UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

LUIS EDUARDO OSSANDÓN CAICONTE

**Especiação e Atividade Antioxidante de Íons
Hidroxiflavílio**

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

SÃO PAULO

07/02/2012

LUIS EDUARDO OSSANDÓN CAICONTE

**Especiação e Atividade Antioxidante de Íons
Hidroxiavílio**

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

Orientador: Prof. Dr. Frank Herbert Quina

SÃO PAULO

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

“Especiação e atividade anti-oxidante de íons hidroxiflavílio”

LUIS EDUARDO OSSANDÓN CAICONTE

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências - Programa: Química.

Aprovado (a) por:

Prof. Dr. Frank Herbert Quina
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. Erick Leite Bastos
IQ - USP

Prof. Dr. Daniel Rettori
UNIFESP- Diadema

SÃO PAULO
07 de fevereiro de 2012

AGRADECIMENTOS

À minha Família, por me apoiar incondicionalmente e ser a base da minha aprendizagem na vida.

Ao Prof. Dr. Frank Herbert Quina, por me aceitar como o seu aluno, pela ajuda, orientação e disposição.

Ao pessoal de laboratório, Sergio, Priscila, Bárbara e Volnir, por me ajudar e ser sempre muito legais comigo.

Ao Prof. Dr. Josef Wilhelm Baader e o seu pessoal de laboratório, por facilitar os aparelhos usados para as medidas antioxidantes.

À Prof. Marlene Morales e o Prof. Dr. Oscar Waissbluth, por me ajudar e apresentar ao meu orientador.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado concedida (processo 133809/2009-9).

RESUMO

Luis, E.O.C. **Especiação e Atividade Anti-Oxidante de Íons Hidroxiflavílios**. 2011. 92 p. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

As antocianinas compreendem o maior conjunto de pigmentos solúveis em água do reino vegetal. Responsáveis pelas cores vermelha, azul e roxa da maioria das frutas e flores, estas pertencem ao grupo dos flavonóides (polifenóis). A cor apresentada por uma determinada antocianina depende do padrão de substituição, presença ou não de íons metálicos ou de outras moléculas capazes de estabilizar a cor, co-pigmentos, do pH local do meio e da natureza do microambiente em que a antocianina se encontra.

Neste projeto, realizou-se um estudo de especiação e das propriedades antioxidantes de uma série de compostos análogos às antocianinas: os sais de 3'-hidroxiflavílio (3'-HF), 4'-hidroxiflavílio (4'-HF), 7,4'-dihidroxiflavílio (7,4'-DHF), 3',4'-dihidroxiflavílio (3',4'-DHF), 5,7-dihidroxi-4-metilflavílio (5,7-DH-4-MF), 7-hidroxi-4-metilflavílio (7-H-4-MF) e 7-metoxi-4-metilflavílio (7-metox-4-MF).

No estudo de especiação, foram determinados o pK imediatamente após a preparação da amostra e o pK_{final} após 1 dia. Para 3'-HF, os valores do pK e pK_{final} foram 2,88±0,05 e 1,94±0,15; para 4'-HF, 4,56±0,10 e 4,23±0,20. Para os flavílios com dois grupos hidroxila ionizáveis, as constantes pK₁, pK₂, pK_{1final} e pK_{2final} para 7,4'-DHF foram 4,12±0,07, 7,85±0,01, 3,29±0,01 e 7,40±0,03; para 3',4'-DHF, 3,98±0,10, 8,80±0,40, 3,70±0,01 e 7,01±0,22. Para o 5,7-DH-4-MF, que não sofre hidratação devido à presença do grupo metílico na posição 4, o pK₁ e pK₂ foram 4,87±0,01 e 7,97±0,01.

Para a determinação da atividade antioxidante, foi utilizado o método de ABTS em que o poder antioxidante é obtida comparando-se a descoloração do radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzoiltiazolina-6-sulfônico) (ABTS^{•+}), a 734 nm, pela amostra com a do composto padrão Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), sendo expressa como a TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). A cinética da reação com os flavílios é bifásica, com uma fase lenta devido à atividade antioxidante residual dos subprodutos da reação. Utilizou-se a primeira derivada das curvas cinéticas para identificar o fim da fase rápida e, portanto, o tempo ótimo para a determinação do valor da TEAC. Os

monohidroxi flavílios (3'-HF e 4'-HF) e o 7,4'-DHF não apresentaram poder antioxidante em solução aquosa a pH 2,1 ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$). Por outro lado, o grupo catecol presente no anel B do 3',4'-DHF e o grupo resorcinol no anel A do 5,7-DH-4-MF conferem propriedades antioxidantes, mesmo em pH baixo. Também apresentaram atividade antioxidante a pH 2,1 o 7-H-4-MF e o 7-metox-4-MF. Em pHs acima do pK, a formação de cis- e trans-chalconas, devido à hidratação, tautomerização e isomerização dos flavílios, resultou num aumento do valor da TEAC.

Palavras Chaves: Antocianinas, Íons Flavílios, Método ABTS, Capacidade Antioxidante, TEAC.

ABSTRACT

Luis, E.O.C. **Speciation and Antioxidant Activity of Hydroxyflavylium Ions**. 2011. 92 p. Master Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Anthocyanins are the major water-soluble pigments of the plant kingdom. Responsible of the red, blue and purple colors of the majority of fruit and flowers, they belong to the group of flavonoids (polyphenols). The color presented by an anthocyanin depends on the pattern of substitution, the presence or not of metal ions or other molecules capable to stabilize the color (co-pigments), the local pH of the solution and the nature of the microenvironment of the anthocyanin.

In this project, a study was made of the speciation and the antioxidant properties of a series of compounds analogous to anthocyanins: 3'-hydroxyflavylium (3'-HF), 4'-hydroxyflavylium (4'-HF), 7,4'-dihydroxyflavylium (7,4'-DHF), 3',4'-dihydroxyflavylium (3',4'-DHF), 5,7-dihydroxy-4-methylflavylium (5,7-DH-4-MF), 7-hydroxy-4-methylflavylium (7-H-4-MF) and 7-methoxy-4-methylflavylium (7-Methox-4-MF).

In the study of the speciation, the pK is determined immediately after preparation of the samples and the pK_{final} after 1 day. For 3'-HF, the values of pK and pK_{final} were 2.88 ± 0.05 and 1.94 ± 0.15 ; for 4'-HF, 4.56 ± 0.10 and 4.23 ± 0.20 . For the flavyliums with two ionizable hydroxyl groups, the constants pK_1 , pK_2 , $pK_{1\text{final}}$ and $pK_{2\text{final}}$ for 7,4'-DHF were 4.12 ± 0.07 , 7.85 ± 0.01 , 3.29 ± 0.01 and 7.40 ± 0.03 ; for 3',4'-DHF, they were 3.98 ± 0.10 , 8.80 ± 0.40 , 3.70 ± 0.01 and 7.01 ± 0.22 . For 5,7-DH-4-MF, which does not hydrate due to the presence of the methyl group at position 4, pK_1 and pK_2 were 4.87 ± 0.01 and 7.97 ± 0.01 .

For the determination of the antioxidant activity, the ABTS method was employed, in which the antioxidant power is obtained by comparing the rate of bleaching of the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radical (ABTS^{+}), at 734 nm, by the sample with that of the standard compound Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), the result being expressed as the TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). The reaction kinetics with the flavyliums are biphasic, with the slower phase due to the residual antioxidant activity of the reaction subproducts. The first derivative of the kinetic curves was employed to determine the end of the faster phase and thus the optimum time for measuring

the TEAC value. The monohydroxyflavyliums (3'-HF and 4'-HF) and 7,4'-DHF showed no antioxidant power in aqueous solution at pH 2.1 ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$). However, the catechol group in ring B of 3',4'-DHF and the resorcinol group in ring A of 5,7-DH-4-MF conferred antioxidant properties even at low pH. In addition, 7-H-4-MF and 7-Methox-4-MF also showed antioxidant activity at pH 2.1. At pH above the pK, the formation of the cis- and trans-chalcones via hydration, tautomerization and isomerization resulted in an increase in the value of the TEAC.

Keywords: Anthocyanins, Flavylium Ions, ABTS method, Antioxidant Capacity, TEAC.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'-HF	3'-hidroxiflavílio
4'-HF	4'-hidroxiflavílio
3',4'-DHF	3',4'-dihidroxiflavílio
7,4'-DHF	7,4'-dihidroxiflavílio
5,7-DH-4-MF	5,7-dihidroxi-7-metilflavílio
7-H-4-MF	7-hidroxi-4-metilflavílio
7-Me-4-MF	7-metoxi-4-metilflavílio
AH ₂ ⁺	Íon Flavílio Diprotonado
AH	Flavílio Protonado, Base Conjugada do AH ₂ ⁺
A ⁻	Base Quinonoidal, Base Conjugada do AH
AH ⁺	Íon flavílio protonado
A	Base Quinonoidal, Base Conjugada do AH ⁺
B	Hemiacetal
C _c	<i>cis</i> -Chalcona
C _t	<i>trans</i> -Chalcona
K	Constante de Equilíbrio da Reação
K _f	Constante de Equilíbrio da Reação Final (a 1 dia)
K _h	Constante de Equilíbrio da Reação de Hidratação
K _t	Constante de Equilíbrio da Reação de Tautomerização
K _i	Constante de Equilíbrio da Reação de Isomerização
K _a	Constante de Equilíbrio da Reação de Desprotonação

TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
ABTS	2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ABTS ^{•+}	Radical 2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
TPZ	2,4,6-tris(2-piridil)-1,3,5-triazina
SET	Proton-Coupled Electron-Transfer Process
HAT	Hydrogen-Transfer Process
$A_{734\text{ nm}}$	Absorbância a 734 nm
$\delta A_{734\text{ nm}}$	Derivada da Absorbância no comprimento 734 nm
$(A_0 - A)_{734\text{ nm}}$	Diferencia entre Absorbâncias na ausência e presença do Antioxidante a 734 nm no tempo determinado

INDICE

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Antocianinas	13
1.2. Anti-Oxidantes	17
2. OBJETIVOS	21
3. PARTE EXPERIMENTAL	22
3.1. Materiais	22
3.2. Equipamentos	22
3.3. Síntese de Sais de Flavílio	23
3.3.1. Perclorato de 4'-hidroxiflavílio	23
3.3.2. Perclorato de 3'-hidroxiflavílio	24
3.3.3. Tetrafluoroborato de 7,4'-dihidroxiflavílio	25
3.3.4. Perclorato de 3',4'-dihidroxiflavílio	25
3.3.5. Perclorato de 5,7-dihidroxi-4-metilflavílio, Cloreto de 7-hidroxi-4-metilflavílio e Cloreto de 7-metoxi-4-metilflavílio	27
3.4. Determinação das Constantes de Equilíbrio em Solução Aquosa	28
3.4.1. Perclorato de 4'-hidroxiflavílio	28
3.4.2. Perclorato de 3'-hidroxiflavílio	28
3.4.3. Tetrafluoroborato de 7,4'-dihidroxiflavílio	28
3.4.4. Perclorato de 3',4'-dihidroxiflavílio	29
3.4.5. Perclorato de 5,7-dihidroxi-4-metilflavílio	29
3.5. Capacidade Anti-Oxidante dos Sais Flavílio	30
3.5.1. Método ABTS (TEAC)	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. Determinação das Constantes de Equilíbrio em Solução Aquosa	31
4.1.1. Perclorato de 4'-hidroxiflavílio	31
4.1.2. Perclorato de 3'-hidroxiflavílio	36
4.1.3. Tetrafluoroborato de 7,4'-dihidroxiflavílio	39
4.1.4. Perclorato de 3',4'-dihidroxiflavílio	45
4.1.5. Perclorato de 5,7-dihidroxi-4-metilflavílio	51

4.2. Capacidade Anti-Oxidante dos Sais Flavílio – Método ABTS	56
4.2.1. Trolox (Padrão)	56
4.2.2. Perclorato de 4'-hidroxiflavílio	58
4.2.3. Perclorato de 3'-hidroxiflavílio	62
4.2.4. Tetrafluoroborato de 7,4'-dihidroxiflavílio	66
4.2.5. Perclorato de 3',4'-dihidroxiflavílio	70
4.2.6. Perclorato de 5,7-dihidroxi-4-metilflavílio	74
4.2.7. Cloreto de 7-hidroxi-4-metilflavílio	77
4.2.8. Cloreto de 7-metoxi-4-metilflavílio	78
5. CONCLUSÃO	85
6. BIBLIOGRAFÍA	87

1. INTRODUÇÃO

1.1. Antocianinas

As antocianinas (das palavras gregas *anthos*: flor, e *kyanos*: azul), pertencentes ao grupo dos flavonóides, compreendem o maior conjunto de pigmentos solúveis em água do reino vegetal. São os responsáveis pelas cores vermelha, azul e roxa da maioria das frutas e flores. Por exemplo, as flores de cor azul contêm a antocianina delphinina nas pétalas [1,4-6,8-10,12,44,51,63,75]. A cor apresentada por uma determinada antocianina depende do padrão de substituição, da presença ou não de íons metálicos ou de outras moléculas capazes de estabilizar a cor, chamados de co-pigmentos, do pH local do meio e da natureza do microambiente em que a antocianina encontra-se [1,5,8].

A diferença das clorofilas e dos carotenóides, a absorção eletrônica das antocianinas está distribuída por toda a região visível do espectro eletromagnético, entre 400 e 700 nm [1].

O interesse no estudo de antocianinas deve-se aos benefícios de atividade farmacológica e possível benefícios à saúde, outorgando vantagem para seu uso como corantes alimentícios [8,27]. Além do uso mercadológico que têm por serem produtos naturais, as antocianinas fazem parte da dieta comum humana há milhares de anos e, portanto, pode-se afirmar que os seres humanos estão adaptados ao consumo destes compostos [1].

As moléculas das antocianinas são encontradas nas plantas no interior dos vacúolos de células epidérmicas, tanto na forma de cristais como dissolvidas [1,4,6,9]. Com relação ao papel que cumprem, leva em conta o fato que antocianinas absorvem luz UV (especialmente resistência contra UV-B) e verde, são bons antioxidantes e desativadores de espécies ativas de oxigênio, fornecem proteção contra patógenos e herbívoros, e finalmente, em flores, atraem insetos polinizadores, como por exemplo, abelhas. Em folhas, a absorção UV ajuda a proteger o aparelho fotossintético contra os efeitos de um excesso de radiação solar e o conseqüente estresse foto-oxidativo [20,63,75,87].

O cromóforo base das antocianinas, o íon 2-fenilbenzopirílio ou íon flavílio, tipicamente apresenta substituintes hidroxila nas posições 3 (glicosilado por unidades como glicose, galactose e arabinose, necessário para estabilidade térmica) e 5 (às vezes glicosilado), com um ou mais substituintes hidroxila ou metoxila nas posições C3' a C5' do anel B (Figura 1) [1,3,4,8,12,75].

Antocianina	R _{3'}	R _{5'}	R ₅
Malvina	OCH ₃	OCH ₃	Glycosyl
Oenina	OCH ₃	OCH ₃	H
Pelargonina	H	H	Glycosyl
Peonina	OCH ₃	H	Glycosyl
Cianina	OH	H	Glycosyl
Delfinina	OH	OH	Glycosyl

Figura 1. O cromóforo básico das antocianinas e exemplos de antocianinas monoglicosídeas e diglicosídeas.

A utilidade prática das antocianinas como corantes é limitada pela rápida perda da cor das antocianinas em $\text{pH} > 3$, devido à instabilidade química do cátion flavílio a pHs maiores, e que, portanto, sofrem transformações em soluções ácidas e neutras [1,6,55]. As antocianinas naturais, como muitos dos seus análogos sintéticos (sais de flavílio), possuem uma ampla reatividade química no estado fundamental em meio aquoso, envolvendo uma série de equilíbrios simultâneos dependentes do pH do meio. Estes incluem (Esquema 1) equilíbrios ácido-base da antocianina, bases quinonoidais (numa escala de tempo de nano a micro-segundos), de hidratação e abertura do anel flavílio, hemiacetal sem cor (numa escala de tempo de segundos a minutos) e de tautomerização e isomerização (numa escala de tempo de minutos a horas) das chalconas resultantes da abertura do anel flavílio, sem cor e de cor amarelo pálido para as chalconas ionizadas [1,5,6,9-12,46].

Esquema 1. Transformações estruturais da antocianina malvidina-3-glicosídeo (oenina) em solução aquosa ligeiramente ácida.

A carga positiva do cátion flavílio está deslocalizada por todo o anel pirílio (anéis A e C), mas as posições C2 e C4 são as que apresentam a maior densidade de carga positiva, tornando-as suscetíveis a um ataque nucleofílico pela molécula de água, em meios

moderadamente ácidos [12,44]. Assim, uma adição nucleofílica da água ao cátion flavílio produz o produto de hidratação na posição C2, dando origem a dois hemiacetais enantioméricos (B). Os hemiacetais absorvem ao redor de 260-280 nm, consequência da diminuição da participação do anel C no sistema π conjugado. As chalconas, que estão em equilíbrio tautomérico com os hemiacetais, absorvem entre 320-360 nm para a trans-chalcona e em torno a 300 nm para a cis-chalcona, cuja conformação não é planar [1,13].

Na natureza, desenvolveram-se estratégias para estabilizar a cor vermelho das antocianinas a pH ao redor de 5 (pH dos vacúolos das células de plantas), por meio da complexação da forma catiônica da antocianina (íon flavílio) por um íon metálico ou por uma molécula orgânica incolor (co-pigmento), o que inibe a reação de hidratação em pHs ácidos [4-6,10]. Este fenômeno, conhecido como “co-pigmentação”, também provoca, em alguns casos, profundas mudanças na cor da antocianina, como por exemplo, de vermelho para azul [10]. Também pode ocorrer uma estabilização da cor a concentrações elevadas, por agregação da antocianina. Os co-pigmentos são geralmente polifenóis que não absorvem na região visível, mas, ao interagirem com a antocianina, provocam um desvio da absorção para comprimentos de onda maiores (efeito batocrômico) e um aumento da intensidade da cor da antocianina (efeito hiperocrômico), resultado das interações entre o co-pigmento e as espécies coloridas das antocianinas [26].

A antocianina livre de substituintes glicosídeos ou aglicona é conhecida como antocianidina e também é encontrada eventualmente em alguns tecidos vegetais [1,8,12].

1.2. Antioxidantes

Um antioxidante é uma substância, sintética ou natural, que inibe reações de oxidação que ocorrem no sistema onde está presente, protegendo o resto das espécies. Desta maneira, os antioxidantes previnem ou retardam a deterioração de produtos como gorduras, óleos, produtos alimentícios, gasolina, petróleo, etc., assim como também de origem biológico, por exemplo, tecido animal e vegetal [85].

Nos seres vivos, os radicais livres são produzidos constantemente nas células, devido ao processo de metabolismo. Quando a produção de radicais livres excede a capacidade antioxidante própria dos tecidos, provoca-se o stress oxidativo, que induz danos na membrana celular, DNA, alterações protéicas, etc. Em humanos, o stress oxidativo é associado com doenças crônicas, como arteriosclerose, câncer, envelhecimento, e doenças neurodegenerativas ou pulmonares. Estudos epidemiológicos sugerem o consumo de vegetais para reduzir ou prevenir a incidência das doenças crônicas mencionadas anteriormente [57,59-61,64-66,68,69,71,75,83].

Os benefícios do consumo de frutas e verduras para a nutrição e preservação de boa saúde humana têm sido atribuídos, em certa medida, à capacidade antioxidante de alguns dos seus componentes, como as vitaminas, carotenóides e fenóis, que protegem, principalmente as gorduras (lipoperoxidação), colesterol, polipeptídios e proteínas, e ácidos nucleicos contra o dano oxidativo em células.

Muitos franceses, especificamente da zona sul, que tem uma alimentação rica em gordura e alto consumo de tabaco, apresentam uma baixa porcentagem de doenças cardíacas em comparação com outras nações do norte de Europa, como Alemanha e Reino Unido. A causa deste tão chamado “Paradoxo Frances” pode ser o alto consumo de vinho tinto, derivado da fermentação de uva preta, rico em compostos polifenólicos, que protegem de doenças do coração devido à sua capacidade de inibir a oxidação do LDL (Low Density Lipoprotein), dando conta do nível de importância dos antioxidantes [51-53,57,59-61,63,66,68-71,75,84]. Como consequência, nas últimas décadas, o interesse nos flavólios cresceu por o poder antioxidante que apresentam.

Para determinar a atividade antioxidante de uma espécie existem diferentes ensaios, sendo os métodos comumente mais utilizados o FRAP, DPPH e ABTS, devido à sua rapidez e simplicidade [83]. Nestes casos, o antioxidante pode reagir através de dois tipos de mecanismos: baseado num processo de transferência ou abstração de átomos de hidrogênio

(HAT) ou por acoplamento de processos de transferência de elétrons-prótons (SET) [57,60,66,74,78,85].

No entanto, os métodos FRAP e DPPH apresentam alguns inconvenientes para a determinação da capacidade antioxidante com íons flavílios. O FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) está baseado na habilidade do antioxidante de reduzir o Fe^{3+} a Fe^{2+} na presença do TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-1,3,5-triazina). O complexo Fe^{2+} -TPTZ apresenta uma absorção intensa a 593 nm, que interfere com a absorção dos flavílios. Além disso, apresenta uma faixa de pH ótimo de trabalho desde 0 a 4. O método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) está baseado na habilidade do antioxidante de doar um átomo de hidrogênio ao radical DPPH $^{\bullet}$, que absorve nos comprimentos de onda de 405 nm (máxima absorção) e 515 nm, onde também existe interferência com a absorção dos flavílios. Além disso, o DPPH só é solúvel em meio alcoólico [57,59,60,65,66,68,70-72,83].

Por outro lado, o método ABTS utiliza a reação do radical ABTS $^{+\bullet}$ [2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)] com o antioxidante, que posteriormente forma um radical mais estável. Os comprimentos de onda de máxima absorção que apresenta o ABTS $^{+\bullet}$ são 414, 734 e 815 nm, sendo 734 nm o comprimento de onda de trabalho, onde não existem interferências da absorção de flavílios [59,68,83,84]. A contrário do FRAP, o ABTS $^{+\bullet}$ é estável numa faixa maior de pHs ácidos, o que permite trabalhar desde 0 a 7. É solúvel em meio alcoólico, mas também apresenta uma alta solubilidade em meio aquoso [57,64,78].

O radical ABTS $^{+\bullet}$ pode ser gerado de maneira enzimática, por reação com o radical ferrilmioglobina ou metamioglobina (obtido por reação entre mioglobina e H_2O_2) ou peroxidase (em presença de H_2O_2); por via química, por oxidação com MnO_2 ou $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$; ou por vias eletroquímica e fotoquímica [57,58,65,68-70,74,76-79,83,86].

Esquema 2. Transformações estruturais do ABTS [2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)] a $\text{ABTS}^{+\bullet}$ [58].

A desvantagem que apresenta o método está relacionada com a preparação da solução de $\text{ABTS}^{+\bullet}$, que deve ser mantida por aproximadamente 12 horas no escuro para gerar o radical. No entanto, para o FRAP e DPPH, a solução pode ser utilizada imediatamente depois de ser preparada [71].

O método ABTS também é conhecido como TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), onde o poder antioxidante de uma amostra é expresso relativo a um composto padrão, neste caso o Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). O Trolox é um análogo da vitamina E, usado amplamente em aplicações biológicas e bioquímicas para reduzir o estresse ou dano oxidativo e como padrão em medições de capacidade antioxidante na indústria alimentaria e nutricional. Existem outros compostos

padrões menos utilizados, como o β -caroteno e o ácido ascórbico [37,50,59-61,64-66,68-72,74-76,78,83,84].

Figura 2. Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox).

2. OBJETIVOS

Neste projeto, propõem-se o estudo da especiação em meio aquoso de uma série de compostos análogos às antocianinas, como o 3'-hidroxiflavílio (3'-HF), 4'-hidroxiflavílio (4'-HF), 3',4'-diidroxiflavílio (3',4'-DHF), 7,4'-diidroxiflavílio (7,4'-DHF) e 5,7-diidroxiflavílio (5,7-DH-4-MF). Também, pretende-se determinar a capacidade antioxidante em função do número e posição de grupos hidroxila nos anéis A e B. Os resultados são relevantes à questão dos possíveis funções *in vivo* das antocianinas em plantas, bem como para o eventual aproveitamento de antocianinas em aplicações tecnológicas.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiais

Os reagentes utilizados foram: HCl 35% (Merck), HClO₄ p.a. 70% (Merck), HBF₄ 48% em água (Aldrich), Ácido acético glacial (Merck), NaOH p.a. (Merck), Etanol p.a. (Merck), Salicilaldeído p.a. (Fluka AG, >99%), NaCl p.a (Nuclear CAQ), Anidrido acético p.a. (Merck), 3-hidroxiacetofenona 97% (Aldrich), 4-hidroxiacetofenona 98% (Aldrich), Éter etílico p.a. (Dinâmica), Metanol (Synth), AlCl₃ (Riedel-de Haën), K₂S₂O₈ 99% (Merck), [(ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzoiltiazolina-6-sulfônico)] de diamônio "ABTS" (Sigma Aldrich, 98%) e Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico "Trolox" (Acros Organics, 98%). As soluções aquosas foram feitas com água purificada por sistema Mili-Q.

3.2. Equipamentos

As medidas espectrofotométricas foram realizadas num espectrofotômetro Diode Array 8452A da Hewlett Packard, acoplado a um banho refrigerado Lauda Ecoline Re 106. As medidas de cinética foram feitas em espectrofotômetro Varian Cary 50 Bio acoplado a um banho refrigerado Varian Cary PCB 150 Water Peltier System.

As determinações de pH foram feitas com um pH-metro da Fisher Scientific, Modelo Accumet 50.

As medidas de NMR-H¹ foram feitas na Central Analítica do IQ-USP, equipamento AC 200, 300 MHz, solvente metanol deuterado.

3.3. Síntese de Sais Flavílio

A síntese de sais flavílio, estudadas neste trabalho, foram baseadas na reação de condensação entre uma acetofenona e uma o-hidroxibenzaldeído [27,28] (Figura 3).

$R_1 = H$	$R_1 = Me$	$R_1 = Me$	$R_1 = H$	$R_1 = H$	$R_1 = H$	$R_1 = H$	$R_1 = H$
$R_2 = H$	$R_2 = H$	$R_2 = H$	$R_2 = H$	$R_2 = H$	$R_2 = H$	$R_2 = OH$	$R_2 = H$
$R_3 = OH, OMe, Me, NH_2, NMe_2$	$R_3 = H, OH, OMe$	$R_3 = OH, OMe$	$R_3 = NMe_2$	$R_3 = NMe_2$	$R_3 = Butil$	$R_3 = H, OH$	$R_3 = H$
$R_4 = H$	$R_4 = H$	$R_4 = H$	$R_4 = H$	$R_4 = H$	$R_4 = H$	$R_4 = H$	$R_4 = OH$
$R_5 = H$	$R_5 = H$	$R_5 = OH$	$R_5 = OH$	$R_5 = H$	$R_5 = OH$	$R_5 = H$	$R_5 = OH$
$R_6 = H$	$R_6 = H$	$R_6 = H$	$R_6 = H$	$R_6 = OH$	$R_6 = H$	$R_6 = H$	$R_6 = H$

Figura 3. Reação de condensação de uma acetofenona com um o-hidroxibenzaldeído [27,28].

3.3.1. Perclorato de 4'-hidroxiflavílio (4'-HF)

A uma solução contendo 1,36 mL (0,01 mol) de 4-hidroxiacetofenona e 1 mL (0,01 mol) de o-hidroxibenzaldeído em 25 mL de ácido acético glacial e 5 mL de ácido tetrafluorobórico (solução aquosa a 48%), foram adicionados, sob agitação, gota a gota 20 mL de anidrido acético, mantendo a temperatura da mistura reacional em torno de 80°C. Ao final da adição, a mistura reacional fica sob agitação durante 16 horas a temperatura ambiente. Após este período, por adição de éter etílico, precipita um sólido de cor laranja. O produto foi solubilizado numa solução de ácido perclórico a 5%, a uma temperatura entre 80°-90°C, condições onde a solubilidade do flavílio é maior. Posteriormente a solução foi colocada num banho de gelo, diminuindo a solubilidade do sal, obtendo assim formação de cristais do produto. Esses foram filtrados, lavados com ácido acético glacial e éter etílico e secados em vácuo por dois dias [27]. O rendimento da síntese foi de 48,1%, 1,48 g de produto. Análise elementar % C (teórico/experimental) = (55,81/52,24), % H (teórico/experimental) = (3,44/2,95). 1H NMR δ = 7,18 (dubleto, $H^{3'}$ e $H^{5'}$), 7,93 (triplete, H^6 ou H^7), 8,20-8,29

(multiplete, H^5 , H^8 e H^6 ou H^7), 8,50 (dublete, H^3), 8,52 (dublete, $H^{2'}$ e $H^{6'}$), 9,20 (dublete, H^4).

4'-HF

3.3.2. Perclorato de 3'-hidroxiflavílio (3'-HF)

A uma solução contendo 0,7 g (0,005 mol) de 3-hidroxiacetofenona e 0,5 mL (0,005 mol) de o-hidroxibenzaldeído em 5 mL de ácido acético glacial e 5 mL de ácido tetrafluorobórico (solução aquosa a 48%), foram adicionados, sob agitação, 10 mL de anidrido acético, mantendo a temperatura da mistura reacional em torno de 80°C. Ao final da adição, a mistura reacional ficou sob agitação durante 12 horas à temperatura ambiente. Após este período, por adição de éter etílico, precipitou um sólido de cor laranja claro. O sólido foi filtrado e lavado sucessivamente com água fria, ácido acético glacial e éter etílico. O produto foi solubilizado numa solução de ácido perclórico a 5%, a uma temperatura entre 80°-90°C. Posteriormente a solução foi colocada num banho de gelo, obtendo a formação de cristais. O sólido filtrado, lavado com ácido acético glacial e éter etílico e secado em vácuo por dois dias [27]. O rendimento da síntese foi de 22,7%, 0,24 g de produto. Análise elementar % C (teórico/experimental) = (55,81/52,28), % H (teórico/experimental) = (3,44/3,34). ^1H NMR δ = 7,29 (dublete, $H^{4'}$), 7,56 (triplete, $H^{5'}$), 7,73 (singleto, $H^{2'}$), 7,99 (triplete, H^6 ou H^7), 8,18 (dublete, $H^{6'}$), 8,30-8,40 (multiplete, H^5 , H^8 e H^6 ou H^7), 8,79 (dublete, H^3), 9,49 (dublete, H^4).

3'-HF

3.3.3. Tetrafluoroborato de 7,4'-dihidroxiavilíio (7,4'-DHF)

A uma solução contendo 0,1 g ($7,34 \times 10^{-4}$ mol) de 4-hidroxiacetofenona e 0,101 g ($7,34 \times 10^{-4}$ mol) de 2,4-dihidroxiavilíio em 1,7 mL de ácido acético glacial e 0,32 mL de ácido tetrafluorobórico (solução aquosa a 48%), foram adicionados, sob agitação, gota a gota 1,3 mL de anidrido acético, mantendo a temperatura da mistura reacional em torno de 70°C. Ao final da adição, a mistura reacional ficou sob agitação durante 12 horas à temperatura ambiente e posteriormente em repouso durante dois dias. Após este período, por adição de éter etílico, foram formados uns cristais de cor laranja. O sólido foi filtrado, lavado com ácido acético glacial e éter etílico e secado em vácuo por dois dias [27]. O rendimento da síntese foi de 14,3%, 0,034 g de produto. Análise elementar % C (teórico/experimental) = (55,26/52,72), % H (teórico/experimental) = (3,40/3,63). ^1H NMR δ = 7,11 (dubleto, $\text{H}^{3'}$ e $\text{H}^{5'}$), 7,38 (dubleto, H^6), 7,45 (singleto, H^8), 8,11 (dubleto, H^5), 8,26 (dubleto, H^3), 8,41 (dubleto, $\text{H}^{2'}$ e $\text{H}^{6'}$), 9,00 (dubleto, H^4).

7,4'-DHF

3.3.4. Perclorato de 3',4'-dihidroxiavilíio (3',4'-DHF)

Para a síntese do 3',4'-DHF primeiro teve que ser preparado o 3,4-dihidroxiacetofenona a partir do catecol.

Na primeira parte da síntese foi preparado catecol diacetato por acetilação de catecol com anidrido acético em solução aquosa alcalina. 2 g de catecol (0,018 mol) foram dissolvidos em 4 mL de solução NaOH 11 mol/L. Logo foi esfriada e misturada com 14 g de gelo picado. Posteriormente, 4,1 mL de anidrido acético (0,0436 mol) foram adicionados imediatamente, seguido de uma agitação vigorosa da mistura por alguns minutos, precipitando um sólido de cor branco que foi filtrado e lavado com água. O produto formado foi recristalizado duas vezes em etanol e secado em vácuo por 24 horas. O rendimento da síntese foi de 59%, 2,08 g de produto [42].

Na segunda parte da síntese foi preparada a 3,4-diidroxiacetofenona por ação do cloreto de alumínio. 1,47 g de catecol diacetato ($7,6 \times 10^{-3}$ mol) e 2,02 g de AlCl_3 (0,0152 mol) foram dissolvidos em 7,6 mL de nitrobenzeno. A mistura foi aquecida a 95°C por 2,5 horas, formando uma mistura viscosa de cor marrom. Esta foi esfriado e descomposto com 6 g de gelo picado e 1,6 mL de HCl 35%. O nitrobenzeno foi removido por arraste de vapor e o produto formado, dissolvido na fase aquosa, extraído com éter etílico e deixado em processo de cristalização. Findo este período, o produto foi dissolvido em água para a sua recristalização. O rendimento da síntese foi de 61,5%, 0,71 g de produto [43].

Obtido o precursor 3,4-diidroxiacetofenona, continua-se com a síntese do íon 3',4'-diidroxi flavílio. A uma solução contendo 0,31 g (0,002 mol) de 3,4-diidroxiacetofenona e 0,2 mL (0,002 mol) de o-hidroxibenzaldeído em 2,5 mL de ácido acético glacial e 2 mL de ácido tetrafluorobórico (solução aquosa a 48%), foram adicionados, sob agitação, gota a gota 2,5 mL de anidrido acético, mantendo a temperatura da mistura reacional em torno de 75°C . Ao final da adição, a mistura reacional ficou sob agitação durante 12 horas a temperatura ambiente e posteriormente em repouso durante uma semana. Findo este período, por adição de éter etílico, precipita um sólido de cor vermelha escuro. O sólido foi filtrado e lavado com éter etílico. O produto foi solubilizado numa solução de ácido perclórico a 5%, a uma temperatura entre $80^\circ\text{--}90^\circ\text{C}$. Posteriormente, a solução foi colocada num banho de gelo, obtendo cristais que foram filtrados, lavados com ácido acético glacial e secados em vácuo por dois dias [27]. Análise elementar % C (teórico/experimental) = (53,19/51,74), % H (teórico/experimental) = (3,27/4,05). ^1H NMR δ = 7,13 (dubleto, $\text{H}^{5'}$), 7,90 (multipeto, H^6 ou H^7), 7,98 (dubleto, $\text{H}^{2'}$), 8,18 (dubleto, $\text{H}^{6'}$), 8,22-8,27 (multipeto, H^5 , H^8 e H^6 ou H^7), 8,57 (dubleto, H^3), 9,13 (dubleto, H^4) [27].

3',4'-DHF

3.3.5. Perclorato de 5,7-dihidroxi-4-metilflavílio (5,7-DH-4-MF), Cloreto de 7-hidroxi-4-metilflavílio (7-H-4-MF) e Cloreto de 7-metoxi-4-metilflavílio (7-Me-4-MF)

Estes flavílios já se encontravam sintetizados e analisados por companheiros do laboratório e, portanto, foram fornecidos por eles.

5,7-DH-4-MF

7-H-4-MF

7-Me-4-MF

3.4. Determinação das Constantes de Equilíbrio em Solução Aquosa

3.4.1. Perclorato de 4'-hidroxiflavílio

Foram realizados dois conjuntos de experimentos para a determinação das constantes de equilíbrio do perclorato de 4'-hidroxiflavílio. No primeiro experimento, as medidas de absorção eletrônica em função do pH foram realizadas imediatamente após a preparação das soluções. No segundo experimento, as determinações das absorbâncias foram feitas 1 dia após o preparo (incubação) das soluções para se detectar eventuais produtos formados, como hemiacetais e chalconas, sendo as amostras deixadas ao abrigo da luz a 25°C. Os pH de trabalho foram entre 1-7.

No primeiro caso foi preparada uma solução-estoque da substância em 1 mL de metanol, com concentração final próxima a 5×10^{-3} M. Para a determinação de pK foram usadas soluções de HClO_4 0,4M e CH_3COOH 0,2M + NaCl 0,35M. Foram preparadas uma série de amostras, a diferentes pH, a partir das soluções mencionadas, a 25°C. Para o ajuste de pH maiores foi utilizada uma solução de NaOH 0,1M + NaCl 0,3M. As medições de absorbância foram feitas a partir da diluição de 10 μL da solução-estoque de 4'-HF em 2 mL da solução de pH determinado. Para o branco, foram utilizadas as soluções de pH correspondente a cada medição. As medidas foram feitas em triplicata.

3.4.2. Perclorato de 3'-hidroxiflavílio

Foi realizado o mesmo procedimento de 4'-HF com 3'-HF. Os pH de trabalho foram entre 0-6. As soluções usadas nas medições foram HClO_4 0,4M e CH_3COOH 0,2M + NaCl 0,35M. Para o ajuste de pH maiores foi utilizada uma solução de NaOH 0,1M + NaCl 0,3M.

3.4.3. Tetrafluoroborato de 7,4'-dihidroxiflavílio

Foi realizado o mesmo procedimento de 4'-HF com 7,4'-DHF. Os pH de trabalho foram entre 1-10. As soluções usadas nas medições foram HClO_4 0,4M e CH_3COOH 0,2M + NaCl 0,35M. Para o ajuste de pH maiores foi utilizada uma solução de NaOH 0,1M + NaCl 0,3M, NaOH 0,01M + NaCl 0,39M e NaH_2PO_4 0,2M + NaCl 0,2M.

3.4.4. Perclorato de 3',4'-dihidroxi-flavílio

Foi realizado o mesmo procedimento de 4'-HF com 3',4'-DHF. Os pH de trabalho foram entre 1-10. As soluções usadas nas medições foram HClO_4 0,4M e CH_3COOH 0,2M + NaCl 0,35M. Para o ajuste de pH maiores foram utilizadas soluções de NaOH 0,1M + NaCl 0,3M, NaOH 0,01M + NaCl 0,39M e NaH_2PO_4 0,2M + NaCl 0,2M. A solução-estoque foi preparada em ambiente saturado com nitrogênio.

3.4.5. Perclorato de 5,7-dihidroxi-4-metilflavílio

Foi realizado o mesmo procedimento de 4'-HF com 5,7-DH-4-MF. Os pH de trabalho foram entre 1-10. As soluções usadas nas medições foram HClO_4 0,4M e CH_3COOH 0,2M + NaCl 0,35M. Para o ajuste de pH maiores foram utilizadas soluções de NaOH 0,1M + NaCl 0,3M, NaOH 0,01M + NaCl 0,39M e NaH_2PO_4 0,2M + NaCl 0,2M.

3.5. Capacidade Antioxidante dos Sais Flavílio

3.5.1. Método ABTS (TEAC – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

O ensaio foi baseado no método descrito por Re, Pellegrini, Proteggente, Pannala, Yang e Rice-Evans [39], que compara o poder antioxidante entre o Trolox e amostra por meio da descoloração do radical $ABTS^{+\bullet}$ presente na solução [37,50,59-61,64-66,68-70].

O $ABTS^{+\bullet}$ foi gerado através da reação entre ABTS 7 mM e $K_2S_2O_8$ 2,45 mM em água, produzindo o $ABTS^{+\bullet}$ azul-verde após 12 horas no escuro, a temperatura ambiente. O mecanismo para esta reação, proposto por Henriquez, Aliaga e Lissi [77] é o seguinte [37,39,56-61,65,68,71,76]:

Foram preparadas soluções dos cinco sais flavílio a testar com concentração conhecida de 0,5 mg/mL.

A reação entre os reagentes foi seguida pela variação da absorbância do radical, a 734 nm ($\epsilon_{734nm} = 1,5 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [37,56-62]), em função do tempo. Para isso, foi preparado um conjunto de 6 amostras contendo uma alíquota da solução estoque do flavílio, para assim obter uma concentração entre 0 e 7 mM. A cada amostra, foi adicionada uma alíquota da solução estoque do radical $ABTS^{+\bullet}$, necessária para obter uma absorbância final de $0,7 \pm 0,02$ ao comprimento de onda mencionado anteriormente, tudo em um volume total de 3 mL, completado com solução tampão [37,56-62,65,66,68-71,73-78,86]. O procedimento foi feito com cada sal do flavílio e em dois conjuntos para cada íon flavílio, o primeiro de maneira imediata e o segundo após um dia de incubação, para permitir a formação de outras espécies.

Os valores de absorbância obtidos foram comparados contra uma curva padrão de Trolox, construída através da redução da absorbância de $ABTS^{+\bullet}$ por diferentes concentrações de Trolox, para assim determinar o TEAC de cada sal flavílio. Cada experimento foi feito em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação das Constantes de Equilíbrio em Solução Aquosa

4.1.1. Perclorato de 4'-hidroxiflavílio

A partir dos espectros de absorção apresentados na Figura 4, é possível observar que o cátion flavílio, AH^+ , tem uma absorção máxima a 436 nm. Ao aumentar o pH verifica-se um decréscimo da banda e o aparecimento de uma banda a 498 nm, que atribui-se à espécie A, base quinonoidal, e outra entre 300-350 nm correspondente às espécies hemiacetal e *cis*-chalcona [44,54].

Figura 4. Espectros de absorção do 4'-HF obtidos imediatamente após a preparação da amostra, entre pH 2 e 7 a 25°C.

Em estas condições, existe um pseudo-equilíbrio entre AH^+ (cátion flavílio) e A (base quinonoidal), B (hemiacetal) e C_c (*cis*-chalcona), onde pode ser determinado o valor da constante K. Este é só um equilíbrio temporal e, com o transcurso do tempo, chega-se ao estado de equilíbrio final, onde as únicas espécies participantes deste serão AH^+ e C_t (*trans*-chalcona). Pela Figura 5, foi determinado o pK, obtendo um valor de $4,56 \pm 0,10$.

Figura 5. Variação da fração molar do cátion flavílio (AH^+) e a soma das espécies restantes (CB) que são a base quinonoidal (A), hemiacetal (B), e cis-chalcona (C_c), em função do pH, a 25°C. Valores obtidos em função da variação da absorbância normalizada.

Da mesma maneira, foram obtidos os espectros do flavílio após 1 dia de incubação, em diferentes pH, apresentados na Figura 6. Nestes espectros, é possível observar a diminuição da absorbância a 498 nm e um aumento da banda entre 300 e 350 nm, o que indica a diminuição da base quinonoidal, espécie favorecida cineticamente, e o aumento da trans-chalcona, espécie favorecida termodinamicamente, por a sua estabilidade a pH maiores [44]. Pela Figura 6 foi determinado o pK_f , obtendo um valor de $4,23 \pm 0,20$.

Figura 6. Espectros de absorção do 4'-HF obtidos após de 1 dia da preparação da amostra, entre pH 1 e 7 a 25°C.

Figura 7. Variação da fração molar do cátion flavílio (AH^+) e da soma das espécies restantes (CB) que são a base quinonoidal, hemiacetal, cis e trans-chalcona, após 1 dia, em função do pH, a 25°C. Valores obtidos em função da variação de absorbância normalizada.

Com os valores obtidos das constantes pK , pK_f e pK_a (5,53, valor da literatura [44, 53]), é possível obter um gráfico da distribuição das espécies em função do pH, Figuras 8-10, através das seguintes equações:

$$C_0 = [AH^+] + [A] + [B] + [C_c] \quad \text{para a medição imediata (K)}$$

Sendo C_0 a soma das concentrações de todas as espécies presentes na solução, onde ainda não houve tempo de formar quantidades apreciáveis do C_t .

$$\text{e } C_{0f} = [AH^+] + [A] + [B] + [C_c] + [C_t] \quad \text{para a medição a 1 dia (K}_f\text{)}$$

Sendo C_{0f} a soma das concentrações de todas as espécies presentes na solução, onde o sistema está em equilíbrio termodinâmico entre todas.

Assim as expressões das frações molares são:

para a medição imediata, considerando a equação (5),

$$\frac{[AH^+]}{C_0} = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a + K_h + K_h K_t}$$

$$\frac{[A]}{C_0} = \frac{K_a}{[H^+] + K_a + K_h + K_h K_t}$$

$$\frac{([B] + [C_c])}{C_0} = \frac{K_h + K_h K_t}{[H^+] + K_a + K_h + K_h K_t}$$

Considerando que $K_h + K_h K_t = K - K_a$

e para a medição após 1 dia, considerando a equação (6),

$$\frac{[AH^+]}{C_0} = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a + K_h + K_h K_t + K_h K_t K_i}$$

$$\frac{[A]}{C_0} = \frac{K_a}{[H^+] + K_a + K_h + K_h K_t + K_h K_t K_i}$$

$$\frac{([B] + [C_c])}{C_0} = \frac{K_h + K_h K_t}{[H^+] + K_a + K_h + K_h K_t + K_h K_t K_i}$$

$$\frac{[C_t]}{C_0} = \frac{K_h K_t K_i}{[H^+] + K_a + K_h + K_h K_t + K_h K_t K_i}$$

considerando que $K_h + K_h K_t + K_h K_t K_i = K_f - K_a$ e $K_h K_t K_i = K_f - K$

Pina, Melo, Laia, Parola e Lima, Chem. Soc. Rev. 2012, para uma discussão detalhada da origem e significado destas equações [88].

Figura 8. Fração molar das espécies AH^+ e A em equilíbrio em função do pH, considerando só o pK_a , a 25°C.

Figura 9. Fração molar das espécies AH^+ , A , B e C_c em equilíbrio em função do pH, considerando o pK_a e pK , medida imediatamente a 25°C [53].

Figura 10. Fração molar das espécies AH^+ , A, B, C_c e C_t em equilíbrio em função do pH, considerando o pK_a e pK_f , medida após 1 dia a 25°C.

4.1.2. Perclorato de 3'-hidroxiflavílio

A partir dos espectros de absorção apresentados na Figura 11, observa-se que o cátion flavílio, AH^+ , tem uma absorção máxima a 388 nm. Ao aumentar o pH, verifica-se um decréscimo da banda. Não foi possível observar alguma banda relacionada com a base quinonoidal, devido ao fato que a base desaparece rapidamente, formando imediatamente o hemiacetal e cis-chalcona, representada por um leve aparecimento de bandas a 300 nm [27].

Figura 11. Espectros de absorção do 3'-HF obtidos imediatamente depois da preparação da amostra, entre pH 1 e 5 a 25°C.

Nestas condições, existe um pseudo-equilíbrio entre AH^+ e B e C_c , onde foi determinado o valor da constante K entre as espécies. Pela Figura 12 foi determinado o pK, obtendo um valor de $2,88 \pm 0,05$.

Figura 12. Variação da fração molar do cátion flavílio (AH^+) e da soma das espécies restantes (CB), que são o hemiacetal e cis-chalcona, em função do pH, a 25°C.

Da mesma maneira, foi obtido o espectro do flavílio após 1 dia de incubação, em diferentes pH, apresentado na Figura 13, onde é possível observar a diminuição da absorbância a 388 nm, e um aumento da banda entre 300 e 350 nm, o que indica o aparecimento da trans-chalcona. Pela Figura 14 foi determinado o pK_f , obtendo um valor de $1,94 \pm 0,15$.

Figura 13. Espectros de absorção do 3'-HF obtidos 1 dia após a preparação da amostra, entre pH 0 e 5 a 25°C.

Figura 14. Variação da fração molar do cátion flavílio (AH^+) e da soma das espécies restantes (CB) que são o hemiacetal, cis e trans-chalcona, após 1 dia, em função do pH, a 25°C.

Com os valores obtidos das constantes pK , pK_f é possível obter um gráfico da distribuição das espécies em função do pH, Figura 15, como foi feito anteriormente.

Figura 15. Fração molar das espécies AH^+ , B, C_c e C_t em equilíbrio em função do pH, a diferentes tempos de reação e 25°C. (1) Medição imediata. (2) Medição após 1 dia.

4.1.3. Tetrafluoroborato de 7,4'-dihidroxiavilíio

A partir dos espectros de absorção apresentados na Figura 16, observa-se que o cátion flavílio, AH_2^+ , tem uma absorção máxima a 458 nm. Ao aumentar o pH, verifica-se um decréscimo da banda e o aparecimento de outra a 490 nm, que atribui-se à espécie AH, base quinonoidal. Também se observa o aparecimento de uma banda a 372 nm, devido à formação da trans-chalcona. Não é possível observar uma banda correspondente ao hemiacetal e cis-chalcona, por causa do tempo de vida curto destas espécies [45-49].

Figura 16. Espectros de absorção do 7,4'-DHF obtidos imediatamente após a preparação da amostra, entre pH 2 e 6 a 25°C.

Nestas condições, existe um pseudo-equilíbrio entre AH_2^+ e AH e C_t , onde foi determinado o valor da constante K_1 entre as espécies. Pela Figura 17 foi determinado o pK_1 , obtendo um valor de $4,12 \pm 0,07$.

Figura 17. Variação da fração molar do cátion flavílio (AH_2^+) e soma das espécies restantes (CB), base quinonoidal e trans-chalcona, em função do pH, a 25°C.

No espectro após 1 dia de incubação, apresentado na Figura 18, é possível observar a diminuição da absorbância a 490 nm, AH, e um aumento da banda a 372 nm, C_t, sendo esta ultima a espécie predominante a pHs maiores. Pela Figura 19 foi determinado o pK_{1f} , obtendo um valor de $3,29 \pm 0,01$.

Figura 18. Espectros de absorção do 7,4'-DHF obtidos após 1 dia da preparação da amostra, entre pH 2 e 6 a 25°C [47].

Figura 19. Variação da fração molar do cátion flavílio (AH_2^+) e da soma das espécies restantes (CB), base quinonoidal e trans-chalcona em função do pH, após 1 dia a 25°C.

Com os valores das constantes pK_1 , pK_{1f} foi construído o gráfico da distribuição das espécies em função do pH, Figura 20.

Figura 20. Fração molar das espécies em equilíbrio AH_2^+ , AH e C_1 em função do pH, a diferentes tempos de reação, entre pH 1-5 a 25°C. (1) Medição imediata. (2) Medição após 1 dia.

Para pHs maiores, Figura 21, obtém-se uma diminuição da banda a 490 nm, AH , e o aparecimento de outra a 536 nm, correspondente à base quinonoidal ionizada, A^- . Também existe uma diminuição da banda a 372 nm e um leve aumento de outra a 390 nm, devido à *trans*-chalcona ionizada C_1^- [45-49].

Figura 21. Espectros de absorção do 7,4'-DHF obtidos imediatamente depois da preparação da amostra, entre pH 6 e 9 a 25°C.

A constante de pseudo-equilíbrio K_2 , entre AH , C_t e A^- , C_t^- , foi determinada pelo gráfico da Figura 22, obtendo um pK_2 de $7,85 \pm 0,01$.

Figura 22. Variação da fração molar das espécies AH , C_t e A^- , C_t^- , em função do pH, a 25°C. Medição imediata.

No espectro após 1 dia de incubação, apresentado na Figura 23, observa-se a diminuição da banda a 372 nm, C_t , a pHs maiores. Por outro lado, um aumento das bandas a 536 nm, A^- , e 390 nm, C_t^- . Pela Figura 24 foi determinado o pK_{2f} , obtendo um valor de $7,40 \pm 0,03$ [45-49].

Figura 23. Espectros de absorção do 7,4'-DHF obtidos após 1 dia a preparação da amostra, entre pH 5 e 9 a 25°C.

Figura 24. Variação da fração molar das espécies AH, C_t , A^- e C_t^- , após 1 dia, em função do pH, a 25°C.

Com os valores das constantes pK_2 e pK_{2f} foi construído o gráfico da distribuição das espécies em função do pH, figura 25.

Figura 25. Fração molar das espécies em equilíbrio em função do pH, a diferentes tempos de reação, entre pH 6-9 a 25°C. (1) Medição imediata. (2) Medição após 1 dia.

4.1.4. Perclorato de 3',4'-dihidroxi flavílio

A partir dos espectros de absorção apresentados na Figura 26, observa-se que o cátion flavílio, AH_2^+ , tem uma absorção máxima a 458 nm. Ao aumentar o pH, verifica-se um decréscimo da banda e o aparecimento de outra a 522 nm, que atribui-se à espécie AH, base quinonoidal. Também se observa o aparecimento leve de uma banda a 356 nm, devido à formação de trans-chalcona [27].

Figura 26. Espectros de absorção do 3',4'-DHF obtidos imediatamente após a preparação da amostra, entre pH 1 e 5 a 25°C.

Na Figura 27 é apresentado o gráfico das frações molares que existem no pseudo-equilíbrio, AH_2^+ , AH e C_t , determinando assim o valor do pK_1 de $3,98 \pm 0,10$.

Figura 27. Variação da fração molar do cátion flavílio (AH_2^+) e da soma das espécies restantes, base quinonoidal e trans-chalcona, em função do pH, a 25°C.

Após 1 dia de incubação, apresentado na Figura 28, é possível observar a diminuição da absorbância a 522 nm, AH , e um aumento da banda a 356 nm, C_t . Pela Figura 29 foi determinado o pK_{1f} , obtendo um valor de $3,70 \pm 0,01$.

Figura 28. Espectros de absorção do 3',4'-DHF obtidos após de 1 dia da preparação da amostra, entre pH 1 e 5 a 25°C.

Figura 29. Variação da fração molar do cátion flavílio (AH_2^+) e da soma das espécies restantes, base quinonoidal, AH, e trans-chalcona, C_t , após 1 dia, em função do pH, a 25°C.

Com os valores das constantes pK_1 e pK_{1f} , foi construído o gráfico da distribuição das espécies em função do pH, Figura 30.

Figura 30. Fração molar das espécies em equilíbrio em função do pH, entre pH 1-5, a diferentes tempos de reação e 25°C. (1) Medição imediata (2) Medição após 1 dia.

Em pHs maiores, Figura 31, obtém-se uma diminuição da banda a 522 nm, AH, e o aparecimento de outras bandas a 650 nm, da base quinonoidal ionizada, A^- , e a 405 nm da trans-chalcona ionizada, C_t^- .

Figura 31. Espectros de absorção do 7,4'-DHF obtidos imediatamente após a preparação da amostra, entre pH 6 e 10 a 25°C.

A constante de pseudo-equilíbrio, entre AH, C_t e A^- , C_t^- , foi determinada pelo gráfico da Figura 32, obtendo um pK_2 de $8,80 \pm 0,40$.

Figura 32. Variação da fração molar do grupo de espécies AH, C_t e A^- , C_t^- em função do pH, a 25°C.

No espectro após 1 dia de incubação, apresentado na Figura 33, observa-se uma diminuição maior das bandas 356 nm, C_t e 522 nm, AH, a pHs elevados. Por outro lado, existe um aumento da banda a 650 nm, A^- (a banda é mais notória), e permanência da banda a 405 nm, C_t^- . Pela Figura 34 foi determinado o pK_{2f} , obtendo um valor de $7,01 \pm 0,22$.

Figura 33. Espectros de absorção do 3',4'-DHF obtidos 1 dia após a preparação da amostra, entre pH 6 e 10 a 25°C.

Figura 34. Variação da fração molar das espécies AH, C_t e A⁻, C_t⁻, em função do pH, após 1 dia e 25°C.

Deve-se considerar que esta espécie é instável, nas suas formas de base quinonoidal e base quinonoidal ionizada; portanto, após um dia de incubação, a sua instabilidade é mais evidente, e aumenta a dificuldade das medições [27]. Portanto, os resultados são pouco confiáveis.

Com os valores das constantes pK₂ e pK_{2f}, foi construído o gráfico da distribuição das espécies em função do pH, Figura 35.

Figura 35. Fração molar das espécies em equilíbrio em função do pH, a diferentes tempos de reação, entre pH 6-11 a 25°C. (1) Medição imediata. (2) Medição após 1 dia.

4.1.5. Perclorato de 5,7-dihidroxi-4-metilflavílio

A partir dos espectros de absorção apresentados na Figura 36, observa-se que o cátion flavílio, AH_2^+ , tem absorção máxima a 380 nm e 438 nm. Ao aumentar o pH, verifica-se um decréscimo das bandas e o aparecimento de outra a 468 nm, que atribui-se à base quinonoidal, AH [27].

Figura 36. Espectros de absorção do 5,7-DH-4-MF obtidos imediatamente após a preparação da amostra, entre pH 3 e 6 a 25°C.

A pHs maiores, Figura 37, obtém-se uma diminuição das bandas a 468 nm, AH, e aparecimento de outra a 410 nm, correspondente à base quinonoidal ionizada, A⁻.

No espectro após 1 dia de incubação a pHs entre 6-9, Figura 38, observa-se que não existe variação das bandas, nem o aparecimento de outras correspondentes a espécies como hemiacetal e chalconas, devido a presença do grupo metílico na posição 4, que evita a reação de hidratação.

Figura 37. Espectros de absorção do 5,7-DH-4-MF obtidos imediatamente depois da preparação da amostra, entre pH 6 e 9 a 25°C.

Figura 38. Espectros de absorção do 5,7-DH-4-MF obtidos após 1 dia da preparação da amostra, entre pH 6 e 9 a 25°C.

Com os gráficos de fração molar em função do pH, Figuras 39 e 40, foram obtidos o pK_1 de $4,87 \pm 0,01$ e pK_2 $7,97 \pm 0,01$.

Figura 39. Variação da fração molar do cátion flavílio (AH_2^+) e da base quinonoidal (AH), em função do pH, a 25°C.

Figura 40. Variação da fração molar da base quinonoidal e da base quinonoidal ionizada em função do pH, a 25°C.

Figura 41. Fração molar das espécies em equilíbrio, cátion flavílio, base quinonoidal e base quinonoidal ionizada em função do pH, a 25°C.

De acordo aos resultados obtidos da especiação dos flavílios, foi construída a Tabela 1, que resume os dados de pK e pK_f.

Tabela 1. Valores de pK e pK_f obtidos para cada Flavílio.

Flavílio	pK			
	imediato		1 dia de incubação	
	1	2	1 _{final}	2 _{final}
3'-HF	2,88 ± 0,05	---	1,94 ± 0,15	---
4'-HF	4,56 ± 0,10	---	4,23 ± 0,20	---
7,4'-DHF	4,12 ± 0,07	7,85 ± 0,01	3,29 ± 0,01	7,40 ± 0,03
3',4',DHF	3,98 ± 0,10	8,80 ± 0,40	3,70 ± 0,01	7,01 ± 0,22
5,7-DH-4-MF	4,87 ± 0,01	7,97 ± 0,01	---	---

A diferença dos comprimentos de onda de máxima absorção entre 3'-HF com 4'-HF, 3',4'-DHF e 7,4'-DHF, deve-se à presença do grupo hidroxila na posição 4', que influi na estabilidade do cátion flavílio e que causa um deslocamento da absorção a comprimentos de onda maiores (efeito batocrómico); a substituição na posição 3' não influi na estabilidade [44].

A presença do grupo metílico na posição 4, como em 5,7-DH-4-MF, protege contra a hidratação e evita a formação do hemiacetal e posterior formação de chalconas [1,10,13,14,20,27].

4.2. Capacidade Antioxidante de Sais Flavíio - Método ABTS (TEAC)

No comprimento de onda usado neste método, 734 nm, não existe interferência por absorção dos cátions flavíio utilizados ou dos seus produtos de ionização, hidratação, tautomerização ou isomerização.

Figura 42. Espectro de absorção do radical ABTS^{•+}.

4.2.1. Trolox (Padrão)

A reação entre o Trolox e o ABTS^{•+} é imediata, obtendo-se uma absorbância constante desde o começo da medição, como é apresentado na Figura 43. De acordo com esta variação de absorbância, foi construído um gráfico, Figura 44, para a determinação do coeficiente angular de $0,0214 (\mu\text{M Trolox})^{-1}$, em tampão $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ a pH 2,1.

Figura 43. Variação da absorbância a 734 nm do radical ABTS^{•+} em função do tempo, a diferentes concentrações de Trolox, 0-7 μM, em tampão H₃PO₄/H₂PO₄⁻ pH 2,1 e 25°C.

Figura 44. Diferencia entre a absorbância do radical ABTS^{•+}, a 734 nm, na ausência de Trolox, A_0 , e na presença, A , de Trolox a uma concentração entre 0-7 μM, em tampão H₃PO₄/H₂PO₄⁻ pH 2,1 e 25°C.

Tambem foram realizadas medidas em tampão CH₃COOH/CH₃COO⁻ de pH 4,7 e H₂PO₄⁻/HPO₄⁼ de pH 6,2, obtendo coeficientes angulares de 0,0236 e 0,0225 (μM Trolox)⁻¹.

4.2.2. Perclorato 4'-hidroxiflavílio

Não existe reação entre o cátion flavílio 4'-HF e $\text{ABTS}^{+\bullet}$ em tampão $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ a pH 2,1, a concentrações entre 0-7 μM de 4'-HF, como observa-se na Figura 45. Por outro lado, em tampão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ pH 6,2, Figura 46, o composto apresenta capacidade antioxidante, devido à formação da base quinonoidal e/ou chalcona-cis.

Em pH 6,2, a absorbância do radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ continua diminuindo, sem atingir um valor constante de absorbância, que indica o não termino da reação, necessário para a realização dos cálculos. No entanto, nos primeiros 5 minutos de reação observa-se uma variação maior, indicando que existem duas cinéticas, uma rápida, que acontece nos primeiros minutos, e outra lenta. Por motivo do anterior foi aplicada a derivada aos valores da Figura 46, para assim obter o ponto de quebre que indicará o tempo no qual termina a reação rápida e começa a lenta, apresentado na Figura 47 (considerar $\delta A_{734\text{nm}}/\delta t$ como $\delta A_{734\text{nm}}$). Desta maneira, os resultados do TEAC serão determinados com relação a este ponto.

Também foi construído um gráfico da variação do TEAC em função do tempo, Figura 49.

Figura 45. Variação da absorbância do radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ a 734 nm em função do tempo, a concentrações de 4'-HF de 0-7 μM , em tampão $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ pH 2,1 e 25°C.

Figura 46. Variação da absorvância do radical $\text{ABTS}^{+•}$ a 734 nm em função do tempo, a concentrações de 4'-HF de 0-7 μM , em tampão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{=}$ pH 6,2 e 25°C .

Figura 47. A primeira derivada das curvas cinéticas da Figura 46.

Figura 48. Diferencia entre a absorvância do radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ a 734 nm, na ausência, A_0 , e presença, A , do 4'-HF, a uma concentração entre 0-7 μM , em tampão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ pH 6,2 e 25°C. Valores referentes ao ponto de quebra da primeira derivada.

O valor do TEAC é calculado de acordo à seguinte equação:

$$TEAC = \frac{m_f}{m_T}$$

onde m_f é o coeficiente angular do flavílio, obtido, por exemplo, da Figura 48, e m_T o coeficiente angular do Trolox, obtido, por exemplo, da Figura 44. Sendo ambos os valores referentes ao mesmo pH (tampão).

O valor do TEAC obtido, com relação ao ponto de quebra da medição imediata, foi de 1,71. Na Figura 49 são apresentados os valores durante o transcorrer a reação.

Figura 49. Variação do TEAC, para 4'-HF, em função do tempo, em tampão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ pH 6,2 e 25°C. Medição imediata.

Para as medidas após 1 dia de incubação, foram feitos os mesmos tratamentos de dados utilizados anteriormente, obtendo um TEAC de 1,66, no ponto de quebre.

Figura 50. Variação da absorbância do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a 734 nm, em função do tempo, a concentrações de 4'-HF de 0-7 µM, em tampão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ pH 6,2, a 25°C e após 1 dia de incubação.

Figura 51. Variação do TEAC, para 4'-HF, em função do tempo, em tampão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ pH 6,2, a 25°C e após 1 dia de incubação.

4.2.3. Perclorato de 3'-hidroxiflavílio

Igual ao 4'-HF, o 3'-HF não reage com $\text{ABTS}^{+\bullet}$ em tampão $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ a pH 1,1, e concentrações entre 0-7 μM de 3'-HF, Figura 52. Por outro lado, em tampão $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ de pH 4,7, Figura 53, apresenta capacidade antioxidante, devido à formação da cis-chalcona. O valor do TEAC obtido no ponto de quebre, da medição imediata, foi de 0,76.

Figura 52. Variação da absorbância do radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ a 734 nm em função do tempo, a concentrações de 3'-HF de 0-7 μM , em tampão $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ pH 1,1 e 25°C.

Figura 53. Variação da absorvância do radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ a 734 nm em função do tempo, a concentrações de 3'-HF de 0-7 μM , em tampão $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ de pH 4,7 e 25°C.

Figura 54. A primeira derivada das curvas cinéticas da Figura 53.

Figura 55. Variação do TEAC, para 3'-HF, em função do tempo, em tampão $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ pH 4,7, a 25°C. Medição imediata.

Para as medidas após 1 dia de incubação, foi obtido um TEAC de 1,16, no ponto de quebre.

Figura 56. Variação da absorvância do radical $\text{ABTS}^{+•}$ a 734 nm em função do tempo, a concentrações de 3'-HF de 0-7 μM , em tampão $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ de pH 4,7, após 1 dia e 25°C.

Figura 57. A primeira derivada das curvas cinéticas da Figura 56.

Figura 58. Variação do TEAC, para 3'-HF, em função do tempo, em tampão $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ pH 4,7, após 1 dia e 25°C.

4.2.4. Tetrafluoroborato de 7,4'-dihidroxiavílio

Ao contrario dos íons flavílios anteriores, o 7,4'-DHF apresenta uma leve capacidade antioxidante em tampão $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ a pH 2,1, entre as concentrações de 0-5 μM de 7,4'-DHF, Figura 59.

O comportamento linear da variação da absorbância, não permitiu a aplicação da abordagem da primeira derivada; portanto, o tempo escolhido para o calculo do TEAC foi o ponto de quebre observado em pH 6,2 para esta mesma sal flavílio.

O TEAC, da medição imediata, foi de 0,081. Após 1 dia de incubação, esse valor não apresentou variação.

Figura 59. Variação da absorbância do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a 734 nm em função do tempo, a concentrações de 7,4'-HF de 0-5 μM , em tampão $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ pH 2,1 e 25°C.

Figura 60. Variação do TEAC, para 7,4'-HF, em função do tempo, em tampão $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ pH 2,1, a 25°C. Medição imediata.

A pH 6,2, em tampão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ e concentrações entre 0-5 μM , o 7,4'-DHF apresenta uma capacidade antioxidante consideravelmente maior, com um TEAC de 2,08 no ponto de quebre, principalmente pela formação da trans-chalcona, Figura 61.

Por outro lado, após 1 dia de incubação nas mesmas condições, obtém-se um valor do TEAC de 3,00.

Figura 61. Variação da absorvância do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a 734 nm em função do tempo, a concentrações entre 0-5 μM de 7,4'-DHF, em tampão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ pH 6,2, a 25°C.

Figura 62. A primeira derivada das curvas cinéticas da Figura 61.

Figura 63. Variação do TEAC, para 7,4'-DHF, em função do tempo, em tampão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ pH 6,2, a 25°C. Medição imediata.

Figura 64. Variação da absorbância do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a 734 nm em função do tempo, a concentrações entre 0-5 μM de 7,4'-DHF, em tampão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ pH 6,2, após 1 dia e 25°C.

Figura 65. Variação do TEAC, para 7,4'-DHF, em função do tempo, em tampão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ pH 6,2, após 1 dia e 25°C.

4.2.5. Perclorato de 3',4'-dihidroxiavílio

O 3',4'-DHF tem capacidade antioxidante em tampão $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ a pH 2,1, e concentrações entre 0-7 μM , Figura 66, devido só ao cátion flavílio, que é a única espécie presente neste pH.

O TEAC obtido foi de 1,11. Após 1 dia de incubação, esse valor permanece constante.

Figura 66. Variação da absorvância do radical $\text{ABTS}^{+•}$ a 734 nm em função do tempo, a concentrações de 3',4'-HF de 0-7 μM , em tampão $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ pH 2,1 e 25°C.

Figura 67. A primeira derivada das curvas cinéticas da Figura 66.

Figura 68. Variação do TEAC, para 3',4'-HF, em função do tempo, em tampão $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ pH 2,1, a 25°C. Medição imediata.

A pH 6,2, tampão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$, o poder antioxidante aumentou, obtendo-se um TEAC de 2,32, principalmente como consequência da formação da trans-chalcona. No entanto, após 1 dia de incubação, o TEAC diminuiu a 1,66. Esta diminuição deve-se à degradação das espécies, como foi mencionado anteriormente.

Figura 69. Variação da absorbância do radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ a 734 nm em função do tempo, a concentrações entre 0-5 μM de 3',4'-DHF, em tampão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ pH 6,2, a 25°C.

Figura 70. A primeira derivada da curvas cinéticas da Figura 69.

Figura 71. Variação do TEAC, para 3',4'-DHF, em função do tempo, em tampão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ pH 6,2, a 25°C. Medição imediata.

Figura 72. Variação da absorbância do radical ABTS^{•+} a 734 nm em função do tempo, a concentrações entre 0-5 μM de 3',4'-DHF, em tampão H₂PO₄⁻/HPO₄⁼ pH 6,2, após 1 dia e 25°C.

Figura 73. Variação do TEAC, para 3',4'-DHF, em função do tempo, em tampão H₂PO₄⁻/HPO₄⁼ pH 6,2, após 1 dia e 25°C.

4.2.6. Perclorato de 5,7-dihidroxi-4-metilflavílio

O 5,7-DH-4-MF apresenta uma capacidade antioxidante maior do que os cátions flavílio analisados anteriormente em tampão $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ a pH 2,1, a concentrações entre 0-5 μM , Figura 74. O TEAC obtido foi de 2,85.

Figura 74. Variação da absorvância do radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ a 734 nm em função do tempo, a concentrações de 5,7-DH-4-MF de 0-5 μM , em tampão $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ pH 2,1 e 25°C.

Figura 75. A primeira derivada das curvas cinéticas da Figura 74.

Figura 76. Variação do TEAC, para 5,7-DH-4-MF, em função do tempo, em tampão $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ pH 2,1, a 25°C. Medição imediata.

Em tampão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ pH 6,2, o poder antioxidante obtido foi de 2,70, sendo nestas condições a base quinonoidal, AH, a espécie que interage com o radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$, Figura 77.

Figura 77. Variação da absorvância do radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ a 734 nm em função do tempo, a concentrações entre 0-5 μM de 5,7-DH-4-MF, em tampão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ pH 6,2, a 25°C.

Figura 78. Variação do TEAC, para 5,7-DH-4-MF, em função do tempo, em tampão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ pH 6,2, a 25°C. Medição imediata.

De acordo com as análises anteriores, o 5,7-DH-4-MF não apresenta formação de outras espécies após 1 dia de incubação; portanto, não seria necessário realizar medidas a esse tempo. Mesmo assim, foram feitas medidas a pH 6,2 (tampão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$) após 1 dia de incubação, condições que favorecem a produção dos derivados do íon flavílio. O TEAC permaneceu constante.

Para obter uma aproximação da contribuição do grupo metílico na posição 4 e grupos hidroxila em 5 e 7 na capacidade antioxidante do cátion flavílio 5,7-DH-4-MF, foram feitas medidas com os flavílios 7-hidroxi-4-metilflavílio (7-H-4-MF) e 7-metoxi-4-metilflavílio (7-Metox-4-MF).

4.2.7. Cloreto de 7-hidroxi-4-metilflavílio (7-H-4-MF)

O 7-H-4-MF apresenta uma capacidade antioxidante em tampão $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ a pH 2,1, a concentrações entre 0-5 μM , Figura 79. O TEAC obtido foi de 1,39.

Figura 79. Variação da absorvância do radical $\text{ABTS}^{+•}$ a 734 nm em função do tempo, a concentrações de 7-H-4-MF de 0-5 μM , em tampão $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ pH 2,1 e 25°C.

Figura 80. A primeira derivada das curvas cinéticas da Figura 79.

Figura 81. Variação do TEAC, para 7-H-4-MF, em função do tempo, em tampão $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ pH 2,1, a 25°C. Medição imediata.

4.2.8. Cloreto de 7-metoxi-4-metilflavílio (7-Met-4-MF)

O 7-Met-4-MF apresenta uma capacidade antioxidante em tampão $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ a pH 2,1, a concentrações entre 0-5 μM , Figura 82. O TEAC obtido foi de 0,94.

Figura 82. Variação da absorvância do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a 734 nm em função do tempo, a concentrações de 7-Met-4-MF de 0-5 μM , em tampão $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ pH 2,1 e 25°C.

Figura 83. A primeira derivada das curvas cinéticas da Figura 82.

Figura 84. Variação do TEAC, para 7-Metox-4-MF, em função do tempo, em tampão $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ pH 2,1, a 25°C. Medição imediata.

De acordo aos resultados obtidos foram construídas as Tabelas 2 e 3, que resumem os dados da determinação da capacidade antioxidante (TEAC) dos sais de flavílio analisados.

Tabela 2. Valores do TEAC obtidos para cada Flavílio no ponto de quebre.

Flavílio	TEAC			
	imediato		1 dia de incubação	
	pH 2,1	pH 6,2	pH 2,1	pH 6,2
3'-HF	---	$0,76 \pm 0,06^*$	---	$1,16 \pm 0,05^*$
4'-HF	---	$1,71 \pm 0,05$	---	$1,66 \pm 0,06$
7,4'-DHF	$0,08 \pm 0,03$	$2,08 \pm 0,17$	$0,09 \pm 0,00$	$3,00 \pm 0,07$
3',4',DHF	$1,11 \pm 0,09$	$2,32 \pm 0,18$	$1,13 \pm 0,05$	$1,66 \pm 0,02$
5,7-DH-4-MF	$2,85 \pm 0,08$	$2,70 \pm 0,08$	---	$2,66 \pm 0,07$
7-H-4-MF	$1,39 \pm 0,08$	---	---	---
7-Met-4-MF	$0,94 \pm 0,02$	---	---	---

(*) Medida em tampão de pH 4,7.

Tabela 3. Valores do TEAC obtidos para cada Flavílio a 60 minutos.

Flavílio	TEAC			
	imediato		1 dia de incubação	
	pH 2,1	pH 6,2	pH 2,1	pH 6,2
3'-HF	---	$1,13 \pm 0,05^*$	---	$1,69 \pm 0,04^*$
4'-HF	---	$2,23 \pm 0,05$	---	$2,17 \pm 0,03$
7,4'-DHF	$0,34 \pm 0,01$	$3,57 \pm 0,05$	$0,33 \pm 0,02$	$3,08 \pm 0,05$
3',4',DHF	$1,73 \pm 0,08$	$2,45 \pm 0,20$	$1,71 \pm 0,06$	$1,64 \pm 0,04$
5,7-DH-4-MF	$3,33 \pm 0,26$	$3,03 \pm 0,04$	---	$2,63 \pm 0,10$
7-H-4-MF	$2,37 \pm 0,13$	---	---	---
7-Met-4-MF	$1,25 \pm 0,04$	---	---	---

(*) Medida em tampão de pH 4,7.

A reação entre Trolox e ABTS^{•+} mostrou que, em poucos segundos, atinge-se um valor constante de absorbância, que indica o termino da reação [59,60,74,77,80,81].

Tanto o 3'-HF como 4'-HF não apresentaram poder antioxidante em pH 2,1, mas sim em pH 4,7 (3'-HF) ou 6,2 (4'-HF), pela formação da cis-chalcona na medição imediata e da trans-chalcona após 1 dia de incubação. O poder antioxidante das chalconas é bem conhecido [59,75]. No caso do 3'-HF, o aumento do TEAC a pH 4,7 entre a medição imediata e após 1 dia tem relação com a maior concentração de trans-chalcona nesta ultima. Para 4'-HF, o valor permanece praticamente constante, mas a presença do grupo OH na posição 4' causa um

incremento na estabilização comparado com um grupo OH na posição 3', devido ao maior número de estruturas de ressonância que apresenta o radical derivado das chalconas do 4'-HF, o que explica a diferença entre os TEACs das duas espécies a pHs mais altos.

A mínima interação de 7,4'-DHF com o radical ABTS^{•+} em pH 2,1, é provocada pela formação de trans-chalcona. No entanto, para pH 6,2 o valor do TEAC aumenta de maneira considerável por a maior concentração de trans-chalcona na solução. A 1 dia de incubação ocorre o mesmo, o valor do TEAC cresce consequência da maior concentração de trans-chalcona que se produz ao transcorrer o tempo, ao igual que 3'-HF.

Ao contrário do 3'-HF e 4'-HF, o 3',4'-DHF apresenta poder antioxidante a pH 2,1, devido à estrutura tipo catecol do anel B [84]. Da mesma maneira que nos flavílios anteriores, o TEAC aumenta em pH 6,2 pela presença do trans-chalcona. A facilidade de oxidação do flavílio no anel B, pode ser explicada pela formação do radical orto-semiquinona formado, que facilita a transferência do elétron [44,75,76,78,84].

No caso do 5,7-DH-4-MF, este apresenta capacidade antioxidante, tanto em pH 2,1 como em pH 6,2. No primeiro pH, só existe o cátion flavílio; no segundo pH, como não há formação de hemiacetal ou cis- ou trans-chalcona, deve-se só à base quinonoidal. A variação entre os dois valores do TEAC é pouco significativa; portanto, não há indicação de uma grande diferença do poder antioxidante entre o cátion e a base quinonoidal. Com relação aos grupos funcionais presentes no flavílio, a atividade é produzida por um grupo resorcinol no anel A. No entanto, a experiência com o 7-Met-4-MF demonstra que não só os grupos hidroxila presentes no flavílio outorgam atividade antioxidante ao composto, senão também o grupo CH₃ na posição 4, que pode doar um átomo de hidrogênio e o radical resultante ser estabilizado por ressonância entre os anéis C e A.

A ausência e presença de poder antioxidante a pH 1,1 ou 2,1 dos flavílios analisados, também ocorre com os seus análogos as flavonas, como por exemplo, o 7-hidroxiflavona, 4'-hidroxiflavona e 7,4'-diidroxiflavona, que não apresentam atividade antioxidante a pHs menores do que o pK_a. No entanto, 5,7-diidroxiflavona e 3',4'-diidroxiflavona apresentam poder antioxidante a pHs menores do que o seu pK_a e, no caso do 3',4'-diidroxiflavona, o poder anti-oxidante é maior [78].

Os dados das capacidades antioxidantes do 5,7-DH-4-MF, 7-H-4-MF e 7-Met-4-MF sugerem valores do TEAC vinculados à posição de cada grupo funcional. Assim, para o grupo

CH₃ na posição 4, o TEAC seria 0,94; para um grupo OH na posição 7, seria 0,45; para um grupo OH na posição 5, seria 1,46. No cálculo dos valores, não foi considerado um possível efeito sinérgico sobre a capacidade antioxidante, do grupo resorcinol. Este efeito aumenta o TEAC; por exemplo, na quercetina (3',4',3,5,7-pentaidroxiflavona), o valor do TEAC é maior que a soma dos TEACs de 3',4'-diidroxiflavona e 3,5,7-triidroxiflavona [78].

Aparentemente, a oxidação está mais favorecida por substituintes no anel A que no B, devido a que o grupo tipo catecol, presente em 3',4'-DHF, tem uma capacidade antioxidante menor que o grupo tipo resorcinol do 5,7-DH-4-MF, a pH 2,1.

O comportamento não linear obtido nos gráficos de A_{734nm} vs. tempo, é explicado por estudos que reportam que os radicais ABTS^{•+} sofrem degradação em presença de polifenóis. Os produtos da reação, como por exemplo o radical semiquinona, podem dimerizar ou interagir com outro radical ABTS^{•+}, formando um aduto covalente instável, que posteriormente produz um segundo aduto que decompõe a molécula de ABTS ao qual esta ligada. Assim, da quantidade total de ABTS^{•+} que reage, só uns 30%, aproximadamente, corresponde à reação com o polifenol propriamente dito. Portanto, os 70% restantes correspondem à reação com produtos, sendo os últimos os que aumentariam, consideravelmente, o TEAC na avaliação de capacidade antioxidante total. Como consequência deste comportamento, a reação apresenta duas fases. A primeira, a fase rápida, acontece nos primeiros minutos e a segunda, a fase lenta, que se estende até finalizar a reação [58,59,61,68-70,76,79,80,83].

O inconveniente que apresentam as medidas do TEAC é justamente a contribuição dos produtos formados, que continuam interagindo com o radical ABTS^{•+}, sendo o principal problema para estudos que tentam realizar uma correlação entre a estrutura do composto e a sua capacidade antioxidante [56,61,68,70]. No entanto, a aplicação da primeira derivada para obter o ponto de quebra tenta excluir a contribuição da segunda fase ao valor do TEAC. Deste modo, obtém-se um tempo onde o TEAC deve ser medido, correspondente a cada polifenol. Comumente nos estudos de antioxidantes utiliza-se um tempo fixo, na faixa de 5-30 minutos, desconsiderando o que acontece durante a reação [58-62,65,68-71,74,78]. Como mostram os gráficos de absorvância (734 nm) vs. tempo deste trabalho, o tempo necessário para o término da reação pode ser de 1 hora ou mais, enquanto que, para atingir o ponto de quebra é entre 6 e 18 minutos para os flavílios estudados. O fato de não considerar as fases na escolha do tempo de medida explica a ampla diferença entre os valores reportados para um determinado

polifenol, por exemplo, de 3,1 a 6,4 para quercetina, além das diferenças no método [56,70]. Com Trolox, a reação é imediata e independente do tempo. Estudos da reação mostram que primeiro é formado um radical Trolox, por uma interação entre $\text{ABTS}^{+\bullet}$ e Trolox, de estequiometria 1:1. Posteriormente, o radical Trolox reage com um segundo $\text{ABTS}^{+\bullet}$, formando um aduto estável, sendo a estequiometria para a reação total 1:2 [59,77,80,83].

Para verificar a formação das espécies que continuam reagindo com $\text{ABTS}^{+\bullet}$, foi seguido o espectro UV-Vis no transcurso da reação, Figura 85 e 86, mas não foi possível observar nenhuma variação atribuível aos adutos ou produtos formados. No entanto, isso não indica ausência destes, devido ao fato que as bandas do ABTS e $\text{ABTS}^{+\bullet}$ podem estar em sobreposição com àquelas das espécies de interesse, ou que estas ultimas não apresentem absorção suficientemente distintas na faixa do comprimento de onda utilizado.

O tempo determinado para os pontos de inflexão a pH 6,2 foi menor que a pH 2,1. Em relação aos valores do TEACs calculados num tempo maior do que o ponto de quebre, Tabela 3, os valores superam os obtidos na Tabela 2, mas existe a mesma correlação entre as capacidades antioxidantes dos flavílios, com algumas diferenças. Este é o caso do 7,4'-DHF a pH 6,2, que apresenta um TEAC menor na medida após 1 dia, mas maior que 3',4'-DHF e 5,7-DH-4-MF na medida imediata, que demonstra as diferenças que ocorrem quando as medidas são feitas a diferentes tempos, obtendo resultados totalmente opostos.

Figura 85. Variação do espectro de absorção durante a reação entre $\text{ABTS}^{+\bullet}$ e 3',4'-DHF, pH 2,1 e 25°C.

Figura 86. Variação do espectro de absorção durante a reação entre $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e 5,7-DH-4-MF, pH 6,2 e 25°C.

5. CONCLUSÃO

Os cátions flavílios, a pHs perto ou maiores do que o pK, apresentam uma mistura complexa de espécies. Esta mistura pode ser simplificada findo 1 dia de incubação, onde alguns compostos são totalmente transformados em outros ou diminuem a sua concentração (bases quinonoidais, hemiacetais e cis-chalconas), enquanto outros aumentam a concentração, as vezes sendo a espécie principal na solução (frequentemente a trans-chalcona).

A falta de consenso referente ao tempo em que deve ser realizada a medida na determinação da capacidade antioxidante através do método ABTS (TEAC) resulta, muitas vezes, na sobrevaloração do poder antioxidante, consequência dos subprodutos que continuam reagindo. A aplicação da primeira derivada aos dados de absorbância (a 734 nm) obtidos durante a reação tenta identificar o tempo ótimo da medida, onde finaliza a primeira fase e começa a segunda, sendo a primeira fase produzida principalmente pela interação entre o flavílio e ABTS^{••}. Assim foi possível reduzir a participação dos subprodutos no valor do TEAC, para a posterior determinação e comparação da atividade antioxidante entre os compostos estudados.

Os cátions flavílios das espécies 3',4'-DHF e 5,7-DH-4-MF, em solução aquosa a pH 2,1 (tampão H₃PO₄/H₂PO₄⁻), apresentam poder antioxidante, devido a presença de dois grupos hidroxila no mesmo anel, sendo que aqueles que encontram-se ligados ao anel A tem maior capacidade antioxidante do que os no anel B. Por outro lado, os íons flavílio que não apresentam poder antioxidante nestas condições, ou seja, o 3'-HF, 4'-HF e 7,4'-DHF, reagem com o radical ABTS^{••} em solução aquosa a pHs maiores, pH 4,7 (tampão CH₃COOH/CH₃COO⁻) para 3'-HF e pH 6,2 (tampão H₂PO₄⁻/HPO₄⁼) para 4'-HF e 7,4'-HF, onde provavelmente as espécies responsáveis para a atividade anti-oxidante observada são a base quinonoidal, a chalcona-cis e/ou a chalcona-trans.

O poder antioxidante de um grupo tipo resorcinol no anel A é maior do que de um grupo tipo catecol no anel B, o que aparentemente indica uma maior importância do anel A e os seus substituintes hidroxila do que no anel B. Portanto, é necessário realizar mais comparações entre diferentes configurações de grupos hidroxila no anel A e B.

As medidas feitas com 7-H-4-MF e 7-Met-4-MF demonstram que não só os grupos hidroxila contribuem à capacidade antioxidante, senão também o grupo metílico na posição 4

do anel C. Por outro lado, ao considerar a atividade individual de cada grupo hidroxila, esta foi maior para o grupo OH na posição 5.

O aumento do TEAC a pHs maiores que o pK pode ser atribuído à presença da base quinonoidal, do hemiacetal, e/ou das cis- e trans-chalcona, sendo as propriedades antioxidantes destas ultimas bem conhecidas.

Finalmente, o uso do ponto de inflexão pode ser uma forma simples de excluir ou reduzir as interferências produzidas pelos subprodutos da reação, que provocam o aumento do TEAC, e assim permitir a realização de comparações entre as estruturas de compostos e sua correspondente capacidade antioxidante. No entanto, é necessário fazer estudos posteriores de especiação durante o transcurso da reação, para determinar a participação que os subprodutos podem ter na primeira fase e verificar a eficácia do uso do ponto inflexão.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Freitas, A. A., *Tese de Doutorado*, IQ-USP, 2006.
- [2]. Whitting, D., *Natural Product Reports*, 2001, 18, 583-606.
- [3]. Figueiredo, P.; Lima, J. C.; Santos, H.; Wigand, M. C.; Brouillard, R.; Maçanita, A. L.; Pina, F., *Journal of The American Chemical Society*, 1994, 116, 1249-1254.
- [4]. El Hajji, H.; Dangles, O.; Figueiredo, P.; Brouillard, R., *Helvetica Chimica Acta*, 1997, 80, 398-413.
- [5]. Pina, F., *Journal of The Chemical Society, Faraday Transactions*, 1998, 94, 2109-2116.
- [6]. Pina, F., *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 1998, 117, 51-59.
- [7]. Pina, F.; Roque, A., *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 1998, 114, 59-64.
- [8]. Costa, C. T.; Horton, D.; Margolis, S. A., *Journal of Chromatography A*, 2000, 881, 403-410.
- [9]. Melo, M. J.; Moncada, M. C.; Pina, F., *Tetrahedron Letters*, 2000, 41, 1987-1991.
- [10]. Ferreira da Silva, P.; Lima, J. C.; Freitas, A. A.; Shimizu, K.; Maçanita, A. L.; Quina, F. H., *The Journal of Physical Chemistry A*, 2005, 109, 7329-7338.
- [11]. Baranac, M. J.; Amic, D. S., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1990, 38, 2111-2115.
- [12]. Amic, D.; Baranac, J.; Vukadinovic, V., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1990, 38, 936-940.
- [13]. McClelland, R. A.; Gedge, S., *Journal of The American Chemical Society*, 1980, 102, 5838-5848.
- [14]. Lima, J. C.; Abreu, I.; Brouillard, R.; Maçanita, A. L., *Chemical Physics Letters*, 1998, 298, 189-195.
- [15]. Pina, F.; Benedito, L.; Melo, M. J.; Parola, A. J.; Bernardo, A., *Journal of The Chemical Society, Faraday Transactions*, 1996, 92, 1693-1699.
- [16]. Matsushima, R.; Mizuno, H.; Itoh, H., *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 1995, 89, 251-256.
- [17]. Matsushima, R.; Murakami, T., *Bulletin of The Chemical Society of Japan*, 2000, 73, 2215-2219.

- [18]. Furtado, P.; Figueiredo, P.; Chaves das Neves, H.; Pina, F., *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 1993, 75, 113-118.
- [19]. Moreira, P. F. Jr.; Giestas, L.; Yiwha, C.; Vautier-Gongo, C.; Quina, F. H.; Maçanita, A. L.; Lima, J. C., *The Journal of Physical Chemistry A*, 2003, 107, 4203-4210.
- [20]. Quina, F. H.; Freitas, A. A.; Maçanita, A.; Silva, P. F.; Lima, J. C., *The Spectrum*, 2006, 19, 18-23. Disponível em:
www.bgsu.edu/departments/photochem/assets/pdf/spectrum/winter2006spectrum.pdf
- [21]. Rodrigues, R. F.; Ferreira da Silva, P.; Shimizu, K.; Freitas, A. A.; Kovalenko, S. A.; Ernsting, N. P.; Quina, F. H.; Maçanita, A., *Chemistry - A European Journal*, 2009, 15, 1397-1402.
- [22]. Lima, J. C.; Vautier-Giongo, C.; Lopes, A.; Melo, E.; Quina, F. H.; Maçanita, A. L., *The Journal of Physical Chemistry A*, 2002, 106, 5851-5859.
- [23]. Vautier-Giongo, C.; Yihwa, C.; Moreira, P. F.; Lima, J. C.; Freitas, A. A.; Alves, M.; Quina, F. H.; Maçanita, A. L., *Langmuir*, 2002, 18, 10109-10115.
- [24]. Rodrigues, R.; Vautier-Giongo, C.; Silva, P. F.; Fernandes, A. C.; Cruz, R.; Maçanita, A. L.; Quina, F. H., *Langmuir*, 2006, 22, 933-940.
- [25]. Giestas, L.; Yihwa, C.; Lima, J. C.; Vautier-Giongo, C.; Lopes, A.; Maçanita, A. L.; Quina, F. H., *The Journal of Physical Chemistry A*, 2003, 107, 3263-3269.
- [26]. Brouillard, R.; Mazza, G.; Saad, Z.; Albrecht-Gary, A. M.; Cheminat, A., *Journal of The American Chemical Society*, 1989, 111, 2604-2610.
- [27]. Roque, A. L., *Tese de Doutorado*, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.
- [28]. Katritzky, A. R.; Czerney, P.; Levell, J. R.; Du, W., *European Journal of Organic Chemistry*, 1998, 2623-2629.
- [29]. McClelland, R. A.; McGall, G. H., *The Journal of Organic Chemistry*, 1982, 47, 3730-3736.
- [30]. Asen, S.; Norris, K. H.; Stewart, R. N., *Phytochemistry*, 1969, 8, 653-659.
- [31]. Moncada, M. C.; Moura, S.; Melo, M. J.; Roque, A.; Lodeiro, C.; Pina, F., *Inorganica Chimica Acta*, 2003, 356, 51-61.
- [32]. Dangles, O.; Elhabiri, M.; Brouillard, R., *Journal of The Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1994, 2, 2587-2596.
- [33]. Dimitric Markovic, J. M.; Markovic, Z. S.; Baranac, J. M.; Dasic, M. L., *Monatshefte für Chemie*, 2007, 138, 1225-1232.

- [34]. Takeda, K.; Yamashita, T.; Takahashi, A.; Timberlake, C. F., *Phytochemistry*, 1990, 29, No. 4, 1089-1091.
- [35]. Ozório, R. A., *Dissertação de Mestrado*, Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.
- [36]. Rockenbach, I. I., *Dissertação de Mestrado*, Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.
- [37]. Kuskoski, E. M.; Asuero, A. G.; García-Parrilla, M. C.; Troncoso, A. M.; Fett, R., *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2004, 24(4), 691-693.
- [38]. Mulder, W. H., *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2003, 161, 21-25.
- [39]. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yan, M.; Rice-Evans, C., *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, 26, 1231-1237.
- [40]. Kunradi Vieira, F. G.; Campelo Borges, G.; Copetti, C.; Gonzaga, L. V.; Nunes, E. C.; Fett, R., *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 2009, 59, No. 1, 101-106.
- [41]. Miller, N. J.; Sampson, J.; Candeias, L. P.; Bramley, P. M.; Rice-Evans, C. A., *FEBS Letters*, 1996, 384, 240-242.
- [42]. Chaobin, H.; Zhihua, L.; Lun, Z.; Tai-Zhung, C., *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 2001, Vol. 39, 1242-1248.
- [43]. Jefferson, A.; Wangchareontrakul, S., *Australian Journal of Chemistry*, 1985, 38, 605-614.
- [44]. Pereira, G. K.; Donate, P. M.; Galembeck, S. E., *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 1997, 392, 169-179.
- [45]. Pina, F.; Melo, M. J.; Parola, A. J.; Maestri, M.; Balzani, V., *Chemistry - A European Journal*, 1998, 4, No. 10, 2001-2007.
- [46]. Figueiredo, P.; Elhabiri, M.; Saito, N.; Brouillard, R., *Journal of The American Chemical Society*, 1996, 118, 4788-4793.
- [47]. Petrov, V.; Laia, C. A. T.; Pina, F., *Langmuir*, 2009, 25, 594-601.
- [48]. Harper, K. A.; Chandler, B. V., *Australian Journal of Chemistry*, 1967, 20, 731-744.
- [49]. Pina, F.; Lima, J. C.; Parola, A. J.; Afonso, C. A. M., *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, 43, 1525-1527.
- [50]. Jiménez, J. P., *Tesis Doctoral*, Metodología Para La Evaluación De Ingredientes Funcionales Antioxidantes – Efecto de Fibra Antioxidante de Uva en Status Antioxidantes y Parámetros de Riesgo Vascular en Humanos, Instituto del Frío (CSIC)

Departamento de Metabolismo y Nutrición, Facultad de Ciencias, Departamento de Química y Física Aplicada, Universidad Autónoma de Madrid.

- [51]. Leopoldini, M.; Rondinelli, F.; Russo, N.; Toscano, M., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58, 8862-8871.
- [52]. Renaud, S.; De Lorgeril, M., *The Lancet*, 1992, 339, 1523-1526.
- [53]. Hertog, M. G. L.; Freskens, E. J. M.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B.; Kromhout, D., *The Lancet*, 1993, 342, 1007-1011.
- [54]. Mazza, G.; Raymond Brouillard, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1987, 35, 422-426.
- [55]. Fernandez, D.; Parola, A. J.; Branco, L. C.; Afonso, C. A. M.; Pina, F., *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2004, 168, 185-189.
- [56]. Arts, M. J. T. J.; Dallinga, J. S.; Voss, H.; Haenen, G. R. M. M.; Bast, A., *Food Chemistry*, 2004, 88, 567-570.
- [57]. Zanpini, I. C.; Ordoñez, R. M.; Isla, M. I., *AAPS PharmSciTech*, 2010, vol. 11, N°3, 1159-1163.
- [58]. Osman, A. M.; Wong, K. K. Y.; Fernyhough, A., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 346, 321-329.
- [59]. Arts, M. J. T. J.; Haenen, G. R. M. M.; Voss Hans-Peter; Bast, A., *Food and Chemical Toxicology*, 2004, 42, 45-49.
- [60]. Stratil, P.; Klejdus, B.; Kúban, V., *J. Agric. Food Chemistry*, 2006, 54, 607-616.
- [61]. Arts, M. J. T. J.; Dallinga, J. S.; Voss Hans-Peter; Haenen, G. R. M. M.; Bast, A., *Food Chemistry*, 2003, 80, 409-414.
- [62]. Berg, R.; Haenen, G. R. M. M.; Berg, H.; Vijgh, W.; Bast, A., *Food Chemistry*, 2000, 70, 391-395.
- [63]. Harbone, J. B.; Williams, C. A., *Phytochemistry*, 2000, 55, 481-504.
- [64]. Cano, A.; Hernández-Ruíz, J.; García-Cánovas, F.; Acosta, M.; Arnao, M. B., *Phytochemical Analysis*, 1998, vol. 9, 196-202.
- [65]. Pasko, P.; Barton, H.; Zagrodski, P.; Gorinstein, S.; Foltá, M.; Zachwieja, Z., *Food Chemistry*, 2009, 115, 994-998.
- [66]. Siquet, C.; Paiva-Martins, F.; Lima, J. L. F. C.; Reis, S.; Borges, F., *Free Radical Research*, 2006, 40(4), 433-442.
- [67]. Young, A. J.; Lowe, G. M., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2001, vol. 385, No. 1, 20-27.

- [68]. Kuskoski, E. M.; Asuero, A. G.; Troncoso, A. M.; Mancini-Filho, J.; Fett, R., *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2005, 25(4), 726-732.
- [69]. Berg, R.; Haenen, G. R. M. M.; Berg, H.; Bast, A., *Food Chemistry*, 1999, 66, 511-517.
- [70]. Walker, R. B.; Everette, J. D., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57, 1156-1161.
- [71]. Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L.; Byrne, D. H., *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006, 19, 669-675.
- [72]. Villaño, D.; Fernández-Pachón, M. S.; Troncoso, A. M.; García-Parrilla, M. C., *Analytica Chimica Acta*, 2005, 538, 391-398.
- [73]. Henriquez, C.; Lissi, E., *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 2002, vol. 47, n. 4.
- [74]. Miller, N. J.; Rice-Evans, C. A., *Free Radical Research*, 1996, vol. 26, 195-199.
- [75]. Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J., *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2002, 13, 572-584.
- [76]. Pannala, A. S.; Chan, T. S.; O'Brien, P. J.; Rice-Evans, C. A., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 282, 1161-1168.
- [77]. Henriquez, C.; Aliaga, C.; Lissi, E., *International Journal of Chemical Kinetics*, 2002, 34, 659-665.
- [78]. Lemanska, K.; Szymusiak, H.; Tyrakowska, B.; Zielinski, R.; Soffers, A. E. M. F.; Rietjens, I. M. C. M., *Free Radical Biology & Medicine*, 2001, vol. 31, 869-881.
- [79]. Osman, A. M.; Wong, K. K. Y.; Hill, S. J.; Fernyhough, A., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 340, 597-603.
- [80]. Henriquez, C.; Aliaga, C.; Lissi, E., *Journal of the Chilean Chemical Society*, 2004, vol. 49, n. 1.
- [81]. Campos, A. M.; Lissi, E. A., *International Journal of Chemical Kinetics*, 1997, vol. 29, 219-224.
- [82]. Jovanovic, S. V.; Steenken, S.; Hara, Y.; Simic, M. G., *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1996, 11, 2497-2504.
- [83]. Arnao, M. B., *Trends in Food Science & Technology*, 2000, 11, 419-421.
- [84]. Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G., *Free Radical Biology & Medicine*, 1996, vol. 20, No. 7, 933-956.
- [85]. Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 1841-1856.

- [86]. Lee, C.; Yoon, J., *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2008, 197, 232-238.
- [87]. Harbone, J. B.; Smith, D. M., *Biochemical Systematics and Ecology*, 1978, vol. 6, 127-130.
- [88]. Pina, F.; Melo, M. J.; Laia, C. A. T.; Parola, A. J.; Lima, J. C., *Chemical Society Review*, 2012, 41, 869-908.