Work. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 35 (1-2), 7-20.

[18] Memoli A., Palermiti L.G., Travagli V., Alhaique F. (1996). Studies of Differently Induced Peroxidation Phenomena in Lecithins. *J. Agric. Food Chem.*, 44 (9), 2814-2817.

[19] Akers M.J. (1985). Drug Stabilization against Oxidative Degradation. *J. Chem. Educ.*, 62 (4), 325-327.

[20] Halliwell B., Aeschbach R., Lölinger J., Aruoma O.I. (1995). The Characterization of Antioxidants. *Fd Chem. Toxic.*, 33 (7), 601-617.

[21] Gordon M.H., Kouřimská L. (1995). The Effects of Antioxidants on Changes in Oils during Heating and Deep Frying. *J. Sci. Food Agric.*, 68, 347-353.

[22] Coppen P.P. (1983), in Rancidity in Foods. Edited by Allen J.C., Hamilton R.J., Applied Science Publishers LTD., London, pp 67-87.

[23] Rajalakshmi D., Narasimhan S. (1996), in Food Antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Perspectives. Edited by Madhavi D.L., Deshpande S.S., Salunkhe D.K., Marcel Dekker Inc., New York, pp 65-157.

[24] Papas A.M. (1993). Oil-soluble Antioxidants in Foods. *Toxicology and Industrial Health*, 9 (1-2), 123-149.

[25] Scott G. (1985). Antioxidants *in vitro* and *in vivo*. *Chemistry in Britain*, 7, 648-653.

- [26] Milovanovic M., Picuric-Jovanovic K., Vucelic-Radovic B., Vrbaski Z. (1996). Antioxidant Effects of Flavonoids of *Anthriscus sylvestris* in Lard. *J. Am Oil Chem. Soc.*, 73 (6), 773-776.
- [27] Chen Q., Shi H., Ho C.-T. (1992). Effects of Rosemary Extracts and Major Constituents on Lipid Oxidation and Soybean Lipoxygenase Activity. *J. Am Oil Chem. Soc.*, 69 (10), 999-1002.
- [28] Barata E., Guillemin L., Rodrigues L., Morais J.G. (1995). Aplicação da oxigrafia ao estudo da actividade anti-oxidante. *Rev. Port. Farm.*, 45 (3), 95-99.
- [29] Wong J.W., Hashimoto K., Shibamoto T. (1995). Antioxidant Activities of Rosemary and Sage Extracts and Vitamin E in a Model Meat System. *J. Agric. Food Chem.*, 43 (10), 2707-2712.
- [30] Madsen H.L., Bertelsen G., Skibsted L.H. (1997). Antioxidative Activity of Spices and Spice Extracts, in ACS Symposium Series 660: Spices: Flavor Chemistry and Antioxidant Properties. Edited by Sara J. Risch, Chi-Tang Ho, ACS, Washington, pp 176-187.
- [31] Cuvelier M.-E., Richard H., Berset C. (1996). Antioxidative Activity and Phenolic Composition of Pilot-Plant and Commercial Extracts of Sage and Rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73 (5), 645-652.
- [32] Blekas G., Tsimidou M., Boskou D. (1995). Contribution of  $\alpha$ -tocopherol to olive oil stability. *Food Chem.*, 52, 289-294.
- [33] Silva, F.A.M. (1997). "Sistemas Antioxidantes Endógenos. Métodos de Avaliação do Grau de Oxidação Lipídica e da Capacidade Antioxidante". Trabalho de Seminário do Curso de Mestrado em Controlo de Qualidade, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto.
- [34] Chen J.H., Ho C.-T. (1997). Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (7), 2374-2378.
- [35] Choi S.W., Sapers G.M. (1994). Purpling Reaction of Sinapic Acid Model Systems Containing L-DOPA and Mushroom Tyrosinase. *J. Agric. Food Chem.*, 42 (5), 1183-1189.
- [36] Cilliers J.J.L., Singleton V.L. (1989). Nonenzymatic Autoxidative Phenolic Browning Reactions in a Caffeic Acid Model System. *J. Agric. Food Chem.*, 37 (4), 890-896.
- [37] Rosazza J.P.N., Huang Z., Dostal L., Volm T., Rousseau B. (1995). Review: Biocatalytic transformations of ferulic acid: an abundant aromatic natural product. *J. Ind. Microbiol.*, 15, 457-471.

- [38] Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1996). Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radic. Biol. Med.*, 20 (7), 933-956.
- [39] Larson R.A. (1988). The Antioxidants of Higher Plants. *Phytochemistry*, 27 (4), 969-978.
- [40] Yamanaka N., Oda O., Nagao S. (1997). Prooxidant activity of caffeic acid, dietary non-flavonoid phenolic acid, on Cu<sup>2+</sup>-induced low density lipoprotein oxidation. *FEBS Letters*, 405, 186-190.
- [41] Sem A., Miller S.S., Arnason J.T., Fulcher R.G. (1991). Quantitative Determination by High Performance Liquid Chromatography and Microspectrofluorimetry of Phenolic Acids in Maize Grain. *Phytochemical Analysis*, 2, 225-229.
- [42] Terao J., Karasawa H., Arai H., Nagao A., Suzuki T., Takama K. (1993). Peroxyl Radical Scavenging Activity of Caffeic Acid and Its Related Phenolic Compounds in Solution. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57 (7), 1204-1205.
- [43] von Gadow A., Joubert E., Hansmann C.F. (1997). Effect of Extraction Time and Additional Heating on the Antioxidant Activity of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*) Extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (4), 1370-1374.
- [44] Yanishlieva N.V., Marinova E.M. (1995). Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. *Food Chem.*, 54 (4), 377-382.
- [45] Marinova E.M., Yanishlieva N.V. (1994). Effect of Lipid Unsaturation on the Antioxidative Activity of Some Phenolic Acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71 (4), 427-434.
- [46] von Gadow A., Joubert E., Hansmann C.F. (1997). Comparison of the Antioxidant Activity of Aspalathin with That of Other Plant Phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*),  $\alpha$ -Tocopherol, BHT and BHA. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (3), 632-638.
- [47] Foti M., Piattelli M., Baratta M.T., Ruberto G. (1996). Flavonoids, Coumarins and Cinnamic Acids as Antioxidants in a Micellar System. Structure-Activity Relationship. *J. Agric. Food Chem.*, 44 (2), 497-501.
- [48] Laranjinha J.A.N., Almeida L.M., Madeira V.M.C. (1994). Reactivity of Dietary Phenolic Acids with Peroxyl Radicals: Antioxidant Activity upon Low Density Lipoprotein Peroxidation. *Biochem. Pharmacol.*, 48 (3), 487-494.

[49] Cuvelier M.-E., Richard H., Berset C. (1992). Comparison of the Antioxidative Activity of Some Acid-phenols: Structure-Activity Relationship. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56 (2), 324-325.

[50] Brand-Williams W., Cuvelier M.-E., Berset C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 28, 25-30.

[51] Borges M.F.M. (1994). “Síntese de produtos naturais com potencial actividade biológica e obtenção de derivados”. Tese de Doutoramento, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

# **Parte A**

## **Síntese de Derivados de Ácidos Cinâmicos**

**Índice**

	<b>Pág.</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>21</b>
<b>1.1. Nomenclatura de ácidos cinâmicos e derivados .....</b>	<b>21</b>
<b>1.2. Processos gerais de esterificação de ácidos</b>	
<b>carboxílicos .....</b>	<b>23</b>
<b>1.3. Obtenção de ésteres de ácidos cinâmicos .....</b>	<b>26</b>
<b>2. Condições Experimentais .....</b>	<b>28</b>
<b>2.1. Instrumentação .....</b>	<b>28</b>
<b>2.2. Cromatografia .....</b>	<b>29</b>
<b>2.3. Reagentes e solventes .....</b>	<b>30</b>
<b>2.4. Generalidades .....</b>	<b>30</b>
<b>2.5. Síntese de ésteres metílicos e propílicos de ácidos</b>	
<b><i>trans</i>-cinâmicos .....</b>	<b>31</b>
<b>2.5.1. Síntese do <i>trans</i>-cafeiato de metilo .....</b>	<b>32</b>
<b>2.5.2. Síntese do <i>trans</i>-ferulato de metilo .....</b>	<b>33</b>
<b>2.5.3. Síntese do <i>trans</i>-isoferulato de metilo .....</b>	<b>34</b>
<b>2.5.4. Síntese do <i>trans</i>-hidrocafeiato de metilo .....</b>	<b>35</b>
<b>2.5.5. Síntese do <i>trans</i>-cafeiato de propilo .....</b>	<b>36</b>
<b>2.5.6. Síntese do <i>trans</i>-ferulato de propilo .....</b>	<b>37</b>
<b>2.5.7. Síntese do <i>trans</i>-isoferulato de propilo .....</b>	<b>38</b>
<b>2.5.8. Síntese do <i>trans</i>-hidrocafeiato de propilo .....</b>	<b>39</b>
<b>3. Elucidação estrutural dos ésteres sintetizados .....</b>	<b>40</b>
<b>4. Bibliografia .....</b>	<b>51</b>

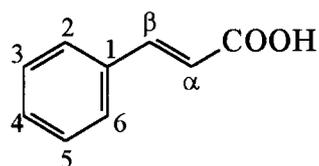
## 1. Introdução

### 1.1. Nomenclatura de ácidos cinâmicos e derivados

Os princípios gerais da nomenclatura de produtos naturais e compostos relacionados estão descritos na seção F da IUPAC [1]. De um modo geral é recomendado o uso de nomes triviais para compostos naturais e nomes semissistemáticos para compostos estruturalmente relacionados, de origem natural ou sintética.

O termo “ácido cinâmico” é usado para designar o composto da **fig. 1**. A denominação genérica de ácidos cinâmicos engloba os compostos que possuem a estrutura geral do ácido cinâmico e substituintes em diferentes posições.

O sistema de numeração indicado na estrutura da **fig. 1** está de acordo com as regras da IUPAC para a classificação trivial e/ou semissistemática [1]. O nome sistemático do ácido cinâmico, recomendado pelo *Chemical Abstracts*, corresponde ao ácido 3-fenil-2-propenóico [2].



**Fig. 1** – Estrutura do ácido cinâmico.

Uma das propriedades características dos ácidos cinâmicos é a possibilidade de existência de isomerismo *cis/trans*. Actualmente o *Chemical Abstracts* propõe para estes compostos a nomenclatura *Z* e *E* (e.g. o ácido *trans*-cinâmico, acima representado, é designado por (*E*)-3-fenil-2-propenóico) [2, 3]. Embora esta convenção seja aceite pela IUPAC, a organização salvaguarda que “o uso desta nomenclatura não impede a

aplicação da designação *trans* e *cis* nas discussões de relações estéricas de um tipo genérico ou grupos de interesse particular” [1].

Os nomes triviais e semissistemáticos dos ácidos *trans*-cinâmicos referidos ao longo desta dissertação estão indicados na **tabela 1**.

Compostos		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Nome trivial	Nome semissistemático		
Ácido cafeico (C)	Ácido 3,4-diidroxicinâmico	OH	OH
Ácido ferúlico (F)	Ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico	OH	OCH <sub>3</sub>
Ácido Isoferúlico (I)	Ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico	OCH <sub>3</sub>	OH

**Tabela 1 - Nomes triviais e semissistemáticos de ácidos *trans*-cinâmicos.**

O análogo do ácido *trans*-cafeico hidrogenado nas posições  $\alpha$  e  $\beta$  corresponde ao composto com o nome trivial de ácido hidrocafeico (HC) ou diidrocafeico, e nome semissistemático ácido 3,4-diidroxí-hidrocinâmico, o qual será igualmente citado neste trabalho.

Os ésteres dos ácidos cinâmicos (-COOR) são designados genericamente de cinamatos. A nomenclatura usada para estes compostos é a consagrada pela IUPAC para os ésteres dos ácidos carboxílicos (*e.g.* o éster metílico do ácido *trans*-cinâmico é designado por *trans*-cinamato de metilo). É normalmente mantida a numeração do ácido cinâmico correspondente [1].

Ao longo deste trabalho serão usados, preferencialmente, os nomes triviais dos compostos, de acordo com a convenção da IUPAC. A nomenclatura segundo as normas do *Chemical Abstracts* está incluída em 2. (pág. 28) [2].

## 1.2. Processos gerais de esterificação de ácidos carboxílicos

Os ácidos carboxílicos podem reagir com álcoois originando a formação de ésteres. Esta reacção de condensação é genericamente designada de esterificação (fig. 2) [4].

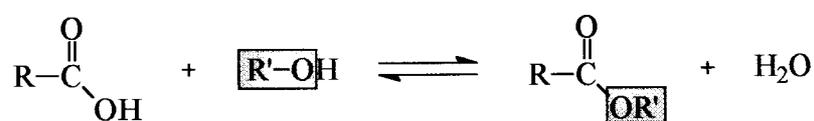


Fig. 2 – Equação geral da reacção de esterificação.

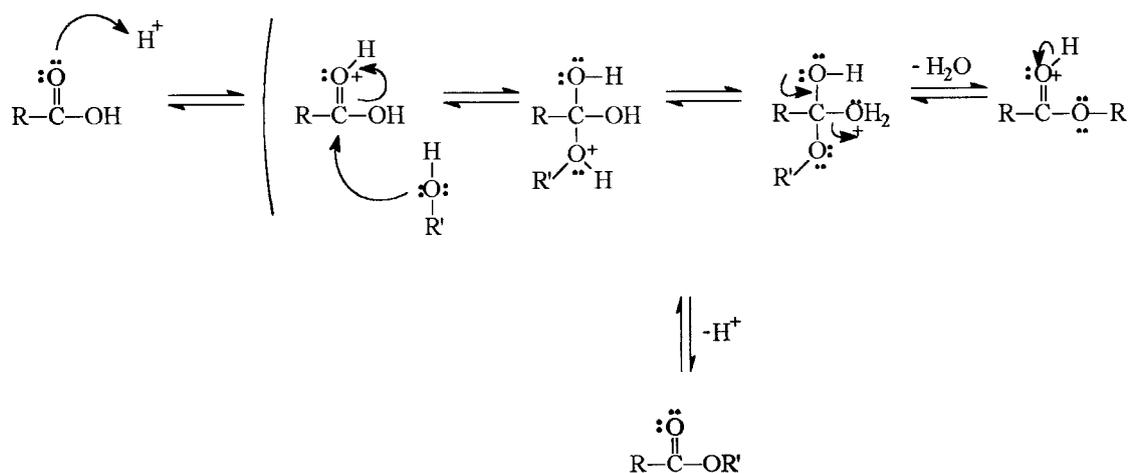
As reacções de esterificação são reversíveis e ocorrem muito lentamente na ausência de catalisadores. Contudo, quando se usa um ácido forte (*e.g.* ácido sulfúrico ou ácido clorídrico) como catalisador (esterificação de Fischer), este tipo de reacções atinge o equilíbrio ao fim de poucas horas. Como a posição de equilíbrio determina a quantidade de éster que se forma, o uso de um dos produtos de partida (ácido carboxílico ou álcool) em excesso aumenta o rendimento da reacção, em função da quantidade de reagente limitante presente no meio reaccional [4, 5].

O rendimento dos processos de esterificação pode também ser melhorado através da remoção de água à medida que esta se forma no meio reaccional (*e.g.* por destilação simples, por destilação de uma mistura azeotrópica com benzeno ou com auxílio de tamises moleculares), ou em alternativa promovendo o aquecimento do meio reaccional [4-6].

A activação de ácidos carboxílicos, e a subsequente conversão em ésteres, pode ser efectuada na presença de um agente condensante. Entre os mais citados incluem-se carbodiimidas (*e.g.* N,N-diciclo-hexilcarbodiimida (DCC)) e os derivados do imidazol (*e.g.* N,N'-carbonildiimidazol) [7-9].

Os factores estéricos afectam a velocidade da reacção de esterificação. A presença de grupos volumosos nas moléculas dos reagentes (ácido e/ou álcool) compromete significativamente o sucesso da reacção. Este facto explica os fracos rendimentos obtidos em processos de esterificação directa envolvendo álcoois terciários [5].

A esterificação ácido-catalisada ocorre segundo um mecanismo típico de adição nucleofílica (**fig.3**):

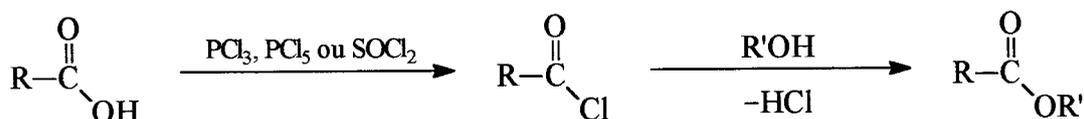


**Fig. 3 – Mecanismo da reacção de esterificação com catalise ácida.**

A esterificação via cloreto de acilo ou anidrido de ácido constitui um método alternativo à esterificação directa.

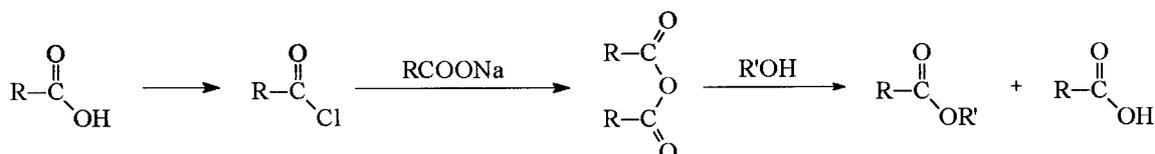
A preparação de cloretos de acilo a partir dos ácidos correspondentes é normalmente efectuada com tricloreto de fósforo ( $\text{PCl}_3$ ), pentacloreto de fósforo ( $\text{PCl}_5$ ) ou cloreto de tionilo ( $\text{SOCl}_2$ ). Os cloretos de acilo são mais reactivos que os correspondentes ácidos carboxílicos, pelo que a reacção de adição nucleofílica ocorre

mais rapidamente e com bom rendimento, não necessitando do catalisador (**fig. 4**) [5]. Por vezes é frequente a adição de piridina ao meio reaccional, a qual reage não só com o HCl que se liberta, evitando a ocorrência de reacções laterais ácido-catalisadas, mas também com o cloreto de acilo, formando um intermediário ainda mais reactivo [4].



**Fig. 4 – Obtenção de ésteres via cloreto de acilo.**

Os anidridos de ácidos carboxílicos podem também reagir com álcoois e conduzir à obtenção de ésteres (**fig. 5**) [4]. Os anidridos de ácido podem obter-se, entre outros processos, pela reacção do respectivo cloreto de acilo com o sal sódico do ácido [5].



**Fig. 5 – Obtenção de ésteres via anidrido de ácido.**

O processo de transesterificação, catalisada por um ácido ou por uma base, permite igualmente obter ésteres (**fig. 6**). Este método permite a conversão de ésteres de baixo ponto de ebulição em ésteres de ponto de ebulição superior. O mecanismo reaccional subjacente é idêntico ao da hidrólise de um éster [6, 10].

Na transesterificação, o equilíbrio é deslocado no sentido dos produtos pelo aquecimento a refluxo do meio reaccional [4, 6].

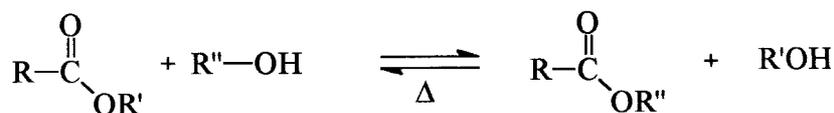


Fig. 6 – Esquema geral do processo de transesterificação.

Encontra-se ainda referido na literatura um outro processo de obtenção de ésteres com base na reacção de sais sódicos dos ácidos carboxílicos com brometos e iodetos de alquilo primários e secundários, à temperatura ambiente e em solventes apróticos dipolares [6].

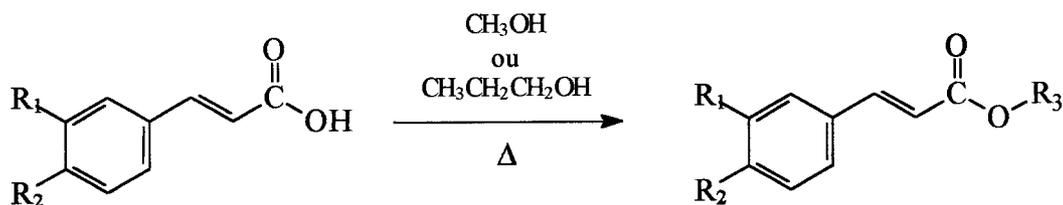
### 1.3. Obtenção de ésteres de ácidos cinâmicos

Nos últimos anos foram efectuados alguns estudos relativos às condições de preparação de ésteres de ácidos cinâmicos e compostos aparentados [7, 8, 11-14].

Entre os métodos usados citam-se:

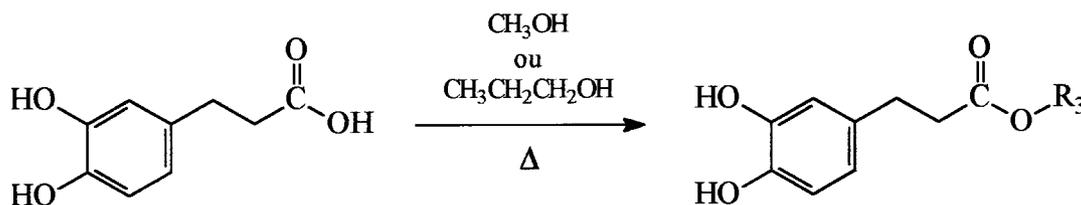
- Esterificação com catálise ácida;
- Esterificação via cloretos de cinamoílo;
- Esterificação de ácidos cinâmicos na presença de N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) e piridina;
- Esterificação de ácidos cinâmicos na presença de N,N-diciclohexilcarbodiimida e 4-pirrolidina.

Os compostos sintetizados neste trabalho foram obtidos por esterificação directa de ácidos cinâmicos, catalisada por um ácido forte (fig. 7).



Compostos	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Ácido cafeico (C)	OH	OH
Ácido ferúlico (F)	OCH <sub>3</sub>	OH
Ácido isoferúlico (I)	OH	OCH <sub>3</sub>

Compostos	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Cafeiato de metilo (CM)	OH	OH	CH <sub>3</sub>
Cafeiato de propilo (CP)	OH	OH	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
Ferulato de metilo (FM)	OCH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>
Ferulato de propilo (FP)	OCH <sub>3</sub>	OH	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
Isoferulato de metilo (IM)	OH	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
Isoferulato de propilo (IP)	OH	OCH <sub>3</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>



Composto
Ácido hidrocafeico (HC)

Compostos	R <sub>3</sub>
Hidrocafeiato de metilo (HCM)	CH <sub>3</sub>
Hidrocafeiato de propilo (HCP)	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>

Fig. 7 – Esquema geral das sínteses efectuadas.

A metodologia usada algumas vantagens:

- Envolve a utilização de reagentes de uso corrente, sendo portanto economicamente favorável;
- A reacção decorre num só passo e é relativamente rápida;

- A purificação dos produtos obtidos é, de uma forma geral, simples e rápida;
- Os rendimentos obtidos são satisfatórios;
- O processo é adequado ao tipo de matéria-prima. Alguns trabalhos demonstraram que a obtenção de cloretos de acilo de compostos com estrutura catecólica (*e.g.* ácidos cafeico e hidrocafeico) requer uma etapa preliminar de protecção do grupo catecol. Por outro lado, na reacção de esterificação com a DCC ocorre a ligação irreversível do catalisador aos ácidos cinâmicos, devido provavelmente à existência de um sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado [11, 14].

Os ácidos cinâmicos, e os seus derivados, usados neste trabalho possuem um padrão de substituição adequado para a realização de um estudo preliminar de relação estrutura-actividade (SAR).

## **2. Condições Experimentais**

### **2.1. Instrumentação**

- As pesagens foram efectuadas em balança Mettler AE 100.
- Os solventes foram evaporados com auxílio de pressão reduzida, usando um evaporador rotativo “Büchi”.
- Os pontos de fusão (PF) foram determinados num microscópio de Köfler da marca “Reichert Thermovar” e não foram corrigidos.
- Os espectros no infravermelho (IV) foram registados num espectrofotómetro ATI Mattson Genesis Series FTIR, usando pastilhas de brometo de potássio (Uvasol,

Merck) contendo aproximadamente 1% de amostra, ou filmes entre duas pastilhas de KBr.

Somente as bandas de absorção mais importantes se encontram referidas ( $\nu_{\text{máx.}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ).

- Os espectros no ultravioleta (UV) foram registados num espectrofotómetro UV/Vis Varian Cary 1E, a partir de soluções etanólicas.

Somente as bandas de absorção mais importantes se encontram referidas ( $\lambda_{\text{máx.}}$ , nm).

- Os espectros de massa (EM) foram registados num espectrómetro VG AutoSpec (impacto electrónico (IE)) e referidos em  $m/z$  (% intensidade relativa).
- Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos num aparelho Bruker AMX 300, à temperatura ambiente, a partir de soluções (conc. 10 mg/0,5 ml) de cada um dos compostos em DMSO- $d_6$  (Uvasol, Merck), com grau de deuteração superior a 99,0%. Como referência interna usou-se o TMS.

Nos espectros de ressonância magnética nuclear de protão (RMN  $^1\text{H}$ ), registados a 300,13 MHz, indica-se o desvio químico ( $\delta$ , ppm), o número de protões, a multiplicidade e a(s) constante(s) de acoplamento ( $J$ , Hz).

Nos espectros de ressonância magnética nuclear de carbono treze (RMN  $^{13}\text{C}$ ), registados a 75,47 MHz, indica-se o desvio químico ( $\delta$ , ppm).

## 2.2. Cromatografia

- Na cromatografia em camada fina (CCF) usou-se como fase estacionária gele de sílica 60 GF<sub>254</sub> (Merck), com uma espessura de 0,25 mm, e placas pré-revestidas de gele de sílica 60 F<sub>254</sub> (Merck) e de celulose (Merck), com espessura de camada de 0,2 e 0,1 mm, respectivamente.

As fases móveis são referidas em cada síntese, mencionando no caso de misturas de solventes a proporção volumétrica dos vários componentes.

Os cromatogramas foram revelados por acção da luz ultravioleta (UV) de comprimentos de onda 254 e 366 nm, vapores de iodo e/ou solução aquosa de cloreto férrico a 10% (p/v).

- Nos processos de purificação por cromatografia em coluna (CC) usou-se como fase estacionária gele de sílica 60 (0,2-0,5 mm, Merck). As fases móveis usadas são referidas em cada síntese, mencionando no caso de misturas de solventes a proporção volumétrica dos vários componentes. Em todos esses processos recolheram-se fracções de aproximadamente 15 ml.

### 2.3. Reagentes e solventes

- Os solventes e reagentes utilizados foram todos de qualidade *pro analysi* ou “para síntese” das firmas Merck, Aldrich e Sigma.
- A verificação da pureza dos reagentes foi efectuada por análise comparativa dos valores de PF e dos dados de IV obtidos experimentalmente, e os descritos na literatura.

### 2.4. Generalidades

- A evolução e o final das reacções de síntese foram acompanhados por CCF, em diferentes eluentes e adsorventes, e por espectrofotometria no IV.
- O último passo dos processos de purificação foi, sempre que possível, a cristalização.

- Os critérios de pureza adoptados foram, sempre que possível, a nitidez e constância do ponto de fusão (PF) e a observação de uma única mancha em cromatografia em camada fina, fazendo variar a fase estacionária e a composição da fase móvel.
- Após purificação os compostos foram acondicionados em frascos de vidro âmbar, com rolha de borracha, e mantidos em atmosfera de azoto.

## 2.5. Síntese dos ésteres metílicos e propílicos de ácidos *trans*-cinâmicos

A esterificação dos ácidos *trans*-cafeico, *trans*-ferúlico, *trans*-isoferúlico e *trans*-hidrocafeico foi obtida por catálise ácida segundo o método de Pearl e Beyer modificado [15].

### Método geral para a preparação dos compostos:

Os ácidos *trans*-cinâmicos correspondentes (cerca de 1,0 g) foram dissolvidos em metanol (200 ml) ou 1-propanol (400 ml). À solução foi adicionado H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (1,0 ml) e a mistura foi aquecida a refluxo, com agitação magnética, durante cerca de 3 horas (tempo ao fim do qual se observou por CCF não existir produto de partida). Após reacção, o solvente foi parcialmente evaporado até cerca de metade com auxílio de pressão reduzida. A solução arrefecida foi vertida em gelo (50 g), neutralizada com uma solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 10% e, em seguida, extraída com éter etílico (3x150 ml). As fases orgânicas resultantes foram reunidas, lavadas com água (3x100 ml) e desidratadas com MgSO<sub>4</sub> anidro. Após a evaporação do solvente com auxílio de pressão reduzida, obteve-se um resíduo, o qual foi purificado por CC (\*).

O controlo cromatográfico da reacção e das fracções de coluna foi efectuado por CCF nos sistemas:

- gele de sílica; éter de petróleo (40-60°C)/éter etílico/HCOOH (5:5:0,1)

- gele de sílica; clorofórmio/metanol/CH<sub>3</sub>COOH (19:1:0,5)
- celulose; água/ácido acético glacial (9:1)

### 2.5.1. Síntese do *trans*-cafeiato de metilo (CM)

(*E*)-3-(3,4-diidroxifenil)-2-propenoato de metilo

(\*) Após a evaporação do solvente com auxílio de pressão reduzida, obteve-se um resíduo sólido de cor castanha amarelada, o qual foi purificado por CC (gele de sílica; éter de petróleo (40-60°C)/éter etílico (6:4)). As frações contendo predominantemente o composto pretendido foram reunidas e o solvente evaporado. O resíduo obtido foi cristalizado do sistema metanol/água obtendo-se cristais brancos de *trans*-cafeiato de metilo (707,4 mg, 65%).

PF: 156-159 °C.

IV  $\nu_{\text{máx.}}$  (cm<sup>-1</sup>) (KBr): 3476, 2944, 2364, 2338, 1675, 1607, 1535, 1441, 1277, 1247, 1183, 1105, 1038, 981.

UV  $\lambda_{\text{máx.}}^{\text{Etanol}}$  (nm) (log  $\epsilon$ ): 332 (4,2), 245 (4,0), 217 (4,1), 202 (4,0).

RMN <sup>1</sup>H  $\delta$ : 3,68 (3H, *s*, OCH<sub>3</sub>); 6,27 (1H, *d*, *J*=15,9; H( $\alpha$ )); 6,76 (1H, *d*, *J*=8,2; H(5)); 7,00 (1H, *dd*, *J*=8,2; 2,1; H(6)); 7,05 (1H, *d*, *J*=2,1; H(2)); 7,48 (1H, *d*, *J*=15,9; H( $\beta$ )); 9,33-9,45 (1H, *s*, OH).

RMN <sup>13</sup>C  $\delta$ : 51,2 OCH<sub>3</sub>; 113,7 C(2); 114,8 C( $\alpha$ ); 115,7 C(5); 121,4 C(6); 125,5 C(1); 145,2 C(4); 145,6 C(3); 148,4 C( $\beta$ ); 167,0 (C=O).

EM-IE: 194 (M<sup>+</sup>, 100), 163 (100), 136 (22), 135 (28), 134 (36), 123 (10), 117 (23), 89 (29), 77 (23).

### 2.5.2. Síntese do *trans*-ferulato de metilo (FM)

(*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propenoato de metilo

(\*) Após a evaporação do solvente com auxílio de pressão reduzida, obteve-se um resíduo oleoso e incolor, o qual foi purificado por CC (gele de sílica; éter de petróleo (40-60°C)/éter etílico (7:3)). As frações contendo predominantemente o composto pretendido foram reunidas e o solvente evaporado. O resíduo obtido foi cristalizado do sistema éter etílico/n-hexano obtendo-se cristais brancos levemente amarelados de *trans*-ferulato de metilo, os quais foram recristalizados do sistema (879,2 mg, 82%).

PF: 57-60 °C.

IV  $\nu_{\text{máx.}}$  (cm<sup>-1</sup>) (KBr): 3394, 2944, 1702, 1679, 1636, 1596, 1515, 1433, 1265, 1159, 1121, 1027, 979.

UV  $\lambda_{\text{máx.}}$ <sup>Etanol</sup> (nm) (log  $\epsilon$ ): 325 (4,3), 236 (4,0), 217 (4,1), 201 (4,0).

RMN <sup>1</sup>H  $\delta$ : 3,69 (3H, *s*, OCH<sub>3</sub>); 3,81 (3H, *s*, OCH<sub>3</sub>); 6,48 (1H, *d*, *J*=15,9; H( $\alpha$ )); 6,79 (1H, *d*, *J*=8,1; H(5)); 7,12 (1H, *dd*, *J*=8,2; 1,9; H(6)); 7,32 (1H, *d*, *J*=1,9; H(2)); 7,56 (1H, *d*, *J*=15,9; H( $\beta$ )); 9,62 (1H, *s*, OH).

RMN <sup>13</sup>C  $\delta$ : 51,2-55,7 OCH<sub>3</sub>; 111,3 C(2); 114,2 C( $\alpha$ ); 115,5 C(5); 123,1 C(6); 125,5 C(1); 145,1 C(4); 147,9 C( $\beta$ ); 149,4 C(3); 167,1 (C=O).

EM-IE: 208 (M<sup>+</sup>, 100), 194 (18), 193 (35), 177 (93), 150 (60), 149 (71), 134 (65), 133 (71), 117 (74), 105 (57), 89 (75), 77 (57), 63 (41).

### 2.5.3. Síntese do *trans*-isoferulato de metilo (IM)

(*E*)-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-2-propenoato de metilo

(\*) Após a evaporação do solvente com auxílio de pressão reduzida, obteve-se um resíduo sólido amarelado, o qual foi purificado por CC (gele de sílica; éter de petróleo (40-60°C)/éter etílico (7:3)). As frações contendo predominantemente o composto pretendido foram reunidas e o solvente evaporado. O resíduo obtido foi cristalizado do sistema éter etílico/n-hexano obtendo-se cristais brancos de *trans*-isoferulato de metilo (857,7 mg, 80%).

PF: 71-73 °C.

IV  $\nu_{\text{máx.}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) (KBr): 3413, 2949, 1719, 1638, 1583, 1513, 1445, 1313, 1216, 1165, 1128, 1019, 976.

UV  $\lambda_{\text{máx.}}$  <sup>Etanol</sup> (nm) (log  $\epsilon$ ): 325 (4,2), 295 (4,2), 243 (4,1), 217 (4,2), 201 (4,1).

RMN <sup>1</sup>H  $\delta$ : 3,69 (3H, s; OCH<sub>3</sub>); 3,80 (3H, s; OCH<sub>3</sub>); 6,35 (1H, d,  $J=15,9$ ; H( $\alpha$ )); 6,95 (1H, d,  $J=8,1$ ; H(5)); 7,10 (1H, d,  $J=2,0$ ; H(2)); 7,13 (1H, d,  $J=8,1$ ; 2,1; H(6)); 7,52 (1H, d,  $J=15,9$ ; H( $\beta$ )); 9,21 (1H, s; OH).

RMN <sup>13</sup>C  $\delta$ : 51,3-55,6 OCH<sub>3</sub>; 111,9 C(5); 114,2 C(2); 114,8 C( $\alpha$ ); 121,3 C(6); 126,8 C(1); 144,8 C(3); 146,7 C( $\beta$ ); 150,1 C(4); 166,9 (C=O).

EM-IE: 208 (M<sup>+</sup>, 100), 194 (7), 193 (25), 177 (70), 150 (16), 149 (24), 148 (19), 147 (16), 135 (10), 134 (25), 133 (27), 105 (20), 89 (24), 77 (22).

**2.5.4. Síntese do *trans*-hidrocafeiato de metilo (HCM)**

3-(3,4-diidroxifenil)propanoato de metilo

(\*) Após a evaporação do solvente com auxílio de pressão reduzida, obteve-se um resíduo oleoso acastanhado, o qual foi purificado por CC (gele de sílica; éter de petróleo (40-60°C)/éter etílico (7:3)). As frações contendo predominantemente o composto pretendido foram reunidas e o solvente evaporado. O resíduo obtido foi cristalizado do sistema éter etílico/n-hexano obtendo-se cristais brancos de *trans*-hidrocafeiato de metilo (732,3 mg, 68%).

**PF:** 69-71 °C.**IV**  $\nu_{\text{máx.}}$  (cm<sup>-1</sup>) (KBr): 3481, 3309, 2944, 1711, 1607, 1516, 1443, 1378, 1342, 1311, 1276, 1205, 1181, 1106, 984.**UV**  $\lambda_{\text{máx.}}$ <sup>Etanol</sup> (nm) (log  $\epsilon$ ): 283 (3,5), 204 (4,4).**RMN** <sup>1</sup>H  $\delta$ : 2,51 (1H, *t*, *J*=7,4; H( $\alpha$ )); 2,66 (1H, *t*, *J*=7,3; H( $\beta$ )); 3,56 (3H, *s*; OCH<sub>3</sub>); 6,42 (1H, *dd*, *J*=8,0; 2,1; H(6)); 6,56 (1H, *d*, *J*=2,0; H(2)); 6,61 (1H, *d*, *J*=8,0; H(5)); 8,71 (1H, *s*; OH).**RMN** <sup>13</sup>C  $\delta$ : 29,7 C( $\alpha$ ); 35,4 C( $\beta$ ); 55,2 OCH<sub>3</sub>; 115,5 C(2)<sup>♦</sup>; 115,6 C(5)<sup>♦</sup>; 118,7 C(6); 131,3 C(1); 143,5 C(4); 145,0 C(3); 172,8 (C=O).<sup>♦</sup> Estes valores podem ser interconvertíveis.**EM-IE:** 196 (M<sup>+</sup>, 82), 165 (22), 137 (23), 136 (85), 123 (100), 91 (22), 77 (24).

### 2.5.5. Síntese do *trans*-cafeiato de propilo (CP)

(*E*)-3-(3,4-diidroxifenil)-2-propenoato de propilo

(\*) Após a evaporação do solvente com auxílio de pressão reduzida, obteve-se um resíduo oleoso amarelado, o qual foi purificado por CC (gele de sílica; éter de petróleo (40-60°C)/éter etílico (7:3)). As fracções contendo predominantemente o composto pretendido foram reunidas e o solvente evaporado. O resíduo sólido obtido, ligeiramente amarelado, foi cristalizado do sistema metanol/água obtendo-se cristais brancos de *trans*-cafeiato de propilo (791,6 mg, 62%).

**PF:** 125-127 °C.

**IV**  $\nu_{\text{máx.}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) (KBr): 3462, 2969, 2895, 1665, 1605, 1534, 1476, 1442, 1319, 1278, 1239, 1184, 1155, 1111, 1037, 982.

**UV**  $\lambda_{\text{máx.}}$  <sup>Etanol</sup> (nm) (log  $\epsilon$ ): 331 (4,2), 218 (4,2), 202 (4,3).

**RMN <sup>1</sup>H**  $\delta$ : 0,91 (3H, *t*,  $J=7,4$ ;  $\text{CH}_3$ ); 1,63 (2H, *m*;  $\text{CH}_2$ ); 4,06 (2H, *t*,  $J=6,7$ ;  $\text{OCH}_2$ ); 6,26 (1H, *d*,  $J=15,9$ ; H( $\alpha$ )); 6,75 (1H, *d*,  $J=8,0$ ; H(5)); 7,00 (1H, *dd*,  $J=8,1$ ; 2,0; H(6)); 7,04 (1H, *d*,  $J=2,0$ ; H(2)); 7,47 (1H, *d*,  $J=15,9$ ; H( $\beta$ )); 9,19-9,56 (1H, *s*; OH).

**RMN <sup>13</sup>C**  $\delta$ : 10,3  $\text{CH}_3$ ; 21,7  $\text{CH}_2$ ; 65,2  $\text{OCH}_2$ ; 113,9 C(2); 114,8 C( $\alpha$ ); 115,7 C(5); 121,4 C(6); 125,5 C(1); 145,0 C(4); 145,6 C(3); 148,4 C( $\beta$ ); 166,6 (C=O).

**EM-IE:** 222 ( $\text{M}^{+\bullet}$ , 90), 180 (81), 163 (100), 136 (54), 135 (37), 134 (43), 123 (15), 117 (24), 89 (40), 77 (22).

### 2.5.6. Síntese do *trans*-ferulato de propilo (FP)

(*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propenoato de propilo

(\*) Após a evaporação do solvente com auxílio de pressão reduzida, obteve-se um resíduo oleoso acastanhado, o qual foi purificado por CC (gele de sílica; éter de petróleo (40-60°C)/éter etílico (8:2)). As frações contendo predominantemente o composto pretendido foram reunidas e o solvente evaporado. O resíduo obtido foi cristalizado do sistema metanol/água obtendo-se cristais brancos de *trans*-ferulato de propilo (1,08 g, 79%).

PF: 34-37 °C.

IV  $\nu_{\text{máx.}}$  (cm<sup>-1</sup>) (KBr): 3437, 2961, 2929, 1696, 1631, 1595, 1514, 1459, 1264, 1165, 1125, 1031, 985.

UV  $\lambda_{\text{máx.}}^{\text{Etanol}}$  (nm) (log  $\epsilon$ ): 325 (4,3), 236 (4,0), 217 (4,1), 201 (4,1).

RMN <sup>1</sup>H  $\delta$ : 0,92 (3H, *t*, *J*=7,4; CH<sub>3</sub>); 1,64 (2H, *m*; CH<sub>2</sub>); 4,07 (2H, *t*, *J*=6,6; OCH<sub>2</sub>); 3,81 (3H, *s*; OCH<sub>3</sub>); 6,48 (1H, *d*, *J*=15,9; H( $\alpha$ )); 6,78 (1H, *d*, *J*=8,2; H(5)); 7,11 (1H, *dd*, *J*=8,2; 1,9; H(6)); 7,32 (1H, *d*, *J*=1,8; H(2)); 7,54 (1H, *d*, *J*=15,9; H( $\beta$ )); 9,63 (1H, *s*; OH).

RMN <sup>13</sup>C  $\delta$ : 10,4 CH<sub>3</sub>; 21,7 CH<sub>2</sub>; 55,7 OCH<sub>3</sub>; 65,2 OCH<sub>2</sub>; 111,1 C(2); 114,5 C( $\alpha$ ); 115,5 C(5); 123,2 C(6); 125,6 C(1); 145,0 C(4); 147,9 C( $\beta$ ); 149,3 C(3); 166,7 (C=O).

EM-IE: 236 (M<sup>+</sup>, 100), 194 (89), 177 (94), 150 (86), 149 (50), 134 (39), 133 (33), 117 (47), 105 (30), 89 (57), 77 (34).

### 2.5.7. Síntese do *trans*-isoferulato de propilo (IP)

(*E*)-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-2-propenoato de propilo

(\*) Após a evaporação do solvente com auxílio de pressão reduzida, obteve-se um resíduo oleoso acastanhado, o qual foi purificado por CC (gele de sílica; éter de petróleo (40-60°C)/éter etílico (8:2)). As frações contendo predominantemente o composto pretendido foram reunidas e o solvente evaporado. O resíduo oleoso obtido foi sujeito sem sucesso a várias tentativas de cristalização em diversos sistemas de solventes. O produto foi descrito como um óleo incolor (1,03 g, 84%).

**IV**  $\nu_{\text{máx.}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) (KBr): 3417, 2968, 2888, 2844, 1711, 1630, 1587, 1515, 1446, 1388, 1350, 1311, 1262, 1132, 1059, 1027, 984.

**UV**  $\lambda_{\text{máx.}}^{\text{Etanol}}$  (nm) ( $\log \epsilon$ ): 325 (4,2), 295 (4,1), 243 (4,0), 217 (4,1), 202 (4,1).

**RMN**  $^1\text{H}$   $\delta$ : 0,91 (3H, *t*,  $J=7,4$ ;  $\text{CH}_3$ ); 1,63 (2H, *m*,  $\text{CH}_2$ ); 4,07 (2H, *t*,  $J=6,7$ ;  $\text{OCH}_2$ ); 3,80 (3H, *s*;  $\text{OCH}_3$ ); 6,34 (1H, *d*,  $J=15,9$ ; H( $\alpha$ )); 6,94 (1H, *d*,  $J=8,1$ ; H(5)); 7,10 (1H, *d*,  $J=1,9$ ; H(2)); 7,12 (1H, *d*,  $J=8,1$ ; 1,9; H(6)); 7,51 (1H, *d*,  $J=15,9$ ; H( $\beta$ )); 9,20 (1H, *s*; OH).

**RMN**  $^{13}\text{C}$   $\delta$ : 10,3  $\text{CH}_3$ ; 21,7  $\text{CH}_2$ ; 55,6  $\text{OCH}_3$ ; 65,3  $\text{OCH}_2$ ; 111,9 C(5); 114,2 C(2); 115,1 C( $\alpha$ ); 121,2 C(6); 126,9 C(1); 144,7 C(3); 146,7 C( $\beta$ ); 150,1 C(4); 166,5 (C=O).

**EM-IE**: 236 ( $\text{M}^+$ , 100), 194 (70), 177 (91), 150 (57), 149 (42), 148 (24), 147 (23), 145 (30), 135 (28), 134 (37), 133 (31), 117 (34), 105 (25), 89 (42).

### 2.5.8. Síntese do *trans*-hidrocafeiato de propilo (HCP)

3-(3,4-diidroxifenil)propanoato de propilo

(\*) Após a evaporação do solvente com auxílio de pressão reduzida, obteve-se um resíduo oleoso amarelado, o qual foi purificado por CC (gele de sílica; éter de petróleo (40-60°C)/éter etílico (8:2)). As frações contendo predominantemente o composto pretendido foram reunidas e o solvente evaporado. O resíduo oleoso obtido foi sujeito sem sucesso a várias tentativas de cristalização em diversos sistemas de solventes. O produto foi descrito como um óleo transparente de tom levemente amarelado (877,9 mg, 70%).

IV  $\nu_{\text{máx.}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) (KBr): 3427, 3350, 2969, 2883, 1710, 1609, 1523, 1448, 1356, 1279, 1197, 1112, 984.

UV  $\lambda_{\text{máx.}}^{\text{Etanol}}$  (nm) ( $\log \epsilon$ ): 282 (3,5), 204 (4,4).

RMN  $^1\text{H}$   $\delta$ : 0,84 (3H, *t*,  $J=7,4$ ;  $\text{CH}_3$ ); 1,54 (2H, *m*,  $\text{CH}_2$ ); 3,93 (2H, *t*,  $J=6,6$ ;  $\text{OCH}_2$ ); 2,50 (1H, *t*,  $J=7,5$ ; H( $\alpha$ )); 2,66 (1H, *t*,  $J=7,3$ ; H( $\beta$ )); 6,43 (1H, *dd*,  $J=8,0$ ; 2,1; H(6)); 6,57 (1H, *d*,  $J=2,1$ ; H(2)); 6,61 (1H, *d*,  $J=8,0$ ; H(5)); 8,69 (1H, *s*; OH).

RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$ : 10,3  $\text{CH}_3$ ; 21,5  $\text{CH}_2$ ; 65,3  $\text{OCH}_2$ ; 29,8 C( $\alpha$ ); 35,6 C( $\beta$ ); 115,4 C(2) $^\diamond$ ; 115,6 C(5) $^\diamond$ ; 118,8 C(6); 131,3 C(1); 143,5 C(4); 145,0 C(3); 172,4 (C=O).

$^\diamond$  Estes valores podem ser interconvertíveis.

EM-IE: 224 ( $\text{M}^+$ , 95), 182 (49), 165 (84), 137 (54), 136 (93), 123 (100), 91 (48), 77 (31).

### 3. Elucidação estrutural dos ésteres sintetizados

A elucidação estrutural dos compostos sintetizados foi estabelecida através de dados de IV, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e EM-IE.

Os dados obtidos por espectrofotometria no IV para os ácidos cinâmicos e derivados estão descritos de forma sucinta nas **tabelas 2a-2d**.

Grupos	(C)	(CM)	(CP)
OH	3489 3315	3476	3462
CH <sub>2</sub> ,CH <sub>3</sub>		2944	2969 2895
C=O	1645	1675	1665
C=C	1619 1601 1531	1607 1535	1605 1534

Tabela 2a - Dados de IV dos compostos C, CM e CP.

Grupos	(I)	(IM)	(IP)
OH	3403 3379	3413	3417
CH <sub>2</sub> ,CH <sub>3</sub>		2949	2968 2888
C=O	1689	1719	1711
C=C	1665 1623 1607 1577 1508	1638 1583 1513	1630 1587 1515

Tabela 2b - Dados de IV dos compostos I, IM e IP.

Grupos	(F)	(FM)	(FP)
OH	3434	3394	3437
CH <sub>2</sub> ,CH <sub>3</sub>		2944	2961 2929
C=O	1688	1702	1696
C=C	1661 1617 1592 1511	1679 1636 1596 1515	1631 1595 1514 1459

Tabela 2c - Dados de IV dos compostos F, FM e FP.

Grupos	(HC)	(HCM)	(HCP)
OH	3464	3481	3427
	3364	3309	3350
CH <sub>2</sub> ,CH <sub>3</sub>		2944	2969
			2883
C=O	1673	1711	1710
C=C	1603	1607	1609
	1565	1516	1523
	1523	1443	1448
	1444		

Tabela 2d - Dados de IV dos compostos HC, HCM e HCP.

A modificação na frequência de vibração do grupo carbonilo evidencia a transformação pretendida (esterificação do grupo carboxilo). A banda correspondente ao estiramento da ligação C=O dos ésteres aparece a uma frequência de vibração superior à dos ácidos correspondentes, devido ao efeito indutivo dos grupos alcóxilo [5, 16]. Esse incremento da frequência de vibração do grupo C=O é superior no caso dos ésteres metílicos, à exceção dos derivados do ácido hidrocaféico. O aumento de frequência observado no caso dos derivados dos ácidos C, I e F é inferior ao verificado para os ésteres do HC. Este efeito pode ser consequência da conjugação do grupo C=O com a dupla ligação da cadeia lateral (sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado) [5, 16].

Embora os ésteres apresentem uma banda de absorção característica da ligação C-O ( $1300-1200\text{ cm}^{-1}$ ), o grande número de bandas, presente na zona de impressão digital dos espectros dos compostos em análise, não permitiu em nenhum caso definir com clareza a frequência da referida vibração [5].

Os dados de RMN  $^1\text{H}$  dos ácidos cinâmicos e derivados estão evidenciados na **tabelas 3a-3d**. Os desvios químicos correspondentes aos prótons dos anéis aromáticos foram assinalados com base na multiplicidade dos sinais e constantes de acoplamento.

Para facilitar a interpretação dos valores obtidos, os diferentes compostos foram agrupados em duas séries:

- **Série A**, definida pelos compostos contendo na sua estrutura uma dupla ligação entre os carbonos  $\alpha$  e  $\beta$  (C, CM, CP, I, IM, IP, F, FM e FP - tabelas 3a-3c);
- **Série B**, definida pelos compostos com cadeia lateral saturada (HC, HCM e HCP- tabela 3d).

$^1\text{H}$	(C)	(CM)	(CP)
<u>COOH</u>	12,14	-	-
<u>OH</u>	9,56	9,45	9,56
	9,17	9,33	9,19
H ( $\alpha$ )	6,17 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 15,9)	6,27 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 15,9)	6,26 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 15,9)
H ( $\beta$ )	7,41 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 15,9)	7,48 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 15,9)	7,47 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 15,9)
H (2)	7,02 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0)	7,05 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,1)	7,04 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0)
H (5)	6,75 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0)	6,76 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,2)	6,75 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0)
H (6)	6,96 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,2 ; 2,0)	7,00 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,2 ; 2,1)	7,00 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,1 ; 2,0)
<u>OCH<sub>3</sub></u>	-	3,68 ( <i>s</i> )	-
<u>OCH<sub>2</sub></u>	-	-	4,06 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 6,7)
<u>CH<sub>2</sub></u>	-	-	1,63 ( <i>m</i> )
<u>CH<sub>3</sub></u>	-	-	0,91 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 7,4)

Tabela 3a - Dados de RMN  $^1\text{H}$  dos compostos C, CM e CP.

$^1\text{H}$	(I)	(IM)	(IP)
<u>COOH</u>	12,18	-	-
<u>OH</u>	9,22	9,21	9,20
H ( $\alpha$ )	6,24 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 15,9)	6,35 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 15,9)	6,34 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 15,9)
H ( $\beta$ )	7,44 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 15,9)	7,52 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 15,9)	7,51 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 15,9)
H (2)	7,06 ( <i>s</i> )	7,10 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0)	7,10 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 1,9)
H (5)	6,94 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0)	6,95 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,1)	6,94 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,1)
H (6)	7,08 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 7,9 ; 2,0)	7,13 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,1 ; 2,1)	7,12 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,1 ; 1,9)
<u>OCH<sub>3</sub></u>	3,80 ( <i>s</i> )	3,80 ( <i>s</i> )	3,80 ( <i>s</i> )
<u>OCH<sub>3</sub></u>	-	3,69 ( <i>s</i> )	-
<u>OCH<sub>2</sub></u>	-	-	4,07 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 6,7)
<u>CH<sub>2</sub></u>	-	-	1,63 ( <i>m</i> )
<u>CH<sub>3</sub></u>	-	-	0,91 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 7,4)

Tabela 3b - Dados de RMN  $^1\text{H}$  dos compostos I, IM e IP.

<sup>1</sup> H	(F)	(FM)	(FP)
<u>COOH</u>	12,17	-	-
<u>OH</u>	9,59	9,62	9,63
H (α)	6,36 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 15,9)	6,48 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 15,9)	6,48 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 15,9)
H (β)	7,48 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 15,9)	7,56 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 15,9)	7,54 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 15,9)
H (2)	7,27 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 1,8)	7,32 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 1,9)	7,32 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 1,8)
H (5)	6,78 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,2)	6,79 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,1)	6,78 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,2)
H (6)	7,08 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,1 ; 1,8)	7,12 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,2 ; 1,9)	7,11 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,2 ; 1,9)
<u>OCH<sub>3</sub></u>	3,80 ( <i>s</i> )	3,81 ( <i>s</i> )	3,81 ( <i>s</i> )
<u>OCH<sub>3</sub></u>	-	3,69 ( <i>s</i> )	-
<u>OCH<sub>2</sub></u>	-	-	4,07 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 6,6)
<u>CH<sub>2</sub></u>	-	-	1,64 ( <i>m</i> )
<u>CH<sub>3</sub></u>	-	-	0,92 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 7,4)

Tabela 3c - Dados de RMN <sup>1</sup>H dos compostos F, FM e FP.

<sup>1</sup> H	(HC)	(HCM)	(HCP)
<u>COOH</u>	12,01	-	-
<u>OH</u>	8,73	8,71	8,69
H (α)	2,42 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 7,5)	2,51 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 7,4)	2,50 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 7,5)
H (β)	2,63 ( <i>t</i> , *)	2,66 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 7,3)	2,66 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 7,3)
H (2)	6,57 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0)	6,56 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0)	6,57 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,1)
H (5)	6,61 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,9)	6,61 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0)	6,61 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0)
H (6)	6,43 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0 ; 2,0)	6,42 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0 ; 2,1)	6,43 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0 ; 2,1)
<u>OCH<sub>3</sub></u>	-	3,56 ( <i>s</i> )	-
<u>OCH<sub>2</sub></u>	-	-	3,93 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 6,6)
<u>CH<sub>2</sub></u>	-	-	1,54 ( <i>m</i> )
<u>CH<sub>3</sub></u>	-	-	0,84 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 7,4)

\* Não foi possível calcular a constante de acoplamento.

Tabela 3d - Dados de RMN <sup>1</sup>H dos compostos HC, HCM e HCP.

Do conjunto dos dados de RMN <sup>1</sup>H salientam-se pela sua importância, em termos de caracterização estrutural dos ésteres sintetizados, as seguintes observações:

- os compostos da série A apresentam dois prótons olefinicos (H(α) e H(β)) (δ 6,2-7,6 ppm), cuja configuração *trans* é confirmada pela constante de

acoplamento ( $J=15,9$  Hz), e três prótons aromáticos num padrão de substituição 1,3,4 ( $\delta$  6,8-7,3 ppm) [16, 17];

- os compostos da série B apresentam o mesmo padrão de substituição do núcleo aromático e a presença de dois sinais a  $\delta$  2,4-2,7 ppm correspondentes aos prótons metilénicos da cadeia lateral saturada;
- a ausência do sinal do próton do grupo  $\text{COOH}$  a  $\delta \approx 12$  ppm no espectro dos ésteres cinâmicos confirma a transformação pretendida;
- os ésteres metílicos apresentam um singuleto a  $\delta$  3,68-3,81 ppm (compostos CM, IM e FM) e  $\delta \approx 3,56$  ppm (HCM). O deslocamento para menor campo do desvio químico dos prótons metílicos dos compostos da série A (CM, IM e FM) pode ser atribuído à desprotecção causada pelo efeito de ressonância resultante da conjugação;
- as mesmas considerações podem ser feitas para o caso dos ésteres propílicos no que diz respeito aos sinais dos prótons  $\text{OCH}_2$ ,  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ .

Os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  evidenciados nas tabelas **4a-4d**, apresentam valores de desvio químico que confirmam também a identidade dos compostos sintetizados.

A atribuição dos sinais correspondentes aos átomos de carbono do anel aromático foi efectuada por analogia com a dos compostos de partida, a qual está de acordo com os dados descritos na literatura para compostos da mesma natureza [12, 14, 17-21].

$^{13}\text{C}$	(C)	(CM)	(CP)
C=O	168,0	167,0	166,6
C ( $\alpha$ )	114,6	114,8	114,8
C ( $\beta$ )	148,2	148,4	148,4
C (1)	125,7	125,5	125,5
C (2)	115,1	113,7	113,9
C (3)	145,6	145,6	145,6
C (4)	144,7	145,2	145,0
C (5)	115,8	115,7	115,7
C (6)	121,2	121,4	121,4
OCH <sub>2</sub>	-	-	65,2
OCH <sub>3</sub>	-	51,2	-
CH <sub>2</sub>	-	-	21,7
CH <sub>3</sub>	-	-	10,3

Tabela 4a - Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  dos compostos C, CM e CP.

$^{13}\text{C}$	(I)	(IM)	(IP)
C=O	167,9	166,9	166,5
C ( $\alpha$ )	114,1	114,8	115,1
C ( $\beta$ )	146,7	146,7	146,7
C (1)	127,1	126,8	126,9
C (2)	116,2	114,2	114,2
C (3)	144,3	144,8	144,7
C (4)	148,9	150,1	150,1
C (5)	111,9	111,9	111,9
C (6)	121,1	121,3	121,2
OCH <sub>2</sub>	-	-	65,3
OCH <sub>3</sub>	55,6	55,6	55,6
		51,3	-
CH <sub>2</sub>	-	-	21,7
CH <sub>3</sub>	-	-	10,3

Tabela 4b - Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  dos compostos I, IM e IP.

$^{13}\text{C}$	(F)	(FM)	(FP)
C=O	168,0	167,1	166,7
C ( $\alpha$ )	115,6	114,2	114,5
C ( $\beta$ )	147,9	147,9	147,9
C (1)	125,8	125,5	125,6
C (2)	111,1	111,3	111,1
C (3)	149,1	149,4	149,3
C (4)	144,6	145,1	145,0
C (5)	115,5	115,5	115,5
C (6)	122,9	123,1	123,2
OCH <sub>2</sub>	-		65,2
OCH <sub>3</sub>	55,7	55,7	55,7
		51,2	
CH <sub>2</sub>	-		21,7
CH <sub>3</sub>	-		10,4

Tabela 4c - Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  dos compostos F, FM e FP.

$^{13}\text{C}$	(HC)	(HCM)	(HCP)
C=O	174,0	172,8	172,4
C ( $\alpha$ )	29,8	29,7	29,8
C ( $\beta$ )	35,8	35,4	35,6
C (1)	131,7	131,3	131,3
C (2)	115,7 <sup>♦</sup>	115,5 <sup>♦</sup>	115,4 <sup>♦</sup>
C (3)	145,0	145,0	145,0
C (4)	143,4	143,5	143,5
C (5)	115,5 <sup>♦</sup>	115,6 <sup>♦</sup>	115,6 <sup>♦</sup>
C (6)	118,8	118,7	118,8
OCH <sub>2</sub>	-	-	65,3
OCH <sub>3</sub>	-	55,2	-
CH <sub>2</sub>	-	-	21,5
CH <sub>3</sub>	-	-	10,3

<sup>♦</sup> Estes valores podem ser interconvertíveis.

Tabela 4d - Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  dos compostos HC, HCM e HCP.

Do conjunto dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  salientam-se pela sua importância, em termos de caracterização estrutural dos ésteres sintetizados, as seguintes observações:

- modificação no desvio químico do sinal correspondente ao grupo carbonilo. De um modo geral, a esterificação resulta numa diminuição do desvio químico do grupo  $\text{C}=\text{O}$  do ácido correspondente;
- na série B, os sinais correspondentes aos átomos de carbono do anel aromático não sofreram alteração no desvio químico, provavelmente devido à ausência do efeito da conjugação;
- o desvio químico do sinal correspondente aos átomos de carbono  $\alpha$  e  $\beta$  (série A –  $\text{C}(\alpha)$   $\delta$  114,2-115,1 ppm e  $\text{C}(\beta)$   $\delta$  146,7-148,4 ppm; série B -  $\text{C}(\alpha)$   $\delta \approx 29,7$  ppm e  $\text{C}(\beta)$   $\delta \approx 35,5$  ppm) está de acordo com o descrito na literatura para compostos da mesma família química [22];
- a presença de um sinal, no caso dos ésteres metílicos, a  $\delta$  51,0-55,5 ppm sugere a presença do grupo  $\text{OCH}_3$  [16];
- os sinais a  $\delta \approx 65,2$ ,  $\delta \approx 21,7$  e  $\delta \approx 10,3$  sugerem a presença dos grupos  $\text{OCH}_2$ ,  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ , respectivamente, os quais são característicos dos ésteres propílicos.

Os dados obtidos a partir dos espectros de EM-IE dos compostos sintetizados estão indicados na **tabela 5**.

Em todos os casos o pico correspondente ao ião molecular ( $\text{M}^+$ ) revelou-se bastante proeminente e, com exceção dos compostos CP, HCM e HCP, corresponde ao pico mais intenso (pico base). Esta observação traduz por um lado a necessidade de baixa energia para ionizar as moléculas dos compostos, e por outro uma grande estabilidade dos referidos fragmentos. Estes factos estão de acordo com o descrito para ésteres de ácidos aromáticos [5, 16].

CM	CP	IM	IP	FM	FP	HCM	HCP
194	222	208	236	208	236	196	224
(M <sup>+</sup> , 100)	(M <sup>+</sup> , 90)	(M <sup>+</sup> , 100)	(M <sup>+</sup> , 82)	(M <sup>+</sup> , 95)			
-	180 (81)	194 (7)	194 (70)	194 (18)	194 (89)	-	182 (49)
-	-	193 (25)	-	193 (35)	-	-	-
163 (100)	163 (100)	177 (70)	177 (91)	177 (93)	177 (94)	165 (22)	165 (84)
136 (22)	136 (54)	150 (16)	150 (57)	150 (60)	150 (86)	137 (23)	137 (54)
-	-	149 (24)	149 (42)	149 (71)	149 (50)	-	-
-	-	148 (19)	148 (24)	-	-	-	-
-	-	147 (16)	147 (23)	-	-	-	-
135 (28)	135 (37)	135 (10)	135 (28)	134 (65)	134 (39)	136 (85)	136 (93)
134 (36)	134 (43)	134 (25)	134 (37)	133 (71)	133 (33)	123 (100)	123 (100)
-	-	133 (27)	133 (31)	-	-	-	-

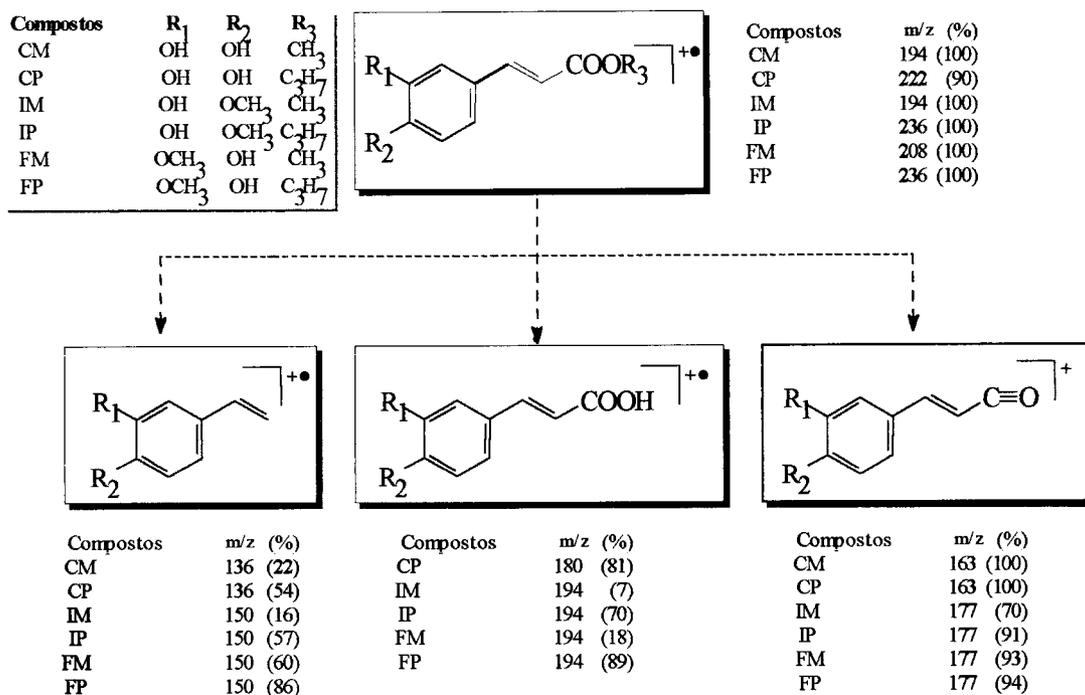
Tabela 5 – Valores de  $m/z$  dos fragmentos mais representativos de cada composto.

Os ácidos cinâmicos são uma classe de compostos muito estudada no que se refere à sua caracterização estrutural por espectrometria de massa por impacto electrónico (EM-IE), encontrando-se descritos alguns padrões típicos de fragmentação e que auxiliam à identificação dos compostos [23, 24].

Nas **figuras 8 e 9** apresenta-se um esquema interpretativo de alguns dos fragmentos obtidos por decomposição do ião molecular dos compostos.

Para os ésteres propílicos (CP, HCP, IP e FP) foi possível observar um pico a M<sup>+</sup> - 42 u.m.a., o que corresponde à eliminação do fragmento neutro H<sub>2</sub>C=CHCH<sub>3</sub>. Esta quebra pode ser explicada com base no rearranjo de McLafferty (**fig. 10**). Este mecanismo de fragmentação envolve a transferência intramolecular de um átomo de hidrogénio ligado ao carbono em posição  $\gamma$  em relação ao grupo carbonilo, através da formação de um estado de transição de baixa energia semelhante a um anel de seis membros.

Outros fragmentos igualmente importantes são os que resultam da eliminação de  $\cdot\text{OCH}_3$  e de  $\cdot\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ , e que correspondem aos picos  $\text{M}^{+\bullet} - 31$  u.m.a. e  $\text{M}^{+\bullet} - 59$  u.m.a., respectivamente.



**Fig. 8 – Esquema interpretativo de alguns dos fragmentos de massa dos compostos CM, CP, IM, IP, FM e FP.**

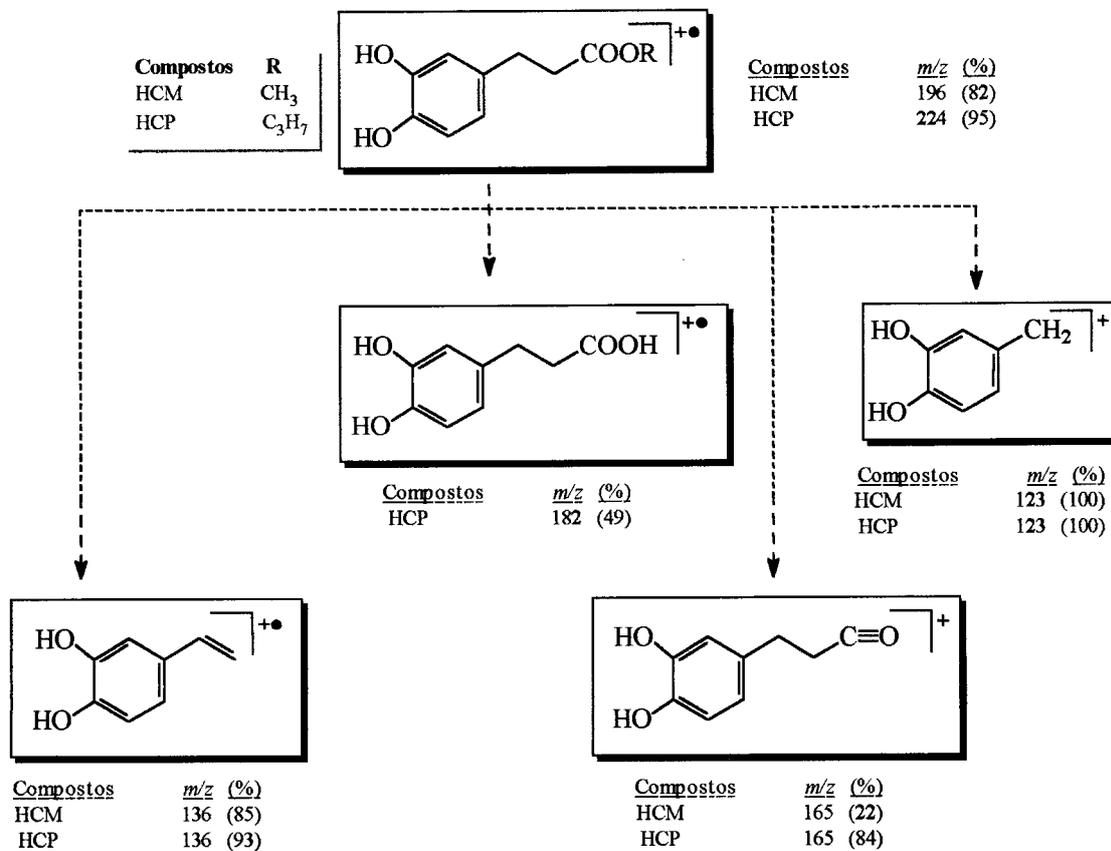


Fig. 9 – Esquema interpretativo de alguns dos fragmentos de massa dos compostos HCM e HCP.

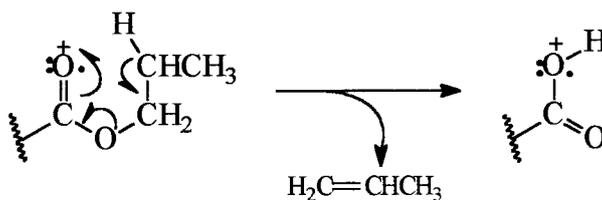


Fig. 10 – Rearranjo de McLafferty.

---

## 4. Bibliografia

- [1] "Nomenclature of Organic Chemistry – Sections A, B, C, D, E, F and H" (1979). International Union of Pure and Applied Chemistry – Organic Chemistry Division, Ed. J. Rigaudy, S. P. Klesney, Pergamon Press, London.
- [2] "Dictionary of Organic Compounds", fifth edition (1982), Chapman and Hall, London.
- [3] Swain T., Harborne J.B., van Sumere C. (1979). Recent Advances in Phytochemistry – Biochemistry of Plant Phenolics, Vol. 12, Plenum Press, New York.
- [4] Solomons, T.W. G. (1996), in Organic Chemistry, sixth edition, John Wiley & Sons Inc., New York.
- [5] B.S. Furniss, A.J. Hannaford, P.W.G. Smith, A.R. Tatchell (1989), in Vogel's - Text book of Practical Organic Chemistry, fifth edition, Longman Scientific & Technical, Longman Group Ltd, England.
- [6] March, J. (1985), in Advanced Organic Chemistry - Reactions, Mechanisms and Structure, third edition, John Wiley & Sons Inc., New York.
- [7] Zacharie B., Connolly T.P., Penney C.L. (1995). A Simple one-step Conversion of Carboxylic Acids to Esters Using EEDQ. *J. Org. Chem.*, 60 (21), 7072-7074.
- [8] Zhao H., Neamati N., Mazumder A., Sunder S., Pommier Y., Burke, Jr. T.R. (1997). Arylamide Inhibitors of HIV-1 Integrase. *J. Med. Chem.*, 40 (8), 1186-1194.
- [9] Kim S., Kim Y.C., Lee J.I. (1983). A New Convenient Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Tetrahedron Letters*, 24 (32), 3365-3368.
- [10] Sykes, P. (1986), in A Guide Book to Mechanism In Organic Chemistry, sixth edition, Addison Wesley Longman Ltd, Longman Group Ltd, England.
- [11] Pinto, D. C. G. A. (1996). "2-Estirilcromonas: Síntese, Caracterização Estrutural e Transformações em Pirazóis". Tese de Doutorado, Universidade de Aveiro.

- [12] Sugiura M., Naito Y., Yamaura Y., Fukaya C., Yokoyama K. (1989). Inhibitory Activities and Inhibition Specificities of Caffeic Acid Derivatives and Related Compounds toward 5-Lipoxygenase. *Chem. Pharm. Bull.*, 37 (4), 1039-1043.
- [13] Yun-Choi H.S., Kim M.H., Jung K.H. (1996). Esters of Substituted Benzoic Acids as Anti-thrombotic Agents. *Arch. Pharm. Res.*, 19 (1), 66-70.
- [14] Van Heerden F.R., Brandt E.V., Roux D.G. (1980). Isolation and Synthesis of *Trans*- and *Cis*-(-)-Clovamides and their Deoxy Analogues from the Bark of *Dalbergia Melanoxylon*. *Phytochemistry*, 19, 2125-2129.
- [15] Pearl I. A., Beyer D. L. (1951). *J. Org. Chem.*, 16 (12), 217
- [16] Silverstein R.M., Bassler G.C., Morrill T.C. (1991), in *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, fifth edition, John Wiley & Sons Inc., New York.
- [17] Hahn R., Nahrstedt A. (1993). Hydroxycinnamic Acid Derivatives, Caffeoylmalic and New Caffeoylaldonic Acid Esters, from *Chelidonium majus*. *Planta Med.*, 59, 71-75.
- [18] Chawla A., Singh M., Murthy M.S., Gupta M.P., Singh H. (1987). Anti-inflammatory Action of Ferulic Acid and Its Esters in Carrageenan Induced Rat Paw Oedema Model. *Indian J. Exp. Biol.*, 25 (3), 187-189.
- [19] Ai C.-b., Li L.-n. (1992). Salvianolic Acids A and E: Two New Depsides from *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Med.*, 58, 197-199.
- [20] Sumaryono W., Proksch P., Wray V., Witte L., Hartmann T. (1991). Qualitative and Quantitative Analysis of the Phenolic Constituents from *Orthosiphon aristatus*. *Planta Med.*, 57, 176-180.
- [21] Cheminat A., Zawatzky R., Becker H., Brouillard R. (1988). Caffeoyl Conjugates from *Echinacea* Spices: Structures and Biological Activity. *Phytochemistry*, 27 (9), 2787-2794.
- [22] Kuhnt M., Rimpler H., Heinrich M. (1994). Lignans and other compounds from the mixe indian medicinal plant *Hyptis verticillata*. *Phytochemistry*, 36 (2), 485-489.
- [23] Gottlieb, O.R. (1968), in *Introdução à espectrometria de massa das substâncias orgânicas*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil.

[24] Petrou A.L. (1993). Binuclear vanadium(V) and vanadium(IV, V) complexes of dihydrocaffeic, caffeic and ferulic acids. *Transition Met. Chem.*, 18, 462-466.

## **Parte B**

### **Determinação da Actividade Anti-radicalar**

---

## Índice

	Pág.
<b>1. Introdução .....</b>	<b>56</b>
<b>2. Condições Experimentais .....</b>	<b>60</b>
<b>2.1. Instrumentação .....</b>	<b>60</b>
<b>2.2. Reagentes e solventes .....</b>	<b>60</b>
<b>2.3. Preparação da solução de DPPH<sup>•</sup> .....</b>	<b>61</b>
<b>2.4. Determinação da actividade anti-radicalar         (Método do DPPH<sup>•</sup>) .....</b>	<b>61</b>
<b>2.5. Descrição e análise estatística dos resultados .....</b>	<b>62</b>
<b>3. Resultados e discussão .....</b>	<b>63</b>
<b>4. Conclusão .....</b>	<b>89</b>
<b>5. Bibliografia .....</b>	<b>91</b>

## 1. Introdução

A determinação da capacidade antioxidante de compostos de origem sintética ou natural constitui uma área de inegável interesse no campo da química do alimento, do medicamento, dos produtos cosméticos e outros.

Grande parte dos compostos aos quais são reconhecidas propriedades antioxidantes apresentam, independentemente da sua origem natural ou sintética, uma estrutura fenólica (*e.g.* ácidos benzóicos e cinâmicos, flavonoides, BHT, BHA, galhato de propilo). Os compostos fenólicos podem actuar quer como *scavengers* de radicais livres, os quais participam nas etapas de iniciação e propagação dos processos de autoxidação (*e.g.* radicais alquilo ( $R^\bullet$ ), peróxilo ( $ROO^\bullet$ ), alcoxilo ( $RO^\bullet$ )), quer prevenindo a sua formação através da redução dos hidroperóxidos precursores. Alguns investigadores sugerem ainda a possibilidade de os antioxidantes fenólicos reagirem com outras espécies radicalares (*e.g.* anião radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radicais hidroperóxido ( $HOO^\bullet$ ) e hidroxilo ( $HO^\bullet$ )) ou com o oxigénio singuleto ( $^1O_2$ ), os quais podem também estar envolvidos nos processos de oxidação lipídica [1-5].

A actividade *scavenger* dos compostos fenólicos resulta da sua capacidade de cedência de átomos de hidrogénio ou electrões, com formação de radicais fenoxilo (**1**) (**fig. 1**). A estabilização desses radicais está dependente do efeito de ressonância do núcleo aromático e da acção de outros grupos substituintes presentes nas respectivas estruturas, e contribui de uma forma decisiva para a eficácia dos compostos na interrupção da propagação de processos radicalares (**figuras 1 e 2**) [5-8].

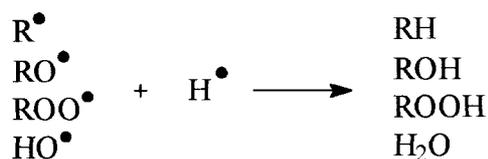
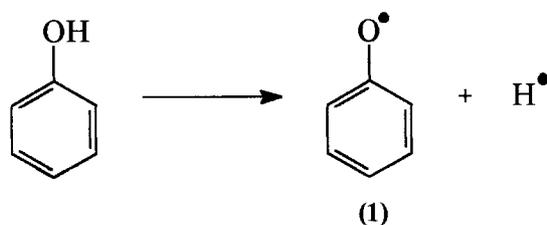


Fig. 1 – Formação do radical fenoxilo e “neutralização” de espécies radicalares.

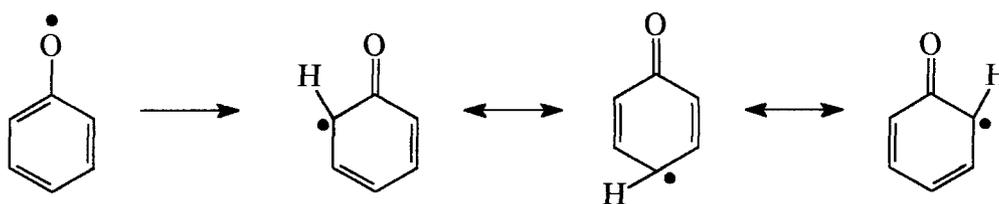


Fig. 2 – Estabilização do radical fenoxilo por efeito de ressonância.

Os radicais fenoxilo podem também sofrer dimerização ou reagir com espécies radicalares, originando produtos de acoplamento (fig. 3) [1].

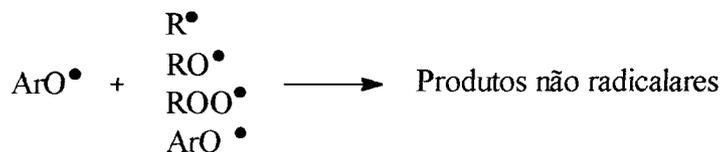


Fig. 3 – Reacção de acoplamento do radical fenoxilo.

Nos últimos anos assistiu-se ao desenvolvimento de um grande número de metodologias analíticas tendo como objectivo a avaliação da actividade anti-radicalar

e/ou antioxidante de compostos. A grande diversidade das condições de ensaio (*e.g.* substratos, concentrações, tempos, temperaturas) e dos sistemas modelo usados tem gerado algumas dificuldades no que respeita à interpretação e comparação de resultados, a qual geralmente se restringe a aspectos qualitativos [5, 9-12].

Procurando clarificar alguns aspectos contraditórios relativos à eficácia de certos compostos, alguns autores referem a necessidade de quantificar as respectivas actividades e de estabelecer uma correlação estrutura-actividade [5, 9].

Para a determinação da actividade anti-radicalar são normalmente efectuados um conjunto de testes genericamente designados de “ensaios armadilha” (*Trap Assays*), os quais permitem avaliar a capacidade *scavenger* de radicais livres [13-15].

Com o objectivo de determinar a actividade anti-radicalar dos compostos sintetizados (**Parte A**), foi seleccionado um método não enzimático, do tipo colorimétrico, tendo como base a reactividade dos compostos a ensaiar com o radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo<sup>1</sup> (DPPH<sup>•</sup>) (**2**) (**fig. 4**). Este radical apresenta um máximo de absorção a 517 nm (soluções etanólicas do radical possuem uma cor violeta forte). Contudo, após redução por um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (B<sup>•</sup>) observa-se uma diminuição da absorvência a esse comprimento de onda (descoloração), proporcional ao número de electrões ou átomos de hidrogénio abstraídos, e que traduz uma capacidade *scavenger* (**fig. 4**) [17-20].

Existe um considerável número de trabalhos tendo por base a aplicação deste método, alguns dos quais recorrem a técnicas de ressonância electrónica de *spin* (ESR), como alternativa à detecção espectrofotométrica do radical estável. Os resultados obtidos nesses estudos permitiram não só demonstrar a actividade anti-radicalar de certos extractos vegetais e/ou de diversos compostos fenólicos (*e.g.* ácidos fenólicos do tipo benzóico e cinâmico, derivados do ácido L-ascórbico, flavonoides, taninos), mas também quantificar as respectivas capacidades *scavenger*, pela determinação de parâmetros cinéticos [9, 17, 21-34, 41].

---

<sup>1</sup> Por vezes este radical aparece também designado por 1,1-Difenil-2-picril-hidrazilo. A designação 2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo está de acordo com as regras de nomenclatura da IUPAC, segundo as quais a posição 1 do radical deve ser atribuída ao átomo de azoto que possui o electrão desemparelhado [16].

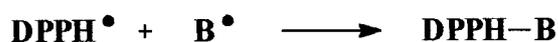
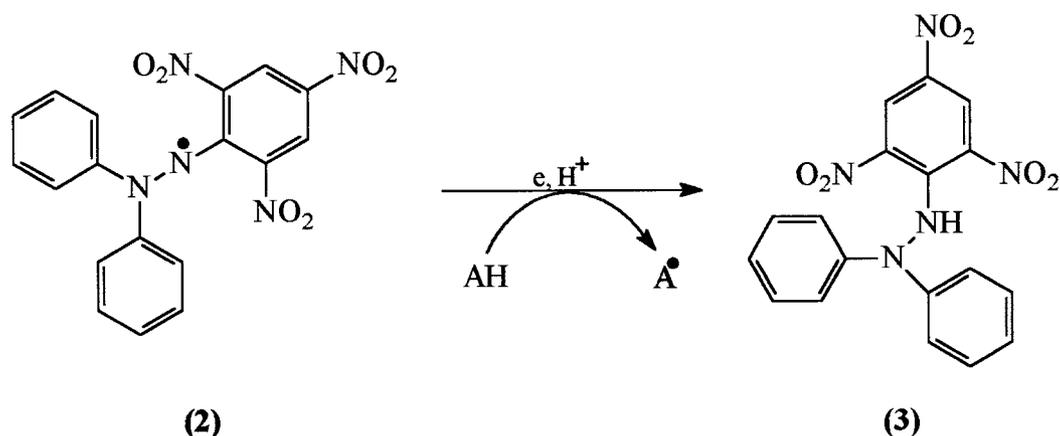


Fig. 4 - Redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH<sup>•</sup>).

Estudos recentes demonstraram que a abstracção de hidrogénio constitui o passo determinante para a velocidade da reacção dos compostos fenólicos com o DPPH<sup>•</sup>, e que a forma reduzida (DPPH-H) (3) (fig. 4) representa o principal produto dessa reacção [35]. Noutros trabalhos foi possível isolar e identificar os produtos de acoplamento de vários alquilgalhatos com o DPPH<sup>•</sup> (dialquil-hexaidroxifenatos) [4, 21]. Estes dados reforçam a hipótese de que o mecanismo de abstracção de átomos de H pelo DPPH<sup>•</sup> é muito semelhante ao que se verifica na presença de espécies reactivas de oxigénio (ROS<sup>2</sup>), embora salvaguardando algumas diferenças de reactividade [9, 12]. Alguns autores observaram a existência de uma boa correlação entre as actividades *scavenger* de DPPH<sup>•</sup> e de outros radicais para certos compostos [12].

<sup>2</sup> Frequentemente encontra-se na literatura o termo “radicais de oxigénio”. Porém, é uma designação incorrecta quando aplicada a todas as espécies de oxigénio, nas quais se incluem formas moleculares não radicalares (*e.g.* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>). É preferível falar em “espécies reactivas de oxigénio” (ROS) para designar colectivamente espécies radicalares e não radicalares [36, 37].

Com o presente trabalho procurou avaliar-se a capacidade anti-radicalar de ácidos hidroxicinâmicos (*e.g.* ácidos cafeico, ferúlico, isoferúlico e hidrocafeico) e dos seus ésteres metílicos e propílicos (**Parte A**), a qual foi comparada com a de outros compostos fenólicos modelo, cujas capacidade *scavenger* e actividade antioxidante são amplamente reconhecidas (*e.g.* o ácido gálgico, os seus ésteres metílico e propílico, e o ( $\pm$ )- $\alpha$ -tocoferol) [10, 38].

A presença de pelo menos um grupo fenólico nas respectivas estruturas químicas (**figuras 5a-5d, páginas 63 e 64**) sugere a possibilidade de cedência de pelo menos um átomo de H, e subsequente formação de radicais fenoxilo, actuando provavelmente como antioxidantes primários.

Neste estudo procurou-se igualmente reflectir sobre alguns aspectos da reactividade dos compostos ensaiados e analisar os resultados obtidos com base na relação estrutura-actividade (SAR).

## 2. Condições Experimentais

### 2.1. Instrumentação

- As pesagens foram efectuadas em balança Mettler AE 100.
- As determinações espectrofotométricas foram realizadas num espectrofotómetro UV/Vis Varian Cary 1E, usando células descartáveis de poliestireno com 1 cm de percurso óptico, adquiridas à firma ATI Unicam.

### 2.2. Reagentes e solventes

- Os ácidos gálgico, cafeico, ferúlico, isoferúlico e hidrocafeico, e os galhatos de metilo e de propilo foram adquiridos à firma Aldrich. O ( $\pm$ )- $\alpha$ -tocoferol e o radical

2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH<sup>•</sup>) são produtos da marca Sigma. O etanol absoluto, de qualidade espectrofotométrica, foi adquirido à firma Merck.

- Os ésteres dos ácidos cinâmicos foram sintetizados de acordo com os procedimentos referidos na **Parte A**.

### 2.3. Preparação da solução de DPPH<sup>•</sup>

A preparação da solução etanólica de DPPH<sup>•</sup> usada nas determinações foi efectuada atendendo às considerações de Blois [18]. Desta forma procurou-se minimizar a perda de actividade do radical.

Para a preparação de uma solução de concentração 0,1 mM, cerca de 39,4 mg (0,1 mmol) do radical foram dissolvidos em 10,0 ml de etanol absoluto. Após agitação em vórtex (30 segundos), a solução foi colocada num banho de ultra-sons durante 15 minutos. Em seguida, retirou-se 1,0 ml e diluiu-se a 100,0 ml com etanol absoluto.

Esta solução foi preparada diariamente e mantida ao abrigo da luz.

UV/Vis  $\lambda_{\text{máx.}}^{\text{Etanol}}$  (nm) (log  $\epsilon$ ): 204 (4,5), 327 (4,1), 517 (3,9).

### 2.4. Determinação da actividade anti-radicalar (Método do DPPH<sup>•</sup>)

O procedimento experimental foi baseado no método de Ohnishi *et al.* [22] e para cada composto foram ensaiadas diferentes concentrações (10, 20, 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$ ).

A 3,0 ml de uma solução etanólica de DPPH<sup>•</sup> 0,1 mM adicionou-se 0,5 ml de uma solução etanólica do composto a ensaiar. Após rápida agitação em vórtex (aprox. 3 segundos), o decréscimo do valor de absorvência foi seguido por espectrofotometria no visível ( $\lambda = 517 \text{ nm}$ ), à temperatura ambiente e usando etanol como branco. Os valores

de absorvência foram registados no  $t_0$  e em intervalos de 60 segundos durante 40 minutos. Decorrido esse tempo, e somente para os casos em que a reacção não atingiu o estado de equilíbrio, foram efectuadas leituras em intervalos subsequentes de 40 minutos até ao tempo máximo de reacção de 200 minutos.

Para cada composto e concentração testados foram realizadas determinações em triplicado. Em todos os ensaios incluiu-se uma amostra controlo, na qual a solução de composto foi substituída por igual volume de etanol.

## 2.5. Descrição e análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos foram representados sob a forma de gráficos de valores de absorvência ( $A$ ) (valores médios  $\pm$  erros padrão) em função do tempo ( $t$ ). Em alguns casos as barras de erro foram omitidas por serem inferiores ao tamanho dos símbolos usados na representação.

O tempo necessário para se atingir o equilíbrio da reacção foi determinado por comparação estatística das leituras de absorvência efectuadas ao longo do tempo, através de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Fisher. As diferenças foram consideradas significativas para  $P \leq 0,05$ , admitindo-se que a reacção atingiu o equilíbrio no tempo a partir do qual deixaram de existir diferenças significativas entre o respectivo valor de absorvência e os valores de leituras subsequentes.

A percentagem de inibição do radical (% Inib.), que corresponde a uma medida da actividade *scavenger*, foi calculada segundo a fórmula proposta por Ogata *et al.* [39]

$$\% \text{ Inib.} = [(A_c - A_t) / A_c] \times 100$$

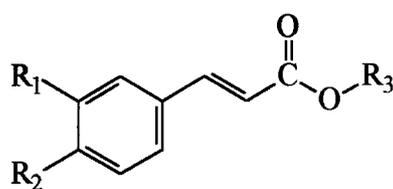
em que  $A_c$  corresponde à absorvência do controlo (solução de DPPH<sup>•</sup> isenta de composto teste) e  $A_t$  à absorvência do problema (solução de DPPH<sup>•</sup> com o composto teste).

Diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre os valores de % Inib. traduzem diferentes actividades anti-radicalares.

### 3. Resultados e discussão

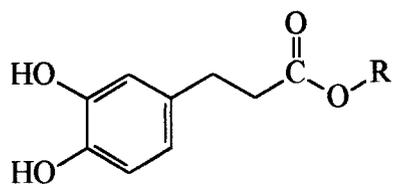
A selecção do comprimento de onda adequado para as determinações (517 nm) foi efectuada com base nos dados de UV/Vis do radical DPPH (2.3., pág. 61) e dos compostos a ensaiar (Parte A). Foi possível constatar que nenhum dos compostos absorve na região do visível, garantindo-se, assim, a não ocorrência de interferências por sobreposição de bandas.

A actividade anti-radicalar de 15 compostos (figuras 5a-5c), nas concentrações de 10, 20, 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$ , foi determinada pelo método do DPPH $^{\bullet}$  e comparada com a do ( $\pm$ )- $\alpha$ -tocoferol (fig. 5d), nas mesmas concentrações. A gama de concentrações ensaiada foi seleccionada de acordo com o trabalho de Ohnishi *et al.* [22].



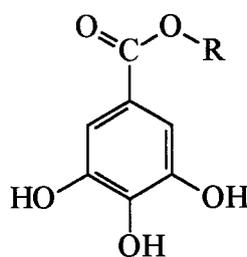
Compostos	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Ácido cafeico (C)	OH	OH	H
Cafeiato de metilo (CM)	OH	OH	CH <sub>3</sub>
Cafeiato de propilo (CP)	OH	OH	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
Ácido ferúlico (F)	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Ferulato de metilo (FM)	OCH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>
Ferulato de propilo (FP)	OCH <sub>3</sub>	OH	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
Ácido isoferúlico (I)	OH	OCH <sub>3</sub>	H
Isoferulato de metilo (IM)	OH	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
Isoferulato de propilo (IP)	OH	OCH <sub>3</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>

Fig. 5a – Estruturas químicas dos ácidos cafeico, ferúlico e isoferúlico, e respectivos ésteres metílicos e propílicos.



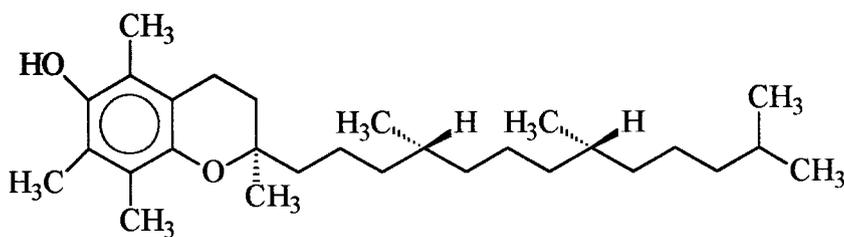
Compostos	R
Acido hidrocafeico (HC)	H
Hidrocafeiato de metilo (HCM)	CH <sub>3</sub>
Hidrocafeiato de propilo (HCP)	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>

Fig. 5b - Estrutura química do ácido hidrocafeico e seus ésteres metílico e propílico.



Compostos	R
Acido gálgico (G)	H
Galhato de metilo (GM)	CH <sub>3</sub>
Galhato de propilo (GP)	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>

Fig. 5c - Estrutura química do ácido gálgico e seus ésteres metílico e propílico.



Composto
(+)- $\alpha$ -Tocoferol ( $\alpha$ -TOH)

Fig. 5d - Estrutura químicas do (+)- $\alpha$ -Tocoferol.

As figuras 6a-6p mostram o decréscimo de absorvência da solução do radical DPPH ao longo do tempo, na presença de cada um dos compostos ensaiados. A abstracção de átomos de H pelo radical e a formação da respectiva hidrazina (DPPH-H), origina uma descoloração da solução (mudança de cor de violeta para amarelo) e, conseqüentemente, uma diminuição da absorvência.

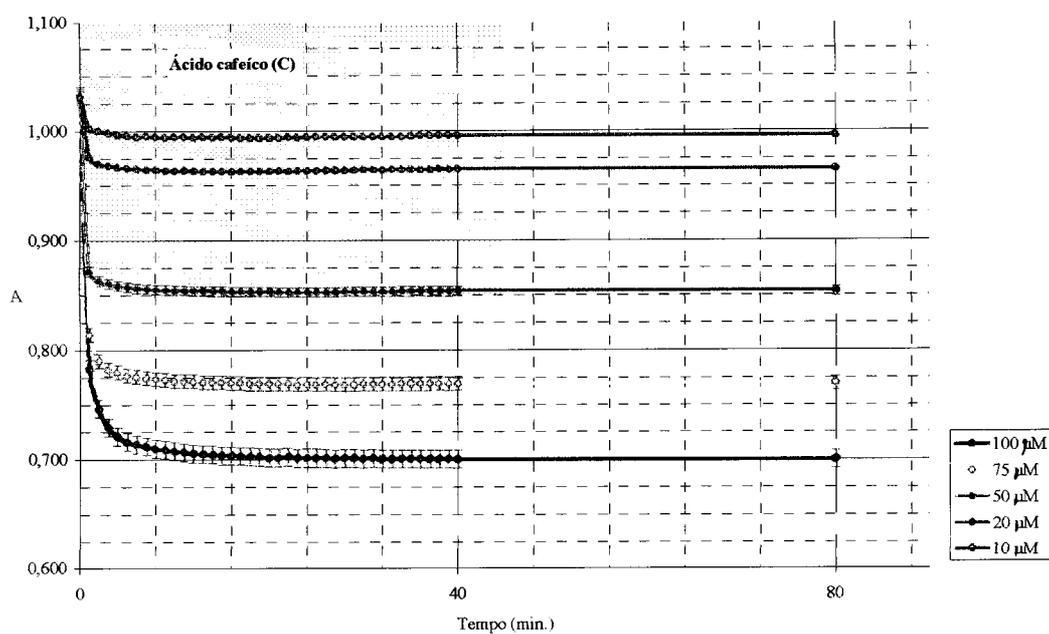


Fig. 6a – Descoloração da solução de DPPH<sup>•</sup> pelo ácido cafeico.

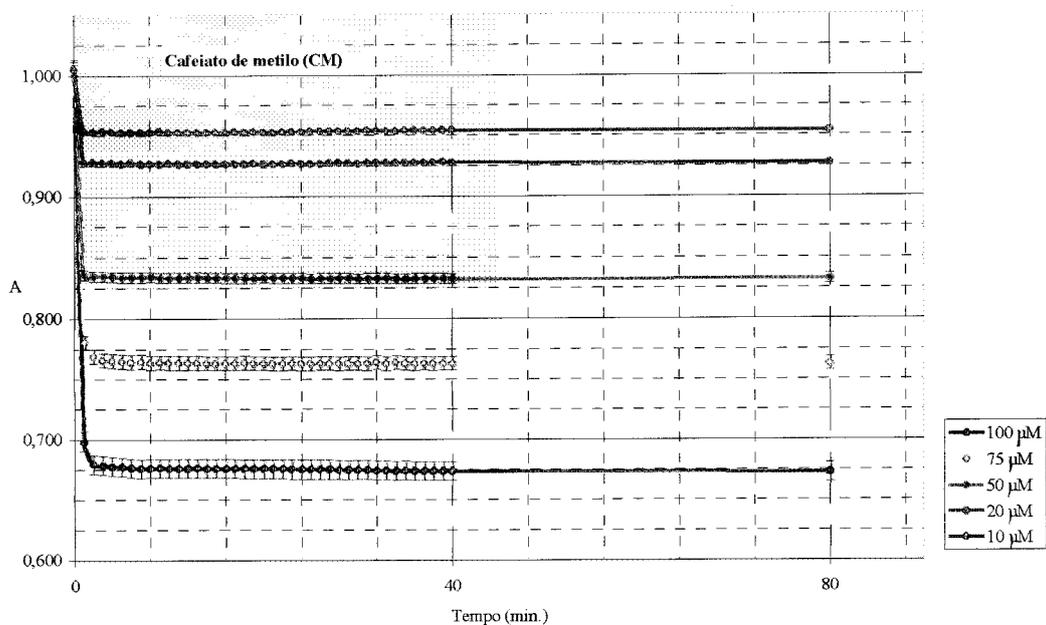


Fig. 6b – Descoloração da solução de DPPH<sup>•</sup> pelo cafeiato de metilo.

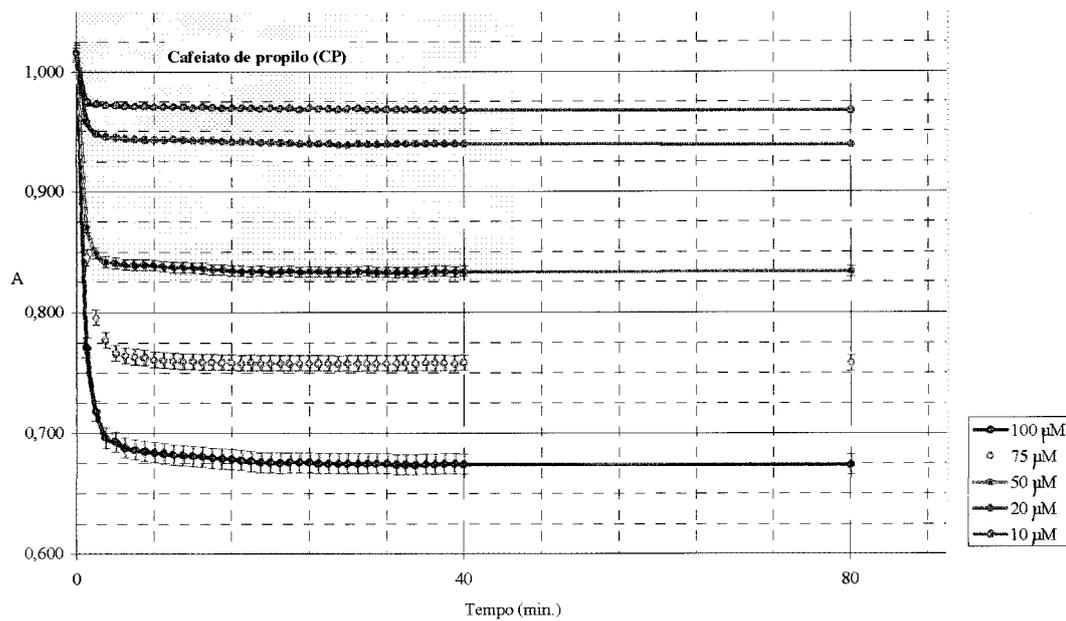


Fig. 6c – Descoloração da solução de DPPH<sup>•</sup> pelo cafeiato de propilo.

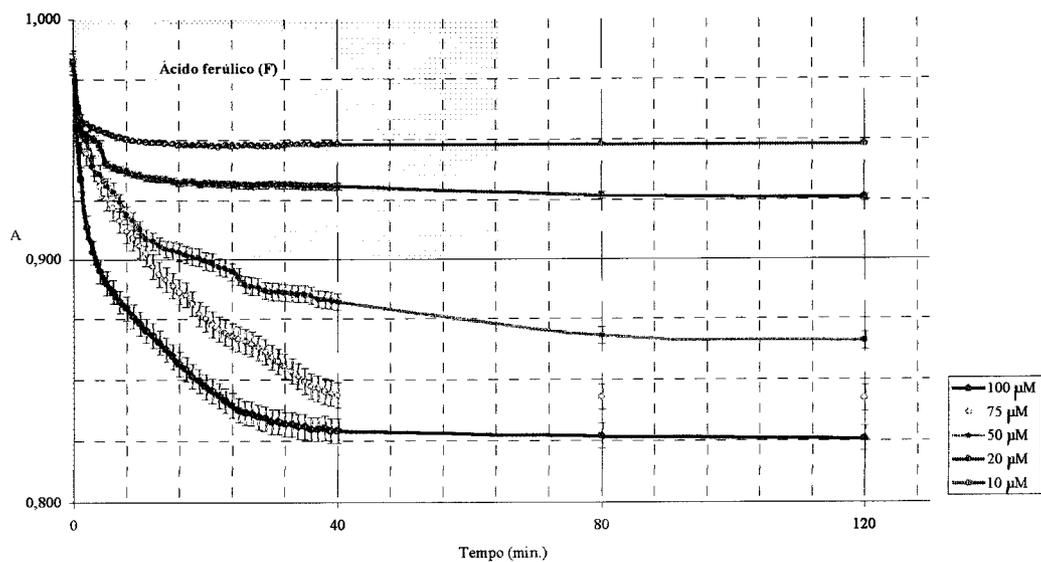


Fig. 6d – Descoloração da solução de DPPH<sup>•</sup> pelo ácido ferúlico.

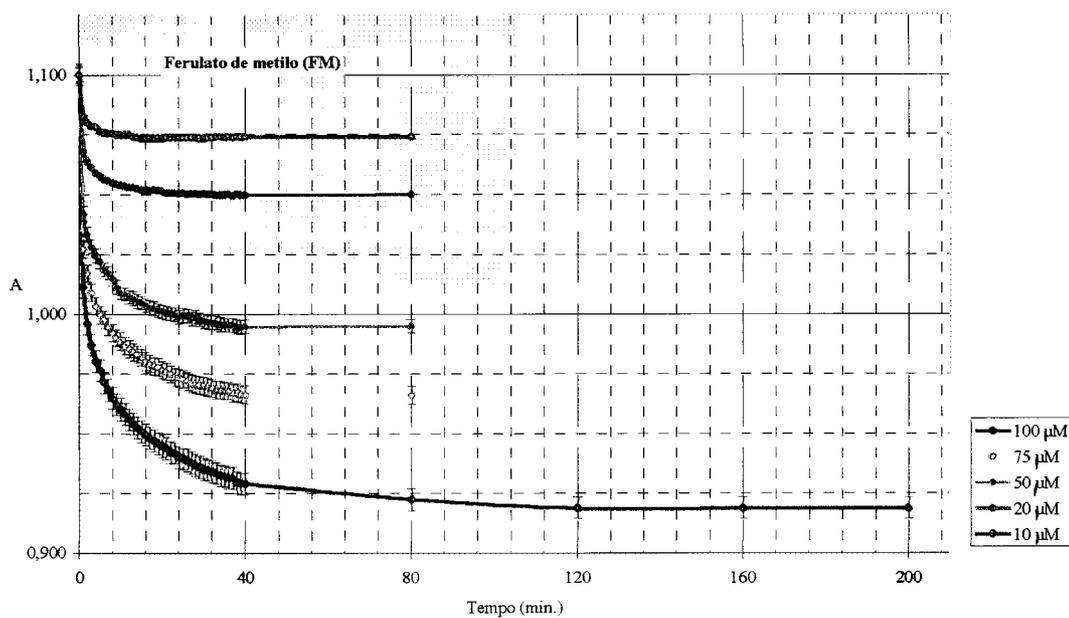
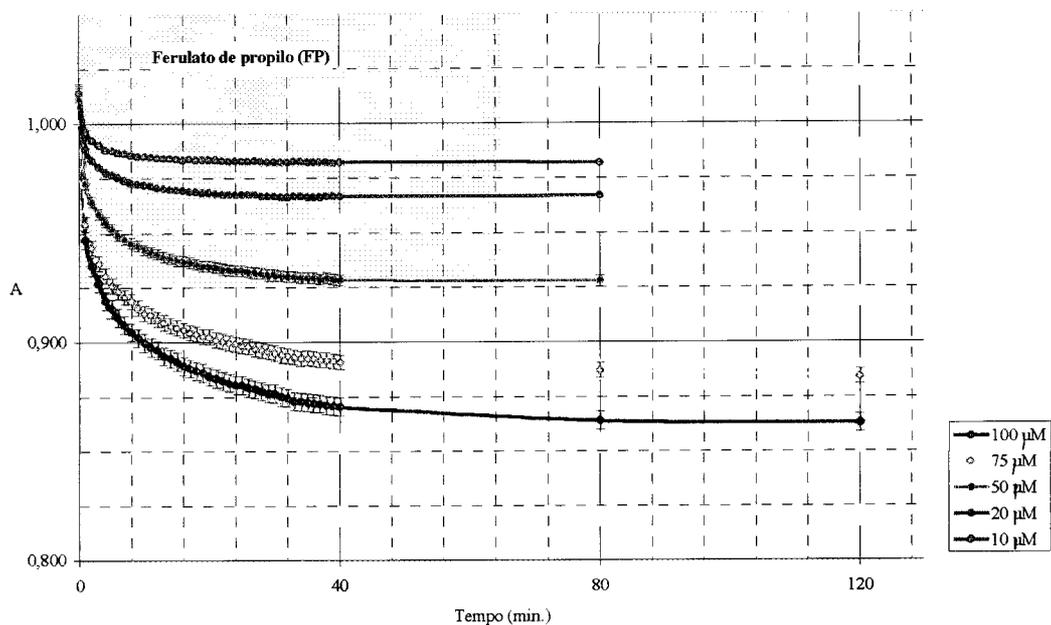
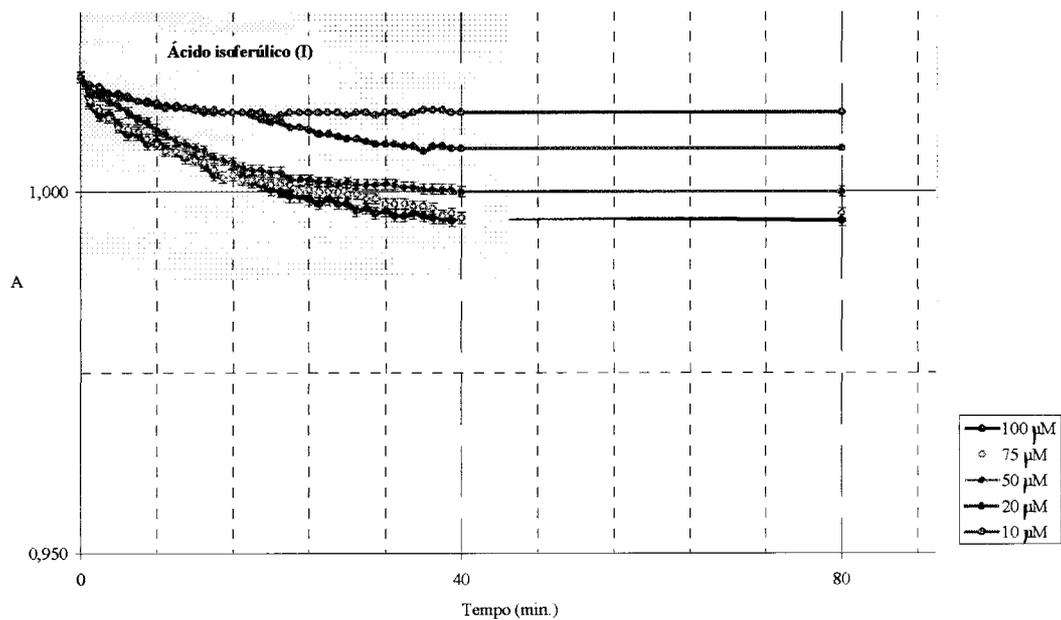


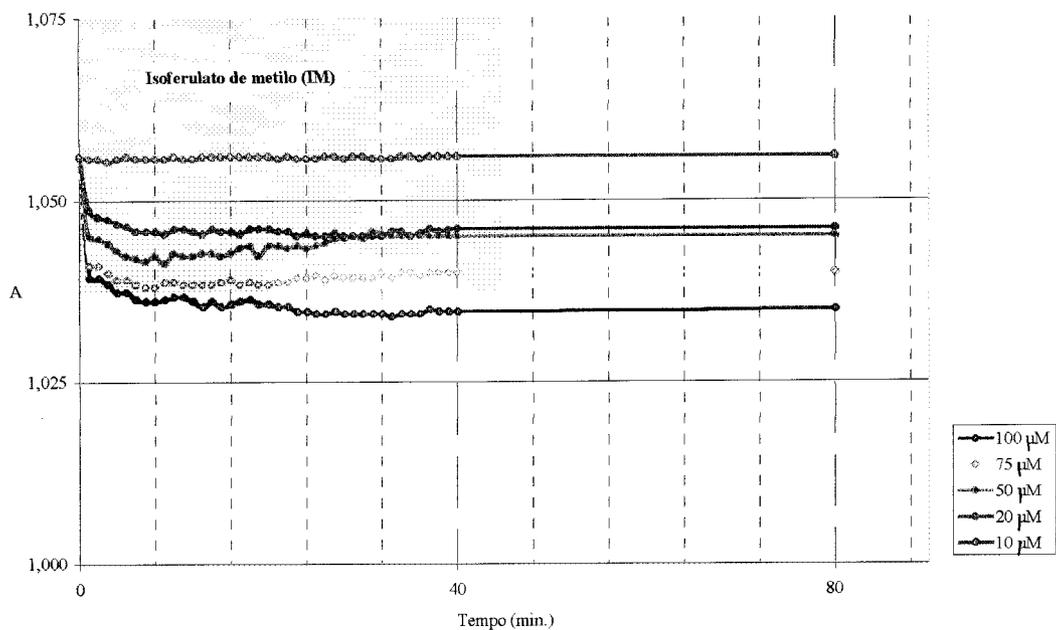
Fig. 6e – Descoloração da solução de DPPH<sup>•</sup> pelo ferulato de metilo.



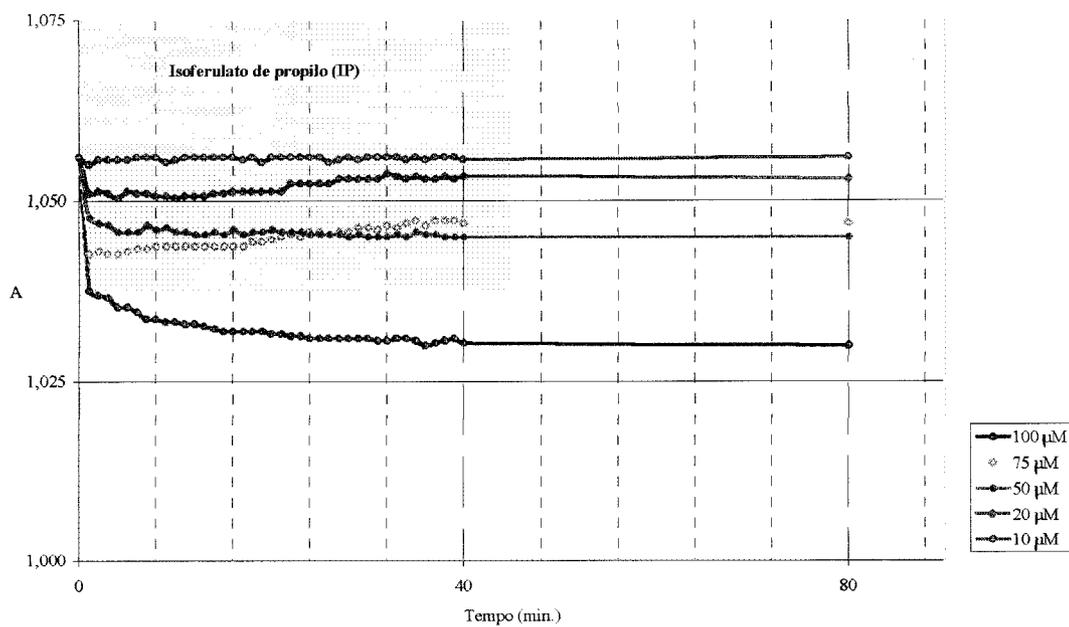
**Fig. 6f – Descoloração da solução de DPPH<sup>•</sup> pelo ferulato de propilo.**



**Fig. 6g – Descoloração da solução de DPPH<sup>•</sup> pelo ácido isoferúlico.**



**Fig. 6h** – Descoloração da solução de DPPH<sup>•</sup> pelo isoferulato de metilo.



**Fig. 6i** – Descoloração da solução de DPPH<sup>•</sup> pelo isoferulato de propilo.

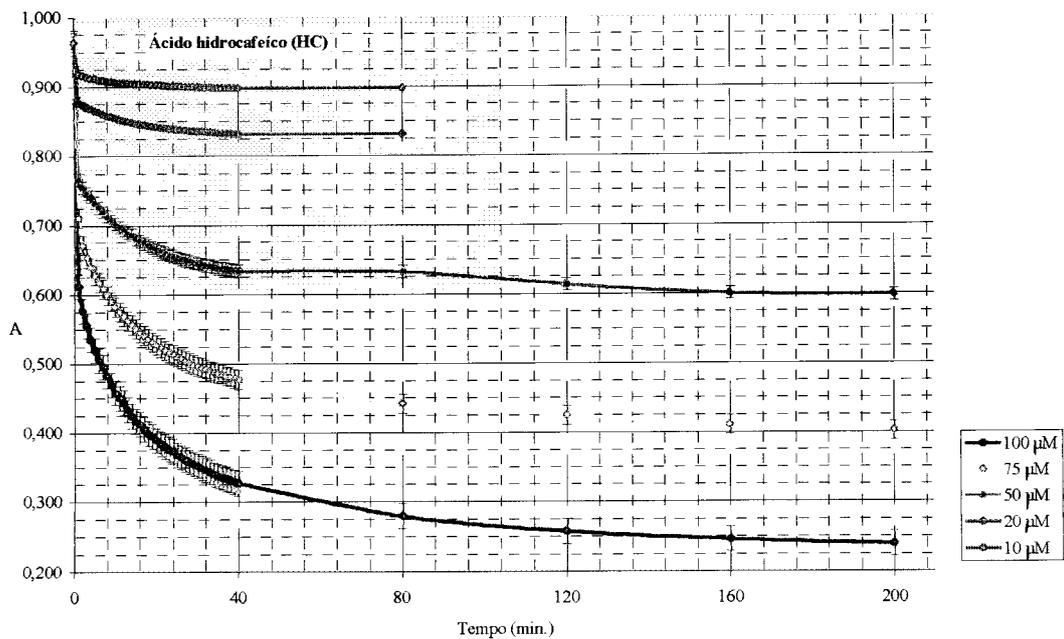


Fig. 6j – Descoloração da solução de DPPH<sup>•</sup> pelo ácido hidrocaféico.

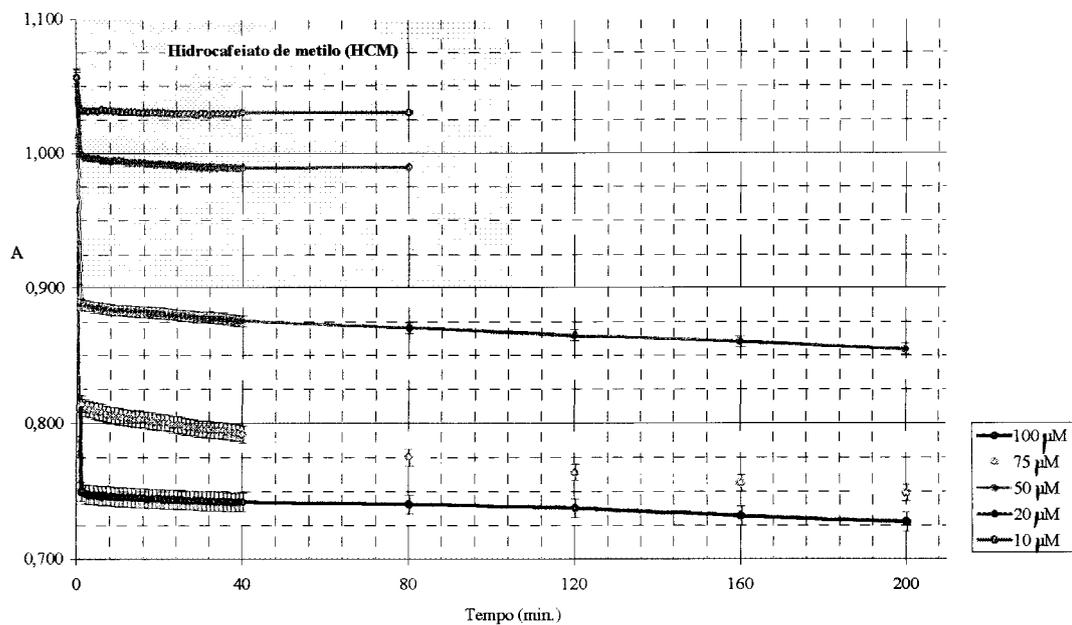


Fig. 6k – Descoloração da solução de DPPH<sup>•</sup> pelo hidrocaféato de metilo.

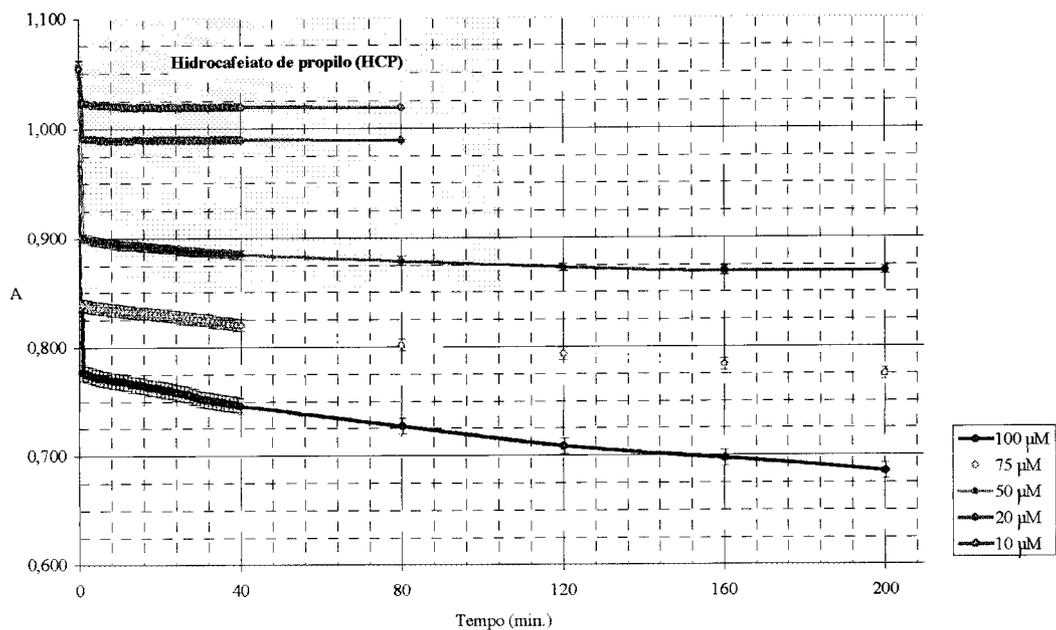


Fig. 6l – Descoloração da solução de DPPH<sup>•</sup> pelo hidrocafeiato de propilo.

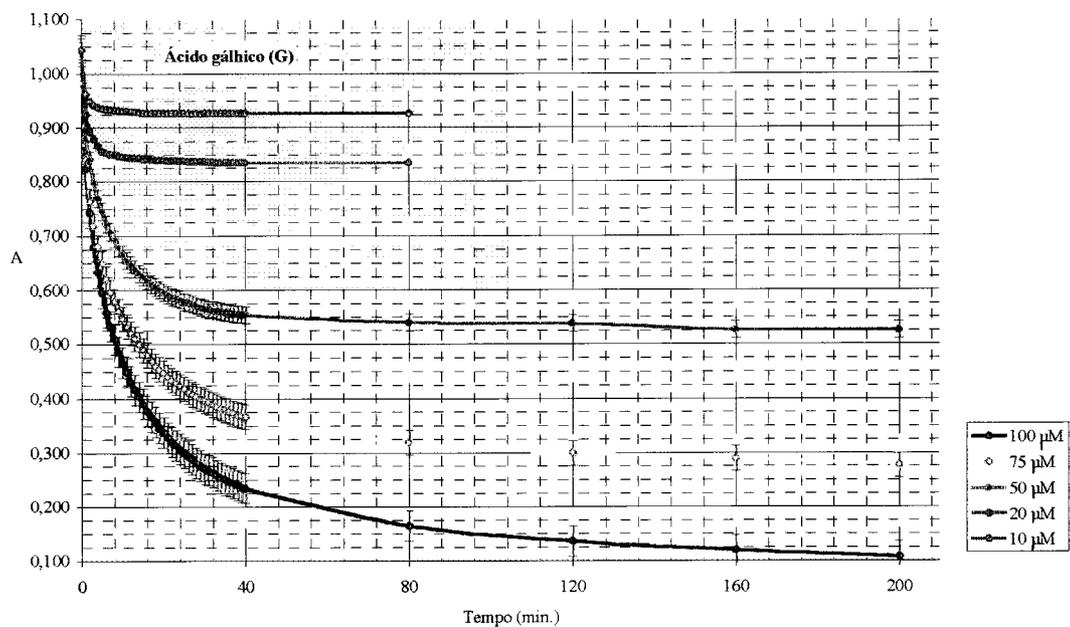


Fig. 6m – Descoloração da solução de DPPH<sup>•</sup> pelo ácido gálico.

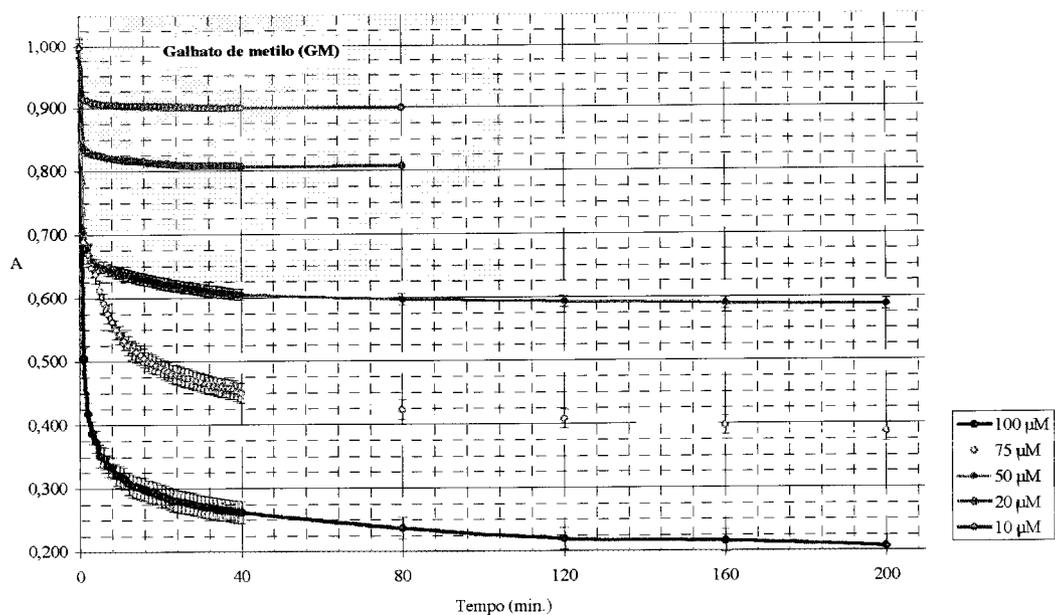


Fig. 6n – Descoloração da solução de DPPH<sup>•</sup> pelo galhato de metilo.

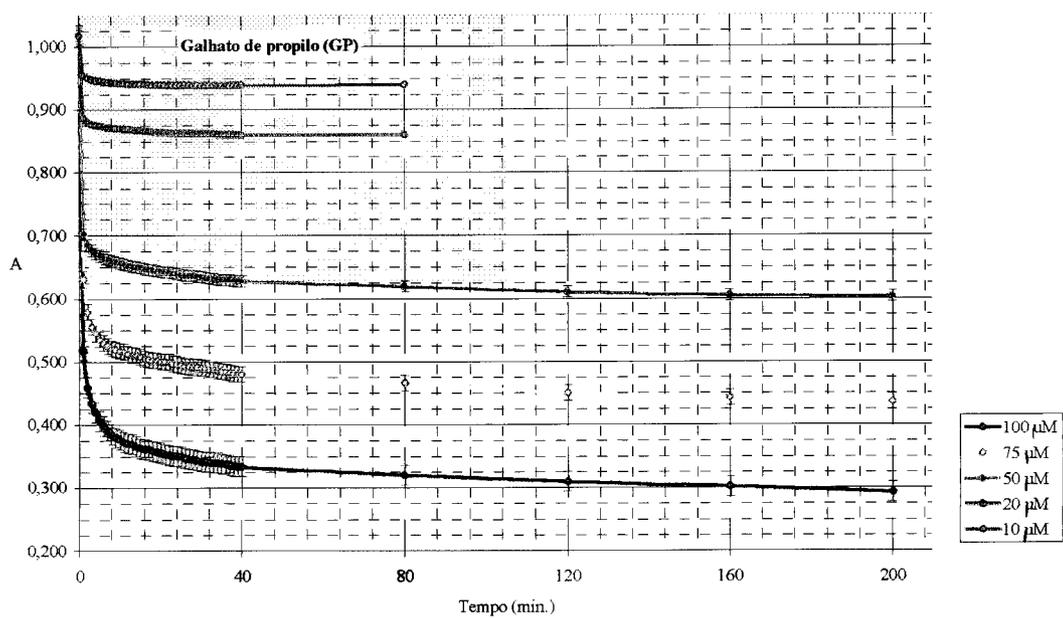


Fig. 6o – Descoloração da solução de DPPH<sup>•</sup> pelo galhato de propilo.

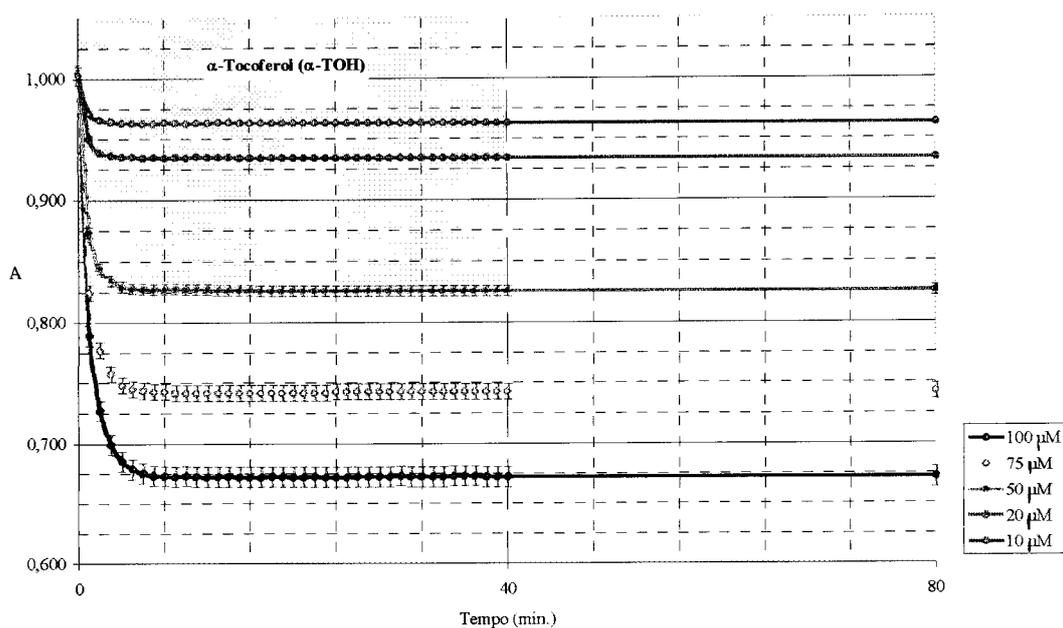


Fig. 6p – Descoloração da solução de  $\text{DPPH}^{\bullet}$  pelo  $(\pm)\text{-}\alpha\text{-tocoferol}$ .

É notório que em algumas situações a adição dos compostos se traduziu numa diminuição de absorvância muito pequena (inferior a 5%) ou mesmo nula. Incluem-se neste grupo o ácido cafeico e os seus ésteres metílico e propílico (conc. 10  $\mu\text{M}$ ), o ácido ferúlico (conc. 10  $\mu\text{M}$ ), o ferulato de metilo e de propilo (conc. 10 e 20  $\mu\text{M}$ ), o ácido isoferúlico e os seus ésteres metílico e propílico (todas as concentrações), o hidrocafeiato de metilo e de propilo (conc. 10  $\mu\text{M}$ ) e o  $(\pm)\text{-}\alpha\text{-tocoferol}$  (conc. 10  $\mu\text{M}$ ). Estes resultados traduzem um poder anti-radicalar reduzido, nas condições experimentais referidas.

Nos casos em que a descoloração da solução do radical ocorreu em maior extensão (*e.g.* ácidos cafeico, hidrocafeico e gálico, respectivos ésteres metílicos e propílicos, e  $(\pm)\text{-}\alpha\text{-tocoferol}$ , todos para concentrações superiores a 20  $\mu\text{M}$ ) verificou-se que mais de 50% do decréscimo total de absorvância registado ao longo do ensaio ocorreu nos primeiros 5 minutos de reacção. Esse efeito é particularmente evidente no caso do ácido cafeico, e seus ésteres, e do  $(\pm)\text{-}\alpha\text{-tocoferol}$ , para os quais o decréscimo

observado no referido período de tempo correspondeu a 90-100% do total registado. Provavelmente quanto mais rápido é o decréscimo de absorvência, maior será a capacidade dos compostos para doar com celeridade átomos de H, isto é, para interagir rapidamente com espécies radicalares.

A análise dos gráficos  $A = f(t)$  permite verificar que a evolução da cinética da reacção de redução do DPPH<sup>•</sup> depende da natureza e da concentração do composto ensaiado, facto que está de acordo com os resultados de outros autores [17].

Os dados obtidos permitiram distinguir três tipos de comportamento cinético, com base nos seguintes critérios (**tabela 1**):

- **Rápido**, correspondendo a uma rápida descoloração da solução de DPPH<sup>•</sup>, atingindo-se o estado de equilíbrio em menos de 20 minutos;
- **Intermédio**, em que o equilíbrio da reacção se alcança num intervalo de tempo compreendido entre os 20 e os 30 minutos;
- **Lento**, traduzido por curvas cujo patamar correspondente ao equilíbrio se observa para além dos 30 minutos ou não se atinge ao fim do tempo limite estabelecido para a reacção (200 min.).

Comportamento cinético					
Rápido ( $t_{\text{equilíbrio}} \leq 20 \text{ min.}$ )		Intermédio ( $20 \text{ min.} < t_{\text{equilíbrio}} \leq 30 \text{ min.}$ )		Lento ( $t_{\text{equilíbrio}} > 30 \text{ min.}$ )	
Composto	Conc. ( $\mu\text{M}$ )	Composto	Conc. ( $\mu\text{M}$ )	Composto	Conc. ( $\mu\text{M}$ )
C	10, 20, 50, 75, 100	FP	20, 50	F	50, 75, 100
CM	10, 20, 50, 75, 100	I	10, 50, 100	FM	50, 75, 100
CP	10, 20, 50, 75, 100	IM	75, 100	FP	75, 100
F	10, 20	IP	20, 50	I	20, 75
FM	10, 20	HC	10	IM	50
FP	10	HCM	20	IP	75, 100
IM	10, 20	GM	10, 20	HC	20, 50, 75, 100
IP	10			HCM	50, 75, 100
HCM	10			HCP	50, 75, 100
HCP	10, 20			G	20, 50, 75, 100
G	10			GM	50, 75, 100
GP	10			GP	20, 50, 75, 100
$\alpha$ -TOH	10, 20, 50, 75, 100				

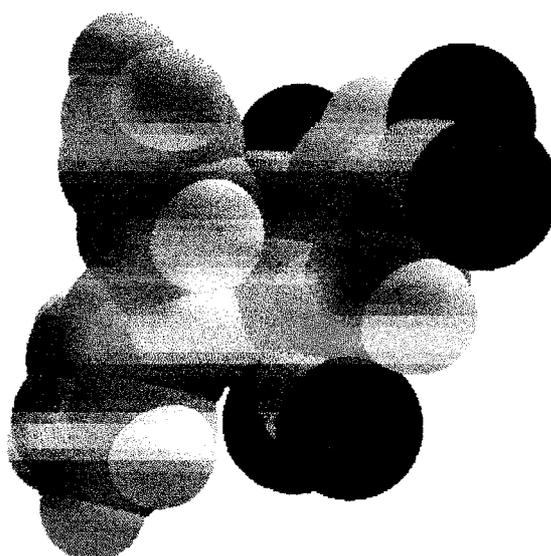
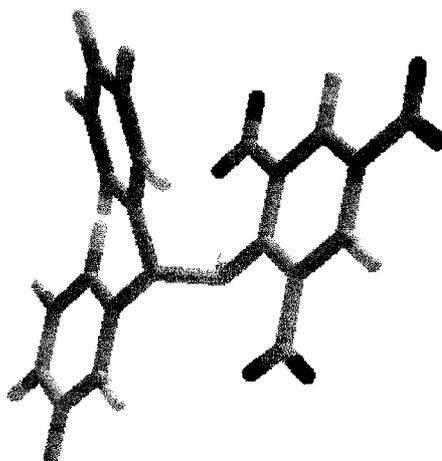
**Tabela 1 - Comportamento cinético dos compostos ensaiados em função da concentração e do tempo necessário para se atingir o equilíbrio da reacção.**

Algumas das variações de comportamento cinético entre os diferentes compostos podem provavelmente justificar-se com base na teoria das colisões, segundo a qual a velocidade da reacção será determinada por três factores:

- Frequência de colisões, isto é, o número de choques entre as moléculas do composto e do radical por unidade de tempo e por unidade de volume da mistura reaccional;
- Factor de energia, isto é, a fracção de colisões com energia suficiente para que as moléculas que colidem reajam entre si (colisões efectivas);
- Factor probabilidade, ou seja, a fracção de colisões que ocorre com a orientação adequada para que a reacção se processe.

O primeiro factor está intimamente relacionado com o procedimento experimental, uma vez que varia de forma proporcional com a temperatura, a agitação e a concentração. Todas as determinações foram realizadas à temperatura ambiente, garantindo dessa forma a estabilidade do radical, e as condições de agitação do meio reaccional foram tanto quanto possível padronizadas (aprox. 3 segundos em vórtex).

Para a maioria dos compostos não se observou uma correlação entre o tipo de comportamento cinético e a concentração, com excepção do ácido cafeico e derivados, e do ( $\pm$ )- $\alpha$ -tocoferol. A molécula do DPPH<sup>•</sup> apresenta na sua estrutura grupos volumosos, pelo que o acesso ao átomo de N que possui o electrão desemparelhado se encontra amplamente condicionado pelo impedimento estérico resultante (**fig. 7**). Este facto, aliado aos factores estéricos da própria estrutura dos compostos, poderá originar um menor número de colisões com orientação apropriada e, portanto, uma diminuição da velocidade da reacção.



**Fig. 7 - Estruturas tridimensionais da molécula do DPPH-H realçando a presença de grupos volumosos.**

Ao contrário de outros trabalhos nos quais a actividade anti-radicalar foi determinada ao fim de um certo tempo de reacção (na maior parte dos casos 20 ou 30 min. [21-23, 28, 29, 40]), neste estudo optou-se por avaliar essa mesma actividade no estado de equilíbrio, isto é, numa situação em que já não se verifica a progressão da

reacção. A comparação dos resultados relativos à percentagem de inibição (% Inib.) do radical, expressos nas **tabelas 2a-2p**, permite constatar que, somente nos casos em que os compostos reagem com o DPPH<sup>•</sup> segundo um padrão de cinética rápida não se observam diferenças consideráveis entre os referidos procedimentos. Para os compostos com um comportamento cinético lento, e em alguns casos intermédio, registam-se variações significativas dos valores de % Inib. no equilíbrio e ao fim de 20 e/ou 30 minutos.

		Ácido cafeico (C)				
		100 µM	75 µM	50 µM	20 µM	10 µM
% Inibição	20 min.	31,9 <sup>a</sup>	25,5 <sup>b</sup>	17,3 <sup>c</sup>	6,7 <sup>d</sup>	3,7 <sup>e</sup>
	30 min.	32,1 <sup>a</sup>	25,5 <sup>b</sup>	17,3 <sup>c</sup>	6,6 <sup>d</sup>	3,7 <sup>e</sup>
	Equilíbrio	30,8 <sup>a</sup>	24,9 <sup>b</sup>	16,9 <sup>c</sup>	6,2 <sup>d</sup>	3,1 <sup>e</sup>

Valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes para  $P \leq 0,05$ .

**Tabela 2a – Valores de % Inib. do radical pelo ácido cafeico.**

		Cafeiato de metilo (CM)				
		100 µM	75 µM	50 µM	20 µM	10 µM
% Inibição	20 min.	32,8 <sup>a</sup>	24,1 <sup>b</sup>	17,0 <sup>c</sup>	7,9 <sup>d</sup>	5,3 <sup>e</sup>
	30 min.	32,8 <sup>a</sup>	24,1 <sup>b</sup>	17,1 <sup>c</sup>	7,8 <sup>d</sup>	5,1 <sup>e</sup>
	Equilíbrio	32,6 <sup>a</sup>	23,9 <sup>b</sup>	16,8 <sup>c</sup>	7,8 <sup>d</sup>	5,2 <sup>e</sup>

Valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes para  $P \leq 0,05$ .

**Tabela 2b - Valores de % Inib. do radical pelo cafeiato de metilo.**

		Cafeiato de propilo (CP)				
		100 µM	75 µM	50 µM	20 µM	10 µM
% Inibição	20 min.	33,5 <sup>a</sup>	25,4 <sup>b</sup>	18,0 <sup>c</sup>	7,4 <sup>d</sup>	4,6 <sup>e</sup>
	30 min.	33,7 <sup>a</sup>	25,4 <sup>b</sup>	17,9 <sup>c</sup>	7,6 <sup>d</sup>	4,7 <sup>e</sup>
	Equilíbrio	33,2 <sup>a</sup>	25,0 <sup>b</sup>	17,5 <sup>c</sup>	7,3 <sup>d</sup>	4,4 <sup>e</sup>

Valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes para  $P \leq 0,05$ .

**Tabela 2c - Valores de % Inib. do radical pelo cafeiato de propilo.**

		Ácido ferúlico (F)				
		100 $\mu$ M	75 $\mu$ M	50 $\mu$ M	20 $\mu$ M	10 $\mu$ M
% Inibição	20 min.	13,7 <sup>a</sup>	10,9 <sup>b</sup>	8,5 <sup>c</sup>	5,1 <sup>d</sup>	3,5 <sup>e</sup>
	30 min.	15,0 <sup>f</sup>	12,1 <sup>g</sup>	9,6 <sup>h</sup>	5,2 <sup>d</sup>	3,6 <sup>e</sup>
	Equilíbrio	15,6 <sup>i</sup>	14,2 <sup>j</sup>	11,6 <sup>k</sup>	5,1 <sup>d</sup>	3,2 <sup>e</sup>

Valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes para  $P \leq 0,05$ .

Tabela 2d - Valores de % Inib. do radical pelo ácido ferúlico.

		Ferulato de metilo (FM)				
		100 $\mu$ M	75 $\mu$ M	50 $\mu$ M	20 $\mu$ M	10 $\mu$ M
% Inibição	20 min.	14,1 <sup>a</sup>	11,3 <sup>b</sup>	9,0 <sup>c</sup>	4,5 <sup>d</sup>	2,5 <sup>e</sup>
	30 min.	15,0 <sup>f</sup>	11,8 <sup>g</sup>	9,4 <sup>h</sup>	4,5 <sup>d</sup>	2,5 <sup>e</sup>
	Equilíbrio	16,5 <sup>i</sup>	12,0 <sup>j</sup>	9,5 <sup>k</sup>	4,4 <sup>d</sup>	2,2 <sup>e</sup>

Valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes para  $P \leq 0,05$ .

Tabela 2e - Valores de % Inib. do radical pelo ferulato de metilo.

		Ferulato de propilo (FP)				
		100 $\mu$ M	75 $\mu$ M	50 $\mu$ M	20 $\mu$ M	10 $\mu$ M
% Inibição	20 min.	12,8 <sup>a</sup>	11,0 <sup>b</sup>	7,8 <sup>c</sup>	4,5 <sup>d</sup>	3,1 <sup>e</sup>
	30 min.	13,6 <sup>f</sup>	11,7 <sup>g</sup>	8,2 <sup>h</sup>	4,6 <sup>i</sup>	3,2 <sup>e</sup>
	Equilíbrio	14,8 <sup>j</sup>	12,5 <sup>k</sup>	8,1 <sup>l</sup>	4,6 <sup>i</sup>	3,1 <sup>e</sup>

Valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes para  $P \leq 0,05$ .

Tabela 2f - Valores de % Inib. do radical pelo ferulato de propilo.

		Ácido isoferúlico (I)				
		100 $\mu$ M	75 $\mu$ M	50 $\mu$ M	20 $\mu$ M	10 $\mu$ M
% Inibição	20 min.	1,6 <sup>a</sup>	1,5 <sup>a</sup>	1,3 <sup>b</sup>	0,6 <sup>c</sup>	0,6 <sup>d</sup>
	30 min.	1,8 <sup>e</sup>	1,7 <sup>f</sup>	1,5 <sup>g</sup>	0,9 <sup>h</sup>	0,5 <sup>i</sup>
	Equilíbrio	1,9 <sup>e</sup>	1,9 <sup>e</sup>	1,5 <sup>g</sup>	0,9 <sup>h</sup>	0,5 <sup>i</sup>

Valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes para  $P \leq 0,05$ .

Tabela 2g - Valores de % Inib. do radical pelo ácido isoferúlico.

		Isoferulato de metilo (IM)				
		100 $\mu\text{M}$	75 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$
% Inibição	20 min.	1,9 <sup>a</sup>	1,4 <sup>b</sup>	1,1 <sup>c</sup>	0,9 <sup>d</sup>	0,0 <sup>e</sup>
	30 min.	2,1 <sup>f</sup>	1,6 <sup>g</sup>	1,0 <sup>h</sup>	1,0 <sup>d</sup>	0,0 <sup>e</sup>
	Equilíbrio	2,0 <sup>f</sup>	1,5 <sup>g</sup>	0,9 <sup>i</sup>	0,9 <sup>d</sup>	0,0 <sup>e</sup>

Valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes para  $P \leq 0,05$ .

Tabela 2h - Valores de % Inib. do radical pelo isoferulato de metilo.

		Isoferulato de propilo (IP)				
		100 $\mu\text{M}$	75 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$
% Inibição	20 min.	2,4 <sup>a</sup>	1,0 <sup>b</sup>	0,9 <sup>c</sup>	0,3 <sup>d</sup>	0,0 <sup>e</sup>
	30 min.	2,4 <sup>f</sup>	1,0 <sup>g</sup>	0,9 <sup>h</sup>	0,3 <sup>i</sup>	0,0 <sup>e</sup>
	Equilíbrio	2,4 <sup>j</sup>	0,9 <sup>k</sup>	0,9 <sup>h</sup>	0,3 <sup>i</sup>	0,0 <sup>e</sup>

Valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes para  $P \leq 0,05$ .

Tabela 2i - Valores de % Inib. do radical pelo isoferulato de propilo.

		Acido hidrocafeico (HC)				
		100 $\mu\text{M}$	75 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$
% Inibição	20 min.	59,6 <sup>a</sup>	45,2 <sup>b</sup>	31,0 <sup>c</sup>	12,6 <sup>d</sup>	6,3 <sup>e</sup>
	30 min.	63,4 <sup>f</sup>	48,5 <sup>g</sup>	33,1 <sup>h</sup>	13,3 <sup>i</sup>	6,6 <sup>j</sup>
	Equilíbrio	N.D.	N.D.	37,8 <sup>k</sup>	13,3 <sup>l</sup>	6,6 <sup>j</sup>

N.D. - Não determinado em virtude de não ter sido atingido o equilíbrio reaccional até aos 200 min.

Valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes para  $P \leq 0,05$ .

Tabela 2j - Valores de % Inib. do radical pelo ácido hidrocafeico.

		Hidrocafeiato de metilo (HCM)				
		100 $\mu\text{M}$	75 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$
% Inibição	20 min.	29,5 <sup>a</sup>	24,2 <sup>b</sup>	16,6 <sup>c</sup>	6,1 <sup>d</sup>	2,5 <sup>e</sup>
	30 min.	29,6 <sup>f</sup>	24,6 <sup>g</sup>	16,9 <sup>h</sup>	6,3 <sup>i</sup>	2,6 <sup>e</sup>
	Equilíbrio	N.D.	N.D.	N.D.	6,2 <sup>i</sup>	2,5 <sup>e</sup>

N.D. - Não determinado em virtude de não ter sido atingido o equilíbrio reaccional até aos 200 min.

Valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes para  $P \leq 0,05$ .

Tabela 2k - Valores de % Inib. do radical pelo hidrocafeiato de metilo.

		Hidrocafeiato de propilo (HCP)				
		100 $\mu$ M	75 $\mu$ M	50 $\mu$ M	20 $\mu$ M	10 $\mu$ M
% Inibição	20 min.	27,9 <sup>a</sup>	21,4 <sup>b</sup>	15,5 <sup>c</sup>	6,3 <sup>d</sup>	3,4 <sup>e</sup>
	30 min.	28,7 <sup>f</sup>	21,8 <sup>g</sup>	15,9 <sup>h</sup>	6,3 <sup>d</sup>	3,4 <sup>e</sup>
	Equilíbrio	N.D.	N.D.	17,5 <sup>i</sup>	6,2 <sup>d</sup>	3,2 <sup>e</sup>

N.D. – Não determinado em virtude de não ter sido atingido o equilíbrio reaccional até aos 200 min.

Valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes para  $P \leq 0,05$ .

**Tabela 2l - Valores de % Inib. do radical pelo hidrocafeiato de propilo.**

		Ácido gálgico (G)				
		100 $\mu$ M	75 $\mu$ M	50 $\mu$ M	20 $\mu$ M	10 $\mu$ M
% Inibição	20 min.	67,7 <sup>a</sup>	57,1 <sup>b</sup>	42,8 <sup>c</sup>	19,4 <sup>d</sup>	11,0 <sup>e</sup>
	30 min.	74,0 <sup>f</sup>	62,0 <sup>g</sup>	45,7 <sup>h</sup>	19,7 <sup>i</sup>	11,1 <sup>e</sup>
	Equilíbrio	N.D.	N.D.	49,5 <sup>j</sup>	19,7 <sup>k</sup>	11,0 <sup>e</sup>

N.D. – Não determinado em virtude de não ter sido atingido o equilíbrio reaccional até aos 200 min.

Valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes para  $P \leq 0,05$ .

**Tabela 2m - Valores de % Inib. do radical pelo ácido gálgico.**

		Galhato de metilo (GM)				
		100 $\mu$ M	75 $\mu$ M	50 $\mu$ M	20 $\mu$ M	10 $\mu$ M
% Inibição	20 min.	71,1 <sup>a</sup>	50,9 <sup>b</sup>	37,4 <sup>c</sup>	18,6 <sup>d</sup>	9,6 <sup>e</sup>
	30 min.	72,8 <sup>f</sup>	53,3 <sup>g</sup>	38,5 <sup>h</sup>	19,0 <sup>i</sup>	9,8 <sup>j</sup>
	Equilíbrio	N.D.	N.D.	N.D.	19,0 <sup>i</sup>	9,7 <sup>j</sup>

N.D. – Não determinado em virtude de não ter sido atingido o equilíbrio reaccional até aos 200 min.

Valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes para  $P \leq 0,05$ .

**Tabela 2n - Valores de % Inib. do radical pelo galhato de metilo.**

		Galhato de propilo (GP)				
		100 $\mu$ M	75 $\mu$ M	50 $\mu$ M	20 $\mu$ M	10 $\mu$ M
% Inibição	20 min.	65,1 <sup>a</sup>	50,9 <sup>b</sup>	36,8 <sup>c</sup>	15,1 <sup>d</sup>	7,7 <sup>e</sup>
	30 min.	66,4 <sup>f</sup>	51,9 <sup>g</sup>	37,7 <sup>h</sup>	15,3 <sup>i</sup>	7,8 <sup>e</sup>
	Equilíbrio	N.D.	N.D.	N.D.	15,5 <sup>j</sup>	7,7 <sup>e</sup>

N.D. – Não determinado em virtude de não ter sido atingido o equilíbrio reaccional até aos 200 min.

Valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes para  $P \leq 0,05$ .

**Tabela 2o - Valores de % Inib. do radical pelo galhato de propilo.**

		<b>(±)-α-Tocoferol (α-TOH)</b>				
		<b>100 μM</b>	<b>75 μM</b>	<b>50 μM</b>	<b>20 μM</b>	<b>10 μM</b>
<b>% Inibição</b>	<b>20 min.</b>	33,0 <sup>a</sup>	26,0 <sup>b</sup>	17,6 <sup>c</sup>	6,9 <sup>d</sup>	4,0 <sup>e</sup>
	<b>30 min.</b>	33,0 <sup>a</sup>	25,9 <sup>b</sup>	17,6 <sup>c</sup>	6,9 <sup>d</sup>	4,0 <sup>e</sup>
	<b>Equilíbrio</b>	33,0 <sup>a</sup>	25,9 <sup>b</sup>	17,6 <sup>c</sup>	6,9 <sup>d</sup>	4,0 <sup>e</sup>

Valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes para  $P \leq 0,05$ .

Tabela 2p - Valores de % Inib. do radical pelo (±)-α-tocoferol.

A comparação dos valores de % de Inib. no equilíbrio está evidenciada na **fig. 8**. Em todos os casos observou-se um aumento da extensão da reacção para valores crescentes de concentração. Para a maior parte dos compostos o incremento na quantidade de DPPH<sup>•</sup> reduzido foi proporcional ao incremento de concentração.

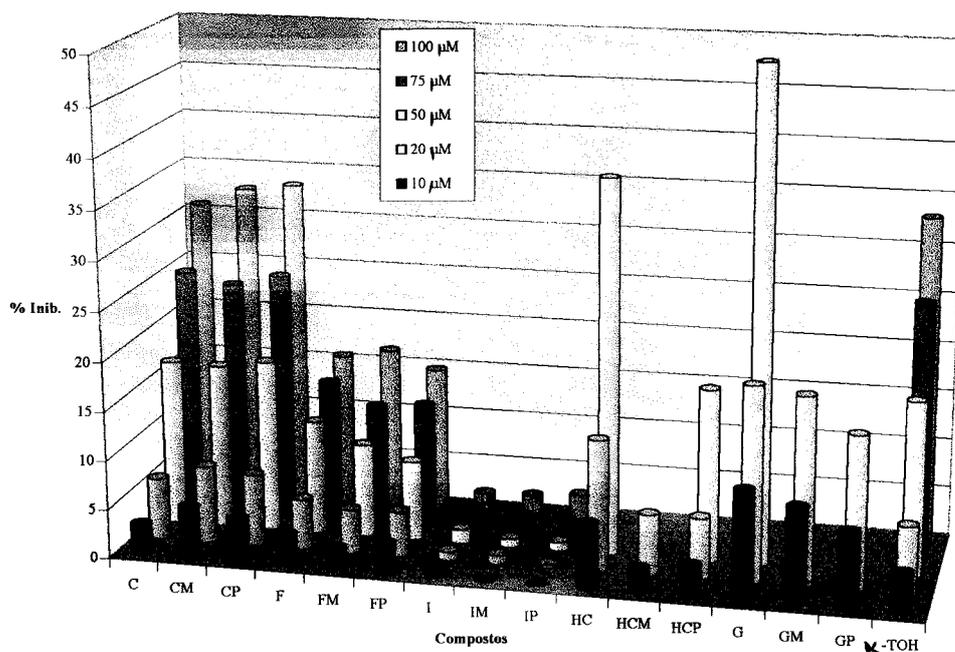
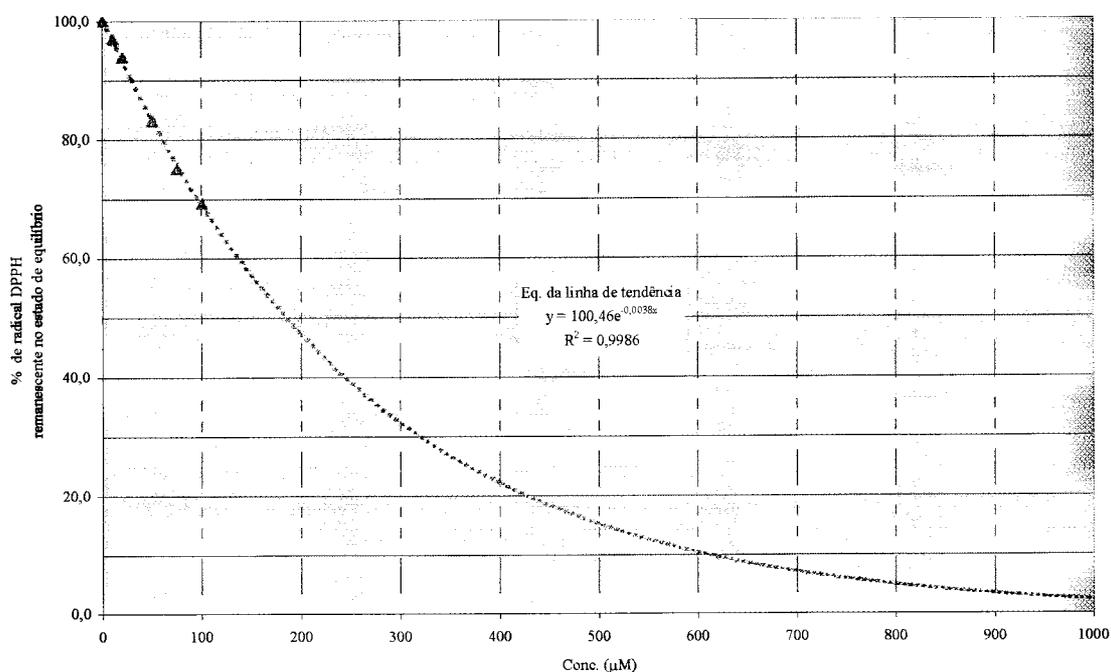


Fig. 8 – Comparação dos valores da % de Inib. do radical no equilíbrio.

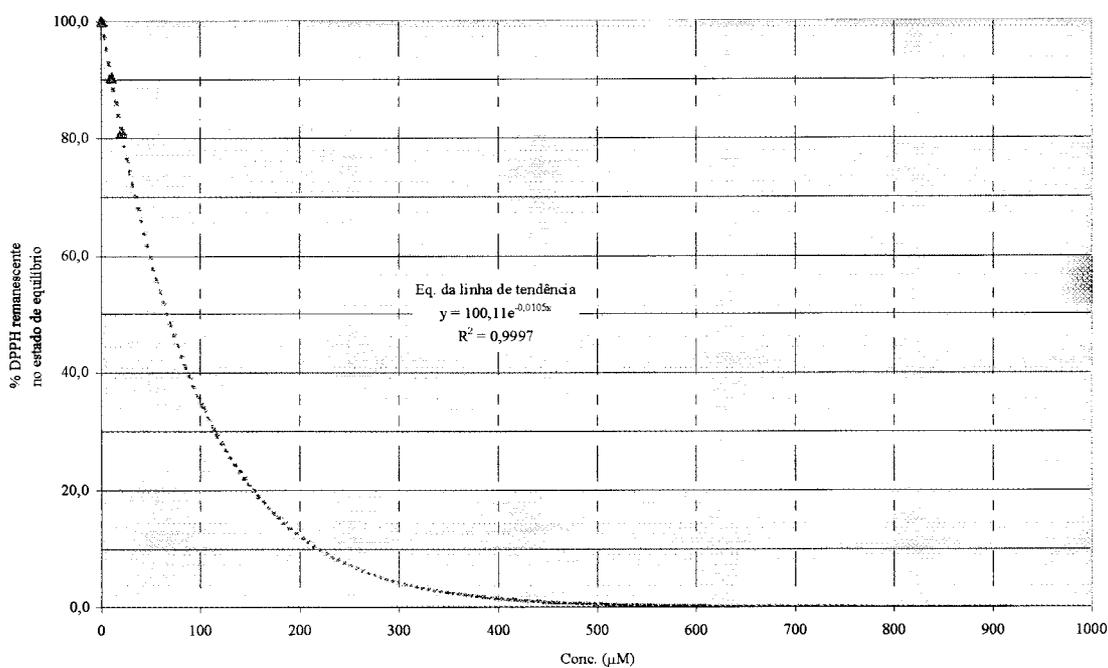
Para salvaguardar os casos em que, para a gama de concentrações ensaiadas, a reacção dos compostos com o DPPH<sup>•</sup> não ocorre em grande extensão (*e.g.* ácidos ferúlico e isoferúlico, e os ésteres correspondentes) ou não atinge o equilíbrio no período de tempo pré-definido, deve optar-se pela análise dos resultados com base na determinação da IC<sub>50</sub>, isto é, a concentração ( $\mu\text{M}$ ) de cada composto necessária para reduzir 50% da quantidade inicial de DPPH<sup>•</sup> (50% Inib.). O valor de IC<sub>50</sub> é determinado por interpolação a partir de um gráfico de % de DPPH<sup>•</sup> remanescente no estado de equilíbrio em função da concentração.

Neste estudo, a gama de concentrações ensaiada não permitiu obter o valor de IC<sub>50</sub> para cada composto. Com o objectivo de comparar a eficácia anti-radicalar dos compostos, nas condições experimentais descritas, foi efectuado um cálculo teórico dos referidos valores.

O gráfico obtido para o ácido cafeico (**fig. 9a**), denota uma grande concentração de pontos na porção inicial da curva, correspondentes às concentrações estudadas, não permitindo definir com rigor a função exponencial. Esta limitação é ainda maior no caso dos compostos HC, HCM, HCP, G, GM e GP, uma vez que para concentrações superiores e/ou iguais a 50  $\mu\text{M}$  não foi possível calcular os respectivos valores de % Inib. no equilíbrio (**fig. 9b**).



**Fig. 9a – Variação da quantidade de DPPH<sup>•</sup>, no estado de equilíbrio, em função da concentração de ácido cafeico.**



**Fig. 9b – Variação da quantidade de DPPH<sup>•</sup>, no estado de equilíbrio, em função da concentração de galhato de metilo.**

O valor de  $IC_{50}$  para cada um dos compostos ensaiados foi estimado a partir da equação da curva exponencial, prevista em função dos valores obtidos experimentalmente (linha de tendência). A partir dos valores calculados, determinou-se a relação  $1/IC_{50}$ , a qual traduz a eficácia anti-radicalar (capacidade *scavenger*) teórica dos compostos (fig. 10). Quanto maior o valor de  $1/IC_{50}$ , maior o poder anti-radicalar [17, 32].

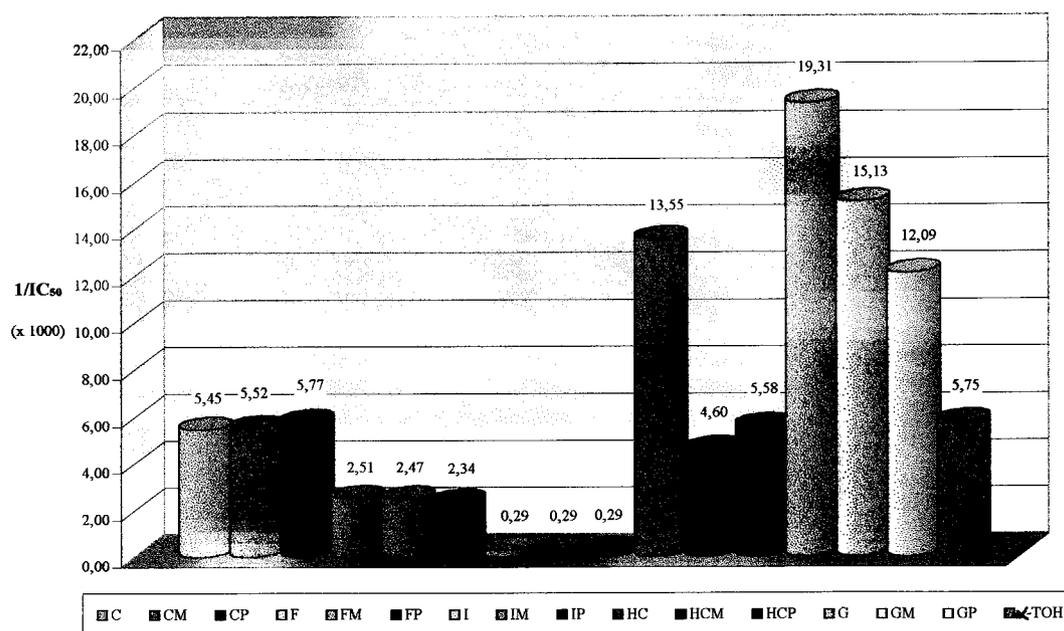


Fig. 10 - Eficácia anti-radicalar teórica ( $1/IC_{50}$ ).

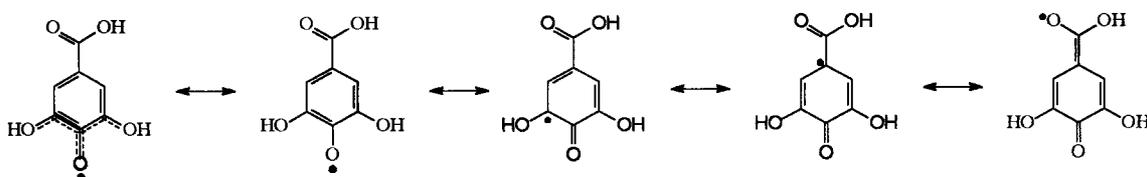
Os dados de  $1/IC_{50}$  (fig. 10) permitiram seriar os compostos em análise segundo uma ordem decrescente de capacidade *scavenger* do  $DPPH^{\bullet}$ :  $G > GM > HC > GP \gg CP \approx \alpha\text{-TOH} \approx HCP \approx CM \approx C > HCM > F \approx FM \approx FP \gg IP = IM = I$ .

Os compostos G, GM, GP e HC apresentam os maiores efeitos *scavenger*, o que pode traduzir uma maior aptidão para inibir processos radicalares. A capacidade *scavenger* do  $\alpha\text{-TOH}$  é inferior à dos compostos anteriormente referidos, e semelhante à do ácido cafeico e seus derivados. O ácido isoferúlico e os seus ésteres metílico e

propílico possuem a menor eficácia anti-radicalar, o que denota uma reduzida capacidade de cedência de átomos de H ao radical.

Numa tentativa de justificar a sequência de efeitos anteriormente apresentada, procurou relacionar-se alguns dos resultados obtidos com as estruturas dos referidos compostos (**figuras 5a-5d, páginas 63 e 64**) (relação estrutura-actividade).

Segundo vários autores, a capacidade *scavenger* dos ácidos fenólicos do tipo benzóico e cinâmico aumenta com o número de grupos hidroxilo substituintes no anel benzénico [25, 28, 41]. Assim, a presença de três hidroxilos fenólicos na estrutura do ácido gálgico poderá ser determinante para o seu maior poder anti-radicalar comparativamente aos ácidos hidrocafeico, cafeico, ferúlico e isoferúlico. É provável que a presença de dois hidroxilos fenólicos em posições adjacentes no radical fenoxilo contribua para a sua estabilização (**fig. 11**) [21, 24]. Embora o grupo carboxilo livre (grupo desactivador) directamente ligado ao anel aromático (*e.g.* ácido gálgico) diminua a densidade electrónica no anel, reduzindo a susceptibilidade do composto à oxidação, é possível que a presença dos grupos hidroxilo em posições não adjacentes ao grupo –COOH reduza consideravelmente esse efeito [10, 42].

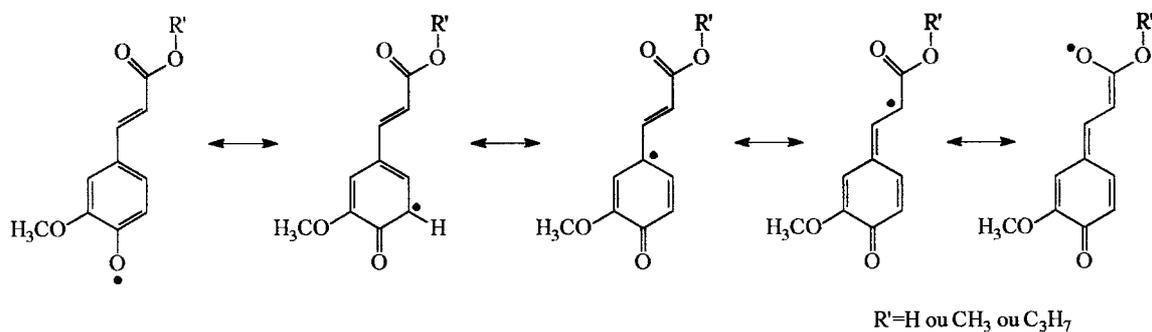


**Fig. 11 - Estabilização por efeito de ressonância do radical fenoxilo formado a partir do ácido gálgico.**

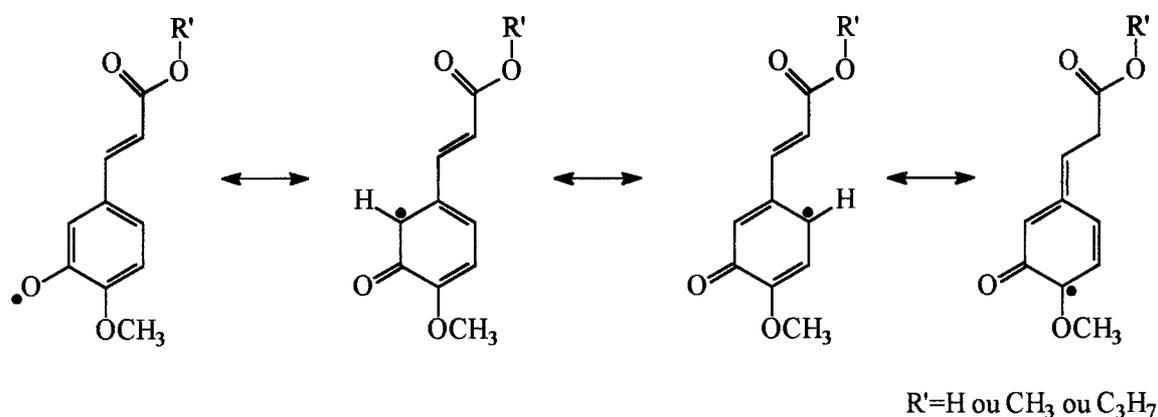
Entre os ácidos cinâmicos, a actividade anti-radicalar relativa ( $C > F \gg I$ ) poderá também estar relacionada com as respectivas estruturas, as quais apresentam em comum um sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado, mas diferem no padrão de substituição do anel aromático.

A dupla ligação da cadeia lateral e a posição do grupo -OH no anel aromático parecem ser factores importantes para a referida actividade.

A maior eficácia do ácido ferúlico, e seus derivados, em relação ao ácido isoferúlico, e respectivos ésteres, poderá ser justificada com base na estabilização dos radicais fenoxilo, formados no processo de redução do DPPH<sup>•</sup>. Quando o grupo -OH se encontra em posição *para* à cadeia insaturada (e.g. ácido ferúlico), a estabilidade do referido radical é maior, pela possibilidade de extensão da deslocalização do electrão desemparelhado ao longo da referida cadeia. Como consequência, o número de estruturas contribuintes para o híbrido aumenta (**figuras 12a-12b**).

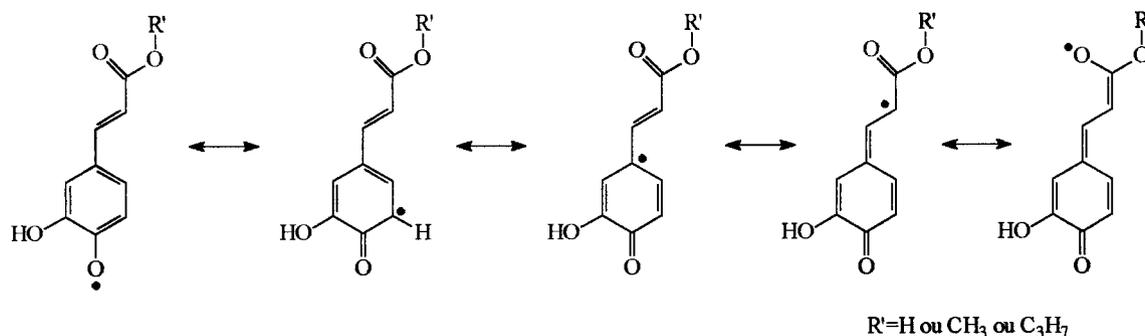


**Fig. 12a** - Estabilização por ressonância do radical formado na reacção do ácido ferúlico, e seus ésteres, com o DPPH<sup>•</sup>.



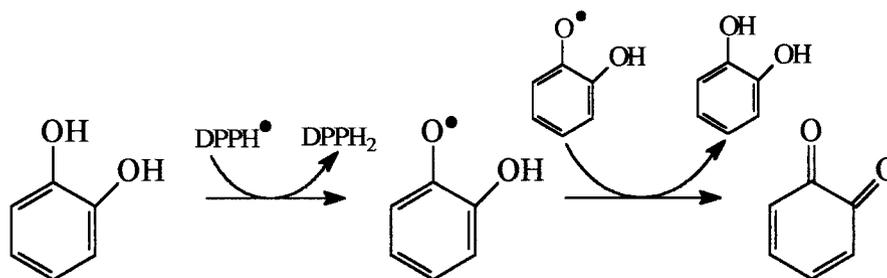
**Fig. 12b** - Estabilização por ressonância do radical formado na reacção do ácido isoferúlico, e seus ésteres, com o DPPH<sup>•</sup>.

A eficácia anti-radicalar relativa dos ácidos cafeico e ferúlico obtida neste trabalho ( $C > F$ ) está de acordo com o descrito por outros autores [5, 6, 17, 25]. Porém, os factores anteriormente referidos não justificam por si só a maior eficácia observada para o ácido cafeico, e seus derivados, uma vez que a estabilização dos respectivos radicais fenoxilo pode ocorrer de um modo análogo (fig. 13).



**Fig. 13 - Estabilização por ressonância do radical formado na reacção do ácido cafeico, e seus ésteres, com o DPPH•.**

A presença de um grupo catecol origina um aumento das propriedades *scavenger* de radicais, provavelmente devido a uma estabilização adicional do radical fenoxilo, através da formação de uma ponte de hidrogénio intramolecular [17, 43]. Procurando explicar a maior actividade observada para os compostos com estrutura catecólica, Brand-Williams *et al.* [17] sugerem ainda a possibilidade de no meio reaccional ocorrer a regeneração do difenol, com formação de *o*-quinonas (fig. 14).



**Fig. 14 - Mecanismo proposto por Brand-Williams *et al.* para a formação de *o*-quinonas [17].**

A capacidade *scavenger* do HC é superior à do C. Este facto permite questionar a importância, em termos de eficácia anti-radicalar, quer da cadeia insaturada, quer do grupo -OH em posição *para*, e colocar a hipótese de que outro mecanismo poderá estar subjacente à actividade destes compostos.

A análise do efeito da esterificação do grupo -COOH dos ácidos fenólicos na capacidade *scavenger* do DPPH<sup>•</sup> (fig. 10), permitiu verificar que:

- Para os derivados dos ácidos cafeico, ferúlico e isoferúlico não houve uma alteração significativa do poder anti-radicalar ( $C \approx CM \approx CP$ ;  $F \approx FM \approx FP$ ;  $I = IM = IP$ ). Estes dados estão de acordo com os obtidos por Rice-Evans *et al.* [10], segundo os quais a esterificação do ácido cafeico pelo ácido quínico não se traduz numa modificação do efeito antioxidante. Cuvelier *et al.* [5] referem, para os mesmos compostos mas em fase lipídica, um decréscimo de actividade;
- Para os ésteres do ácido hidrocafeico foi notória uma diminuição acentuada da capacidade *scavenger* ( $HC \gg HCP > HCM$ ). Esta diferença sugere a importância do grupo carboxilo livre para a elevada actividade do HC e reforça a hipótese de que se trata de um comportamento ímpar no seio do grupo dos ácidos cinâmicos;
- No caso dos derivados do ácido gálico, observou-se uma diminuição do poder anti-radicalar pelo efeito da esterificação ( $G > GM > GP$ ). Rice-Evans *et al.* [10] referem uma menor eficácia antioxidante do GM em relação ao G, enquanto outros autores não observaram uma modificação significativa das propriedades redutoras do DPPH<sup>•</sup> como consequência da esterificação [5, 21].

## 4. Conclusão

Neste estudo procedeu-se à avaliação da actividade anti-radicalar de quatro ácidos hidroxicinâmicos (ácidos cafeico, ferúlico, isoferúlico e hidrocafeico) e dos respectivos derivados esterificados (ésteres metílicos e propílicos), em várias concentrações, pela determinação da capacidade *scavenger* do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>) (Método do DPPH<sup>•</sup>). Nas mesmas condições experimentais, determinou-se a eficácia anti-radicalar de compostos modelo (ácido gálgico, galhato de metilo, galhato de propilo e (+)- $\alpha$ -tocoferol), os quais são usados comercialmente como antioxidantes [44].

Os resultados do trabalho experimental realizado e dos cálculos teóricos efectuados permitiram concluir que:

- Embora a aplicação do método do DPPH<sup>•</sup> seja normalmente considerado uma teste simples e relativamente rápido de avaliar a actividade anti-radicalar de compostos com potencial antioxidante (leitura dos valores absorvência usualmente realizada ao fim de 20 ou 30 min.), é importante proceder ao estudo da cinética da reacção para os diferentes compostos a ensaiar. A capacidade *scavenger*, expressa em termos de percentagem de inibição do DPPH<sup>•</sup> ou do valor de  $1/IC_{50}$ , só deve ser determinada quando a reacção atinge o equilíbrio, o qual varia em função do composto e da sua concentração;
- A eficácia anti-radicalar dos compostos estudados é determinada por alguns aspectos da sua estrutura molecular, nomeadamente pelo padrão de substituição aromática (grau e posição de hidroxilação) e pela possibilidade de estabilização dos radicais fenoxilo que se formam após interacção com o radical. Assim:

- A presença de um grupo pirogalhol ou catecol parece ser determinante em termos de actividade *scavenger*;
- Os dados obtidos para o ácido isoferúlico permitiram reafirmar a hipótese de que a presença de um grupo catecol em que um dos -OH está em posição *para* em relação à cadeia -CH=CHCOOR é fundamental para a actividade anti-radicalar dos ácidos cinâmicos e derivados;
- A metoxilação de um dos grupos fenólicos das posições 3 e 4 da estrutura dos cinamatos resulta num decréscimo significativo de eficácia anti-radicalar;
- A esterificação do grupo carboxilo pode influenciar de modo diferente o comportamento dos cinamatos e dos galhatos. Este facto pode estar relacionado com a acessibilidade de cada composto ao centro do radical;
- Os dados obtidos para o ácido hidrocafeico suscitam dúvidas quanto à importância da cadeia lateral insaturada dos ácidos cinâmicos e derivados no processo *scavenger* de radicais. A caracterização dos intermediários radicalares e dos produtos de acoplamento formados poderá esclarecer essa questão.

Os valores de  $IC_{50}$  calculados a partir das curvas exponenciais previstas (linhas de tendência) deverão ser confirmados experimentalmente. A gama de concentrações a usar pode facilmente definir-se com base nos valores obtidos neste estudo.

É importante salientar que existe uma correlação entre ordem relativa de eficácia anti-radicalar teórica (**fig. 10**) e a definida a partir dos valores de % Inib. no equilíbrio determinados experimentalmente para a concentração de 20  $\mu$ M (**fig. 8**). Este facto permite prever que, embora do ponto de vista quantitativo os dados experimentais possam não confirmar os resultados do estudo teórico efectuado, a ordem relativa de eficácia anti-radicalar entre os compostos não deverá sofrer alteração apreciável.

Para a maioria dos compostos ensaiados o mecanismo da redução do DPPH<sup>•</sup> parece complexo. A aplicabilidade do método não implica o seu conhecimento, no

entanto aquele poderá ajudar à interpretação de alguns dos resultados, permitindo estabelecer uma correlação entre os efeitos anti-radicalares e a estrutura dos compostos. Neste contexto, sugerem-se alguns estudos de continuidade deste trabalho que envolvam o isolamento e caracterização de intermediários e produtos da reacção dos compostos com o DPPH<sup>•</sup>, a determinação da ordem e das constantes de velocidade das reacções, e a avaliação de parâmetros físico-químicos dos compostos (*e.g.* potenciais redox, constantes de acidez, coeficientes de partilha).

## 5. Bibliografia

- [1] Chimi H., Cillard J., Cillard P., Rahmani M. (1991). Peroxyl and Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Some Natural Phenolic Antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68 (5), 307-312.
- [2] Toda S., Kumura M., Ohnishi M. (1991). Effects of Phenolcarboxylic Acids on Superoxide Anion and Lipid Peroxidation Induced by Superoxide Anion. *Planta Med.*, 57, 8-9.
- [3] Montesinos C., Ubeda A., Ferrándiz M.L., Alcaraz M.J. (1991). Superoxide Scavenging Properties of Phenolic Acids. *Planta Med.*, 57 (Suppl. 2), A54.
- [4] Okuda T., Yoshida T., Hatano T. (1992). Antioxidant Effects of Tannins and Related Polyphenols, *in* Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II: Antioxidants and Cancer Prevention. *Edited by* Mou-Tuan Huang, Chi-Tang Ho, Chang Y. Lee, ACS, Washington, pp 87-97.
- [5] Cuvelier M.-E., Richard H., Berset C. (1992). Comparison of the Antioxidative Activity of Some Acid-phenols: Structure-Activity Relationship. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56 (2), 324-325.
- [6] Castelluccio C., Bolwell P., Gerrish C., Rice-Evans C. (1996). Differential distribution of ferulic acid to the major plasma constituents in relation to its potential as an antioxidant. *Biochem. J.*, 316, 691-694.
- [7] Mathiesen L. (1996). "C-Methylated Dihydrochalcones and Chalcones from the Fruits of *Myrica gale* L.: Antioxidant, Radical Scavenging and Uncoupling Activities". Tese de Doutoramento, School of Pharmacy, Department of Pharmacology, University of Oslo, Norway.

- 
- [8] Ruiz J., Pérez A., Pouplana R. (1996). QSAR Study of Phenols: Relation between the Phenoxy Radical Formation and the Antiinflammatory Activity *via* an Antioxidant Mechanism. *Quant. Struct. Act. Relat.*, 15, 219-223.
- [9] Bors W., Michel C., Saran M. (1984). Inhibition of the Bleaching of the Carotenoid Crocin. A Rapid Test for Quantifying Antioxidant Activity. *Biochim. Biophys. Acta*, 796, 312-319.
- [10] Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1996). Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radic. Biol. Med.*, 20 (7), 933-956.
- [11] Frankel E.N. (1993). In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends Food Sci. Technol.*, 4 (7), 220-225.
- [12] Mathiesen L., Malterud K.E., Sund R.B. (1997). Hydrogen Bond Formation as Basis for Radical Scavenging Activity: A Structure-Activity Study of C-Methylated Dihydrochalcones from *Myrica gale* and Structurally Related Acetophenones. *Free Radic. Biol. Med.*, 22 (1-2), 307-311.
- [13] Silva, F.A.M. (1997). "Sistemas Antioxidantes Endógenos. Métodos de Avaliação do Grau de Oxidação Lipídica e da Capacidade Antioxidante". Trabalho de Seminário do Curso de Mestrado em Controlo de Qualidade, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto.
- [14] Arnao M.B., Cano A., Hernández-Ruiz J., García-Cánovas F., Acosta M. (1996). Inhibition by L-Ascorbic Acid and Other Antioxidants of the 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic Acid) Oxidation Catalysed by Peroxidase: A New Approach for Determining Total Antioxidant Status of Foods. *Anal. Biochem.*, 236, 255-261.
- [15] Miller N.J., Rice-Evans C.A. (1996). Spectrophotometric determination of antioxidant activity. *Redox Report*, 2 (3), 161-171.
- [16] "Nomenclature of Organic Chemistry – Sections A, B, C, D, E, F and H" (1979). International Union of Pure and Applied Chemistry – Organic Chemistry Division, Ed. J. Rigaudy, S. P. Klesney, Pergamon Press, London.
- [17] Brand-Williams W., Cuvelier M.-E., Berset C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 28, 25-30.
- [18] Blois M.S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181, 1199-1200.
-

- [19] Cotellet N., Bernier J.-L., Cateau J.-P., Pommery J., Wallet J.-C., Gaydou E.M. (1996). Antioxidant Properties of Hydroxy-flavones. *Free Radic. Biol. Med.*, 20 (1), 35-43.
- [20] Pincemail J., Deby C., Drieu K., Anton R., Goutier R. (1989). Flavonoids as "Antioxidants", in *Flavonoids in Biology & Medicine. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> Int. Symposium on Flavonoids in Biology & Medicine. Edited by N. P. Das, Singapore, pp 161-179.*
- [21] Yoshida T., Mori K., Hatano T., Okumura T., Uehara I., Komagoe K., Fujita Y., Okuda T. (1989). Studies on Inhibition Mechanism of Autoxidation by Tannins and Flavonoids. V. Radical-Scavenging Effects of Tannins and Related Polyphenols on 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical. *Chem. Pharm. Bull.*, 37 (7), 1919-1921.
- [22] Ohnishi M., Morishita H., Iwahashi H., Toda S., Shirataki Y., Kimura M., Kido R. (1994). Inhibitory Effects of Chlorogenic Acids on Linoleic Acid Peroxidation and Haemolysis. *Phytochemistry*, 36 (3), 579-583.
- [23] Morisaki K., Ozaki S. (1996). Design of Novel Hybrid Vitamin C Derivatives: Thermal Stability and Biological Activity. *Chem. Pharm. Bull.*, 44 (9), 1647-1655.
- [24] Sawai Y., Sakata K. (1998). NMR Analytical Approach to Clarify the Antioxidative Molecular Mechanism of Catechins Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J. Agric. Food Chem.*, 46 (1), 111-114.
- [25] von Gadow A., Joubert E., Hansmann C.F. (1997). Comparison of the Antioxidant Activity of Aspalathin with That of Other Plant Phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*),  $\alpha$ -Tocopherol, BHT and BHA. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (3), 632-638.
- [26] Nanjo F., Goto K., Seto R., Suzuki M., Sakai M., Hara Y. (1996). Scavenging Effects of Tea Catechins and Their Derivatives on 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical. *Free Radic. Biol. Med.*, 21 (6), 895-902.
- [27] Malterud K.E., Diep O.H., Sund R.B. (1996). C-Methylated Dihydrochalcones from *Myrica gale* L.: Effects as Antioxidants and as Scavengers of 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Pharmacol. Toxicol.*, 78, 111-116.
- [28] Chen J.H., Ho C.-T. (1997). Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (7), 2374-2378.

- [29] Kim S.S., Lee C.K., Kang S.S., Jung H.A., Choi J.S. (1997). Chlorogenic Acid, an Antioxidant Principle from the Aerial Parts of *Artemisia iwayomogi* that Acts on 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical. *Arch. Pharm. Res.*, 20 (2), 148-154.
- [30] Yen G.-C., Duh P.-D. (1994). Scavenging Effect of Methanolic Extracts of Peanut Hulls on Free Radical and Active-Oxygen Species. *J. Agric. Food Chem.*, 42 (3), 629-632.
- [31] Matsukawa R., Dubinsky Z., Kishimoto E., Masaki K., Masuda Y., Takeuchi T., Chihara M., Yamamoto Y., Niki E., Karube I. (1997). A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *J. Appl. Phycology*, 9, 29-35.
- [32] Ding L., Delrieu P. (1996). Stabilisation D'anti-radicaux Libres Naturels dans une Nouvelle Generation de Vecteurs, Les Glicospheres, et Étude de Leur Activité (P221). Polyphenols Communications 96, Bordeaux, France.
- [33] von Gadow A., Joubert E., Hansmann C.F. (1997). Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green tea, oolong and black tea. *Fd Chem.*, 60 (1), 73-77.
- [34] Sato T., Kawamoto A., Tamura A., Tatsumi Y., Fujii T. (1992). Mechanism of Antioxidant Action of Pueraria Glycoside (PG)-1 (an Isoflavonoid) and Mangiferin (a Xanthonoid). *Chem. Pharm. Bull.*, 40 (3), 721-724.
- [35] Liégard A., Dietliker K., Dubs P., Knobloch G., Kolczak U., Leppard D., Martin R., Meier H.R., Rzadek P., Rist G. (1996). ESR- and CIDNP-Investigation of Industrial Additives. *Appl. Magn. Reson.*, 10, 395-412.
- [36] Bast A., Haenen G.R.M.M., Doelman C.J.A. (1991). Oxidants and Antioxidants: State of the Art. *Am. J. Med.*, 91 (suppl 3C), 2S-13S.
- [37] Aruoma I.O. (1994). Nutrition and Health Aspects of Free Radicals and Antioxidants. *Fd Chem. Toxic.*, 32 (7), 671-683.
- [38] Richman J.E., Chang Y.-C., Kambourakis S., Draths K.M., Almy E., Snell K.D., Strasburg G.M., Frost J.W. (1996). Reaction of 3-Dehydroshikimic Acid with Molecular Oxygen and Hydrogen Peroxide: Products, Mechanism and Associated Antioxidant Activity. *J. Am. Chem. Soc.*, 118 (46), 11587-11591.
- [39] Ogata M., Hoshi M., Shimotohno K., Urano S., Endo T. (1997). Antioxidant Activity of Magnolol, Honokiol and Related Phenolic Compounds. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74 (5), 557-562.

- 
- [40] Capelle S., Cotelle P., Bernier J.L., Catteau J.P. (1994). Antioxidant activities of dihydroxylated salicylic acid derivatives. *Redox Report*, 1, 131-137.
- [41] Hatano T., Edamatsu R., Hiramatsu M., Mori A., Fujita Y., Ysuhara T., Yoshida T., Okuda T. (1989). Effects of the Interaction of Tannins with Co-existing Substances. VI. Effects of Tannins and Related Polyphenols on Superoxide Anion Radical, and on 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical. *Chem. Pharm. Bull.*, 37 (8), 2016-2021.
- [42] Lehmann R.G., Cheng H.H., Harsh J.B. (1987). Oxidation of Phenolic Acids by Soil Iron and Manganese Oxides. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 51, 352-357.
- [43] Madsen H.L., Bertelsen G., Skibsted L.H. (1997). Antioxidative Activity of Spices and Spice Extracts, in ACS Symposium Series 660: Spices: Flavor Chemistry and Antioxidant Properties. Edited by Sara J. Risch, Chi-Tang Ho, ACS, Washington, pp 176-187.
- [44] Aruoma O.I., Murcia A., Butler J., Halliwell B. (1993). Evaluation of the Antioxidant and Prooxidant Actions of Gallic Acid and Its Derivatives. *J. Agric. Food Chem.*, 41 (11), 1880-1885.

## **Parte C**

### **Determinação da Actividade Antioxidante**

**Índice**

	<b>Pág.</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>98</b>
<b>2. Condições Experimentais .....</b>	<b>100</b>
<b>2.1. Instrumentação .....</b>	<b>100</b>
<b>2.2. Reagentes e solventes .....</b>	<b>101</b>
<b>2.3. Preparação das amostras .....</b>	<b>102</b>
<b>2.3.1. Estudo das condições de solubilidade do                 galhato de propilo no óleo de girassol refinado ...</b>	<b>102</b>
<b>2.3.2. Método geral de preparação das amostras .....</b>	<b>104</b>
<b>2.4. Determinação da resistência à oxidação         (Método Rancimat) .....</b>	<b>104</b>
<b>2.5. Descrição e análise estatística dos resultados .....</b>	<b>106</b>
<b>3. Resultados e discussão .....</b>	<b>107</b>
<b>4. Conclusão .....</b>	<b>117</b>
<b>5. Bibliografia .....</b>	<b>119</b>

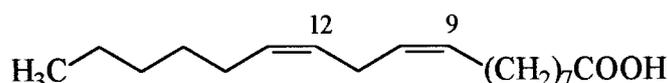
## 1. Introdução

A determinação da eficácia de um antioxidante corresponde frequentemente à medida do alargamento do período de indução (resistência à oxidação) resultante da sua adição. Esse alargamento é expresso como um índice antioxidante ou factor de protecção [1].

Os fenómenos naturais de oxidação são processos lentos, desenrolando-se frequentemente ao longo de vários meses. A medida do estado de oxidação dos lípidos nas condições normais de armazenamento ou de distribuição (**estabilidade em tempo real**), torna-se por vezes incompatível com o controlo de qualidade a nível industrial [2]. Por essa razão, recorre-se normalmente a um conjunto de ensaios nos quais, usando condições padronizadas de oxidação acelerada (oxigenação intensiva, tratamento térmico e/ou iniciação forçada) e seleccionando um determinado parâmetro indicador da degradação oxidativa, se promove o envelhecimento forçado de uma matéria gorda e se avalia a sua resistência à oxidação (RO) (**estabilidade acelerada**). Estes testes permitem estimar de uma forma rápida, e por vezes automatizada, quer a estabilidade oxidativa, quer a eficácia “teórica” de um antioxidante isolado ou em associação [3, 4]. A resistência à oxidação é definida pelo período de tempo, expresso em horas, necessário para se atingir um ponto crítico de oxidação, quer seja uma alteração de gosto, quer uma aceleração brusca da velocidade do processo oxidativo (**período de indução ou tempo de estabilidade**).

Entre os testes propostos para a determinação da resistência à oxidação de óleos e gorduras, o método Rancimat aparece actualmente como um dos mais citados na bibliografia [5-16]. Simples e rápido de executar, é hoje em dia um ensaio de rotina em muitos laboratórios de controlo de qualidade, sendo também útil para a avaliação e comparação da eficácia antioxidante de compostos naturais ou sintéticos, entre si ou relativamente a um antioxidante de referência [17]. Dados recentes apontam para a existência de uma boa correlação entre os tempos de estabilidade oxidativa determinados pelo método Rancimat e os obtidos noutra tipo de ensaios (*e.g.* Método do Oxigénio Activo (AOM)) [3, 14, 17, 18].

O óleo de girassol refinado é amplamente usado na alimentação, como tempero, em banhos de fritura ou no fabrico de margarina. Representa uma importante fonte de ácidos gordos poliinsaturados, nomeadamente de ácido linoleico (ácido *cis*-9,*cis*-12-octadecadienóico) (**fig. 1**), despertando, por isso, particular interesse do ponto de vista nutritivo [19-22]. O ácido linoleico representa cerca de 65-75% do total de ácidos gordos presentes no óleo de girassol [22]. A elevada reactividade do sistema de duplas ligações conjugadas deste ácido gordo é responsável pela sua susceptibilidade à oxidação, sobretudo quando sujeito a altas temperaturas. Os processos de oxidação podem estar na origem do desenvolvimento do ranço, da produção de compostos responsáveis por *off flavours* e *off odors*, da reversão e da ocorrência de um elevado número de reacções de polimerização e de cisão. Este conjunto de alterações oxidativas diminuem consideravelmente o seu tempo de vida e o seu valor nutritivo [3, 22-27].



**Fig. 1 – Estrutura química do ácido linoleico.**

O aumento da resistência à oxidação dos óleos vegetais é motivo de grande preocupação, sobretudo quando sujeitos a processos de fritura. Nos óleos vegetais refinados existem tocoferóis, os quais contribuem para uma protecção natural contra os fenómenos oxidativos que ocorrem durante o período de comercialização. Porém, estes antioxidantes endógenos não resistem a um aquecimento prolongado e/ou repetido a temperaturas da ordem dos 130-190 °C. Nessas condições, os óleos (*e.g.* óleo de girassol) que contêm quantidades apreciáveis de ácidos gordos poliinsaturados, nomeadamente linoleico e/ou linolénico, estão predispostos à degradação oxidativa [28, 29]. Alguns autores consideram mesmo que óleos com teores em ácido linolénico superiores a 2% do total de ácidos gordos não são adequados para processos de fritura [29].

A adição de antioxidantes constitui um dos processos usados a nível industrial para aumentar a resistência oxidativa dos óleos insaturados. Alguns dos compostos, naturais ou sintéticos, actualmente permitidos por lei para os óleos e gorduras usados na preparação de géneros alimentícios, vêm a sua utilização limitada por razões económicas, tecnológicas e outras relacionadas com as suas características físico-químicas (*e.g.* solubilidade, termorresistência).

Alguns trabalhos recentes referem a dificuldade em melhorar, de forma significativa, a estabilidade oxidativa do óleo de girassol pela adição de compostos antioxidantes de origem natural ou sintética [19, 30]. Por conseguinte, parece interessante promover o desenvolvimento de novos antioxidantes, capazes de obviar algumas das limitações anteriormente referidas.

Assiste-se hoje em dia a um interesse crescente na procura de compostos antioxidantes, naturais ou sintéticos, que permitam retardar, de uma forma eficaz e segura, os efeitos indesejáveis do oxigénio atmosférico sobre os lípidos e todos os produtos dos quais estes fazem parte [19].

O presente trabalho corresponde a estudo experimental comparativo da eficácia antioxidante dos ésteres propílicos sintetizados (**Parte A**) (cafeiato de propilo, ferulato de propilo, isoferulato de propilo e hidrocafeiato de propilo) e de dois compostos antioxidantes permitidos, um de origem sintética (galhato de propilo) e outro natural ( $\alpha$ -tocoferol), constituindo uma primeira abordagem na averiguação do potencial antioxidante desses compostos.

## 2. Condições Experimentais

### 2.1. Instrumentação

- As pesagens foram efectuadas em balança Mettler AE 100.

- As determinações da resistência à oxidação foram realizadas num aparelho Rancimat 617 da Metrohm-Herisau A. G.

## 2.2. Reagentes e solventes

- O óleo de girassol refinado, de qualidade comercial, foi gentilmente cedido pela firma ALCO - Indústria de Óleos Alimentares, S.A., acondicionado em embalagens âmbar de 1 litro de capacidade, pertencentes ao mesmo lote. O respectivo boletim analítico encontra-se descrito de forma resumida na **Tabela 1**.

Acidez (%) (AOCS Ca 5 <sup>a</sup> -40)	0,04			
Índice de Peróxidos (meqO <sub>2</sub> /Kg) (AOCS Cd 8-50)	0,00			
Sabão (mg/Kg) (NP-1644)	0,00			
Tempo de Estabilidade à Oxidação (h) (NP-860)	5,6			
Análise Sensorial (procedimento interno P7-02-120)	Aspecto – límpido Flavour – <i>Sui generis</i> Aroma - extinto			
Composição em Ácidos Gordos (%) (NP-974)	C14:0	0,08	C16:0 6,58	C16:1 0,19
	C17:0	0,13	C18:0 4,13	C18:1 20,69
	C18:2	65,83	C18:3 0,12	C20:0 0,32
	C20:1	0,22	C22:0 0,74	C22:1 ---
		C24:0	0,36	

**Tabela 1 – Dados analíticos do óleo de girassol [adaptado do boletim de análise original fornecido].**

- O (+)- $\alpha$ -tocoferol, o galhato de propilo e o etanol absoluto foram adquiridos respectivamente às firmas Sigma, Aldrich e Merck.
- Os ésteres propílicos dos ácidos cafeico, ferúlico, isoferúlico e hidrocafeico foram sintetizados de acordo com os procedimentos referidos na **Parte A**.

## 2.3. Preparação das amostras

### 2.3.1. Estudo das condições de solubilidade do galhato de propilo no óleo de girassol refinado

No início do trabalho experimental verificou-se que alguns dos compostos em análise não eram totalmente solúveis no óleo de girassol (à temperatura ambiente e com agitação). Por conseguinte, foi necessário efectuar um estudo prévio para estabelecer as condições de solubilidade adequadas à preparação das amostras.

Encontram-se mencionados na literatura vários procedimentos experimentais para obviar as dificuldades de dissolução, frequentes na adição de compostos aos óleos e gorduras [4, 14, 19, 28, 30-36]. Após uma análise cuidada das respectivas condições experimentais utilizadas, foram seleccionados quatro protocolos para a preparação das amostras (**tabela 2**).

Como composto teste foi usado o galhato de propilo, uma vez que, em condições normais, apresentou maiores dificuldades de solubilização comparativamente aos compostos sintetizados.

O estudo efectuado consistiu em avaliar a resistência à oxidação (RO), pelo método Rancimat (**2.4., pág. 104**), de amostras de óleo de girassol refinado, previamente fortificadas com galhato de propilo (160 ppm) segundo as condições de cada protocolo. Amostras de óleo de girassol refinado não fortificado (controlo) foram também submetidas às mesmas condições experimentais. Todas as determinações foram efectuadas em triplicado.

Pela análise dos resultados obtidos (**tabela 3**), verificou-se que apenas no caso dos procedimentos 1 e 2 foi possível determinar a RO das amostras fortificadas. A obtenção de curvas de inflexão fora do padrão habitual para as amostras submetidas aos procedimentos experimentais 3 e 4 impossibilitou a determinação desse parâmetro.

Como método geral de solubilização dos compostos no substrato lipídico foi adoptado o procedimento 1, para o qual se registou uma maior repetibilidade de

resultados (traduzida pelo menor valor do coeficiente de variação (CV%)) e, portanto, uma maior precisão nas determinações.

<b>Procedimento 1</b>	1. Solubilizar 16 mg de composto em 50 ml de óleo com auxílio de ultra-sons (30 min.);
	2. Deixar repousar durante 12 horas à T amb. e ao abrigo da luz;
	3. Perfazer volume de 100,0 ml e homogeneizar.
<b>Procedimento 2</b>	1. Solubilizar 16 mg de composto em 50 ml de óleo com auxílio de aquecimento a 40 °C e ultra-sons (30 min.);
	2. Deixar repousar durante 12 horas à T amb. e ao abrigo da luz;
	3. Perfazer volume de 100,0 ml e homogeneizar.
<b>Procedimento 3</b>	1. Dissolver 16 mg de composto em cerca de 2 ml de etanol absoluto;
	2. Adicionar a solução anterior a 100,0 ml de óleo e homogeneizar com auxílio de agitação magnética suave;
	3. Eliminar o etanol com auxílio de corrente de N <sub>2</sub> (1 h).
<b>Procedimento 4</b>	1. Dissolver 16 mg de composto em cerca de 2 ml de etanol absoluto;
	2. Adicionar a solução anterior a 100,0 ml de óleo e homogeneizar com auxílio de agitação magnética suave;
	3. Eliminar o etanol em evaporador rotativo com auxílio de aquecimento e de pressão reduzida (40 °C/0 atm.).

**Tabela 2 - Condições experimentais usadas no estudo de solubilidade do galhato de propilo no óleo de girassol.**

	Procedimento 1		Procedimento 2		Procedimento 3		Procedimento 4	
	Controlo	Amostra	Controlo	Amostra	Controlo	Amostra	Controlo	Amostra
Tempos de estabilidade (h)	5,6	10,3	5,3	9,3	5,4	N.D.	5,3	N.D.
	5,7	10,4	5,3	9,7	5,4	N.D.	5,4	N.D.
	5,7	10,3	5,4	9,5	5,4	N.D.	5,4	N.D.
Valor médio ± Desvio padrão	5,7 ± 0,1	10,3 ± 0,1	5,3 ± 0,1	9,5 ± 0,2	5,4 ± 0,0	--	5,4 ± 0,1	--
Coeficiente de variação (%)	1,8	1,0	1,9	2,1	0,0	--	1,9	--

N.D. – Não determinado.

**Tabela 3 - Resultados da avaliação da RO das amostras de óleo de girassol preparadas segundo os quatro procedimentos descritos.**

### 2.3.2. Método geral de preparação das amostras

Para a avaliação da actividade antioxidante, os compostos foram ensaiados nas concentrações de 160 e 200 ppm, de acordo com a **tabela 4**.

Compostos	Concentração (ppm)
Galhato de propilo (GP)	160 ; 200
Cafeiato de propilo (CP)	160 ; 200
Hidrocafeiato de propilo (HCP)	160 ; 200
Ferulato de propilo (FP)	160
Isoferulato de propilo (IP)	160
$\alpha$ -Tocoferol ( $\alpha$ -TOH)	160

**Tabela 4 - Concentrações das amostras.**

Em função da concentração final desejada, pesou-se uma determinada quantidade de cada composto directamente para um balão volumétrico de 100,0 ml e adicionou-se 50 ml de óleo de girassol. Com auxílio de ultra-sons (30 min.) promoveu-se a sua completa dissolução. Após 12 horas de repouso à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, completou-se o volume.

As amostras controlo, constituídas exclusivamente por óleo de girassol, foram sujeitas às mesmas condições experimentais.

O tempo que mediou entre a preparação das amostras e a determinação da estabilidade oxidativa não excedeu as 24 horas. As amostras foram armazenadas ao abrigo da luz e à temperatura ambiente.

### 2.4. Determinação da resistência à oxidação (Método Rancimat)

O método Rancimat baseia-se no registo das variações da condutividade da água destilada na qual se faz a recolha de ácidos de baixo peso molecular (maioritariamente ácidos fórmico e acético) resultantes da oxidação dos óleos e

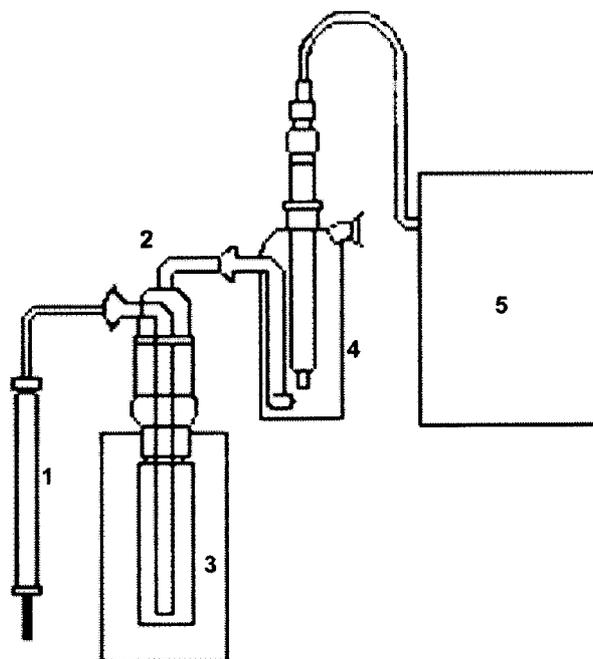
gorduras em condições de oxidação acelerada (alta temperatura e oxigenação intensiva) [18, 37, 38].

Neste ensaio determinou-se a resistência à oxidação do óleo de girassol refinado em condições de oxidação acelerada.

O processo consistiu em fazer passar uma corrente de ar, a um fluxo de 20 litros/h, através de uma toma de cerca de 2,5 g de amostra (2,7 ml) colocada num tubo reactor aquecido a  $110 \pm 0,2$  °C. Os produtos de oxidação voláteis, formados no decorrer do ensaio e arrastados pelo fluxo de ar, foram recolhidos num frasco contendo 50 ml de água desionizada à temperatura ambiente. O aumento de condutividade foi registado de modo automático ao longo do tempo com o auxílio de um eléctrodo imerso na solução resultante, só podendo interromper-se a determinação quando, para cada amostra, o valor da condutividade atingiu o máximo (300  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) (**fig. 2**).

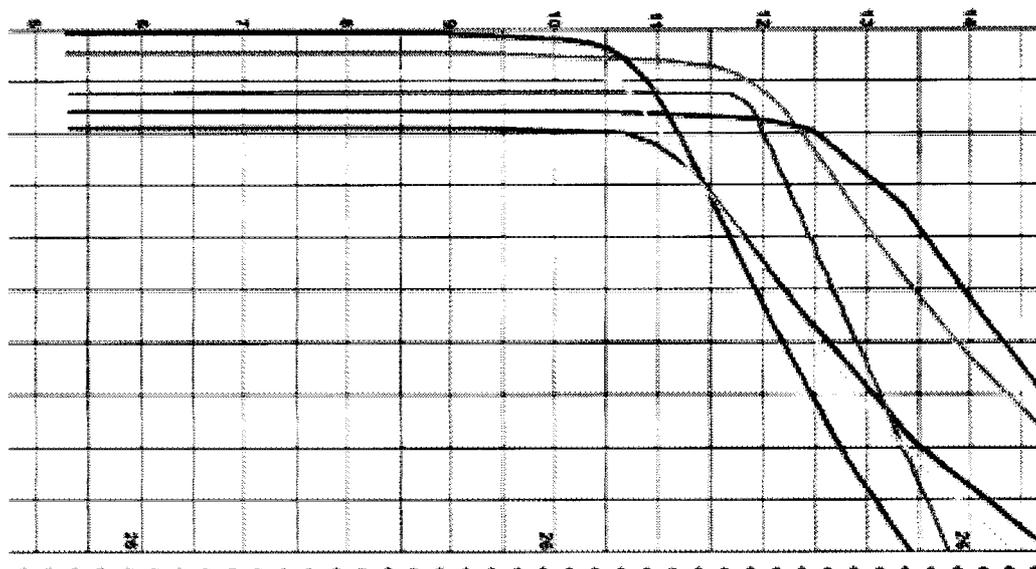
O cálculo dos tempos de estabilidade das amostras foi efectuado pelo método das tangentes. O segmento de recta que medeia entre o início do registo e o ponto de intersecção das tangentes às curvas foi medido com auxílio de uma régua a qual transforma o comprimento (cm) em tempo (horas) (**fig. 3**).

Para cada composto e concentração ensaiados, foram efectuadas determinações em triplicado. Em todos os ensaios incluiu-se uma amostra controlo (óleo de girassol refinado não fortificado).



**Fig.2 – Esquema do aparelho Rancimat 617.**

1 - Controlador do fluxo de ar; 2 - Tubo reactor para colocação da amostra; 3 - Bloco de aquecimento; 4 - Frasco para recolha dos ácidos voláteis contendo uma célula condutimétrica imersa em água destilada; 5 - Amplificador e registor.



**Fig. 3 – Exemplo de um registo obtido nas determinações da RO (método Rancimat).**

## 2.5. Descrição e análise estatística dos resultados

Para cada composto e concentração ensaiados os resultados apresentam-se sob a forma de valores médios de tempo de estabilidade  $\pm$  desvios padrão.

As diferenças entre os valores médios do tempo de estabilidade do controlo e das amostras fortificadas foram determinadas por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Fisher. As diferenças foram consideradas significativas para  $P \leq 0,05$ .

Para estabelecer uma correlação entre os diferentes resultados analíticos obtidos, as amostras foram ordenadas segundo um valor de poder antioxidante (PAO) calculado, para cada composto e concentração, segundo a fórmula de Castera-Rossignol *et al.* [28]

$$\text{PAO} = 100 - [(T_c / T_a) \times 100]$$

em que  $T_c$  representa o tempo de indução do controlo e  $T_a$  o tempo de indução da amostra. O PAO é expresso por um valor compreendido entre 0 e 100.

Os valores de PAO calculados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Fisher. As diferenças foram consideradas significativas para  $P \leq 0,05$ .

## 3. Resultados e discussão

O estudo de estabilidade oxidativa realizado (método Rancimat) permitiu determinar, nas condições experimentais ensaiadas, os tempos de resistência à oxidação (tempos de estabilidade ou períodos de indução) de amostras de óleo de girassol refinado de origem comercial, na presença e na ausência dos compostos testados (**fig. 4**).

As concentrações usadas não ultrapassaram o teor máximo permitido pela legislação comunitária (200 ppm) para a adição de antioxidantes sintéticos (e.g. galhato de propilo) às gorduras e óleos utilizados na produção ou preparação de géneros alimentícios submetidos a tratamentos térmicos [39].

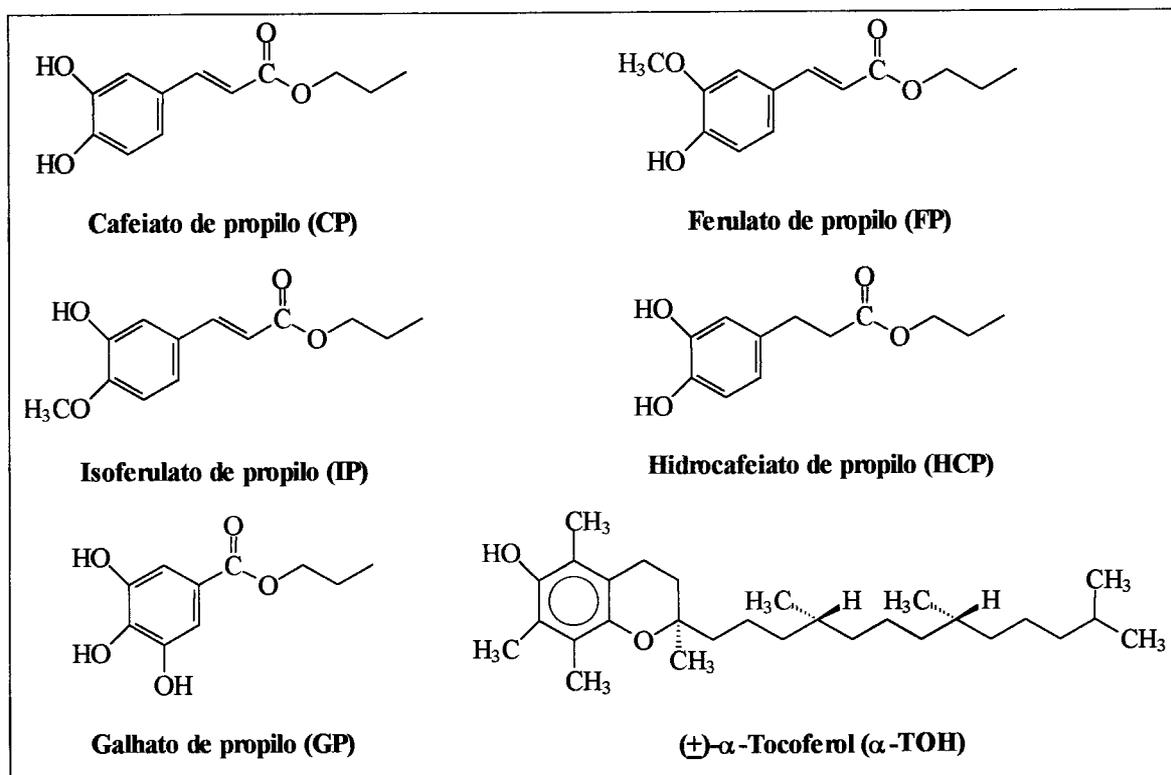


Fig. 4 – Estrutura química dos compostos ensaiados.

Os resultados da **tabela 5** traduzem o efeito da adição de cada um dos compostos, na concentração de 160 ppm e nas condições do ensaio, ao óleo de girassol refinado.

Amostras (conc. 160 ppm)	Tempos de estabilidade (h)	Valor médio $\pm$ desvio padrão (h)	PAO (%) (valor médio)
Controlo	5,8	$5,7 \pm 0,2^a$	0,00 <sup>a</sup>
	5,9		
	5,5		
Óleo + FP	5,6	$5,7 \pm 0,2^a$	0,00 <sup>a</sup>
	5,9		
	5,7		
Óleo + IP	5,6	$5,8 \pm 0,2^b$	1,72 <sup>b</sup>
	6,0		
	5,8		
Óleo + $\alpha$ -TOH	6,0	$5,9 \pm 0,2^c$	3,39 <sup>c</sup>
	6,0		
	5,7		
Óleo + CP	6,7	$6,7 \pm 0,2^d$	14,93 <sup>d</sup>
	6,7		
	6,6		
Óleo + HCP	7,6	$7,7 \pm 0,2^e$	25,97 <sup>e</sup>
	7,9		
	7,7		
Óleo + GP	10,2	$10,4 \pm 0,2^f$	45,19 <sup>f</sup>
	10,6		
	10,3		

Valores na mesma coluna seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes para  $P \leq 0,05$ .

**Tabela 5 - Resultados obtidos no estudo de resistência à oxidação (método Rancimat).**

Ao óleo de girassol refinado não fortificado, isto é, ao qual não se adicionou qualquer um dos compostos em estudo, correspondeu um período de indução médio de 5,7 horas. A adição dos compostos em análise traduziu-se, em diferentes graus, numa melhoria da estabilidade oxidativa do óleo, à excepção do ferulato de propilo (FP) para o qual se obteve um período de indução igual ao do controlo.

A análise dos tempos de estabilidade obtidos para as amostras fortificadas (tabela 5), nas condições de ensaio descritas, permitem distinguir dois grupos (fig.5):

- **Grupo 1** - as amostras fortificadas com cafeiato de propilo (CP), hidrocafeiato de propilo (HCP) e galhato de propilo (GP), para as quais se observou um aumento da estabilidade do óleo de girassol. A esses

compostos correspondem valores PAO mais elevados, revelando uma maior eficácia antioxidante;

- **Grupo 2** - as amostras contendo ferulato de propilo (FP), isoferulato de propilo (IP) e  $(\pm)$ - $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TOH), para as quais os tempos de estabilidade não variaram de forma considerável relativamente ao controlo (amostra não fortificada). Aos compostos mencionados correspondem valores de PAO nulos ou próximos de zero, traduzindo uma actividade antioxidante nula ou muito reduzida.

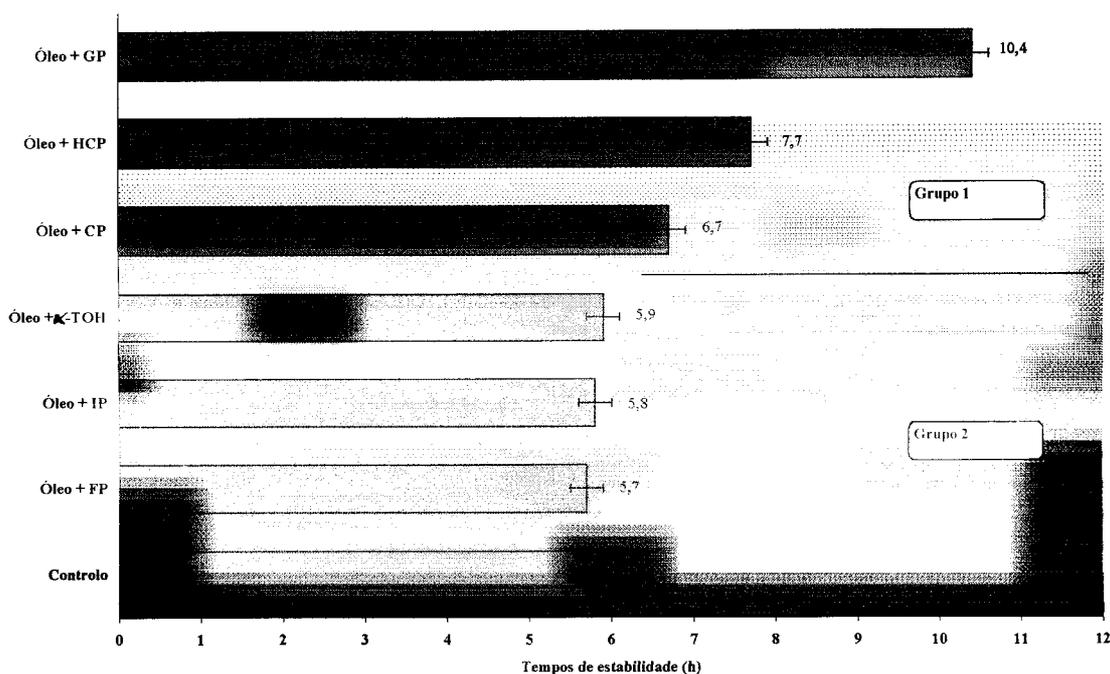


Fig. 5 – Tempos de estabilidade obtidos pelo método Rancimat a 110 °C (conc. 160 ppm).

A resistência oxidativa do óleo de girassol refinado não fortificado está de acordo com o descrito noutros estudos [19]. O tempo de estabilidade obtido (5,7 horas) nas condições drásticas do ensaio, pode ser justificado pelo elevado conteúdo de tocoferóis totais naturalmente presentes neste tipo de óleo vegetal. Alguns autores

---

referem-se a teores da ordem dos 600-700 ppm, mesmo após o processo de refinação, dos quais 80-90% se encontram na forma  $\alpha$  [20, 22, 28, 40].

Neste trabalho verificou-se que, para a concentração ensaiada (160 ppm), a adição de ( $\pm$ )- $\alpha$ -tocoferol ao óleo não originou num aumento considerável da sua estabilidade oxidativa (apenas 0,2 horas, o que corresponde a um incremento de cerca de 3,5%). Este facto é surpreendente se se atender, por um lado à sua elevada solubilidade nos óleos e gorduras, e por outro às suas propriedades antioxidantes, individuais ou sinérgicas, quer na forma de extractos ou de misturas de isómeros de síntese [28, 41]. Contudo, o resultado experimental está de acordo com o descrito por diversos autores, os quais, tendo como base estudos de dose-resposta, concluíram que o teor de  $\alpha$ -tocoferol no óleo de girassol se encontra muito próximo da concentração óptima de estabilização, pelo que um suplemento não se traduz numa maior resistência à oxidação [19, 40]. Alguns trabalhos referem que para concentrações superiores a 500 ppm se nota um efeito pró-oxidante, o qual não foi observado neste estudo [28]. Os ensaios de termo-oxidação e de determinação dos teores residuais dos diferentes isómeros dos tocoferóis, efectuados por Castera-Rossignol *et al.* [28], permitiram concluir que o isómero  $\alpha$  é o mais rapidamente oxidado para temperaturas superiores a 50 °C. Este facto pode também explicar o valor de PAO do  $\alpha$ -TOH obtido nas determinações efectuadas a 110 °C (**tabela 5 e fig.6**).

Entre os compostos que revelaram maior eficácia antioxidante (CP, HCP e GP) os derivados dos ácidos cinâmicos demonstraram um grau de protecção inferior ao do GP (**fig. 6**).

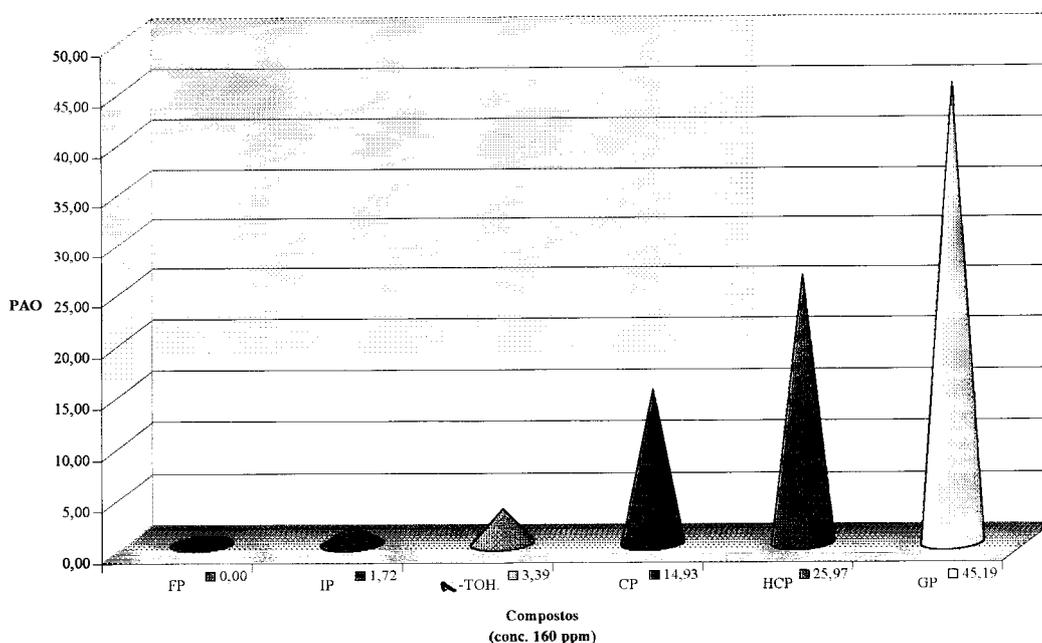


Fig. 6 – Análise comparativa dos valores de PAO.

A partir dos resultados obtidos foi possível estabelecer uma ordem relativa de PAO: GP > HCP > CP >> IP > FP.

A actividade antioxidante dos compostos fenólicos está relacionada com a sua capacidade *scavenger* dos radicais livres (*e.g.* radicais alquilo ( $R^\bullet$ ), peróxilo ( $ROO^\bullet$ ) e alcoxilo ( $RO^\bullet$ )) que se formam no decurso da autoxidação dos óleos e gorduras [25, 42, 43]. A actividade anti-radicalar ocorre segundo um mecanismo de cedência de átomos de H e envolve a formação de novas espécies radicalares a partir dos compostos fenólicos (radicais fenoxilo). A estrutura molecular dos compostos é determinante para a sua capacidade de cedência de átomos de H. Alguns dos efeitos directamente relacionados com as estruturas dos compostos testados (*e.g.* posição e o número de grupos hidroxilo fenólicos, presença de outros substituintes) foram já discutidos neste trabalho (**Parte B**) e poderão também justificar a eficácia antioxidante relativa dos derivados dos ácidos hidroxicinâmicos e do galhato de propilo (GP > HCP > CP >> IP > FP).

Para além dos aspectos directamente relacionados com a diferente reactividade dos compostos perante espécies radiculares, outros factores poderão condicionar o efeito resultante da sua adição, ajudando a explicar a sua eficácia antioxidante relativa:

- Estabilidade térmica dos diferentes compostos nas condições do ensaio (110 °C).

Alguns autores referem que o GP se mantém estável para temperaturas inferiores a 190 °C, facto que poderá contribuir para o seu maior grau de protecção em condições drásticas de termo-oxidação [1].

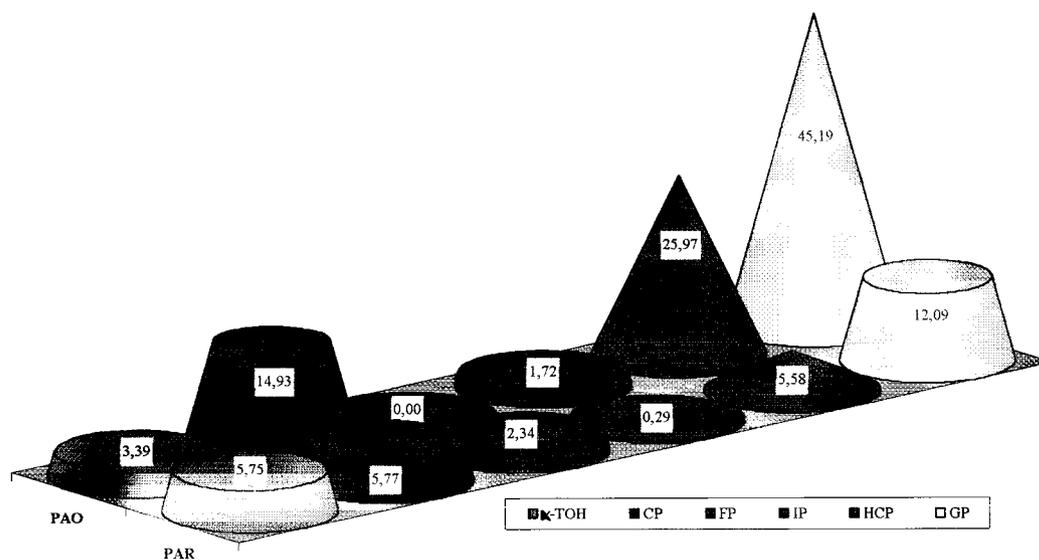
- Afinidade de cada um dos compostos ensaiados para o tipo de substrato lipídico usado.

Segundo a observação de Porter *et al.* [44] designada por “paradoxo polar”, os compostos antioxidantes mais polares (*e.g.* derivados dos ácidos cinâmicos e benzóicos) são mais eficazes em meios apolares (*e.g.* óleos vegetais), enquanto que os compostos mais apolares (*e.g.*  $\alpha$ -tocoferol) apresentam maior eficácia em substratos polares (*e.g.* emulsões lipídicas). Segundo Frankel *et al.* [45] nos sistemas com baixa relação superfície/volume, como é o caso dos óleos vegetais, os compostos que possuem maior equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) orientar-se-ão na interface ar-óleo, conferindo maior protecção contra os fenómenos oxidativos, enquanto que os compostos lipofílicos permanecerão no seio da fase oleosa. A diferente distribuição dos compostos de acordo com a sua afinidade para a fase lipídica poderá também ajudar a explicar o maior poder antioxidante dos compostos GP, HCP e CP em relação ao  $\alpha$ -TOH.

A comparação do poder anti-radicalar (PAR), determinado pelo método do DPPH<sup>•</sup> (Parte B), e o poder antioxidante (PAO), avaliado pelo método Rancimat, permitiu verificar que os compostos que apresentaram maior eficácia antioxidante (GP, CP e HCP), demonstraram igualmente maior actividade anti-radicalar. Do mesmo modo, compostos com reduzido poder antioxidante (FP e IP) exibiram também uma

reduzida eficácia anti-radicalar, havendo apenas a registar uma inversão de posições relativas (**fig. 7**).

Esta observação reforça a hipótese de que o poder antioxidante dos compostos fenólicos está relacionado com o mecanismo de actuação anteriormente discutido (**Parte B**). Porém, não é possível comparar quantitativamente os valores obtidos pelos dois tipos de ensaio. No método Rancimat a eficácia dos compostos é determinada em condições drásticas de oxidação e em meio apolar, enquanto que a avaliação da actividade anti-radicalar pelo método do DPPH<sup>•</sup> decorre em meio polar (etanol), à temperatura ambiente e sem oxigenação intensiva.



**Fig. 7 – Comparação do poder anti-radicalar (PAR) (método DPPH<sup>•</sup>) e do poder antioxidante (PAO) (método Rancimat).**

Numa tentativa de estabelecer uma relação entre a concentração e o PAO, foram efectuadas determinações de resistência à oxidação usando amostras fortificadas com teores de 200 ppm dos compostos que revelaram maior eficácia antioxidante. Os

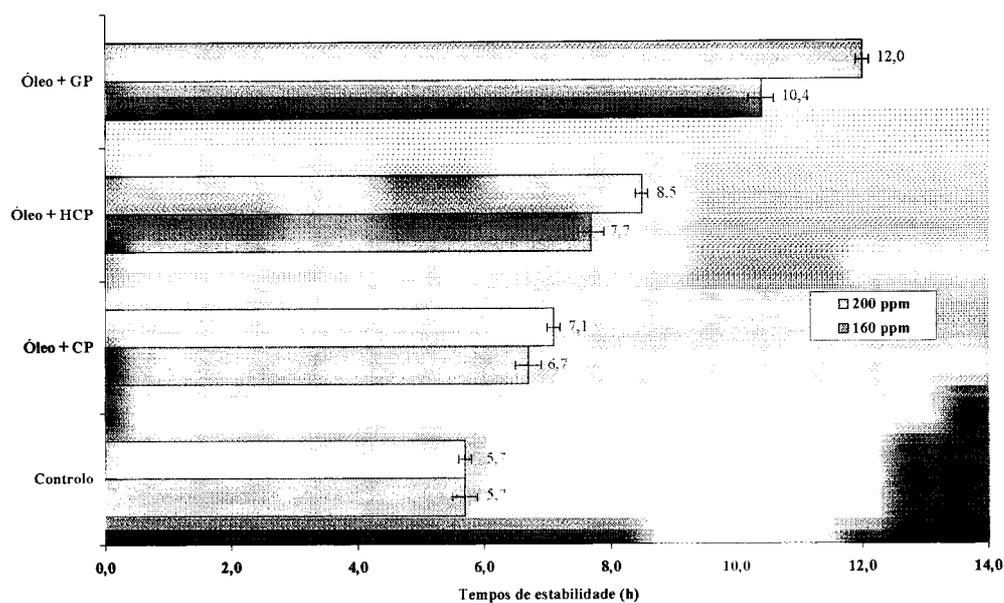
tempos de estabilidade obtidos e os respectivos índices de eficácia antioxidante (PAO) encontram-se expressos na **tabela 6**.

Amostras (conc. 200 ppm)	Tempos de estabilidade (h)	Valor médio $\pm$ desvio padrão	PAO (%) (valor médio)
Controlo	5,7	$5,7 \pm 0,1^a$	0,00 <sup>a</sup>
	5,8		
	5,7		
Óleo + CP	7,1	$7,1 \pm 0,1^b$	19,72 <sup>b</sup>
	7,1		
	7,0		
Óleo + HCP	8,5	$8,5 \pm 0,1^c$	32,94 <sup>c</sup>
	8,5		
	8,4		
Óleo + GP	11,8	$12,0 \pm 0,1^d$	52,50 <sup>d</sup>
	12,2		
	11,9		

Valores na mesma coluna seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes para  $P \leq 0,05$ .

**Tabela 6 - Resultados obtidos no estudo de resistência à oxidação (método Rancimat).**

Em todos os casos registou-se um aumento dos períodos de indução comparativamente ao controlo e aos tempos obtidos nos ensaios anteriormente efectuados (conc. 160 ppm) (**tabela 5, pág. 109**). Na concentração de 200 ppm o GP duplicou o período de indução do óleo de girassol refinado. Para as amostras contendo os compostos HCP e CP registaram-se aumentos de estabilidade de respectivamente 0,8 e 0,4 horas em relação à concentração anteriormente ensaiada (**fig. 8**).



**Fig. 8 – Comparação da estabilidade oxidativa do óleo de girassol refinado fortificado (conc. 160 ppm vs conc. 200 ppm).**

A ordem relativa de eficácia antioxidante entre os compostos, traduzida pelos valores de PAO, manteve-se ( $GP > HCP > CP$ ) (fig.9). A eficácia antioxidante parece estar dependente da concentração, facto que poderá ser confirmado pela realização de estudos dose-resposta.

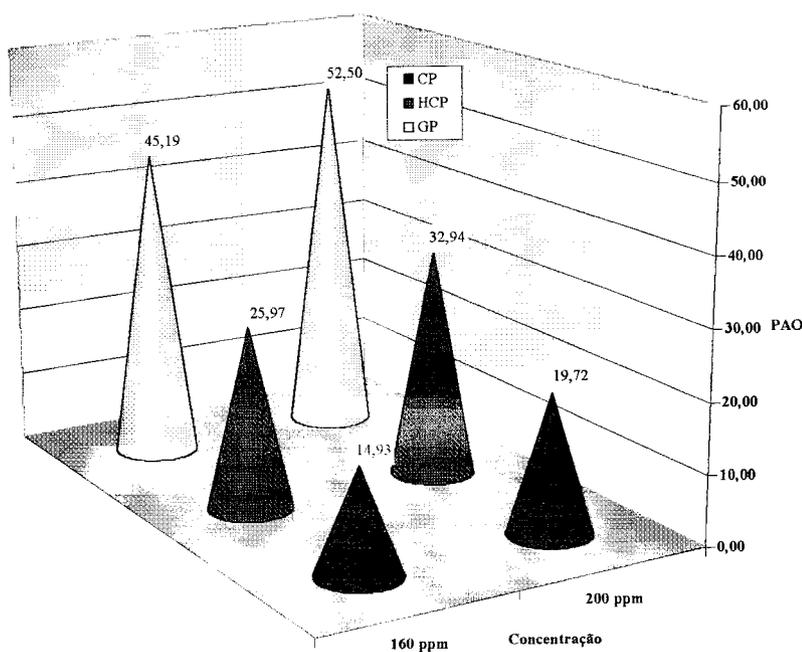


Fig. 9 – Variação do PAO em função da concentração.

#### 4. Conclusão

O trabalho experimental realizado correspondeu a um estudo preliminar de avaliação, e comparação, da eficácia antioxidante dos ésteres propílicos sintetizados (Parte A), e dos antioxidantes de origem sintética (galhato de propilo) e natural ((±)- $\alpha$ -tocoferol), frequentemente usados como aditivos nos óleos e gorduras edíveis.

O ensaio de estabilidade acelerada (método Rancimat) permitiu determinar, nas condições experimentais usadas, os tempos de resistência à oxidação de amostras de óleo de girassol refinado de origem comercial, na presença e na ausência dos compostos testados, e estabelecer uma ordem relativa de eficácia antioxidante (GP > HCP > CP >>  $\alpha$ -TOH > IP > FP).

O estudo efectuado permitiu confirmar a eficácia dos galhatos, nomeadamente do GP, na diminuição da velocidade de oxidação do óleo de girassol refinado, e evidenciou o potencial poder antioxidante dos compostos *ortho*-difenólicos ensaiados (CP e HCP). Em termos de estabilidade oxidativa, parece não haver qualquer vantagem

na adição ao óleo de girassol quer dos compostos monofenólicos (FP e IP), quer de um suplemento de  $\alpha$ -TOH.

Os resultados obtidos suscitam particular interesse pelos ésteres propílicos dos ácidos cafeico e hidrocafeico com vista ao melhoramento da estabilidade oxidativa do óleo de girassol refinado. É, pois, importante complementar o trabalho realizado efectuando estudos dose-resposta, com o objectivo de determinar a dose óptima em termos de eficácia antioxidante ou a dose a partir da qual se observa um efeito pró-oxidante.

O elevado conteúdo de tocoferóis totais naturalmente presentes no óleo de girassol, mesmo após o processo de refinação, poderá condicionar o efeito de qualquer antioxidante exógeno, pelo que em todos os ensaios envolvendo a utilização deste substrato lipídico se deve encarar a possibilidade de ocorrência de efeitos (sinérgicos ou não) entre os tocoferóis e os compostos adicionados [22]. A realização de estudos de sinergismo poderá ajudar a esclarecer se existe vantagem na utilização dos compostos ensaiados em associação com outros antioxidantes.

A determinação da estabilidade oxidativa pelo método Rancimat baseia-se na avaliação dos produtos secundários de oxidação. Os resultados obtidos correspondem a níveis de oxidação elevados e que se situam muito para além do aceitável [2, 3]. A avaliação da estabilidade oxidativa através de parâmetros que se relacionem com a formação dos produtos primários de oxidação (peróxidos), permitirá estimar a eficácia antioxidante dos referidos compostos numa fase mais precoce de evolução oxidativa [25, 46, 47].

A extrapolação dos resultados obtidos para as condições normais de utilização dos produtos lipídicos requer alguns cuidados. Segundo alguns investigadores, o mecanismo de oxidação lipídica nas condições experimentais usadas (oxigenação intensiva e alta temperatura) é diferente do(s) mecanismo(s) envolvido(s) nos processos oxidativos espontâneos que decorrem à temperatura normal de armazenamento e conservação. Em condições de oxidação acelerada, a formação de peróxidos por vias diferentes e a ocorrência reacções laterais (polimerização, ciclização e cisão), conduzem normalmente à formação de novas espécies antioxidantes ou pró-oxidantes capazes de falsear as determinações [2, 3, 28]. Tendo em vista a aplicação dos compostos ensaiados

é indispensável a realização de ensaios em tempo real e nas condições normais de armazenamento e conservação dos produtos.

A resistência à oxidação, medida a alta temperatura, é em regra inferior à verificada a temperaturas mais baixas. O grau de eficácia antioxidante dos compostos, determinado nessas condições, está também dependente da sua maior ou menor estabilidade térmica [2, 3, 48, 46]. Assim, os compostos que se revelaram mais promissores deverão ser sujeitos a ensaios de degradação termo-oxidativa, procurando não só estabelecer uma correlação entre a sua actividade antioxidante e o seu teor residual ao longo do processo oxidativo, mas também averiguar o efeito (antioxidante ou pró-oxidante) de alguns dos compostos provenientes da sua degradação.

Quaisquer que sejam as conclusões desses novos estudos é indispensável verificar a ausência de toxicidade por parte desses compostos. A sua utilização como antioxidantes, em produtos alimentares, medicamentos, cosméticos e outros, estará inevitavelmente dependente do seu perfil toxicológico.

## 5. Bibliografia

[1] Madhavi D.L., Deshpande S.S., Salunkhe D.K. (1996), *in Food Antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Perspectives*. Edited by Madhavi D.L., Deshpande S.S., Salunkhe D.K., Marcel Dekker Inc., New York.

[2] Frankel E.N. (1993). In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends Food Sci. Technol.*, 4 (7), 220-225.

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

[4] Augustin M.A., Berry S.K. (1983). Effectiveness of Antioxidants in Refined, Bleached and Deodorized Palm Olein. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60 (1), 29-32.

[5] Halbaut L., Barbé C., Aróztegui M., de la Torre C. (1997). Oxidative stability of semi-solid excipient mixtures with corn oil and its implication in the degradation of vitamin A. *Int. J. Pharm.*, 147, 31-40.

- [6] Chen J.H., Ho C.-T. (1997). Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (7), 2374-2378.
- [7] de la Presa-Owens S., López-Sabater M.C., Rivero-Urgell M. (1995). Shelf-Life Prediction of an Infant Formula Using an Accelerated Stability Test (Rancimat). *J. Agric. Food Chem.*, 43 (11), 2879-2882.
- [8] Reynhout G. (1991). The Effect of Temperature on the Induction Time of a Stabilized Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68 (12), 983-984.
- [9] Gordon M.H., Kouřimská L. (1995). The Effects of Antioxidants on Changes in Oils during Heating and Deep Frying. *J. Sci. Food Agric.*, 68, 347-353.
- [10] Alaiz M., Zamora R., Hidalgo F.J. (1995). Natural Antioxidants Produced in Oxidized Lipid/Amino Acid Browning Reactions. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72 (12), 1571-1575.
- [11] Pacheco M.T.B., Barrera-Arellano D. (1994). Fraccionamiento del aceite de hígado de tiburón azul (*Prionace glauca*) y su estabilización con antioxidantes. *Grasas y Aceites*, 45 (3), 155-160.
- [12] Palić A., Dikanović-Lučan ž. (1995). Antioxidative Effect of "Herbalox" on Edible Oils. *Fat Sci. Technol.*, 10, 379-381.
- [13] Nwosu C.V., Boyd L.C., Sheldon B. (1997). Effect of Fatty Acid Composition of Phospholipids on Their Antioxidant Properties and Activity Index. *J. Am Oil Chem. Soc.*, 74 (3), 293-297.
- [14] Baldioli M., Servili M., Perreti G., Montedoro G.F. (1996). Antioxidant Activity of Tocopherols and Phenolic Compounds of Virgin Olive Oil. *J. Am Oil Chem. Soc.*, 73 (11), 1589-1592.
- [15] Milovanovic M., Picuric-Jovanovic K., Vucelic-Radovic B., Vrbaski Z. (1996). Antioxidant Effects of Flavonoids of *Anthriscus sylvestris* in Lard. *J. Am Oil Chem. Soc.*, 73 (6), 773-776.
- [16] von Gadow A., Joubert E., Hansmann C.F. (1997). Effect of Extraction Time and Additional Heating on the Antioxidant Activity of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*) Extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (4), 1370-1374.

- [17] Chen C.-W., Lee T.C., Ho C.-T. (1997). Antioxidative Effect and Kinetics Study of Capsanthin on the Chlorophyll-Sensitized Photooxidation of Soybean Oil and Selected Flavor Compounds, in ACS Symposium Series 660: Spices: Flavor Chemistry and Antioxidant Properties. Edited by Sara J. Risch, Chi-Tang Ho, ACS, Washington, pp 188-198.
- [18] Chen Q., Shi H., Ho C.-T. (1992). Effects of Rosemary Extracts and Major Constituents on Lipid Oxidation and Soybean Lipoxigenase Activity. *J. Am Oil Chem. Soc.*, 69 (10), 999-1002.
- [19] Yanishlieva N.V., Marinova E.M. (1996). Antioxidative effectiveness of some natural antioxidants in sunflower oil. *Z Lebensm Unters Forsch*, 203, 220-223.
- [20] Belitz H.-D., Grosch W. (1987), in Food Chemistry. Edited by Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- [21] Huang A.S., Hsieh A.-L., Huang C.-L., Chang S.S. (1981). A Comparison of the Stability of Sunflower Oil and Corn Oil. *J. Am Oil Chem. Soc.*, 58 (11), 997-1001.
- [22] List G.R., Evans C.D., Moser H.A. (1972). Flavor and Oxidative Stability of Northern-Grown Sunflower Seed Oil. *J. Am Oil Chem. Soc.*, 49, 287-292.
- [23] Sherwin E.R. (1978). Oxidation and Antioxidants in Fat and Oil Processing. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 55 (11), 809-814.
- [24] Knörr W., Daute P., Grützmacher R., Höfer R. (1995). Development of New Fields of Application for Linseed Oil. *Fat Sci. Technol.*, 5, 165-169.
- [25] Satue M.T., Huang S.-W., Frankel E.N. (1995). Effect of Natural Antioxidants in Virgin Olive Oil on Oxidative Stability of Refined, Bleached and Deodorized Olive Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72 (10), 1131-1137.
- [26] Savage G.P., McNeil D.L., Dutta P.C. (1997). Lipid Composition and Oxidative Stability of Oils in Hazelnuts (*Corylus avellana* L.) Grown in New Zealand. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74 (6), 755-759.
- [27] Kamal-Eldin A., Marquez-Ruiz G., Dobarganes C., Lars-Åke A. (1997). Characterisation of aldehydic acids in used and unused frying oils. *J. Chromatogr. A*, 776, 245-254.
- [28] Castera-Rossignol A., Bosque F. (1994). Nouvelle approche des anti-oxydants. *OCL*, 1 (2), 131-143.

- [29] Goburdhun D., Jhurree B. (1995). Effect of deep-fat frying on fat oxidation in soybean oil. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 46, 363-371.
- [30] Sherwin E.R., Luckadoo B.M. (1970). Studies on Antioxidant Treatments of Crude Vegetable Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 47, 19-23.
- [31] Cuvelier M.-E., Richard H., Berset C. (1996). Antioxidative Activity and Phenolic Composition of Pilot-Plant and Commercial Extracts of Sage and Rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73 (5), 645-652.
- [32] Koga T., Terao J. (1994). Antioxidant Activity of a Novel Phosphatidyl Derivative of Vitamin E in Lard and Its Model System. *J. Agric. Food Chem.*, 42 (6), 1291-1294.
- [33] Guardiola F., Codony R., Rafecas M., Grau A., Jordán A., Boatella J. (1997). Oxysterol Formation in Spray-Dried Egg Processed and Stored under Various Conditions: Prevention and Relationship with Other Quality Parameters. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (6), 2229-2243.
- [34] Blekas G., Tsimidou M., Boskou D. (1995). Contribution of  $\alpha$ -tocopherol to olive oil stability. *Food Chem.*, 52, 289-294.
- [35] Yanishlieva N.V., Marinova E.M. (1995). Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. *Food Chem.*, 54 (4), 377-382.
- [36] Marinova E.M., Yanishlieva N.V. (1994). Effect of Lipid Unsaturation on the Antioxidative Activity of Some Phenolic Acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71 (4), 427-434.
- [37] deMan J.M., Tie F., de Man L. (1987). Formation of Short Chain Volatile Organic Acids in the Automated AOM Method. *J. Am Oil Chem. Soc.*, 64 (7), 993-996.
- [38] Richheimer S.L., Bernart M.W., King G.A., Kent M.C., Bailey D.T. (1996). Antioxidant Activity of Lipid-Soluble Phenolic Diterpenes from Rosemary. *J. Am Oil Chem. Soc.*, 73 (4), 507-514.
- [39] Jornal Oficial das Comunidades Europeias, nº L61 de 18.3.95, pág. 25.
- [40] Eitenmiller R.R. (1997). Vitamin E Content of Fats and Oils – Nutritional Implications. *Food Technol.*, 51 (5), 78-81.
- [41] Huang S.-W., Frankel E.N., German J.B. (1995). Effects of Individual Tocopherols and Tocopherol Mixtures on the Oxidative Stability of Corn Oil Triglycerides. *J. Agric. Food Chem.*, 43 (9), 2345-2350.

- 
- [42] Omura K. (1995). Antioxidant Synergism between Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72 (12), 1565-1570.
- [43] Madsen H.L., Bertelsen G., Skibsted L.H. (1997). Antioxidative Activity of Spices and Spice Extracts, in ACS Symposium Series 660: Spices: Flavor Chemistry and Antioxidant Properties. Edited by Sara J. Risch, Chi-Tang Ho, ACS, Washington, pp 176-187.
- [44] Porter W.L., Black E.D., Drolet A.M. (1989). Use of Polyamide Oxidative Fluorescence Test on Lipid Emulsions: Contrast in Relative Effectiveness of Antioxidants in Bulk *versus* Dispersed Systems. *J. Agric. Food Chem.*, 37 (3), 615-624.
- [45] Frankel E.N., Huang S.-W., Kanner J., German J.B. (1994). Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants: Bulk Oils *vs* Emulsions. *J. Agric. Food Chem.*, 42 (5), 1054-1059.
- [46] Frankel E.N., Huang S.-W., Aeschbach R., Prior E. (1996). Antioxidant Activity of a Rosemary Extract and Its Constituents, Carnosic Acid, Carnosol and Rosmarinic Acid, in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsion. *J. Agric. Food Chem.*, 44 (1), 131-135.
- [47] Huang S.-W., Hopia A., Schwarz K., Frankel E.N., German J.B. (1996). Antioxidant Activity of  $\alpha$ -Tocopherol and Trolox in Different Lipid Substrates: Bulk Oils *vs* Oil-in-Water Emulsions. *J. Agric. Food Chem.*, 44 (2), 444-452.
- [48] Hamilton R.J., Rossel J.B., Hudson B.J.F., Lölliger J. (1983), in Rancidity in Foods. Edited by Allen J.C., Hamilton R.J., Applied Science Publishers Ltd., London.

---

## Errata

<b>Pág., Linha</b>	<b>Onde se lê...</b>	<b>Deve ler-se...</b>
27, 22	A metodologia usada algumas vantagens:	A metodologia usada apresenta algumas vantagens:
59, Fig. 4	H <sup>+</sup>	H
60, 1	procurou avaliar-se	procurou-se avaliar
89, 9	de compostos modelo (ácido gálico, ... e (+)- $\alpha$ -tocoferol)	dos compostos ácido gálico, ... e (+)- $\alpha$ -tocoferol
98, 6	alargamento	alongamento
98, 18	antioxidante isolado	antioxidante estreme
99, 7	duplas ligações conjugadas	duplas ligações
99, 21	Nos óleos vegetais refinados existem tocoferóis	Nos óleos vegetais refinados existem tocoferóis e tocotrienóis
100, 4	gêneros alimentícios, vêm a sua	gêneros alimentícios, vêm a sua
111, 1	referem-se a teores	referem teores

---

---

## Abstract

The oxidation of lipids is one of the more important reactions involved in the deterioration of the quality of foodstuffs and pharmaceuticals which in turn promotes the shortening of their shelf life. Improved and safe formulations free of both the recognised toxicological effects of the commercial synthetic antioxidants and of the free radicals are needed. Increased interest in suitable antioxidants based on natural models widely distributed in plant kingdom (*e.g.* benzoic and cinnamic acids) is therefore in order.

Following these purposes, the methyl and propyl esters of cinnamic acids (caffeic, ferulic, isoferulic and dihydrocaffeic acids) were obtained by acid catalysed esterification, and their purity and characterisation were achieved by FTIR, NMR and EI-MS (**Part A**). Subsequently, their antiradical and antioxidative activities (**Part B** and **Part C**, respectively) were evaluated.

In order to evaluate the efficiency of the cinnamic acid esters as radical scavengers their reactivity with a stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>) was investigated. The antiradical activity seems to be particularly related to their chemical structures and the esterification seems to influence the antiradical behaviour of cinnamic and gallic acids derivatives in a different way.

The Rancimat method (Metrohm), based on the acceleration of the oxidation process (by high temperature and dry airflow) was chosen to evaluate the antioxidant activity of the propyl esters. Sunflower oil samples were, therefore, fortified with the cinnamates or with the antioxidants ( $\pm$ )- $\alpha$ -tocopherol and propyl gallate, and the retarding effects on the induction time of lipid oxidation were measured. The results allowed to establish a decreasing order of antioxidant power: propyl gallate > propyl dihydrocaffeate > propyl caffeate >> ( $\pm$ )- $\alpha$ -tocopherol > propyl isoferulate > propyl ferulate. The oxidative stability of sunflower oil samples was not improved neither by addition of ferulic and isoferulic acids derivatives, nor by a supplement of ( $\pm$ )- $\alpha$ -tocopherol.

---