UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**Síntese, Caracterização e Reatividade de Antirradicais
de Dupla Função**

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

Tese apresentada ao Instituto
de Química de São Carlos-
IQSC, como parte dos
requisitos necessários para a
defesa do Doutorado.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso

Aluno: Thiago Bueno Ruiz Papa

São Carlos

2015

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1 - Tumorigênese e o papel da inflamação no desenvolvimento do câncer, adaptado de Pan e colaboradores [2]. ROS = espécies reativas de oxigênio; RNS = espécies reativas de nitrogênio; NO = óxido nítrico; PGs = prostaglandinas; ODC = ornitina descarboxilase; MMP = matriz metaloproteinase; VEGF = fator de crescimento endotelial vascular. Adaptado de Pan et al., 2010.[2]</i>	15
<i>Figura 2 - Classificação bidimensional de antioxidantes com base no mapa de doação e aceitação de elétrons [5].</i>	16
<i>Figura 3. Ilustração esquemática da localização e da distribuição da β-caroteno (a) e da astaxantina (b) em um sistema modelo de membrana, adaptado de Liang e colaboradores [12].</i>	17
<i>Figura 4 – Estruturas moleculares dos compostos reportados na Tabela 1.</i>	18
<i>Figura 5 – Estrutura molecular do carotenoide 3,3' dihidroxiisorenierateno e a correspondente quinona.....</i>	19
<i>Figura 6. Ciclo da peroxidação lipídica ilustrando os três principais caminhos de reação responsáveis pelo início do processo oxidativo em alimentos: I) reação radicalar em cadeia iniciada pela ativação de oxigênio gerando radicais hidroxila ou por radicais formados por oxidações químicas ou fotoquímicas; II) formação enzimática de lipídeos hidroperóxidos através da atividade de lipoxigenase; III) formação fotosensibilizada de lipídeos hidroperóxidos.</i>	20
<i>Figura 7 - Ciclo catalítico típico de enzimas peroxidases e da atividade de pseudoperoxidase da mioglobina.....</i>	22
<i>Figura 8 - Estrutura do éster derivado do β-apo-8'-carotenal e ácido p-cumárico.</i>	23
<i>Figura 9 - Estrutura dos ésteres derivados da astaxantina com as ácidos fenólicos p-cumárico e ferúlico.....</i>	23
<i>Figura 10 - Estrutura dos ésteres derivados do ácido retinóico com a quercetina e com a epicatequina..</i>	24
<i>Figura 11 - Espectro de ESI (-) MS do éster cumarato de β-apo-8'-carotenila.....</i>	32
<i>Figura 12 – Estruturas dos flavonóides epicatequina e quercetina com respectiva numeração dos átomos.....</i>	34
<i>Figura 13 - Espectro de ^1H RMN 600 MHz do éster DFA (c) e de seus precursores astaxantina (b) e ácido ferúlico (a) 600 MHz em DMSO-d_6 à temperatura de 25°C. A figura mostra os espectros registrados na região de interesse, entre 4 e 8 ppm.</i>	37
<i>Figura 14 - Numeração dos átomos do éster DFA adotada para a caracterização.....</i>	37
<i>Figura 15 - Espectro de massas de alta resolução com modo de ionização por eletrospray e modo de detecção positiva de íons do éster DFA.</i>	39
<i>Figura 16 - Espectro de ^1H RMN 500 MHz do éster retinoato de quercetina (c) e de seus precursores ácido retinóico (b) e quercetina (a) 500 MHz em CD_3OD à temperatura de 25°C. A figura ilustra os espectros coletados na região de interesse, entre 0 e 8 ppm.</i>	40

<i>Figura 17 - Numeração dos átomos do éster retinoato de quercetina adotada para a caracterização estrutural.</i>	40
<i>Figura 18 - Espectro de massas de alta resolução com modo de ionização por eletrospray e modo de detecção negativa de íons do éster retinoato de quercetina.</i>	42
<i>Figura 19. Espectro de ¹H RMN 500 MHz do éster retinoato de epicatequina (c) e de seus precursores ácido retinóico (b) e epicatequina (a) 500 MHz em CD₃OD à temperatura de 25°C. A figura ilustra os espectros coletados na região de interesse, entre 0 e 8 ppm.</i>	43
<i>Figura 20. Numeração dos átomos do éster retinoato de epicatequina adotada para a caracterização estrutural.</i>	43
<i>Figura 21- Espectro de massas de alta resolução com modo de ionização por eletrospray e modo de detecção negativa de íons do éster retinoato de epicatequina.</i>	45
<i>Figura 22 - Espectro de absorção do éster DFA e de seus precursores astaxantina e ácido ferúlico.</i>	46
<i>Figura 23 - Espectro de Fluorescência 298 K e 77K de (a) astaxantina e (b) DFA, $\lambda_{exc} = 280$ nm. Espectro de emissão total (Fluorescência + Fosforescência) e espectro de fosforescência de (c) astaxantina e (d) DFA, $\lambda_{exc} = 250$ nm, O gráfico inserido mostra a curva de decaimento de fosforescência à 77 K ($\lambda_{exc} = 250$ nm para ambas moléculas).</i>	48
<i>Figura 24 - Espectros eletrônicos de diferença de absorção de transientes a) do DFA e b) da astaxantina, em diferentes intervalos de tempo, $\lambda_{exc}=355$ nm, 9 mJ.</i>	50
<i>Figura 25 - Curvas de decaimento da banda do espectro eletrônico de diferença de absorção das espécies transientes do DFA em diferentes janelas temporais (a) 2 μs/div e (b) 1 ms/div, e para astaxantina em (c) 2 μs/div e (d) 1 ms / div. $\lambda_{exc} = 355$ nm; Laser = 9 mJ/cm².</i>	51
<i>Figura 26. Espectro eletrônico de absorção no UV-vis do retinoato de quercetina, e de seus precursores ácido retinóico e quercetina.</i>	52
<i>Figura 27. Espectro de fluorescência do retinoato de quercetina à 298 K e 77 K em etanol.</i>	53
<i>Figura 28. (a) Espectro de fosforescência do retinoato de quercetina à 77 K em etanol, (b) curva de decaimento de fosforescência do retinoato de quercetina a temperatura de 77 K e $\lambda_{exc} = 355$ nm.</i>	54
<i>Figura 29. Espectro eletrônico de absorção do retinoato de epicatequina, e de seus precursores ácido retinóico e epicatequina em etanol a 298 K.</i>	55
<i>Figura 30. Espectro de fluorescência do retinoato de epicatequina à 298 K e 77 K em etanol, $\lambda_{exc} = 355$ nm.</i>	56
<i>Figura 31 - Voltamogramas cíclicos do éster DFA, e de seus precursores em diclorometano, na velocidade de varredura 200 mV/s, à 25° C.</i>	58
<i>Figura 32 - Voltamogramas cíclicos do éster retinoato de quercetina, e de seus precursores em acetonitrila, na velocidade de varredura 500 mV/s, à 25° C.</i>	59
<i>Figura 33 - Voltamogramas cíclicos do éster retinoato de epicatequina, e de seus precursores em acetonitrila, na velocidade de varredura 500 mV/s, à 25° C.</i>	60
<i>Figura 34 - Gráfico de $(F/1-F) \times [POBN]_{xk_2}$ vs [antioxidante].</i>	63

Figura 35. Espectro de massas de alta resolução com modo de ionização por eletrospray e modo de detecção negativa de íons da mistura reacional contendo DFA e radical 1-hidroxietila, detalhe para o íon com $[M-H]^- = 947$.	64
Figura 36. Espectro de massas de alta resolução com modo de ionização por eletrospray e modo de detecção negativa de íons da mistura reacional contendo DFA e radical 1-hidroxietila, detalhe para o íon com $[M-H]^- = 1037$.	65
Figura 37. Espectro de massas de alta resolução com modo de ionização por eletrospray e modo de detecção negativa de íons da mistura reacional contendo DFA e radical 1-hidroxietila, detalhe para o íon com $[M-H]^- = 771$.	65
Figura 38 - Diagrama comparativo do efeito pró-oxidante, para a reação com o radical 1-hidroxietila proveniente da reação de Fenton na presença de Etanol, dos ésteres bioconjugados, comparados com seus respectivos precursores.	68
Figura 39. Curvas de decaimento do oxigênio singlete excitado em diferentes concentrações de astaxantina. Gráfico inserido de k_{obs} vs [astaxantina].	70
Figura 40. Curvas de decaimento do oxigênio singlete excitado em diferentes concentrações de diferulato de astaxantina. Gráfico inserido de k_{obs} vs [DFA].	70
Figura 41. Comparação dos gráficos de k_{obs} vs [supressor] para reação do éster DFA e da astaxantina com o oxigênio singlete excitado (1O_2).	71
Figura 42. Espectro de 1H 500 MHz da solução de $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ do éster DFA em metanol- d_4 , à temperatura de 25° C , (a) antes e (b) depois da adição de trietilamina (0,08 mmol).	73
Figura 43. Espectro eletrônico de diferença de absorção de transientes da safranina em solução aquosa ($2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) registrado em diferentes intervalos de tempo.	76
Figura 44. Espectro eletrônico de diferença de absorção de transientes da safranina em solução aquosa ($2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de quercetina ($3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes intervalos de tempo.	77
Figura 45. (a) Curva de decaimento do estado tripleto da safranina na presença de concentrações crescentes de quercetina ($0 - 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Energia do laser 8 mJ e $\lambda_{exc} = 532 \text{ nm}$. (b) Gráfico de k_{obs} (s^{-1}) versus concentração do redutor.	78
Figura 46. Espectro eletrônico de diferença de absorção de transientes da safranina em solução aquosa ($2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de retinoato de quercetina ($1,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes intervalos de tempo. Energia do laser 8 mJ e $\lambda_{exc} = 532 \text{ nm}$.	79
Figura 47. (a) Curva de decaimento do estado tripleto da safranina na presença de concentrações crescentes de retinoato de quercetina ($0 - 1,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Energia do laser = 8 mJ e $\lambda_{exc} = 532 \text{ nm}$. (b) Gráfico de k_{obs} (s^{-1}) versus concentração do redutor.	80
Figura 48. Espectro eletrônico de diferença de absorção de transientes da safranina em solução aquosa ($2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de epicatequina ($3,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes intervalos de tempo. Energia do laser 8 mJ e $\lambda_{exc} = 532 \text{ nm}$.	80

Figura 49. (a) Curva de decaimento do estado tripleto da safranina na presença de concentrações crescentes de epicatequina ($0 - 3,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Energia do laser 8 mJ e $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$. (b) Gráfico de k_{obs} (s^{-1}) versus concentração do redutor.	81
Figura 50. Espectro eletrônico de diferença de absorção de transients da safranina em solução aquosa ($2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de retinoato de epicatequina ($8,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes intervalos de tempo. Energia do laser 8 mJ e $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$	82
Figura 51. (a) Curva de decaimento do estado tripleto da safranina na presença de concentrações crescentes de retinoato de epicatequina ($0 - 8,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Energia do laser 8 mJ e $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$. (b) Gráfico de k_{obs} (s^{-1}) versus concentração do redutor.	82
Figura 52. Geometria otimizada e gráficos da superfície dos orbitais HOMO e LUMO para a molécula de diferulato de astaxantina (DFA).	84
Figura 53. Geometria otimizada e gráficos da superfície dos orbitais HOMO e LUMO para a molécula de retinoato de quercetina (RQ).	84
Figura 54. Geometria otimizada e gráficos da superfície dos orbitais HOMO e LUMO para a molécula de retinoato de epicatequina (RE).	85
Figura 55. Mapa doador-aceptor para o diferulato de astaxantina e seus precursores astaxantina e ácido ferúlico.	87
Figura 56. Mapa doador-aceptor para o retinoato de quercetina e seus precursores ácido retinóico e quercetina.	88
Figura 57. Mapa doador-aceptor para o retinoato de quercetina e seus precursores ácido retinóico e quercetina.	89
Figura 58. Mapa doador-aceptor para os compostos listados na Tabela 12.	90

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 - Valores de R_d e R_a em relação aos átomos de Na e F, constantes de velocidade de segunda ordem para reação de desativação das espécies excitadas 1O_2 e $^3Rib^*$ e potenciais de oxidação para carotenóides em comparação às vitaminas C e E.</i>	<i>18</i>
<i>Tabela 2 – Condições experimentais e rendimento global para a reação de esterificação do 8-apo-8'-carotenol com o ácido p-cumárico</i>	<i>31</i>
<i>Tabela 3 – Condições experimentais e rendimentos para a reação de desproteção da hidroxila fenólica do éster.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabela 4 - Dados de RMN para o éster DFA em DMSO-d_6 à 25 °C.</i>	<i>38</i>
<i>Tabela 5 – Dados de RMN para o éster retionato de quercetina em CD$_3$OD à 25°C.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabela 6. Dados de RMN para o éster retionato de quercetina em CD$_3$OD à 25°C.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabela 7 - Propriedades fotofísicas do éster DFA e seus precursores.....</i>	<i>47</i>
<i>Tabela 8. Propriedades fotofísicas dos ésteres retinoato de quercetina (RQ) e retinoato de epicatequina (RE) e de seus precursors ácido retinóico, quercetina e epicatequina.....</i>	<i>57</i>
<i>Tabela 9. Constantes de velocidade de segunda ordem para as reações dos compostos estudados frente ao oxigênio singlete excitado e ao radical 1-hidroxietila.</i>	<i>64</i>
<i>Tabela 10 - Constantes de velocidade de segunda ordem para as reações dos compostos estudados frente ao oxigênio singlete excitado.....</i>	<i>72</i>
<i>Tabela 11. Constantes de velocidade bimoleculares para a redução do estado triplete excitado da safranina a temperatura de 25°C.....</i>	<i>83</i>
<i>Tabela 12 - Energia de ionização (I), afinidade eletrônica (A), poder eletrodoador e poder eletroaceptor (ω^- e ω^+), e índices R_d e R_a. Adaptados de Martinez e colaboradores[5], comparados aos compostos de estudo desse trabalho.</i>	<i>86</i>

LISTA DE ESQUEMAS

<i>Esquema 1 - Reação de redução do 6-apo-8'-carotenal.....</i>	<i>30</i>
<i>Esquema 2 - Reação de proteção da hidroxila fenólica do ácido p-cumárico.</i>	<i>30</i>
<i>Esquema 3 - Rota sintética para a obtenção do éster proveniente da reação do 6-apo-8'-caroteno com o ácido p-cumárico.</i>	<i>31</i>
<i>Esquema 4 - Rota sintética para a formação dos ésteres fenólicos da astaxantina: a) TBDMSCl, Im, DMAP, DCM, t.a..b) (COCl)₂, DMF_(cat), DCM, t.a. c) Pyr DCM, t.a. d) Cs₂CO₃, DMF/H₂O, t.a.</i>	<i>33</i>
<i>Esquema 5 - Via sintética para a obtenção do éster derivado do ácido retinóico com a quercetina: a) TBDMSCl, Im, DMF, t.a., 4h. b) DCC, DMAP, DCM, t.a. c) DCM, t.a. d) Cs₂CO₃, DMF:H₂O(10:1), t.a.</i>	<i>35</i>
<i>Esquema 6 - Via sintética para a obtenção do éster derivado do ácido retinóico com a epicatequina: a) TBDMSCl, Im, DMF, t.a., 4h. b) DCC, DMAP, DCM, t.a. c) DCM, refluxo d) Cs₂CO₃, DMF:H₂O(10:1), t.a. ...</i>	<i>35</i>
<i>Esquema 7 - Formação e reações subsequentes do radical 1-hidroxietila, em destaque, de acordo com o proposto por Andersen e Skibsted^[31].....</i>	<i>61</i>
<i>Esquema 8 - Ilustração da formação do aduto radical 1-hidroxietila/4-POBN.</i>	<i>61</i>
<i>Esquema 9 - Ilustração da reação de competição entre a armadilha química 4-POBN e o ácido fenólico pelo radical 1-hidroxietila.....</i>	<i>62</i>
<i>Esquema 10 – Possíveis produtos da reação entre o éster DFA e o radical 1-hidroxietila</i>	<i>66</i>
<i>Esquema 11 - Esquema de reação propondo o efeito pró-oxidante de polifenóis contendo grupo catecol na presença de Fe(III) e peróxido.....</i>	<i>67</i>
<i>Esquema 12 - Possível equilíbrio ceto-enólico presente no éster DFA.</i>	<i>72</i>
<i>Esquema 13 - Estruturas de ressonância do ânion do éster DFA.</i>	<i>73</i>
<i>Esquema 14. Equilíbrio de protonação da safranina em função do pH do meio, onde pK e pK* são, respectivamente, os valores de pK_a nos estados fundamental e triplete da safranina [41].....</i>	<i>75</i>
<i>Esquema 15. Reações envolvidas na formação das espécies radiculares da safranina.</i>	<i>75</i>
<i>Esquema 16 – Mecanismos fotoquímicos da safranina na presença dos desativadores estudados.....</i>	<i>76</i>

SUMÁRIO

SUMÁRIO	8
RESUMO	10
ABSTRACT	11
LISTA DE ABREVIACÕES	12
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 ANTIOXIDANTES E ANTIRREDUTORES	14
1.2 OXIDAÇÃO NA FASE LIPÍDICA	19
1.3 OXIDAÇÃO NA FASE AQUOSA	21
2 OBJETIVOS	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 REAGENTES	25
3.2 EQUIPAMENTOS	25
3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	26
3.3.1 Procedimento para proteção da hidroxila do ácido ferúlico	26
3.3.2 Procedimento para a obtenção do cloreto de acila referente ao ácido ferúlico	27
3.3.3 Procedimento para a reação de esterificação da astaxantina via cloreto de acila	27
3.3.4 Procedimento para a proteção das hidroxilas fenólicas da Epicatequina	27
3.3.5 Procedimento para a proteção das hidroxilas fenólicas da quercetina	28
3.3.6 Procedimento para a esterificação da epicatequina com o ácido retinóico	28
3.3.7 Procedimento para a esterificação da quercetina com o ácido retinóico	28
3.3.8 Procedimento geral para a reação de desproteção das hidroxilas fenólicas	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 SÍNTESE DOS ÉSTERES FENÓLICOS DE CAROTENÓIDES	30
4.1.1 Síntese dos ésteres derivados do carotenoide β -apo-8'-carotenal	30
4.1.2 Síntese dos ésteres derivados da astaxantina	32
4.1.3 Síntese dos ésteres derivados do ácido retinóico com a quercetina e epicatequina	33
4.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS ÉSTERES CONJUGADOS	36
4.2.1 Caracterização estrutural do diferulato de astaxantina	36
4.2.2 Caracterização estrutural do retinoato de quercetina	39
4.2.3 Caracterização estrutural do retinoato de epicatequina	42
4.3 CARACTERIZAÇÃO FOTOFÍSICA E FOTOQUÍMICA	45
4.3.1 Diferulato de Astaxantina	45
4.3.2 – Ésteres derivados do ácido retinóico	51
4.4 PROPRIEDADES ELETROQUÍMICAS	58

4.4.1	<i>Diferulato de astaxantina</i>	58
4.4.2	<i>Retinoato de quercetina</i>	59
4.4.3	<i>Retinoato de epicatequina</i>	59
4.5	ESTUDOS DE REATIVIDADE FRENTE À ALGUMAS ESPÉCIES OXIDANTES.....	60
4.5.1	<i>Cinética de captação do radical 1-hidroxietila</i>	60
4.5.2	<i>Cinética de desativação do oxigênio singlete excitado</i>	69
4.5.3	<i>Espectros de absorção de transientes via fotólise por pulso de laser</i>	73
4.6	CÁLCULOS TEÓRICOS EMPREGANDO DFT	83
5	CONCLUSÕES	91
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
	ANEXO I	96

RESUMO

A deterioração oxidativa de alimentos é o fator determinante na qualidade sensorial e nutricional do produto, podendo ocorrer em alimentos tanto na fase contínua como na fase dispersa. Em geral, a formação de radicais e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio é o evento primário que ocorre priori ao progresso da oxidação de componentes e estruturas sensíveis e está comumente associado a eventos na fase aquosa. A oxidação de lipídeos é frequentemente investigada em alimentos e em meio biológico separadamente dos eventos no meio aquoso e a proteção antioxidante somente avaliada na fase dispersa. Entretanto, a oxidação de proteínas e eventos na fase contínua vêm despertando considerável interesse e aparentemente antioxidantes eficientes na fase dispersa não protegem de forma eficaz as proteínas e os componentes na fase contínua. Um futuro progresso na proteção antioxidante de alimentos e sistemas biológicos origina de uma abordagem holística dos processos redox envolvidos em ambas as fases dispersa e contínua, bem como o uso combinado de espécies antioxidantes e antiredutoras para um superior efeito antiradical global. Neste sentido, foram preparados três novos compostos antirradicais de dupla função (antioxidante e antiredutor) com adequado balanço hidrofílico-lipofílico e aprimorada propriedade antiradical global. Os antirradicais diferulato de astaxantina, retinoato de quercetina e retinoato de epicatequina se mostraram melhores antioxidantes e antiredutores do que seus precursores isoladamente ou em misturas, apresentando superior eficiência na desativação do oxigênio singlete excitado, captação do radical 1-hidroxietila, menor efeito pró-oxidante em sistemas de oxidação catalisados por íons de ferro, e eficiência na redução do reativo estado triplete da safranina ($E_{1/2} = 1,48 \text{ V vs. NHE}$).

ABSTRACT

The oxidative deterioration of foods is the determining factor in the sensory and nutritional quality of the product, which may occur in complex food both at the continuous and the dispersed phases. In general, the formation of radicals and reactive oxygen and nitrogen species is the primary event that occurs prior to the progress of oxidation of components and sensitive structures and is commonly associated with events in the aqueous phase. The oxidation of lipids is often investigated in food and biological media separately from the events in the aqueous phase and the measurement of the antioxidant protection is only evaluated in the dispersed phase. However, the oxidation of proteins and the events in the continuous phase have attracted considerable interest and apparently, efficient antioxidants in dispersed phase do not effectively protect proteins and components in the continuous phase. A further progress in the antioxidant protection of food and biological systems arise from a holistic approach of the redox processes involved in both the dispersed and continuous phases as well as the combined use of antioxidant and antireductant species for a superior overall antiradical effect. In this sense three new antiradical compounds with dual function (antioxidant and antireductant) were prepared with proper hydrophilic-lipophilic balance and global antiradical properties. The antiradicals astaxanthin diferulate, epicatechin retinoate, and quercetin retinoate are shown to be better antioxidant and antireductant than their precursors, isolated or in mixture, exhibiting enhanced singlet excited oxygen deactivation, 1-hydroxyethyl radical scavenging, lower pro-oxidative effect in the oxidative system catalysed by iron ions and an efficient reduction of the reactive triplet state of safranine ($E_{1/2} = 1.48$ V vs. NHE).

LISTA DE ABREVIATÖES

DFA - diferulato de astaxantina

RQ - retinoato de quercetina

RE - retinoato de epicatequina

ASTA - astaxantina

Im - imidazol

TBDMS - tertbutildimetilsilil

TBAF - fluoreto de tetrabutilamonio

λ_{abs} - comprimento de onda de absorção (máximo)

λ_F - comprimento de onda de emissão de fluorescência (máximo)

ϵ_S - coeficiente de extinção molar no estado fundamental

ϕ_F - rendimento quântico de fluorescência

ϕ_P - rendimento quântico de fosforescência

τ_P - tempo de vida de fosforescência

$\lambda_{m\acute{a}x} (T-T)$ - comprimento de onda (máximo) da transição triplete excitado-triplete

$\tau_T (T-T)$ - tempo de vida de decaimento do estado triplete excitado

E_{S1} - energia do estado singlete

E_{t1} - energia do estado triplete

1 INTRODUÇÃO

O atual aumento da competitividade nas diferentes cadeias agroindustriais, tanto no mercado doméstico quanto internacional, tem forçado produtores e indústrias a desenvolverem produtos de melhor qualidade no tocante a segurança alimentar, rastreabilidade e propriedades sensoriais. Um dos grandes desafios da indústria moderna de alimentos é o desenvolvimento de produtos que combinam conveniência com qualidade sensorial e benefício a saúde. Estes produtos são comumente processados e complexos com respeito a sua composição química. Esta complexidade faz com que sejam altamente sensíveis a deterioração oxidativa, fator determinante na aceitação do produto pelo consumidor e na qualidade nutricional. Processos oxidativos em alimentos são majoritariamente relacionados a modificações oxidativas em lipídeos insaturados, mas também envolvem proteínas, vitaminas e flavorizantes. A proteção dos alimentos frente a reações de oxidação depende de uma combinação de fatores tais como: processamento otimizado e adequado, sistema de embalagens e uso de aditivos adequados. A correta seleção do antioxidante* a ser utilizado é fator determinante na qualidade do produto e como tendência atual do mercado, antioxidantes sintéticos estão sendo continuamente substituídos por antioxidantes naturais oriundos de fontes vegetais.

O efeito antioxidante não depende somente do microambiente (distribuição entre fases e interfaces em alimentos e sistemas complexos) mas também da interação entre diversos antioxidantes e constituintes dos alimentos podendo levar a efeitos sinérgicos ou antagônicos. Assim, a adequada seleção do antioxidante ou sua combinação depende do conhecimento a nível molecular das interações com constituintes dos alimentos e do mecanismo do processo oxidativo.

*antioxidantes podem ser definidos como substâncias que quando presentes em concentrações ínfimas em relação ao substrato ou a estrutura sensível a oxidação retardam ou inibem a oxidação destes substratos e/ou estruturas sensíveis. De uma forma mais ampla, antioxidantes também podem ser definidos como substâncias que quando presentes podem atuar como sinalizadores celulares induzindo a expressão de antioxidantes endógenos ou então como compostos que quando presentes alteram o metabolismo favorecendo a produção de redutores endógenos.

1.1 Antioxidantes e antirredutores

Em relação a alimentos, os antioxidantes podem prevenir o dano oxidativo de alimentos durante as etapas de processamento, estoque e também durante o preparo de refeições. Antioxidantes podem também prover alimentos mais saudáveis em vista a baixos teores de produtos primários e secundários da oxidação de lipídeos e proteínas, bem como, quando ingeridos como parte da dieta, também exercem um efeito benéfico a saúde através da ação antioxidante no trato-gastrointestinal ou então no organismo após serem absorvidos e transportados para corrente sanguínea [1]. Portanto, em alimentos e sistemas biológicos, os antioxidantes apresentam um papel importante na neutralização de radicais e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, desta forma estendendo o tempo de prateleira do alimento e quando ingeridos prevenindo processos inflamatórios, doenças degenerativas e até o câncer. A Figura 1 ilustra a participação de espécies oxidantes reativas no desenvolvimento do processo de Tumorigênese no trato gastro-intestinal (TGI). Uma vez que as espécies reativas de oxigênio são capazes de regular a expressão de genes ativos durante a diferenciação e proliferação celular, provavelmente possam desempenhar um importante papel na fase de promoção da produção do tumor [2], Figura 1. Desta forma, apenas a quantificação da capacidade captora de radicais e atividade redutora não propiciam um regra geral sobre a avaliação final do antioxidante em experimentos de estocagem ou em experimentos de intervenção em humanos [3]. Para alimentos, este fato fica mais evidente na atualidade já que aparentemente antioxidantes que protegem lipídeos não necessariamente protegem proteínas, pelo menos em produtos cárneos [4].

Figura 1 - Tumorigênese e o papel da inflamação no desenvolvimento do câncer, adaptado de Pan e colaboradores [2]. ROS = espécies reativas de oxigênio; RNS = espécies reativas de nitrogênio; NO = óxido nítrico; PGs = prostaglandinas; ODC = ornitina descarboxilase; MMP = matriz metaloproteinase; VEGF = fator de crescimento endotelial vascular. Adaptado de Pan et al., 2010.[2]

Recentemente reportou-se [5] através de cálculos *ab initio* através da Teoria do Funcional de Densidade (DFT) um ranque bidimensional de diversos antioxidantes através de suas capacidades de doar e receber elétrons, classificando as potenciais moléculas antioxidantes (Figura 2). Através da combinação da energia de ionização vertical e a afinidade por elétrons, um índice de aceitação de elétrons, R_a , e um índice de doação de elétrons, R_d , foram definidos relativamente aos átomos de Flúor e Sódio, respectivamente (Tabela 1). Notadamente, compostos que são bons doadores de elétrons (baixo R_d) e bons aceptores de elétrons (alto R_a) são os melhores antirradicais já que eles facilmente doam ou aceitam elétrons. Compostos com propriedades opostas as acima discutidas, tais como o ácido ascórbico, são pobres captadores de radicais. Os melhores antioxidantes são os compostos com baixo R_a e alto R_d como pode ser observado como por exemplo a vitamina E.

Os índices R_a e R_d , podem então ser descritos pelas equações 1 e 2.

$$R_d = \frac{\omega_L^+}{\omega_F^+} \quad (1)$$

$$R_a = \frac{\omega_L^-}{\omega_{Na}^-} \quad (2)$$

onde ω^+ e ω^- são variáveis definidas como poder eletroceptor e eletrodoador, respectivamente. Segundo o estudo de Gazquez e colaboradores [6], essas variáveis são uma ferramenta muito útil para se estimar o poder de doação e aceitação de elétrons, com base em valores de energia de ionização (I) e afinidade eletrônica (A) da determinada molécula em investigação, assim, ω^+ e ω^- são determinados pelas equações 3 e 4.

$$\omega^+ = \frac{(I+3A)^2}{16(I-A)} \quad (3)$$

$$\omega^- = \frac{(3I+A)^2}{16(I-A)} \quad (4)$$

Os valores de energia de ionização (I) foram considerados como a diferença de energia entre o cátion e a molécula neutra, e os valores de afinidade eletrônica (A) foram expressos pela diferença de energia entre o ânion e a molécula neutra.

Figura 2 - Classificação bidimensional de antioxidantes com base no mapa de doação e aceitação de elétrons [5].

O último grupo de classificação é exemplificado pela astaxantina: alto valor de R_a e alto valor de R_d , neste caso os compostos são denominados antirredutores [5],[7],[8]. Vale ressaltar que os valores de R_a e R_d não são inversamente proporcionais e que a nova classificação se fundamenta em uma atribuição bidimensional.

A molécula de astaxantina, Figura 4, é considerada um dos redutores mais fraco entre os carotenoides e em soluções homogêneas, o mais ineficiente captador de radicais dentre os carotenoides [9]. No entanto, quando presente em um sistema heterogêneo e complexo como lipossomo e outros modelos para membranas celulares, a astaxantina mostra-se com atividade antioxidante superior aos demais carotenoides [10]. Este fato sugere que a eficiência antioxidante da astaxantina, em sistemas mais complexos como alimentos e sistemas biológicos, também depende da distribuição e orientação da espécie no interior da membrana celular ou sua localização, microdomínio, na micela. Diversos estudos [11] resumizam que a cadeia poliênica do carotenóide prefere estar localizada na região hidrofóbica da membrana, enquanto que, para os carotenoides com extremidades polares tais como a astaxantina e a zeaxantina, os grupos hidrofílicos orientam-se em duas regiões polares distintas da membrana como ilustrado na Figura 3.

Figura 3. Ilustração esquemática da localização e da distribuição da β -caroteno (a) e da astaxantina (b) em um sistema modelo de membrana, adaptado de Liang e colaboradores [12].

Tabela 1 - Valores de R_d e R_a em relação aos átomos de Na e F, constantes de velocidade de segunda ordem para reação de desativação das espécies excitadas 1O_2 e $^3Rib^*$ e potenciais de oxidação para carotenóides em comparação às vitaminas C e E.

	R_d	R_a	1O_2 ($L\ mol^{-1}\ s^{-1}$) ^{[13]*}	$^3Rib^*$ ($L\ mol^{-1}\ s^{-1}$) ^[14]	E° (V vs. NHE)
Na	1,00	0,18	-	-	-
F	3,99	1,00	-	-	-
β -caroteno	1,40	0,46	$4,6\ 10^9$	-	0,84
Astaxantina	2,10	0,94	$9,9\ 10^9$	-	0,97
Vitamina E	0,31	0,15	$2,7\ 10^7$	$(2,6\pm 0,3)\ 10^9$	0,80
Vitamina C	1,29	0,11	$1,2\ 10^8$	$(2,0\pm 0,3)\ 10^9$	0,22
Vitamina A	1,17	0,20	$3,1\ 10^9$	-	-

*experimentos realizados em clorofórmio

De acordo com os dados apresentados na Tabela 1 é possível observar que as constantes de velocidade de segunda ordem para a desativação do oxigênio singlete excitado por carotenoides é, no mínimo, uma ordem de grandeza superior às constantes de velocidade específica para a desativação pelas vitaminas C e E. As vitaminas C e E possuem potenciais de oxidação consideravelmente menores que o reportado para carotenóides, ou seja, são considerados melhores antioxidantes. No entanto, considerando os valores de R_a e R_d pode-se chegar à conclusão de que compostos com alta afinidade por elétrons, ou seja bons antirredutores, tal como a astaxantina, também são eficientes antirradicais, mesmo apresentando potenciais de oxidação ligeiramente elevados. As estruturas moleculares dos compostos reportados na Tabela 1 são reportadas na Figura 4.

Figura 4 – Estruturas moleculares dos compostos reportados na Tabela 1.

Um estudo recente envolvendo o carotenoide 3,3' dihidroxiisorenierateno (DHIR), Figura 5, reforça a proposta de obter-se antioxidantes/antirradical de melhor eficiência pela conjugação entre o carotenoide e o composto fenólico em sua estrutura molecular [15].

Figura 5 – Estrutura molecular do carotenoide 3,3' dihidroxiisorenierateno e a correspondente quinona

No trabalho reportado por Martin et al. 2009 [15], o carotenóide DHIR exibiu desempenho antioxidante superior aos demais carotenóides investigados (luteína, zeaxantina e astaxantina) em ensaios como por exemplo o de inibição da peroxidação lipídica induzida por cumeno hidroperóxido e a redução do cátion radical ABTS, apresentado um comportamento bifuncional, isto é, com ambas características de carotenoide e composto fenólico. A superior atividade antioxidante desse composto pode ser atribuída a formação da correspondente quinona, Figura 5, que mesmo após a oxidação das duas extremidades fenólicas mantém intacto o sistema poliênico do carotenóide o qual apresenta atividade como antioxidante. Neste mesmo trabalho, o carotenóide DHIR apresentou constante velocidade bimolecular para desativação do oxigênio singlete excitado de $9,7 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, isto é, comparável com o valor típico reportado na literatura para carotenóides.

1.2 Oxidação na fase lipídica

A oxidação de lipídeos é caracteristicamente iniciada pela exposição à radiação luminosa na presença de sensibilizadores, por catálise enzimática ou então por catálise mediada por metais de transição. A Figura 6 ilustra as três principais vias de reação envolvidas na oxidação lipídica em alimentos e detalhadamente descritas abaixo:

- i) Ativação do oxigênio molecular através de catálise por metais de transição,

incluindo ativação por enzimas oxireductases gerando radical hidroxila e subsequentemente abstraindo hidrogênio alílico ou bis-alílico de um lipídeo insaturado (LH). Outros radicais tais como o radical $\bullet\text{OCl}$ formado a partir de desinfetantes (exemplo íon hipoclorito) ou gerado pela atividade da mieloperoxidase podem também iniciar a reação em cadeia através da formação de radicais lipídicos centrados no carbono ($\bullet\text{L}$), os quais prontamente reagem com oxigênio molecular;

ii) Lipoxigenases incorporando oxigênio em lipídeos insaturados e produzindo hidroperóxidos, espécies próoxidantes, como o que ocorre tipicamente em carne de frango e em tecidos vegetais;

iii) Oxidação fotosensibilizada por flavinas, gerando oxigênio singlete excitado (Tipo II) que atua como eletrófilo e ciclo adiciona-se a dupla ligação do lipídeo insaturado formando hidroperóxidos. Em adição a oxidação fotosensibilizada mediada por oxigênio singlete excitado (Tipo II), o estado tripleto excitado do fotosensibilizador pode agir como forte oxidante abstraindo átomo de hidrogênio ou abstração de elétrons seguindo de deprotonação do radical cátion do lipídeo (Tipo I) formando radicais alquila que podem iniciar a reação em cadeia como exemplificado no caso da catalise mediada por metais de transição.

Figura 6. Ciclo da peroxidação lipídica ilustrando os três principais caminhos de reação responsáveis pelo início do processo oxidativo em alimentos: I) reação radicalar em cadeia iniciada pela ativação de oxigênio gerando radicais hidroxila ou por radicais formados por oxidações químicas ou fotoquímicas; II) formação enzimática de lipídeos hidroperóxidos através da atividade de lipoxigenase; III) formação fotosensibilizada de lipídeos hidroperóxidos.

1.3 Oxidação na fase aquosa

Apesar da oxidação lipídica ser considerada o principal agente da deterioração da qualidade de diversos alimentos tais como óleos comestíveis, carnes, leite e produtos lácteos, estes alimentos também apresentam uma fase aquosa que exhibe enzimas oxidoreductase ativas e íons de metais de transição presentes em conjunto com peróxidos, hidroperóxidos e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. No caso de produtos lácteos fermentados, tais como “butter-milk” [16], reporta-se que o teor de antioxidantes lipofílicos não diminuiu com o tempo de armazenamento, enquanto que a capacidade antioxidante na fase aquosa diminuiu significativamente com o concomitante aumento dos teores de hexanal e lipídeos hidroperóxidos. Esta observação sugere que a formação de radicais como evento primário no processo de oxidação lipídica ocorre na fase aquosa e independente do grau e teor de lipídeos insaturados no meio disperso. No caso de produtos cárneos, a oxidação lipídica aparenta também ser iniciada na fase aquosa [4]. As espécies hipervalentes de mioglobina ($MbFe(V)=O$; $MbFe(IV)=O^{+\bullet}$) são moderados catalisadores da oxidação lipídica, no entanto, seus estados de oxidação hipervalentes podem iniciar o processo

de oxidação lipídica pela direta abstração de hidrogênio alílico de lipídeos ou então clivar lipídeos hidroperóxidos gerando radicais alcóxila ($\text{MbFe(IV)=O} + \text{LOOH} \rightarrow \text{MbFe(III)} + \text{LO}^\bullet + \text{OH}^-$), como ilustrado no esquema da Figura 6. Estudos [17] reportaram que a mioglobina parcialmente proteolizada apresenta um aumento significativo na atividade catalítica na oxidação de lipídeos em meio heterogêneo, e a degradação hidrolítica do pigmento heme-Fe durante o processo de digestão pode da mesma forma iniciar um processo oxidativo danoso no trato digestivo promovendo o processo de tumorgênese (Figura 1).

Figura 7 - Ciclo catalítico típico de enzimas peroxidases e da atividade de pseudoperoxidase da mioglobina.

Desta forma, fica patente que em adição a capacidade de captação de radicais, redutora e antirredutora de um antioxidante, a sua polaridade e a interação espacial com a fase lipídica dispersa passam a ser de relevância para a atividade antioxidante durante a oxidação lipídica e de proteínas em meio heterogêneo tanto em alimentos como em sistemas biológicos.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como principal objetivo a modelagem, síntese e caracterização, e a avaliação da reatividade de novos derivados conjugados de carotenóides e compostos fenólicos frente a espécies oxidantes.

Objetivos específicos:

1) Síntese, caracterização, e reatividade de ésteres derivados do β -apo-8'-carotenal com ácidos fenólicos, Figura 8.

Figura 8 - Estrutura do éster derivado do β -apo-8'-carotenal e ácido p-cumárico.

2) Síntese, caracterização, e reatividade de ésteres derivados da astaxantina com ácidos fenólicos, Figura 9.

Figura 9 - Estrutura dos ésteres derivados da astaxantina com as ácidos fenólicos p-cumárico e ferúlico.

3) Síntese, caracterização, e reatividade de ésteres derivados do ácido retinóico com quercetina e epicatequina, Figura 10.

Figura 10 - Estrutura dos ésteres derivados do ácido retinóico com a quercetina e com a epicatequina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Etanol, diclorometano, piridina, hexano, acetato de etila, N,N-dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano (THF), todos de grau HPLC foram obtidos da J.T. Baker. cloreto férrico (97%) e peróxido de hidrogênio (30%) foi obtido da Merck. α -(4-piridil-1-oxido)-N-tertbutil-nirona (99%) (4-POBN), cloreto de tert-butil-dimetil silil 95% (TBDMSCl), imidazol (99%), 4-dimetil-aminopiridina 99% (DMAP), trietilamina (99%), trifenilfosfina (99%), cloroformato de etila (99%), cloroformato de tert-butila (99%), cloreto de pivaloila (99%), ciclohexilcarboxidiimida (DCC) (99%), diisopropilazodicarboxilato (DIAD) (99%) cloreto de oxalila (99%), carbonato de cério (99%), sulfato de sódio (99%), cloreto de amônio (99%), ácido ferúlico (99%), ácido p-cumárico (99%), quercetina (98%), epicatequina (90%) foram obtidos da Sigma-Aldrich. β -apo-8'-carotenal foi obtido da Fluka. Astaxantina (99%) foi obtida da Alexis Chemicals. Todos os solventes deuterados foram obtidos da Sigma-Aldrich. A água foi obtida através de um sistema de osmose reversa acoplado a um sistema de deionização Milli-Q da Millipore Co.

3.2 Equipamentos

A caracterização dos ésteres sintetizados procedeu utilizando um espectrômetro Bruker Avance III de 14,1 Tesla (600,21 MHz para a frequência do hidrogênio), localizado no Laboratório de RMN do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

Os espectros de massas de alta resolução foram feitos empregando um espectrômetro de massas de alta resolução utilizando um sistema de LTQ-Orbitrap Thermo Fischer com interface de ionização por electrospray.

Os espectros eletrônicos de absorção foram obtidos utilizando um espectrofotômetro Hitachi modelo U3501.

Os espectros de emissão foram obtidos utilizando um espectrofluorímetro Hitachi modelo F-4500.

Os experimentos de absorção eletrônica de transientes foram realizados com o modelo LFP-112 nanosecond laser flash photolysis da Luzchem. O terceiro harmônico de um laser pulsado de Nd-YAG da Quantel, em 355nm, atenuado a 14 mJ/cm², com pulsos de 8 ns de duração.

As voltametrias cíclicas foram feitas utilizando um potenciostato EG&G PAR (Princeton Applied Research), modelo 264.

Os experimentos cinéticos envolvendo o radical 1-hidroxietila foram feitos utilizando um espectrômetro de massas de múltiplo estágio do tipo “*ion-trap*” Bruker modelo Esquire 4K com interface de eletrospray sendo feita infusão direta com fluxo de 150 µL/s, condições de nebulização: pressão de 40 psi; fluxo do gás (N₂) 9 L.min⁻¹; temperatura de desolvatação 365°C; voltagem do capilar 3500 V; modo de detecção de íons negativo; ou um espectrômetro de ressonância paramagnética de elétrons (EPR), utilizando um equipamento Bruker modelo EMX PLUS, operando na banda-X. Frequência de micro-ondas; ~9,76 GHz; potência de micro-ondas 1 mW; amplitude de modulação: 1 G, segundo método descrito na literatura [18].

Os experimentos cinéticos envolvendo o oxigênio singlete excitado utilizaram como fonte de excitação um laser pulsado de Nd-YAG Continuum Surelite III operando no segundo harmônico (532 nm) com largura de pulso de 5 ns e frequência de repetição de 10 Hz. A radiação emitida em 1270 nm, referente a emissão de fosforescência oxigênio singlete excitado, foi detectada à ângulos retos por uma fotomultiplicadora de MCT Hamamatsu R5509 resfriada à nitrogênio líquido.

3.3 Procedimentos experimentais

3.3.1 Procedimento para proteção da hidroxila do ácido ferúlico

A proteção foi feita adicionado TBDMSCl (1,70 g; 11,3 mmol), Imidazol (0,77 g; 11,3 mmol) e DMAP (0,094 g; 0,77 mmol) à uma solução de ácido fenólico (0,77 g; 11,3 mmol) em 5 mL de CH₂Cl₂ sob contínua agitação. A reação foi acompanhada até o término por TLC. Em seguida a mistura foi lavada 3 vezes com solução saturada de NH₄Cl, sendo adicionado Na₂SO₄ à fase orgânica, que em seguida foi filtrada e evaporada até a secura. O ácido ferúlico protegido foi obtido após purificação em

coluna de sílica gel, utilizando-se como eluente a mistura acetato de etila:hexano (2:3 v/v).

3.3.2 *Procedimento para a obtenção do cloreto de acila referente ao ácido ferúlico*

O cloreto de ácido foi produzido adicionando-se cloreto de oxalila (0,16 g; 1,3 mmol) e 10 μ L de DMF à uma solução de ácido ferúlico protegido com TBDMS (0,233 g; 0,84 mmol) em 5 mL de CH_2Cl_2 seco a 0 °C, sob atmosfera de argônio e agitação contínua. Após 2 h de agitação à temperatura ambiente, o excesso de cloreto de oxalila foi removido à baixa pressão, sendo o resíduo obtido o cloreto de acila desejado.

3.3.3 *Procedimento para a reação de esterificação da astaxantina via cloreto de acila*

Para a reação de esterificação uma solução de astaxantina (0,050 g; 0,084 mmol) e 250 μ L de piridina em 2 mL de CH_2Cl_2 foi adicionada lentamente à uma solução contendo o cloreto de ácido ferúlico protegido com TBDMS (0,274 g; 0,84 mmol) a 0° C, sob atmosfera de argônio. A reação permaneceu sob agitação por 12 horas. Em seguida a mistura foi lavada 3 vezes com solução saturada de NH_4Cl . Foi adicionado Na_2SO_4 à fase orgânica, que então foi filtrada e evaporada até a secura. O resíduo obtido contém o éster desejado com as hidroxilas fenólicas protegidas, o qual foi posteriormente submetido à reação de desproteção.

3.3.4 *Procedimento para a proteção das hidroxilas fenólicas da Epicatequina*

A proteção das hidroxilas fenólicas da epicatequina procedeu como descrito na literatura [19], sendo adicionado TBDMSCl (2,59 g; 17,25 mmol), imidazol (2,42 g, 35,53 mmol) à uma solução de epicatequina (1,00 g; 3,45 mmol) em 5 mL de DMF. A reação foi conduzida por 4 horas à temperatura ambiente. Em seguida a mistura foi dissolvida em acetato de etila e lavada 3 vezes com água. Foi adicionado Na_2SO_4 à fase orgânica, a qual foi então filtrada e evaporada até a secura. O resíduo foi purificado em coluna de sílica-gel, utilizando como eluente a mistura acetato de etila:hexano na proporção 1:10 v/v.

3.3.5 Procedimento para a proteção das hidroxilas fenólicas da quercetina

A proteção das hidroxilas fenólicas da quercetina procedeu-se como para a reação da epicatequina, necessitando de algumas adaptações, já que nesse caso foram protegidas 3 hidroxilas fenólicas e não 4. Adicionou-se TBDMSCI (1,99 g, 13,2 mmol), imidazol (1,84 g; 27,1 mmol) à uma solução de quercetina (1,0 g; 3,3 mmol) em 5 mL de DMF. A reação foi conduzida por 4 horas à temperatura ambiente. Em seguida a mistura foi dissolvida em Acetato de etila e lavada 3 vezes com água. Foi adicionado Na_2SO_4 à fase orgânica, a qual foi então filtrada e evaporada até a secura. O resíduo foi purificado em coluna de sílica-gel, utilizando como eluente a mistura acetato de etila:hexano na proporção 1:10 v/v.

3.3.6 Procedimento para a esterificação da epicatequina com o ácido retinóico

Uma solução de ácido retinóico (0,30 g; 0,10 mmol), DCC (0,10 g; 0,05 mmol) e DMAP (0,02 g; 0,015 mmol) em CH_2Cl_2 foi adicionada à uma solução contendo (0,37 g; 0,050 mmol) de epicatequina (protegida com TBDMS) em meio de CH_2Cl_2 . A mistura permaneceu sob refluxo até o término da reação, que foi acompanhada por TLC. Em seguida a mistura foi lavada 3 vezes com solução saturada de NaCl. Foi adicionado Na_2SO_4 à fase orgânica, que em seguida foi filtrada e evaporada até secura. O resíduo continha o éster derivado do retinóico e da epicatequina (protegida com TBDMS), o qual foi submetido a reação de desproteção empregando-se carbonato de cézio (seção 3.3.8).

3.3.7 Procedimento para a esterificação da quercetina com o ácido retinóico

Uma solução de ácido retinóico (0,30 g; 0,10 mmol), DCC (0,10 g; 0,05 mmol) e DMAP (0,02 g; 0,015 mmol) em CH_2Cl_2 foi adicionada à uma solução contendo (0,32 g, 0,05 mmol) de epicatequina (protegida com TBDMS) em meio de CH_2Cl_2 . A mistura permaneceu em temperatura ambiente até o término da reação, que foi acompanhada por TLC. Em seguida a mistura reacional foi lavada 3 vezes com solução saturada de NaCl. Foi adicionado Na_2SO_4 à fase orgânica, que em seguida foi filtrada e evaporada até secura. O resíduo continha o éster derivado do retinóico e da epicatequina

(protegida com TBDMS) o qual foi submetido a reação de desproteção empregando-se carbonato de cério (seção 3.3.8).

3.3.8 Procedimento geral para a reação de desproteção das hidroxilas fenólicas

O resíduo contendo o éster com as hidroxilas fenólicas protegidas foi dissolvido em uma solução de DMF:H₂O 10:1 v/v e a reação de desproteção da hidroxila fenólica efetuada utilizando-se excesso de 10 vezes de Cs₂CO₃ por hidroxila. A reação foi acompanhada por TLC e após o término a mistura foi dissolvida em acetato de etila e lavada 3 vezes com água. Foi adicionado Na₂SO₄ à fase orgânica, que foi então foi evaporada até a secura. O resíduo foi purificado por meio de TLC preparativo utilizando-se como eluente a mistura acetato de etila:hexano 2:3 v/v para o éster derivado da astaxantina com ácido ferúlico e a mistura MeOH:CH₂Cl₂ 1:9 v/v para os ésteres derivados do ácido retinóico com a epicatequina e a quercetina.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese dos ésteres fenólicos de carotenóides

4.1.1 Síntese dos ésteres derivados do carotenoide β -apo-8'-carotenal

Em um primeiro momento procurou-se obter a síntese dos ésteres derivados do carotenóide β -apo-8'-carotenal com ácidos fenólicos, ferúlico e p-cumárico. A etapa inicial foi conduzida com a síntese do respectivo álcool [20], β -apo-8'-carotenol, que foi obtido com rendimento quantitativo utilizando-se como redutor o borohidreto de sódio (Esquema 1).

Esquema 1 - Reação de redução do β -apo-8'-carotenal.

No intuito de impedir o processo de interesterificação entre moléculas do ácido p-cumárico, efetuou-se a proteção da hidroxila fenólica do ácido p-cumárico com o grupo protetor tert-butil-dimetil silil (TBDMS) [21]. Obteve-se para esta etapa de proteção um rendimento global de 65% (Esquema 2).

Esquema 2 - Reação de proteção da hidroxila fenólica do ácido p-cumárico.

Após a proteção da hidroxila fenólica do ácido p-cumárico, iniciamos o estudo metodológico para a obtenção do respectivo éster derivado. A Tabela 2 apresenta as diferentes condições experimentais para as quais a esterificação dos ácidos fenólicos com o β -apo-8'-carotenol foram realizadas na tentativa de se obter os ésteres conjugados, sendo o primeiro ácido fenólico investigado o ácido p-cumárico.

Tabela 2 – Condições experimentais e rendimento global para a reação de esterificação do β -apo-8'-carotenol com o ácido p-cumárico

Método de ativação	Condições reacionais	Rendimento (%)
Anidrido misto	ClCO_2Et , TEA, DMAP, THF, t.a.; carotenol	-
Anidrido misto	$\text{ClCO}_2\text{t-bu}$, TEA, DMAP, THF, t.a.; carotenol	-
Anidrido misto	Piv-Cl, TEA, DMAP, THF, t.a.; carotenol	-
Steglich	DCC, DMAP, CH_2Cl_2 , t.a.; carotenol	-
Mistunobu	TFF, DIAD, CH_2Cl_2 , t.a.; carotenol	-
Cloreto de acila	$(\text{COCl})_2$, DMF_{cat} ; carotenol	70%

t.a. = temperatura ambiente

Como é possível observar pela leitura da Tabela 2, só é observado sucesso para a reação de esterificação empregando-se a rota de síntese via cloreto de acila. Desta forma o cloreto de oxalila promoveu a formação do cloreto do ácido p-cumárico, que em seguida na presença do β -apo-8'-carotenol originou a formação do éster p-cumarato de β -apo-8'-carotenila contendo as hidroxilas fenólicas devidamente protegidas. O rendimento global obtido nesta etapa é de 70% (Esquema 3).

Esquema 3 - Rota sintética para a obtenção do éster proveniente da reação do β -apo-8'-caroteno com o ácido p-cumárico.

A reação de desproteção da hidroxila fenólica foi investigada utilizando-se os procedimentos apresentados na Tabela 3. Apenas o processo empregando o

carbonato de cério [22] (Cs_2CO_3) resultou na remoção do grupo de proteção sem promoção de reações paralelas e com rendimento superior a 95%.

Tabela 3 – Condições experimentais e rendimentos para a reação de desproteção da hidroxila fenólica do éster.

Regente	Condições	Rendimento
TBAF	THF, -10°C	-
Ácido 10-canforsulfônico	MeOH:DCM (1:1), t.a.	-
Cs_2CO_3	DMF:H ₂ O (10:1)	95%

t.a. = temperatura ambiente

O éster preparado foi inicialmente caracterizado por espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS), porém, o produto final se mostrou instável degradando facilmente mesmo quando armazenado em atmosfera de argônio à -18°C . Observa-se na Figura 11 o íon pseudo-molecular, $[\text{M}-\text{H}]^-$ do éster correspondente com $m/z = 563,1$ (calculado para $\text{C}_{39}\text{H}_{47}\text{O}_3$).

Figura 11 - Espectro de ESI (-) MS do éster cumarato de β -apo-8'-carotenila.

Como consequência da instabilidade dos ésteres provenientes da reação do ácido p-cumárico com o β -apo-8'-carotenol, deu-se início à síntese dos ésteres dos ácidos fenólicos com a astaxantina.

4.1.2 Síntese dos ésteres derivados da astaxantina

Seguindo a mesma estratégia sintética na qual foi obtido sucesso anteriormente para a obtenção do cumarato de β -apo-8'-carotenila (Esquema 4), os ácidos p-cumárico e ferúlico foram utilizados para a reação de esterificação da astaxantina, sendo alcançado um rendimento global de 80% para as reações de

esterificação/desproteção, obtendo-se os alvos diferulato de astaxantina (DFA) e dicumarato de astaxantina (DCA). Semelhantemente ao éster derivado do β -apo-8'-carotenol, o dicumarato de astaxantina apresentou-se instável impossibilitando a obtenção do mesmo isoladamente dos seus produtos de degradação.

Esquema 4 - Rota sintética para a formação dos ésteres fenólicos da astaxantina: a) TBDMSCl, Im, DMAP, DCM, t.a..b) $(\text{COCl})_2$, $\text{DMF}_{(\text{cat})}$, DCM, t.a. c)Pyr DCM, t.a. d) Cs_2CO_3 , $\text{DMF}/\text{H}_2\text{O}$, t.a.

4.1.3 Síntese dos ésteres derivados do ácido retinóico com a quercetina e epicatequina

A estratégia para a síntese dos ésteres derivados do ácido retinóico com os flavonóides procedeu objetivando-se a manutenção do grupo catecol (hidroxila livre nas posições 3' e 4', Figura 12). A função catecol é a principal responsável pela alta eficiência antioxidante para ambos flavonóides, no produto final, portanto a ligação éster foi orientada na hidroxila adjacente ao carbono com numeração 3 desses flavonoides (Figura 12).

Figura 12 – Estruturas dos flavonóides epicatequina e quercetina com respectiva numeração dos átomos.

A proteção das hidroxilas fenólicas da epicatequina foi obtida com um rendimento de 60% utilizando TBDMS, de acordo com o procedimento reportado por Cruz e colaboradores [19], Esquema 6. Para a proteção das hidroxilas fenólicas da quercetina adotou-se a mesma estratégia reacional, porém com algumas adaptações, já que a hidroxila adjacente ao carbono 5 é menos reativa que a hidroxila adjacente ao carbono 3, sendo então descartada a possibilidade de proteção da mesma, Esquema 5. Neste caso, o procedimento de proteção alcançou um rendimento de 45%. Vale ressaltar que o procedimento comumente empregado para a síntese de ésteres derivados da quercetina é a proteção de todas as hidroxilas fenólicas do derivado rutina, que se trata da molécula de quercetina glicosilada na hidroxila adjacente ao carbono 3, seguida de hidrólise do glicosídeo para então se prosseguir com a etapa de esterificação [23]. O procedimento empregado neste trabalho apresenta um rendimento relativamente menor ao reportado na literatura, proteção da rutina seguido de hidrólise, porém diminuiu-se uma etapa no procedimento, além de que o reagente de partida, a quercetina, é menos dispendioso do que a rutina.

As reações de esterificação da epicatequina e da quercetina com o ácido retinóico foram efetuadas utilizando as condições de Steglich, sendo que a reação envolvendo a epicatequina foi executada empregando-se condição de refluxo enquanto a esterificação da quercetina ocorreu à temperatura ambiente. A desproteção das hidroxilas fenólicas ocorreu empregando Cs_2CO_3 em solução de DMF:H₂O 10:1 v/v [22]. Os rendimentos globais (esterificação/desproteção) foram de 70% para a reação com a quercetina e de 50% para a reação com a epicatequina. As

rotas sintéticas para obtenção dos ésteres derivados do ácido retinóico com os flavonóides encontram-se ilustradas nos Esquemas 5 e 6.

Esquema 5 - Via sintética para a obtenção do éster derivado do ácido retinóico com a quercetina: a) TBDMSCl, Im, DMF, t.a., 4h. b) DCC, DMAP, DCM, t.a. c) DCM, t.a. d) Cs_2CO_3 , DMF:H₂O(10:1), t.a.

Esquema 6 - Via sintética para a obtenção do éster derivado do ácido retinóico com a epicatequina: a) TBDMSCl, Im, DMF, t.a., 4h. b) DCC, DMAP, DCM, t.a. c) DCM, refluxo d) Cs_2CO_3 , DMF:H₂O(10:1), t.a.

O menor rendimento da reação de esterificação da epicatequina, se comparado com a esterificação da quercetina, pode ser atribuído ao emprego da condição de refluxo, o qual pode ter levado a uma parcial degradação dos precursores no meio reacional. A menor reatividade da epicatequina também pode ser justificada pelo fato da hidroxila adjacente ao carbono 3 ser mais impedida estericamente se comparada com a hidroxila análoga na molécula de quercetina.

4.2 Caracterização estrutural dos ésteres conjugados

Os ésteres conjugados foram caracterizados por ressonância magnética nuclear com experimentos 1D e 2D de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC, bem como por espectroscopia de massas de alta resolução com ionização por electrospray.

Os espectros de ressonância magnética nuclear para todos os compostos sintetizados encontram-se de maneira detalhada no Anexo I.

4.2.1 Caracterização estrutural do diferulato de astaxantina

Os espectros de ^1H RMN, do éster DFA e seus precursores em $\text{DMSO-}d_6$ encontram-se na Figura 13. Através da análise do espectro, é possível observar um deslocamento nos sinais do éster conjugado, em comparação com os precursores, o qual pode ser atribuído a um possível aumento da conjugação e consequentemente maior deslocalização da densidade eletrônica na molécula de DFA. É também nítido, o desaparecimento do dubleto em 5,03 ppm referente ao hidrogênio da hidroxila (3-OH) da astaxantina, consequência da formação do éster, bem como a mudança do duplo duplo dubleto em 4,20 ppm referente ao hidrogênio ligado ao carbono 3 da astaxantina, para o duplo dubleto em 5,56 ppm sendo que tanto a mudança de multiplicidade do sinal quanto o deslocamento corroboram com o esperado para a formação de uma ligação éster.

Também é possível observar através da análise do espectro de HSQC o acoplamento entre o carbono $\text{C}_{3,3'}$ e o carbonos $\text{C}_{1'',1'''}$.

Figura 13 - Espectro de ^1H RMN 600 MHz do éster DFA (c) e de seus precursores astaxantina (b) e ácido ferúlico (a) 600 MHz em $\text{DMSO-}d_6$ à temperatura de 25°C . A figura mostra os espectros registrados na região de interesse, entre 4 e 8 ppm.

A Tabela 4 sumariza os dados espectroscópicos, RMN, coletados para elucidação total da estrutura do éster DFA, de acordo com a numeração da Figura 14.

Figura 14 - Numeração dos átomos do éster DFA adotada para a caracterização.

Tabela 4 - Dados de RMN para o éster DFA em DMSO-*d*₆ à 25 °C.

Posição	¹³ C (δ)	¹ H δ, multiplicidade, (J em Hz)	COSY	HSQC	HMBC
1, 1'	36,7	-	-	C _{1, 1'}	-
2, 2' _{eq} 2, 2' _{ax}	42,1	2,04-2,14 m	H _{3, 3'}	C _{2, 2'}	C _{1, 1'} , C _{3, 3'} , C _{4, 4'} , C _{6, 6'} , C _{16, 16'}
3, 3'	70,4	5,56 dd (12,9; 6,3)	H _{2, 2'}	C _{3, 3'}	C _{1, 1'} , C _{2, 2'} , C _{1'', 1'''} , C _{4, 4'}
4, 4'	193,6	-	-	C _{4, 4'}	-
5, 5'	127,0	-	-	C _{5, 5'}	-
6, 6'	160,5	-	-	C _{6, 6'}	-
7, 7'	123,4	6,32 d (16,3)	H _{8, 8'}	C _{7, 7'}	C _{1, 1'} , C _{5, 5'} , C _{8, 8'} , C _{9, 9'} , C _{10, 10'}
8, 8'	141,8	6,57 d (16,3)	H _{7, 7'}	C _{8, 8'}	C _{6, 6'} , C _{9, 9'} , C _{10, 10'} , C _{19, 19'}
9, 9'	135,0	-	-	C _{9, 9'}	-
10, 10'	134,8	6,46 d (11,8)	H _{11, 11'}	C _{10, 10'}	C _{8, 8'} , C _{12, 12'} , C _{19, 19'}
11, 11'	125,0	6,67-6,83 m	H _{10, 10'} ; H _{12, 12'}	C _{11, 11'}	C _{9, 9'} , C _{10, 10'} , C _{13, 13'}
12, 12'	139,3	6,51 d (14,8)	H _{11, 11'}	C _{12, 12'}	C _{9, 9'} , C _{10, 10'} , C _{13, 13'} , C _{14, 14'} , C _{20, 20'}
13, 13'	136,5	-	-	C _{13, 13'}	-
14, 14'	133,7	6,39-6,43 m	H _{15, 15'}	C _{14, 14'}	C _{15, 15'}
15, 15'	130,9	6,76-6,83 m	H _{14, 14'}	C _{15, 15'}	C _{13, 13'} , C _{14, 14'}
16, 16'	25,8	1,37 s	-	C _{16, 16'}	C _{1, 1'} , C _{2, 2'} , C _{6, 6'} , C _{17, 17'}
17, 17'	29,9	1,22 s	-	C _{17, 17'}	C _{1, 1'} , C _{2, 2'} , C _{3, 3'} , C _{6, 6'} , C _{16, 16'}
18, 18'	13,8	1,83 s	-	C _{18, 18'}	C _{4, 4'} , C _{5, 5'} , C _{6, 6'} , C _{8, 8'} , C _{16, 16'}
19, 19'	12,2	2,01 s	-	C _{19, 19'}	C _{8, 8'} , C _{9, 9'} , C _{10, 10'}
20, 20'	12,5	1,97 s	-	C _{20, 20'}	C _{12, 12'} , C _{13, 13'} , C _{14, 14'}
1'', 1'''	165,7	-	-	C _{1'', 1'''}	-
2'', 2'''	114,0	6,57 d (15,8)	H _{3'', 3'''}	C _{2'', 2'''}	C _{3, 3'} , C _{1'', 1'''} , C _{4'', 4'''} , C _{5'', 5'''}
3'', 3'''	145,6	7,60 d (15,8)	H _{2'', 2'''}	C _{3'', 3'''}	C _{1'', 1'''} , C _{2'', 2'''} , C _{4'', 4'''} , C _{5'', 5'''} , C _{6'', 6'''} , C _{9'', 9'''}
4'', 4'''	125,4	-	-	C _{4'', 4'''}	-
5'', 5'''	111,1	7,36 s	-	C _{5'', 5'''}	C _{3'', 3'''} , C _{7'', 7'''} , C _{9'', 9'''}
6'', 6'''	147,9	-	-	C _{6'', 6'''}	-
7'', 7'''	149,4	-	-	C _{7'', 7'''}	-
8'', 8'''	115,4	6,80 d (8,2)	H _{9'', 9'''}	C _{8'', 8'''}	C _{5'', 5'''} , C _{4'', 4'''} , C _{6'', 6'''} , C _{7'', 7'''}
9'', 9'''	123,2	7,14 d (8,2)	H _{8'', 8'''}	C _{9'', 9'''}	C _{3'', 3'''} , C _{5'', 5'''}
10'', 10'''	55,6	3,83 s	-	C _{10'', 10'''}	C _{5'', 5'''} , C _{6'', 6'''}
7'', 7'''-OH	-	9,63 brs	-	-	-

s=singlete, d= dublete, m=multiplete, dd=duplo dublete, bs=sinal alargado.

O composto preparado foi também caracterizado por infusão direta em espectrômetro de massas de alta resolução sendo observado o íon pseudo-molecular [M+H]⁺ com massa exata de 949,49261 e atribuído a formula molecular C₆₀H₆₉O₁₀ com erro de 4,3 ppm, (Figura 15).

Figura 15 - Espectro de massas de alta resolução com modo de ionização por eletrospray e modo de detecção positiva de íons do éster DFA.

4.2.2 Caracterização estrutural do retinoato de quercetina

A Figura 16 contém os espectros de RMN de ¹H do éster retinoato de quercetina e de seus precursores ácido retinóico e quercetina em meio de metanol deuterado (CD₃OD). É possível observar a desblindagem (por volta de 0,15 ppm em relação ao ácido retinóico) dos sinais correspondentes aos hidrogênios olefínicos do ácido retinóico (posições 31, 32, 33, 35) sugerindo um aumento na conjugação em consequência da ligação éster formada na molécula de retinoato de quercetina.

Figura 16 - Espectro de ^1H RMN 500 MHz do éster retinoato de quercetina (c) e de seus precursores ácido retinóico (b) e quercetina (a) 500 MHz em CD_3OD à temperatura de 25°C . A figura ilustra os espectros coletados na região de interesse, entre 0 e 8 ppm.

A Tabela 5 sumariza os dados espectroscópicos para elucidação total da estrutura do éster retinoato de quercetina, de acordo com a numeração da Figura 17.

Figura 17 - Numeração dos átomos do éster retinoato de quercetina adotada para a caracterização estrutural.

Tabela 5 – Dados de RMN para o éster retionato de quercetina em CD₃OD à 25°C.

Posição	¹³ C (δ)	¹ H δ, multiplic., (J em Hz)	COSY	HSQC	HMBC
1	166,3	-	-	-	-
2	100,1	6,24 bs	H ₆	C ₂	C ₆ ; C ₄ ; C ₃ ; C ₁ ;
3	163,2	-	-	-	-
4	105,2	-	-	-	-
5	158,7	-	-	-	-
6	95,1	6,45 bs	H ₂	C ₆	C ₂ ; C ₅ ; C ₁ ; C ₄ ; C ₉
8	158,3	-	-	-	-
9	177,5	-	-	-	-
10	131,5	-	-	-	-
12	122,3	-	-	-	-
13	116,3	7,38 bs	H ₁₅	C ₁₃	C ₁₅ ; C ₁₂ ; C ₁₇ ; C ₁₄ ; C ₈
14	150,3	-	-	-	-
15	122,3	7,33 dd (1,66; 8,42)	H ₁₃ ; H ₁₆	C ₁₅	C ₁₃ ; C ₁₄ ; C ₈
16	116,5	6,88 d (8,42)	H ₁₅	C ₁₆	C ₁₃ ; C ₁₅ ; C ₁₂ ; C ₁₇ ; C ₁₄ ; C ₈
17	146,7	-	-	-	-
22	40,8	1,50 m	H ₂₃	C ₂₂	C ₄₂ ; C ₄₃ ; C ₂₄ ; C ₂₇ ; C ₂₆
23	20,4	1,66 m	H ₂₄ ; H ₂₂	C ₂₃	C ₂₇ ; C ₂₄ ; C ₂₅
24	34,2	2,05 m	H ₂₃	C ₂₄	C ₄₁ ; C ₂₃ ; C ₂₂ ; C ₂₆ ; C ₂₅
25	131,0	-	-	-	-
26	138,9	-	-	-	-
27	35,5	-	-	-	-
28	130,2	6,35 d (16,2)	H ₂₉	C ₂₈	C ₃₁ ; C ₃₀
29	139,1	6,18 d (16,2)	H ₂₈	C ₂₉	C ₄₀ ; C ₃₁ ; C ₂₈ ; C ₃₀ ; C ₂₆
30	141,8	-	-	-	-
31	130,9	6,25 d (11,3)	H ₃₂	C ₃₁	C ₄₀ ; C ₃₃ ; C ₂₉
32	134,0	7,22 dd (11,3; 15,0)	H ₃₁ ; H ₃₃	C ₃₂	C ₃₀ ; C ₃₄
33	135,9	6,50 d (15,0)	H ₃₂	C ₃₃	C ₃₉ ; C ₃₅ ; C ₃₁ ; C ₃₄
34	158,5	-	-	-	-
35	117,0	6,13 s	-	C ₃₅	C ₃₉ ; C ₃₃
36	165,5	-	-	-	-
39	14,2	2,37 s	-	C ₃₉	C ₃₅ ; C ₃₃ ; C ₃₄ ; C ₃₆
40	13,1	2,04 s	-	C ₄₀	C ₃₁ ; C ₂₉ ; C ₃₀
41	22,0	1,72 s	-	C ₄₁	C ₂₅ ; C ₂₆ ; C ₂₄
42	29,5	1,04 s	-	C ₄₂	C ₄₃ ; C ₂₇ ; C ₂₂ ; C ₂₆
43	29,5	1,04 s	-	C ₄₃	C ₄₂ ; C ₂₇ ; C ₂₂ ; C ₂₆

s=singlete, d= dublete, m=multiplete, dd=duplo dublete, bs=sinal alargado.

O éster preparado foi também caracterizado por infusão direta em espectrômetro de massas de alta resolução sendo observada a presença do íon

pseudo-molecular $[M-H]^-$ com massa exata de 583,23279 com erro de -1,6 ppm calculado para $C_{35}H_{35}O_8$ (Figura 18).

Figura 18 - Espectro de massas de alta resolução com modo de ionização por eletrospray e modo de detecção negativa de íons do éster retinoato de quercetina.

quercet neg_130320165910 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 7.27E6
T: FTMS - p ESI Full ms [150.00-700.00]

4.2.3 Caracterização estrutural do retinoato de epicatequina

A Figura 19 contém os espectros de RMN de 1H do éster retinoato de epicatequina e de seus precursores ácido retinóico e epicatequina em meio de metanol deuterado (CD_3OD). É possível observar a desblindagem (aproximadamente 0,2 ppm) do sinal dos sinais correspondentes aos hidrogênios ligados ao carbono da posição 9 do RE se comparado aos hidrogênios análogos presentes na epicatequina bem como a desblindagem de aproximadamente 1,4 ppm do hidrogênio ligado ao carbono da posição 10, também em comparação à epicatequina, sugerindo um aumento na conjugação em consequência da ligação éster formada na molécula de retinoato de epicatequina.

Figura 19. Espectro de ^1H RMN 500 MHz do éster retinoato de epicatequina (c) e de seus precursores ácido retinóico (b) e epicatequina (a) 500 MHz em CD_3OD à temperatura de 25°C . A figura ilustra os espectros coletados na região de interesse, entre 0 e 8 ppm.

A Tabela 6 sumariza os dados espectroscópicos para elucidação total da estrutura do éster retinoato de quercetina, de acordo com a numeração da Figura 20.

Figura 20. Numeração dos átomos do éster retinoato de epicatequina adotada para a caracterização estrutural.

Tabela 6. Dados de RMN para o éster retionato de quercetina em CD₃OD à 25°C.

Posição	¹³ C (δ)	¹ H δ, multiplicidade, (J em Hz)	COSY	HSQC	HMBC
1	157,9	-	-	-	-
2	95,8	5,92 m	-	C ₂	C ₆ ; C ₅ ; C ₄ ; C ₃ ; C ₁ ;
3	157,9	-	-	-	-
4	99,4	-	-	-	-
5	157,4	-	-	-	-
6	96,5	5,95 m	-	C ₆	C ₂ ; C ₁ ; C ₄ ; C ₃ ;
8	78,5	4,98 sl	H ₁₃ ; H ₉ ; H ₁₀ ;	-	C ₉ ; C ₁₀ ; C ₁₃ ; C ₁₅ ; C ₁₂ ; C ₅ ;
9 ^a	26,8	2,80 dl	H ₈ ; H ₁₀ ; H _{9b} ;	-	C ₄ ; C ₁₀ ; C ₈ ; C ₅ ;
9 ^b		2,94 dd	H ₈ ; H ₁₀ ; H _{9a} ;	-	C ₄ ; C ₁₀ ; C ₈ ; C ₅ ;
10	69,2	5,41 s	H ₈ ; H ₉ ;	-	C ₄ ; C ₉ ; C ₃₆ ;
12	131,6	-	-	-	-
13	115,1	6,92 bs	H ₈ ; H ₁₆ ; H ₁₅	C ₁₃	C ₁₅ ; C ₁₂ ; C ₁₇ ; C ₁₄ ; C ₈
14	146,0	-	-	-	-
15	119,3	6,75 m	H ₁₃	C ₁₅	C ₁₃ ; C ₁₄ ; C ₁₇ ; C ₈
16	116,0	6,73 m	H ₁₃	C ₁₆	C ₁₂ ; C ₁₇ ; C ₁₄ ; C ₈
17	146,0	-	-	-	-
22	40,8	1,48 m	H ₂₃	C ₂₂	C ₂₃ ; C ₄₂ ; C ₄₃ ; C ₂₄ ; C ₂₇ ; C ₂₆
23	20,4	1,63 m	H ₂₄ ; H ₂₂	C ₂₃	C ₂₇ ; C ₂₄ ; C ₂₅
24	34,2	2,03 m	H ₂₈ ; H ₂₃	C ₂₄	C ₂₃ ; C ₂₂ ; C ₂₆ ; C ₂₅
25	130,8	-	-	-	-
26	138,9	-	-	-	-
27	35,3	-	-	-	-
28	129,6	6,29 m	H ₄₁ ; H ₂₄ ; H ₂₉	C ₂₈	C ₂₅ ; C ₂₆ ; C ₃₀ ;
29	139,0	6,11 m	H ₄₀ ; H ₂₈	C ₂₉	C ₄₀ ; C ₃₁ ; C ₂₈ ; C ₃₀ ; C ₂₆
30	140,5	-	-	-	-
31	131,1	6,14 m	H ₄₀ ; H ₃₂	C ₃₁	C ₄₀ ; C ₃₃ ; C ₂₉
32	132,4	7,03 dd (11,6; 15,0)	H ₃₁ ; H ₃₃	C ₃₂	C ₃₁ ; C ₃₀ ; C ₃₄
33	136,6	6,31 m	H ₃₂	C ₃₃	C ₃₉ ; C ₃₅ ; C ₃₁ ; C ₃₄
34	154,9	-	-	-	-
35	119,5	5,72 s	-	C ₃₅	C ₃₉ ; C ₃₄ ; C ₃₆ ; C ₃₃
36	168,0	-	-	-	-
39	14,1	2,19 s	-	C ₃₉	C ₃₅ ; C ₃₃ ; C ₃₄ ; C ₃₆
40	13,0	1,98 bs	H ₃₁ ; H ₂₉ ;	C ₄₀	C ₃₁ ; C ₂₉ ; C ₃₀
41	22,0	1,69 bs	H ₂₈ ;-	C ₄₁	C ₂₅ ; C ₂₆ ; C ₂₄
42	29,5	1,02 s	-	C ₄₂	C ₄₃ ; C ₂₇ ; C ₂₂ ; C ₂₆
43	29,5	1,02 s	-	C ₄₃	C ₄₂ ; C ₂₇ ; C ₂₂ ; C ₂₆

s = singlete, d= dublete, m = multiplete, dd = duplo dublete, bs = sinal alargado.

O éster preparado foi também caracterizado por infusão direta em espectrômetro de massas de alta resolução sendo observada a presença do íon pseudo-molecular $[M-H]^-$ com massa exata de 571,27014 com erro de +0,02 ppm calculado para $C_{35}H_{39}O_7$ (Figura 21).

Figura 21- Espectro de massas de alta resolução com modo de ionização por eletrospray e modo de detecção negativa de íons do éster retinoato de epicatequina.

4.3 Caracterização fotofísica e fotoquímica

4.3.1 Diferulato de Astaxantina

Os espectros de absorção, emissão de fluorescência e fosforescência e experimentos empregando fotólise por pulso de laser foram feitos realizados com soluções de $2,0 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹ dos compostos investigados em meio de etanol.

O espectro de absorção no UV-Vis da molécula de DFA, conforme Figura 22, sugere que o espectro eletrônico de absorção do éster derivado apresenta-se como uma sobreposição dos espectros eletrônicos de absorção dos precursores astaxantina e ácido ferúlico. Este fato indica que a conjugação na molécula de éster de astaxantina

não foi completamente estendida até as duas extremidades da molécula, correspondentes as porções de ácido ferúlico. A função éster podem, no entanto, em algum grau estar em um equilíbrio tautomérico ceto-enólico, conforme ilustrado no Esquema 16. O tautomerismo na molécula de DFA, quando deslocado para forma ceto, dificilmente afeta o espectro de absorção eletrônica no UV-vis, que por deconvolução espectral gaussiana pode ser resolvido nos componentes correspondentes à astaxantina e ao ácido ferúlico, veja-se Figura 22.

Figura 22 - Espectro de absorção do éster DFA e de seus precursores astaxantina e ácido ferúlico.

As energias dos estados eletrônicos S_1 foram calculadas com base na intersecção das bandas de absorção e fluorescência e estão reportadas na Tabela 7. A energia do estado eletrônico tripleto T_1 foi avaliada pelo menor valor de comprimento de onda observado no espectro de fosforescência da molécula de DFA registrado a 77K. As propriedades fotofísicas do DFA e de seus precursores estão sumarizadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Propriedades fotofísicas do éster DFA e seus precursores.

Propriedades Fotofísicas	Compostos		
	Ác. Ferúlico	ASTA	DFA
λ_{abs} (nm)	230, 289, 316	226, 290, 316, <u>345</u> , 478	240, 294, 329, <u>345</u> , 478
λ_F (nm)	290, 390	285, 310, 360	322, 334, 347
ϵ_S M ⁻¹ cm ⁻¹ (λ)	17100 (310)	*125000 (472 nm)	95800 (486 nm) 54600 (329nm)
ϕ_F ($\lambda_{exc}=250$ nm)	0,01 (77K); 0,002 (298 K)	0,015 (77K); 0,004 (298K)	0,190 (77K); 0,180 (298K)
ϕ_P (77K)	0,001	0,003	0,230
τ_P (77K)	—	0,7 s	1,6 s
$\lambda_{m\acute{a}x}$ (T-T)	—	450 nm	440 nm
τ_T (T-T)	—	5,2 μ s	4,1 μ s
$\lambda_{m\acute{a}x}$ (radical)	—	860 nm	850 nm
τ (radical)	—	2,4 ms	2 ms
E_{S1}	333,8 kJ.mol ⁻¹	417,8 kJ.mol ⁻¹	401,4 kJ.mol ⁻¹
E_{T1}	323,2 kJ.mol ⁻¹	373,4 kJ.mol ⁻¹	341,6 kJ.mol ⁻¹

O espectro de emissão da astaxantina, no entanto, é fortemente afetado pela esterificação com o não luminescente ácido ferúlico (Figura 23). O rendimento quântico de fluorescência para o novo composto é aumentado mais de dez vezes, à 77K, com excitação em 280 nm e cerca de cinquenta vezes à 298 K, ver figura 23A e 23B para o espectro de fluorescência e Tabela 7 para valores numéricos. A fosforescência foi também, da mesma forma aumentada após a esterificação da astaxantina com ácido ferúlico, e o rendimento quântico de fosforescência à 77 K aumentou de 0,03 a 0,23, para a excitação em 250 nm, com tempo de vida de fosforescência de 1,6 s para o éster comparado com 0,7 s para astaxantina, Figuras 23 C e 23 D.

O espectro de emissão total do novo composto, também ilustrado na Figura 21D, apresenta-se intenso para um carotenoide, que normalmente possui baixos rendimentos quânticos de cruzamento intersistemas para povoar o estado triplete [9]. Sugere-se que o estado triplete do novo composto tenha um maior ϕ_{ISC} se comparado à astaxantina, ou então que os mecanismos de desativação não radioativos são menos eficientes para o diferulato de astaxantina.

Figura 23 - Espectro de Fluorescência 298 K e 77K de (a) astaxantina e (b) DFA, $\lambda_{exc} = 280$ nm. Espectro de emissão total (Fluorescência + Fosforescência) e espectro de fosforescência de (c) astaxantina e (d) DFA, $\lambda_{exc} = 250$ nm, O gráfico inserido mostra a curva de decaimento de fosforescência á 77 K ($\lambda_{exc} = 250$ nm para ambas moléculas).

Os rendimentos quânticos de fluorescência da astaxantina e do éster DFA à 298K foram calculados utilizando a Equação 5 e empregando-se o naftaleno como referência ($\Phi_F = 0.2$).

$$\Phi_F = \Phi_o \left(\frac{n_F^2 DO_o \int I_F(\lambda) d\lambda}{n_o^2 DO_F \int I_o(\lambda) d\lambda} \right) \Phi_F = \frac{\int I(\lambda) \partial \lambda}{\int I(\lambda)^o \partial \lambda} \times \Phi_F^o \times \frac{DO^o}{DO} \times \frac{n^2}{n_o^2}$$

(5)

$$\Phi_F^{77K} = \frac{\int^{77K} I(\lambda) \partial \lambda}{\int^{298K} I(\lambda)^o \partial \lambda} \times \Phi_F^{298K} \times f_c$$

(6)

onde f_c é a constante de contração do solvente (0,84) à 77K e $\int^{77K} I(\lambda) d\lambda$ e $\int^{293} I(\lambda)^0 d\lambda$ são as áreas da curva de emissão de fluorescência à 77K e 298 K respectivamente, DO e DO⁰ são os valores de absorbância a 280 nm para o composto estudado e para o naftaleno, respectivamente. Os rendimentos quânticos de fluorescência e outros parâmetros fotofísicos da astaxantina, ácido ferúlico e DFA estão reportados na Tabela 7.

Pode-se observar que a diferença entre os rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F) à 77K e a 298K é baixa para a astaxantina e para o éster DFA, o que sugere que a influência de processos não radiativos de desativação do estado singlete excitado para esses compostos é irrisória. O éster DFA apresenta um rendimento quântico de fosforescência (Φ_P) cerca de 100 vezes superior ao de seus precursores, astaxantina e ácido ferúlico, indicando um processo de cruzamento entre sistemas mais eficiente e como consequência uma favorável formação do estado triplete excitado.

4.3.1.1 Estudos empregando espectroscopia de absorção de transientes por fotólise por pulso de laser

Com a finalidade de comparar a formação das espécies transientes da astaxantina e do éster DFA, bem como os tempos de vida do radical cátion e do estado tripleto excitado dos mesmos foram feitos estudos empregando espectroscopia de absorção de transientes com fotólise por pulso de laser utilizando soluções de 2×10^{-6} mol L⁻¹ desses compostos em meio de clorofórmio e a temperatura de 298K. A Figura 24a ilustra o espectro eletrônico de diferença de absorção das espécies transientes do éster DFA obtidas por excitação de pulso de laser à 355 nm, com duração de 8 ns, na ausência de oxigênio, na qual se observa duas transições centradas em 440 nm e 850 nm em meio de clorofórmio. Em soluções aeradas não foi observada a formação de espécies transientes, na região de 300-900 nm na janela de tempo investigada (μ s).

Figura 24 - Espectros eletrônicos de diferença de absorção de transientes a) do DFA e b) da astaxantina, em diferentes intervalos de tempo, $\lambda_{exc}=355$ nm, 9 mJ.

No trabalho de Mortensen e Skibsted [9], o espectro eletrônico de diferença de absorção de transientes da astaxantina foi investigado na presença de uma espécie oxidante (radicais tocoferoxila), e as absorções do cátion radical e do estado triplete excitado foram observadas nos mesmos comprimentos de onda registrados para a molécula de DFA (Figura 24a). A Figura 24b ilustra o espectro de diferença de absorção de transientes da astaxantina em meio de clorofórmio.

As Figuras 25a e 25b contém as curvas de decaimento das espécies transientes da astaxantina, enquanto que as Figuras 25c e 25d ilustram as curvas de decaimento das espécies transientes do éster DFA em meio de clorofórmio para efeito de comparação. As espécies com absorção em 440 nm (Figura 24a) e 450 nm (Figura 24b) são atribuídas ao estado triplete excitado do DFA e da astaxantina, respectivamente. Observa-se para estas bandas um tempo curto de decaimento ($\sim 20 \mu$ s). No entanto, as espécies observadas em 850 nm (Figura 24a) e 860 nm (Figura 24b) podem ser atribuídas à formação do cátion radical do DFA e da astaxantina, respectivamente.

Figura 25 - Curvas de decaimento da banda do espectro eletrônico de diferença de absorção das espécies transientes do DFA em diferentes janelas temporais (a) 2 μ s/div e (b) 1 ms/div, e para astaxantina em (c) 2 μ s/div e (d) 1 ms / div. λ_{exc} = 355 nm; Laser = 9 mJ/cm².

Não foram observadas diferenças significativas nos tempos de vida dos estados triplete excitados, bem como do radicais-cátion da astaxantina e do éster DFA gerados e monitorados em meio de clorofórmio na ausência de oxigênio sugerindo que a conjugação do fragmento carotenoide não é estendida com a formação da ligação éster com o ácido ferúlico.

4.3.2 – Ésteres derivados do ácido retinóico

4.3.2.1 Retinoato de quercetina

A Figura 26 contém os espectros eletrônicos de absorção no UV-vis do éster retinoato de quercetina e dos precursores ácido retinóico e quercetina. Pode-se observar que o espectro do RQ apresenta máximo de absorção em 350 nm, diferentemente dos respectivos precursores em 342 nm para o ácido retinóico e 368 nm para a quercetina. O comprimento de onda máximo de absorção do RQ em valores

intermediários aos máximos dos precursores sugere uma extensão das bandas π - π^* dos precursores, com uma possível conjugação entre a porção da molécula referente ao ácido retinóico e o anel C da quercetina..

Figura 26. Espectro eletrônico de absorção no UV-vis do retinoato de quercetina, e de seus precursores ácido retinóico e quercetina.

A banda de absorção centrada em 250 nm, presente no espectro eletrônico do retinoato de quercetina, não sofreu alteração, se comparada com a banda localizada na mesma região do espectro de absorção da quercetina, o que sugere que a conjugação não se estendeu de forma significativa até o anel aromático B (estrutura inserida na Figura 26). Entretanto, pode-se observar uma menor participação de acoplamento eletrônico-vibracional na molécula de RQ, sugerindo uma possível compactação das energias de níveis vibracionais e consequentemente o favorecimento da desativação de níveis vibrônicos excitados por conversão interna (processo não radiativo).

A emissão de fluorescência do retinoato de quercetina apresentou baixa intensidade ($\Phi_F < 10^{-3}$) com máximo de emissão (λ_{Fmax}) centrado em 485 nm a temperatura de 298 K, diferentemente dos precursores não fluorescentes à 298 K quercetina e ácido retinóico, Figura 27 .

Figura 27. Espectro de fluorescência do retinoato de quercetina à 298 K e 77 K em etanol.

O espectro de emissão de fluorescência do RQ ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$) à 77 K aparenta um aumento na intensidade de emissão com máximo deslocado para aproximadamente 470 nm quando comparado ao espectro registrado à 298 K. A quercetina apresenta emissão de fluorescência a 77K com máximo de emissão em 520 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$), já o ácido retinoico não é fluorescente a 77 K ou 298 K. A constatação da emissão de fluorescência do RQ centrada em 470 nm à 77 K sugere que o éster derivado, quando excitado ao estado S_1 , desativa não radiativamente pelo fragmento da molécula correspondente ao ácido retinóico.

A Figura 28 contém o espectro de emissão de fosforescência do retinoato de quercetina, apresentando máximo centrado em $\lambda_{\text{P (max)}} = 500 \text{ nm}$ à 77 K, com tempo de vida de fosforescência de 325 ms. O máximo de emissão de fosforescência da RQ é próximo ao observado na literatura para a molécula de quercetina [24], sugerindo que o estado excitado do RQ possui características próximas ao fragmento quercetina. Esta ultima hipótese também é suportada pelos dados de fosforescência e absorção de transientes.

Figura 28. (a) Espectro de fosforescência do retinoato de quercetina à 77 K em etanol, (b) curva de decaimento de fosforescência do retinoato de quercetina a temperatura de 77 K e $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$.

4.3.2.2 Retinoato de epicatequina

Assim como o observado para o éster derivado da quercetina e do ácido retinóico, o espectro eletrônico de absorção do retinoato de epicatequina, indica uma sobreposição entre as bandas π - π^* dos precursores, ácido retinóico e epicatequina, sendo notado um pequeno deslocamento para o vermelho ($\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$), quando comparado ao espectro eletrônico de absorção do ácido retinóico, Figura 29.

Figura 29. Espectro eletrônico de absorção do retinoato de epicatequina, e de seus precursores ácido retinóico e epicatequina em etanol a 298 K.

A banda de absorção do espectro eletrônico do éster centrada em 250 nm, também não sofreu alterações significativas, sugerindo que a conjugação da molécula após a esterificação não afetou os anéis aromáticos, estendendo-se apenas até o anel C da porção do éster referente à epicatequina. O retinoato de epicatequina apresentou baixa intensidade de fluorescência quando excitado em 355 nm à 298 K, sendo o comprimento de onda de emissão (λ_{Fmax}) de 470 nm.

De forma análoga ao derivado RQ, quando excitado em 355 nm o retinoato de epicatequina excitado ao estado singlete desativa preferencialmente por via não radiativa pelo fragmento referente à porção do ácido retinóico na molécula, apresentando baixa emissão de fluorescência ($\Phi_F < 10^{-3}$).

Na Figura 30 é possível observar que a intensidade de fluorescência do retinoato de epicatequina à 77 K é consideravelmente superior ao experimento à 298 K, confirmando que a desativação do estado excitado singlete se dá por processos

não radiativos, porém minimizada quando comparado ao precursor ácido retinóico (não fluorescente).

Figura 30. Espectro de fluorescência do retinoato de epicatequina à 298 K e 77 K em etanol, $\lambda_{exc} = 355$ nm.

Não foi observada fosforescência para o retinoato de epicatequina à 77K em etanol, sugerindo um decaimento não radiativo predominante para o retorno do estado triplete excitado para o fundamental.

A Tabela 8 sumariza as propriedades fotofísicas e fotoquímicas dos ésteres retinoato de quercetina e retinoato de epicatequina, bem como de seus precursores.

Tabela 8. Propriedades fotofísicas dos ésteres retinoato de quercetina (RQ) e retinoato de epicatequina (RE) e de seus precursors ácido retinóico, quercetina e epicatequina

Propriedades Fotofísicas	Compostos				
	ác. retinóico	Quercetina	RQ	epicatequina	RE
λ_{abs} (nm)	348	250; 368	250; 360	276	360
ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	45000 [25]	20900 [26]	36580	4290 [27]	14744
λ_F (max) (298 K)	Não observado	450;532 nm	485 nm	318 nm	470 nm
λ_P (max) (77K)	Não observado	510; 540 nm [24]	500 nm	-	Não observado
τ_P (77K)	Não observado	Não observado	325,3 ms	-	Não observado
$\lambda_{\text{máx}}$ (T-T)	440 [28]		420 nm*	-	410 nm*
τ_T (T-T)	1,6 μ s [28]		1,94 μ s*	-	6,50 μ s*
τ (radical)		-	>1 ms	-	Não observado
λ (radical)	590 [28]	-	400-450 nm	-	Não observado
E _{S1}		292,35 kJ/mol	299,1 kJ/mol	407,17 kJ/mol	281,74 kJ/mol
E _{T1}		231,6 kJ/mol [24]	288,49 kJ/mol	-	Não observado

* dados experimentais obtidos por espectroscopia de absorção de transientes (anexo I).

Pode se observar um deslocamento na banda de absorção (T-T) para os derivados RQ e RE quando comparado ao ácido retinóico, dados experimentais no anexo I. Este deslocamento e o nítido aumento no tempo de vida do estado triplete excitado sugerem que a conjugação do fragmento ácido retinóico com os flavonóides quercetina e epicatequina modificam as propriedades fotofísicas do fragmento correspondente ao ácido retinóico nos ésteres preparados.

4.4 Propriedades eletroquímicas

4.4.1 Diferulato de astaxantina

Para a determinação dos potenciais de oxidação dos ésteres conjugados e de seus precursores foram preparadas soluções de $1,0 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ dos compostos estudados em diclorometano utilizando TBAPF₆ na concentração de 0,1 mol.L⁻¹ como eletrólito suporte, eletrodo de referência de Ag/AgCl, o eletrodo de carbono vítreo (trabalho), e o contra-eletrodo de platina.

Na Figura 31 se encontram os voltamogramas cíclicos do éster DFA e seus precursores, com os valores de corrente normalizados.

Figura 31 - Voltamogramas cíclicos do éster DFA, e de seus precursores em diclorometano, na velocidade de varredura 200 mV/s, à 25° C.

O voltamograma referente à astaxantina apresenta dois processos de oxidação, com potenciais de pico anódico em 0,76 V e 0,92 V vs Ag/AgCl os quais são também observados no éster DFA, sem variações significativas. O ácido ferúlico possui um processo de oxidação com potencial de pico anódico de 1,20 V vs Ag/AgCl, o qual pode ser relacionado ao terceiro processo observado no éster DFA com potencial de pico anódico de 1,40 V vs Ag/AgCl, ou seja, com um deslocamento de 0,2 V. A variação no potencial de pico anódico sugere uma maior deslocalização da

densidade eletrônica no éster DFA como consequência de uma maior conjugação nesse composto, tornando o fragmento da molécula referente à parte fenólica menos redutor.

4.4.2 Retinoato de quercetina

No voltamograma cíclico da quercetina (Figura 32) foram observados dois processos de oxidação, com potenciais de pico anódico de 1,06 V e 1,47 V vs Ag/AgCl. Já o voltamograma cíclico do éster retinoato de quercetina apresentou dois processos de oxidação, com potenciais de pico anódico em 1,22 V e 1,47 V vs Ag/AgCl o que sugere um possível deslocamento anódico de aproximadamente 0,16 V no primeiro processo de oxidação presente na molécula de quercetina após a formação do éster com o ácido retinóico o que indica uma maior deslocalização da densidade eletrônica tornando o fragmento fenólico no éster menos redutor que a quercetina livre.

Figura 32 - Voltamogramas cíclicos do éster retinoato de quercetina, e de seus precursores em acetonitrila, na velocidade de varredura 500 mV/s, à 25° C.

4.4.3 Retinoato de epicatequina

O voltamograma cíclico da epicatequina (Figura 33) apresentou um processo de oxidação com potencial de pico anódico de 1,26 V vs Ag/AgCl o qual foi observado

com um deslocamento de 0,16 V no éster retinoato de epicatequina, que também apresentou um processo de oxidação em 1,06 V vs Ag/AgCl correspondente à porção referente ao ácido retinóico presente no éster, já que esse processo também foi observado no voltamograma cíclico do ácido retinóico.

Figura 33 - Voltamogramas cíclicos do éster retinoato de epicatequina, e de seus precursores em acetonitrila, na velocidade de varredura 500 mV/s, à 25° C.

4.5 Estudos de reatividade frente à algumas espécies oxidantes

4.5.1 Cinética de captação do radical 1-hidroxietila

O radical 1-hidroxietila é o produto majoritário da oxidação do etanol pelo radical hidroxila, proveniente da reação de Fenton [29], sendo ele um dos principais radicais presentes em bebidas alcoólicas e no metabolismo do etanol no fígado [30]. Essa oxidação se dá pela abstração de um átomo de hidrogênio da molécula de etanol, sendo que essa abstração ocorre preferencialmente no hidrogênio pertencente ao carbono C1 (85%), formando o radical 1-hidroxietila conforme pode ser observado no Esquema 7.[29]

Esquema 7 - Formação e reações subsequentes do radical 1-hidroxietila, em destaque, de acordo com o proposto por Andersen e Skibsted^[31].

Devido à dificuldade de detecção direta do radical 1-hidroxietila devido ao seu baixo tempo de meia vida ($t_{1/2}$), a reação do radical 1-hidroxietila frente aos compostos de interesse foi estudada utilizando-se a técnica de “*spin-trap*”, empregando o 4-POBN como armadilha química, e uma abordagem cinética de competição para a obtenção das constantes de velocidade.

Esquema 8 - Ilustração da formação do aduto radical 1-hidroxietila/4-POBN.

Durante o experimento o radical 1-hidroxietila foi gerado pela reação do cloreto férrico com o peróxido de hidrogênio em etanol, na presença da armadilha química 4-

POBN, a concentração do aduto radical foi monitorada por ESI⁺-MS acompanhando-se a evolução do íon pseudo-molecular com $m/z = 240,1$.

A reação foi conduzida adicionando-se 60 μL de uma solução aquosa de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ levemente acidificada ($\text{pH} \sim 4$) (2 mM) a 1 mL de uma solução de 4-POBN (3,2 mM) em 100% de etanol. A mistura reacional foi degaseificada por 5 minutos com argônio (5.0), seguida do acréscimo de 80 μL de solução H_2O_2 30% (59 mM) para promover a formação do radical 1-hidroxietila e posterior geração do aduto 4-POBN/ $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ durante 1 minuto, sendo então injetada diretamente no espectrômetro de massas. O procedimento foi repetido adicionando-se diferentes alíquotas dos compostos estudados antes da degaseificação da mistura reacional.

As constantes de velocidade aparente da reação entre os compostos estudados e o radical 1-hidroxietila (k_2') foram obtidas através de uma abordagem cinética de competição, Esquema 9.

Esquema 9 - Ilustração da reação de competição entre a armadilha química 4-POBN e o ácido fenólico pelo radical 1-hidroxietila.

Desta forma, variando-se a concentração dos ácidos fenólicos na reação, um gráfico da percentagem de redução do aduto radical ($F/1-F$) vs. Concentração de ácido fenólico foi construído (Figura 34), sendo cada ponto da curva obtido a partir da média da análise em triplicata do aduto radical para cada concentração do antioxidante estudado adicionada. Assim, calculou-se a constante de velocidade aparente de segunda ordem através da Equação 8 [32], na qual conhece-se k_2 ($3,1 \cdot 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$)¹⁴, bem como a concentração da armadilha química.

$$\left(\frac{F}{1-F}\right) \cdot k_2 \cdot [4 - POBN] = k'_2 \cdot [\text{antioxidante}] \quad (8)$$

Figura 34 - Gráfico de $(F/1-F) \times [POBN] \times k_2$ vs $[\text{antioxidante}]$.

De acordo com os valores de constante obtidos, Tabela 9, o éster DFA se mostrou 10 vezes mais reativo que a astaxantina e aproximadamente 100 vezes mais reativo que o ácido ferúlico, e esse efeito observado não foi apenas aditivo já que a reação do radical 1-hidroxietila com os precursores na razão estequiométrica do éster, não apresentou a mesma constante de velocidade aparente, provando que o efeito observado no composto conjugado (DFA) não é meramente um efeito aditivo.

Tabela 9. Constantes de velocidade de segunda ordem para as reações dos compostos estudados frente ao oxigênio singlete excitado e ao radical 1-hidroxietila.

Composto	Radical 1-hidroxietila ($k_2' \times 10^8 \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$)
)DFA	$1,68 \pm 0,10$
Astaxantina	$0,18 \pm 0,02$
Ácido Ferúlico	$0,02 \pm 0,01$
Astaxantina:ác. ferúlico (1:2)	$0,16 \pm 0,03$

O procedimento reacional foi repetido sem a adição da armadilha 4-POBN, e foi feita a injeção direta de uma alíquota da mistura em um espectrômetro de massas visando identificar os produtos da reação do éster DFA com radical 1-hidroxietila, foram identificados 3 possíveis produtos, os espectros encontram-se nas Figuras 35, 36 e 37.

Figura 35. Espectro de massas de alta resolução com modo de ionização por eletrospray e modo de detecção negativa de íons da mistura reacional contendo DFA e radical 1-hidroxietila, detalhe para o íon com $[M-H]^- = 947$.

Figura 36. Espectro de massas de alta resolução com modo de ionização por eletrospray e modo de detecção negativa de íons da mistura reacional contendo DFA e radical 1-hidroxietila, detalhe para o íon com $[M-H]^- = 1037$.

Figura 37. Espectro de massas de alta resolução com modo de ionização por eletrospray e modo de detecção negativa de íons da mistura reacional contendo DFA e radical 1-hidroxietila, detalhe para o íon com $[M-H]^- = 771$.

Considerando os íons encontrados e comparando com os produtos conhecidos para o ácido ferúlico [33], foi proposto o mecanismo de reação de acordo com o Esquema 10.

Esquema 10 – Possíveis produtos da reação entre o éster DFA e o radical 1-hidroxietila

De acordo com o esquema 10 pode-se observar que a porção ácido ferúlico presente no éster DFA sofre o ataque de duas moléculas de radical 1-hidroxietila resultando no produto correspondente ao íon de $m/z = 1037$, podendo ser seguida de um ataque nucleofílico por parte da hidroxila vizinha ao carbono β do ácido ferúlico, o qual resulta na quebra da ligação éster possivelmente gerando a lactona com $m/z=265$ e o monoéster astaxantina/ácido ferúlico, com $m/z=772$, sendo possível que o mesmo mecanismo ocorra na outra extremidade da molécula do monoéster, liberando mais uma lactona e a astaxantina livre.

Para o caso dos ésteres derivados do ácido retinóico com a quercetina e a epicatequina, RQ e RE, foi avaliado a diminuição do efeito pró-oxidante desses ésteres nas condições utilizadas nesse experimento uma vez que já foi reportado na literatura [34] que polifenóis contendo o grupo catecol são capazes de reduzir íons de Fe(III) à espécie Fe(II), Esquema 11. A habilidade de reduzir íons de Fe(III) a Fe(II), o qual podem realimentar a reação de Fenton, resultando numa maior geração de radical hidroxila, e conseqüentemente uma maior geração do radical 1-hidroxietila, caracterizando um comportamento pró-oxidante para essa situação.

Esquema 11 - Esquema de reação propondo o efeito pró-oxidante de polifenóis contendo grupo catecol na presença de Fe(III) e peróxido

Desta forma, o experimento de reatividade desses ésteres frente ao radical 1-hidroxietila foi feito com a finalidade de se avaliar a diminuição desse efeito pró-oxidante desses flavonóides após a esterificação com o ácido retinóico.

A comparação entre o efeito pró-oxidante dos ésteres conjugados e seus respectivos precursores foi feita analisando a diferença entre as concentrações de aduto radical na presença e na ausência dos compostos de interesse, e nesse caso quanto menor essa diferença, menor o efeito pró oxidante.

Na Figura 38 é possível observar a diferença significativa desse efeito pró-oxidante após a reação de esterificação desses flavonóides, sendo que para o éster retinoato de quercetina o efeito pró-oxidante observado foi de cerca de 1/3 se comparado com o flavonóide precursor. Já para o éster retinoato de epicatequina essa redução foi de mais de 1/10, sendo esse efeito pró-oxidante quase anulado.

Uma possível justificativa para a diminuição desse efeito seria o deslocamento anódico em torno de 0,16 V vs Ag/AgCl no potencial de oxidação referentes aos processos envolvendo as porções de flavonóide presentes nos ésteres conjugados, tornando mais difícil a redução do Fe(III) para a espécie Fe(II) diminuindo a taxa da reação de Fenton.

Figura 38 - Diagrama comparativo do efeito pró-oxidante, para a reação com o radical 1-hidroxietila proveniente da reação de Fenton na presença de Etanol, dos ésteres bioconjugados, comparados com seus respectivos precursores.

Essa redução do efeito pró-oxidante desses flavonóides após a esterificação com o ácido retinóico é um resultado muito promissor já que a epicatequina e a quercetina são poderosos antioxidantes e minimizar ou evitar possíveis comportamentos pró-oxidantes desses compostos em determinadas situações é muito interessante no desenvolvimento de novos antioxidantes/antirradicais que possam atuar de forma eficaz em sistemas mais complexos como alimentos e sistemas biológicos.

4.5.2 Cinética de desativação do oxigênio singlete excitado

Diferulato de astaxantina

Para avaliar a capacidade de desativação do oxigênio singlete pelo éster sintetizado e de seus precursores, as amostras foram dissolvidas em uma solução etanólica de azul de metileno (16 μM), sendo a concentração da astaxantina e do éster AFE 1 mg/mL e para o ácido ferúlico de 3 mg/mL. Os experimentos de desativação do oxigênio singlete foram realizados adicionando diferentes alíquotas das soluções estoque diretamente à uma cubeta contendo a solução de azul de metileno (16 μM).

Figura 39. Curvas de decaimento do oxigênio singlete excitado em diferentes concentrações de astaxantina. Gráfico inserido de k_{obs} vs [astaxantina].

Figura 40. Curvas de decaimento do oxigênio singlete excitado em diferentes concentrações de diferulato de astaxantina. Gráfico inserido de k_{obs} vs [DFA].

As constantes de velocidade de segunda ordem para a desativação do oxigênio singlete excitado, foram calculadas pelo ajuste linear da equação $k_{\text{obs}} = k_0 + k_2[\text{supressor}]$ ao gráfico de k_{obs} vs. $[\text{supressor}]$ (Figura 41).

Figura 41. Comparação dos gráficos de k_{obs} vs $[\text{supressor}]$ para reação do éster DFA e da astaxantina com o oxigênio singlete excitado ($^1\text{O}_2$).

Para a reação do oxigênio singlete excitado observou-se uma maior reatividade do éster diferulato de astaxantina, Tabela 10, como o observado para a reação com o radical 1-hidroxietila, Tabela 9, sendo a constante de velocidade para a reação do éster DFA uma ordem de grandeza maior que a da reação com a astaxantina, e 4 ordens de grandeza superior à do ácido ferúlico, podendo-se concluir que o mecanismo de desativação de oxigênio singlete por meio do éster DFA é similar ao da astaxantina utilizando a cadeia poliênica para uma desativação física mais eficiente do oxigênio singlete excitado, processo esse em concordância com o rendimento quântico de fosforescência (Φ_P) do éster DFA, 100 vezes superior ao do carotenoide precursor.

Tabela 10 - Constantes de velocidade de segunda ordem para as reações dos compostos estudados frente ao oxigênio singlete excitado.

Composto	$^1\text{O}_2^*$ $k_2 \times 10^{10} \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$
DFA	$1,58 \pm 0,10$
Astaxantina	$0,12 \pm 0,01$
Ácido Ferúlico	$\sim 0,0001$

Visando melhor compreender a maior reatividade do éster DFA frente às espécies oxidantes devido à um possível aumento na conjugação da mesma se comparada aos seus precursores, e considerando-se que não fora observado experimentalmente um aumento significativo na conjugação do diferulato de astaxantina, se comparado com seu precursor astaxantina, ocorreu que o aumento da reatividade poderia ser reflexo de um equilíbrio ceto-enólico, na carbonila presente no anel de ciclohexeno oriundo da astaxantina (Esquema 12) como alguns estudos sugerem em compostos similares [35, 36].

Esquema 12 - Possível equilíbrio ceto-enólico presente no éster DFA.

Com a finalidade de se investigar esse tautomerismo, foi feito um experimento de RMN, adicionando-se trietilamina (0,08 mmol) à uma solução de $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ do éster DFA em metanol- d_4 , visando deslocar o equilíbrio para a forma enólica. A Figura 42 contém o espectro de ^1H da solução antes (a) e depois (b) da adição de base, e não é observada mudança no sentido da formação do enol no anel de ciclohexeno, a qual seria caracterizada pelo desaparecimento do sinal em 5,63 ppm.

Figura 42. Espectro de ^1H 500 MHz da solução de $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ do éster DFA em metanol- d_4 , à temperatura de 25°C , (a) antes e (b) depois da adição de trietilamina (0,08 mmol).

Por outro lado, foi observado o deslocamento dos sinais referentes ao ácido ferúlico, bem como o aumento do sinal em 8,63 ppm sugerindo à ressonância da carga negativa do ânion formado após a desprotonação da hidroxila fenólica, demonstrado no Esquema 13.

Esquema 13 - Estruturas de ressonância do ânion do éster DFA.

4.5.3 Espectros de absorção de transientes via fotólise por pulso de laser

Em virtude das características espectrais (absorção na região de 250 nm a 450 nm) dos derivados RQ e RE e seus precursores, os quais interferem na geração dos conhecidos oxidantes biológicos riboflavina tripleto ($E_{1/2} = 1,77 \text{ V vs NHE}$; $\tau = 15 \mu\text{s}$) [37] e da fotogeração de radicais via fotólise de peróxidos, como o peróxido de benzoila e o cumeno hidroperóxido, optamos por utilizar a safranina no estado tripleto como modelo de espécie oxidante reativa.

A estimativa do potencial de redução do estado triplete excitado da safranina pode ser calculada pela equação 7 [38]:

$$E_{1/2}^{*red} = E_{1/2}^{red} + E_{0,0} + w_r \quad (7)$$

onde $E_{1/2}^{*red}$ é o potencial de redução no estado excitado, $E_{1/2}^{red}$ é o potencial de redução no estado fundamental, $E_{0,0}$ é a diferença de energia entre os menores níveis de energia do estado triplete e estado fundamental e w_r é o termo referente ao trabalho eletrostático que descreve a geração e a separação de carga no complexo de transferência de elétron.

Considerando-se os valores de $E_{1/2}^{red}$ e $E_{0,0}$ para a safranina reportados na literatura [39], [40] e o termo w_r implícito nos experimentos para obtenção de tais potenciais, o valor estimado para o potencial de redução do estado tripleto da safranina ($E_{1/2}^{*red}$) é de 1,48 V vs NHE.

A safranina apresenta uma larga banda com comprimento de onda máximo de absorção centrado em 520 nm e livre de interferência espectral. O espectro de transientes gerado por excitação da solução aquosa da safranina, com laser em 532 nm, é ilustrado na Figura 43. O espectro de diferença de absorção de transientes apresenta diferentes bandas de absorção T-T entre 400 e 850 nm. Em meio orgânico não prótico, a banda de absorção T-T é característica da espécie neutra da safranina (3Sf) e observada em torno de 800-850 nm. Em meio polar prótico, o espectro de diferença de absorção de transientes apresenta um deslocamento da banda de absorção T-T para 600 nm indicando a presença da espécie protonada ($^3SfH^+$). Entretanto, em solução aquosa com pH = 7, a safranina tipicamente apresenta uma pronunciada absorção em 600 nm e uma pequena banda de absorção em 830 nm, como pode ser observado no espectro presente na Figura 43 e atribuídas as espécies $^3SfH^+$ e 3Sf respectivamente. A estrutura molecular da Safranina e seu equilíbrio ácido-base estão ilustradas no Esquema 14.

Esquema 14. Equilíbrio de protonação da safranina em função do pH do meio, onde pK e pK^* são, respectivamente, os valores de pK_a nos estados fundamental e tripleto da safranina [41].

Em meio anaeróbico e na ausência de redutores externos, a safranina quando excitado ao seu estado tripleto sofre reação de aniquilação promovendo a formação das espécies radicalares semi-reduzida ($\text{Sf}^{\bullet-}$) e semi-oxidada ($\text{Sf}^{\bullet+}$) da safranina com absorções (D-D) características em 400 nm e 650 nm para a espécie $\text{Sf}^{\bullet-}$ e em 440 nm para a espécie $\text{Sf}^{\bullet+}$ [41]. As espécies radicalares semi-oxidada e semi-reduzida são também distinguíveis pelos seus diferentes tempos de vida: 40 μs para a espécie $\text{Sf}^{\bullet+}$ e >150 μs para a espécie $\text{Sf}^{\bullet-}$. O Esquema 15 ilustra as fotoreações e equilíbrio ácido-base proposto para a safranina fotoexcitada em meio anaeróbico e na ausência de redutores [41].

Esquema 15. Reações envolvidas na formação das espécies radicalares da safranina.

Em meio aquoso, neutro, anaeróbico e na presença de redutores (quercetina, epicatequina, RQ e RE), a banda T-T da safranina é suprimida com constantes de velocidade observada de primeira ordem com dependência linear com a concentração do redutor. Paralelamente ao decaimento da banda referente ao estado tripleto, um crescimento da banda referente à espécie semi-reduzida da safranina é observado em 650 nm (tempo de decaimento > 150 μs). O esquema 16 ilustra a reação de transferência de elétrons entre a safranina fotoexcitada e os redutores investigados.

Esquema 16 – Mecanismos fotoquímicos da safranina na presença dos desativadores estudados.

A Figura 43 contém o espectro eletrônico de diferença de absorção das espécies transientes da safranina, obtidas por excitação de pulso de laser de 532 nm na ausência de oxigênio em meio aquoso neutro. O espectro registrado 0,8 μs logo após o pulso de excitação de 532 nm com duração de 4 ns apresenta a banda de absorção centrada em 600 nm referente à formação do estado tripleto protonado da safranina, (${}^3\text{SfH}^+$). Observa-se também a banda referente à espécie radicalar semi-reduzida com máximo centrado em 650 nm oriunda do auto-decaimento via reação de aniquilação.

Figura 43. Espectro eletrônico de diferença de absorção de transientes da safranina em solução aquosa ($2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) registrado em diferentes intervalos de tempo.

Foram registrados espectros eletrônicos de diferença de absorção de transientes para a mistura safranina ($2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) e quercetina ($3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) em diferentes intervalos de tempo, em solução aquosa neutra, na ausência de oxigênio e a temperatura ambiente, Figura 44.

Figura 44. Espectro eletrônico de diferença de absorção de transientes da safranina em solução aquosa ($2 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de quercetina ($3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes intervalos de tempo.

A Figura 44 ilustra as alterações no espectro de absorção de transientes do estado tripleto da safranina na presença de quercetina em meio aquoso neutro e anaeróbico. Observa-se claramente o decaimento do estado tripleto (^3Sf) e a formação da espécie radical $\text{Sf}^{\cdot-}$ em 420 nm na presença do redutor quercetina. O tempo de vida do estado tripleto (^3Sf) e a formação do ânion radical ($\text{Sf}^{\cdot-}$) dependeram linearmente da concentração do redutor (Figura 45 b).

O decaimento da espécie tripleto (^3Sf) com absorção centrada em 830 nm, foi monitorado em concentrações crescentes de quercetina, sendo a constante bimolecular de redução do estado tripleto excitado da safranina pela quercetina (k_q)

de $4,2 \cdot 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a temperatura de 25°C obtida pelo ajuste linear da equação $k_{\text{obs}} = k_0 + k_2[\text{redutor}]$ ao gráfico de k_{obs} vs. $[\text{redutor}]$.

Figura 45. (a) Curva de decaimento do estado tripleto da safranina na presença de concentrações crescentes de quercetina ($0 - 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Energia do laser 8 mJ e $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$. (b) Gráfico de $k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1})$ versus concentração do redutor.

A Figura 46 contém o espectro de diferença de absorvância de transientes para a fotoredução do estado tripleto da safranina na presença de RQ. Observa-se as mesmas características espectrais visualizadas para a redução da ^3Sf pela quercetina (Figura 44).

Figura 46. Espectro eletrônico de diferença de absorção de transientes da safranina em solução aquosa (2×10^{-5} mol L⁻¹) na presença de retinoato de quercetina ($1,4 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) em diferentes intervalos de tempo. Energia do laser 8 mJ e $\lambda_{exc} = 532$ nm.

Similarmente o decaimento do estado triplete excitado da safranina, foi monitorado na presença de concentrações crescentes de retinoato de quercetina, sendo a constante bimolecular de redução do estado triplete excitado da safranina pelo retinoato de quercetina (k_q) de $8,7 \cdot 10^8$ L.mol⁻¹.s⁻¹ a temperatura de 25 °C e obtida pelo ajuste linear da equação $k_{obs} = k_0 + k_2[\text{redutor}]$ ao gráfico de k_{obs} vs. [redutor]. Figura 47 b.

Figura 47. (a) Curva de decaimento do estado tripleto da safranina na presença de concentrações crescentes de retinoato de quercetina ($0 - 1,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Energia do laser = 8 mJ e $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$. (b) Gráfico de $k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1})$ versus concentração do redutor.

Foram registrados espectros eletrônicos de diferença de absorção de transientes para a mistura fotoexcitada de safranina ($2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) e epicatequina ($3,8 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$), em diferentes intervalos de tempo, em solução aquoso anaeróbico neutro e a temperatura ambiente, Figura 48.

Figura 48. Espectro eletrônico de diferença de absorção de transientes da safranina em solução aquosa ($2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de epicatequina ($3,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes intervalos de tempo. Energia do laser 8 mJ e $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$.

Analogamente, o decaimento do estado tripleto excitado da safranina, foi monitorado na presença de concentrações crescentes de epicatequina, sendo a constante bimolecular de redução do estado tripleto excitado da safranina pela epicatequina (k_q) de $2,9 \cdot 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a temperatura de 25°C e calculada pelo ajuste linear da equação $k_{\text{obs}} = k_0 + k_2[\text{redutor}]$ ao gráfico de k_{obs} vs. $[\text{redutor}]$, Figura 49 b.

Figura 49. (a) Curva de decaimento do estado tripleto da safranina na presença de concentrações crescentes de epicatequina ($0 - 3,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Energia do laser 8 mJ e $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$. (b) Gráfico de $k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1})$ versus concentração do redutor.

Foram registrados espectros eletrônicos de diferença de absorção de transientes para a mistura fotoexcitada de safranina ($2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) e retinoato de epicatequina ($8,5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) em diferentes intervalos de tempo, em solução aquosa e a temperatura ambiente, Figura 50.

Figura 50. Espectro eletrônico de diferença de absorção de transients da safranina em solução aquosa ($2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de retinoato de epicatequina ($8,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes intervalos de tempo. Energia do laser 8 mJ e $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$.

O decaimento do estado tripleto excitado da safranina, foi monitorado na presença de concentrações crescentes de retinoato de epicatequina, sendo a constante bimolecular de redução do estado tripleto excitado da safranina pelo retinoato de epicatequina (k_q) de $2,1 \cdot 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a temperatura de 25°C e obtida pelo ajuste linear da equação $k_{\text{obs}} = k_0 + k_2[\text{reduzidor}]$ ao gráfico de k_{obs} vs. [reduzidor], Figura 51 b,.

Figura 51. (a) Curva de decaimento do estado tripleto da safranina na presença de concentrações crescentes de retinoato de epicatequina ($0 - 8,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Energia do laser 8 mJ e $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$. (b) Gráfico de k_{obs} (s^{-1}) versus concentração do redutor.

A Tabela 11, sumariza as constantes bimoleculares de velocidade para a redução do estado triplete excitado da safranina pelos compostos de interesse.

Tabela 11. Constantes de velocidade bimoleculares para a redução do estado triplete excitado da safranina a temperatura de 25°C.

Composto	k_q (L.mol ⁻¹ .s ⁻¹)
quercetina	$4,2.10^9 \pm 0,10$
retinoato de quercetina	$8,7.10^8 \pm 0,70$
epicatequina	$2,9.10^9 \pm 0,02$
retinoato de epicatequina	$2,1.10^8 \pm 0,20$

Nota-se pela análise dos dados de constante de velocidade reportados na Tabela 11 que a esterificação dos flavonoides com o ácido retinóico promove uma diminuição da atividade antioxidante do fragmento fenólico no éster, condizente com a diminuição da capacidade redutora dos ésteres em comparação aos flavonoides precursores.

4.6 Cálculos teóricos empregando DFT

Foram feitos cálculos teóricos empregando DFT com a base B3LYP/6-31G(d) utilizando o Software GAUSSIAN 09[42], com a finalidade de se obter os valores de R_a e R_d para os ésteres conjugados, e seus precursores como o descrito por Martinez e colaboradores [5]. As geometrias otimizadas bem como os gráficos de contorno dos orbitais HOMO e LUMO para os novos compostos estudados neste trabalho estão ilustrados nas Figuras 52, 53 e 54.

Figura 52. Geometria otimizada e gráficos da superfície dos orbitais HOMO e LUMO para a molécula de diferulato de astaxantina (DFA).

Figura 53. Geometria otimizada e gráficos da superfície dos orbitais HOMO e LUMO para a molécula de retinoato de quercetina (RQ).

Figura 54. Geometria otimizada e gráficos da superfície dos orbitais HOMO e LUMO para a molécula de retinoato de epicatequina (RE).

Na Tabela 12 encontram valores de I , A , ω^+ , ω^- , R_d e R_a de uma série de antioxidantes conhecidos e dos compostos investigados nesse trabalho.

Tabela 12 - Energia de ionização (I), afinidade eletrônica (A), poder eletrodoador e poder eletroaceptor (ω^- e ω^+), e índices R_d e R_a . Adaptados de Martinez e colaboradores[5], comparados aos compostos de estudo desse trabalho.

	I (eV)	A (eV)	ω^-	ω^+	R_d	R_a
Na	5,14	0,54	3,46	0,62	1,00	0,18
F	17,54	3,40	13,80	3,40	3,99	1,00
β -caroteno	5,10	1,47	4,84	1,56	1,40	0,46
Zeaxantina	5,15	1,54	5,00	1,65	1,44	0,49
Cantaxantina	5,57	2,22	6,69	2,79	1,93	0,82
Vitamina E	6,70	-5,55	1,08	0,51	0,31	0,15
Vitamina C	8,53	-0,39	4,46	0,38	1,29	0,11
Astaxantina	5,70	2,42	7,26	3,20	2,10	0,94
DFA	5,50	2,21	6,66	2,80	1,92	0,82
Ác. Ferúlico	6,18	1,38	5,17	1,39	1,49	0,41
Ác. retinóico	6,36	1,07	4,80	1,08	1,38	0,32
Quercetina	6,60	0,33	4,03	0,57	0,17	1,17
QRE	6,12	1,19	4,84	1,19	1,40	0,34
Epicatequina	6,97	-0,89	3,19	0,15	0,92	0,43
ERE	6,11	1,07	4,67	1,08	1,35	0,31

A Figura 55 ilustra o mapa doador-aceptor para o DFA e seus precursores astaxantina e ácido ferúlico. É possível observar que o éster preparado encontra-se em uma posição intermediária entre seus precursores, com uma maior contribuição das características da astaxantina, pois o DFA teve um maior aumento do seu caráter aceptor de elétrons do que de seu caráter doador, mesmo com a proporção de 1:2 (astaxantina:ácido ferúlico). É evidente que a conjugação do ácido ferúlico com a astaxantina via ligação éster modifica acentuadamente as propriedades do fragmento

fenólico tornando-o com melhores características de antirredutor quanto comparado ao ácido fenólico livre. Analogamente, a porção carotenoide é modificada, em menor extensão, tornando-se mais antioxidante, refletindo estas propriedades na melhor atividade antirradical observada para o novo composto preparado.

Figura 55. Mapa doador-aceptor para o diferulato de astaxantina e seus precursores astaxantina e ácido ferúlico.

A Figura 56 ilustra o mapa doador-aceptor para o RQ e seus precursores quercetina e ácido retinóico. De acordo com o mapa, o éster RQ possui propriedades doadoras/aceptoras muito próximas as do ácido retinóico, ou seja, a esterificação modifica mais acentuadamente a porção fenólica (antioxidante) da molécula em comparação a modificação do fragmento poliênico (antirredutora).

Figura 56. Mapa doador-aceptor para o retinoato de quercetina e seus precursores ácido retinóico e quercetina.

Também é possível correlacionar os estudos eletroquímicos com o mapa, já que o éster RQ se mostrou menos redutor, compatível com um baixo R_d , o que refletiu nos experimentos envolvendo o radical 1-hidroxietila gerado por reação de Fenton, nos quais o novo composto mostrou-se menos pro-oxidante, já que sua capacidade de reduzir íons de ferro (III) é marcadamente diminuída.

Analogamente ao observado retinoato de quercetina, o mapa doador-aceptor para o RE, Figura 57, sugere que o éster sintetizado apresenta características similares ao seu precursor ácido retinóico, o que corrobora também com os resultados obtidos nos experimentos fotoquímicos e nos estudos eletroquímicos, isto é, o

fragmento fenólico torna-se ligeiramente menos antioxidante e o fragmento referente ao ácido retinóico menos antirredutor.

Figura 57. Mapa doador-aceptor para o retinoato de quercetina e seus precursores ácido retinóico e quercetina.

A Figura 58 ilustra o mapa doador-aceptor para as moléculas elencadas na Tabela 12 bem como para os novos compostos preparados.

Figura 58. Mapa doador-aceptor para os compostos listados na Tabela 12.

5 CONCLUSÕES

A reação de esterificação de ácidos fenólicos com a astaxantina foi obtida com sucesso empregando-se a rota de esterificação via cloreto de acila e a desproteção das hidroxilas fenólicas, protegidas com TBDMS, empregando Cs_2CO_3 apresentou rendimento quantitativo, sendo o rendimento global da esterificação de aproximadamente 80%. O éster diferulato de astaxantina (DFA) apresentou propriedades antioxidentes no fragmento fenólico, e antirredutoras no fragmento carotenoide, apresentando um efeito global antirradical superior ao efeito aditivo da combinação de seus precursores frente à desativação do oxigênio singleto excitado e captação do radical 1-hidroxietila.

Os ésteres retinoato de epicatequina (RE) e retinoato de quercetina (RQ) foram obtidos empregando-se condições de Steglich e similar procedimento de proteção/desproteção das hidroxilas fenólicas levando a obtenção dos novos derivados com rendimento global da esterificação ao redor de 60%. Similarmente ao diferulato de astaxantina, os ésteres fenólicos do ácido retinóico apresentaram propriedades antioxidantes e antirredutoras de seus precursores com significativo efeito global antirradical e diminuída ação pró-oxidativa em meio de geração de radicais catalisada pela presença de íons ferro. Em linhas gerais os novos compostos mantiveram as propriedades antirradicais (antioxidante e antirredutora) de seus precursores com significativa melhora na ação antirradical como previsto pelo cálculo dos valores de R_a e R_d , obtidos empregando-se DFT.

Os cálculos de R_a e R_d se mostraram uma eficiente ferramenta no desenho de novos antirradicais de dupla função e os ésteres preparados neste trabalho como promissores antirradicais com balanço lipofílico-hidrofílico para emprego em sistemas heterogêneos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HALLIWELL, B.; ZHAO, K.; WHITEMAN, M. The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? **Free Radical Research**, v. 33, p. 819-830, 2000.
2. PAN, M.; LAI, C.; HO, C. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. **Food & Function**, v. 1, p. 15-31, 2010.
3. BECKER, E. M.; NISSEN, L. R.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. **European Food Research and Technology**, v. 219, p. 561-571, 2004.
4. LUND, M. N.; HVIID, M. S.; SKIBSTED, L. H. The combined effect of antioxidants and modified atmosphere packaging on protein and lipid oxidation in beef patties during chill storage. **Meat Science**, v. 76, p. 226-233, 2007.
5. MARTINEZ, A.; RODRIGUES-GIRONÉZ, M. A.; COSTAS, M. Donator Acceptor Map for Carotenoids, Melatonin and Vitamins. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 112, p. 9037-9042, 2008.
6. GÁZQUEZ, J. L.; CEDILLO, A.; VELA, A. Electrodonating and electroaccepting powers. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 111, n.10, p. 1966-1970, 2007.
7. MARTÍNEZ, A.; Donator-acceptor map and work function for linear polyene-conjugated molecules. a density functional approximation study. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, p. 3212-3217, 2009.
8. MARTÍNEZ, A. Donator acceptor of psitacofulvins and anthocyanins: are they good antioxidant substance? **Journal of Physical Chemistry B**, v.113, p. 4915-4921, 2009.
9. MORTENSEN, A.; SKIBSTED, L. H. Relative stability of carotenoid radical cations and homologue tocopheroxyl radicals. A real time kinetic study of antioxidant hierarchy. **FEBS Letters**, v. 417, p. 261-266, 1997.
10. NAGUI, Y. M. A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1150-1154, 2000.
11. FOSS, B. J.; NADOLSKI, G.; LOCKWOOD, S. F. Hydrophilic carotenoid amphiphiles: Methods of synthesis and biological applications. **Mini-Reviews of Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 953-969, 2006.
12. LIANG, J.; TIAN, Y.; YANG, F.; ZHANG, J.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant synergism between carotenoids in membranes. Astaxanthin as a radical transfer bridge. **Food Chemistry**, v.115, p. 1437-1442, 2009.
13. MIN, D. B.; BOFF, J. M. **Lipid oxidation of edible oil, in Food Lipids, Chemistry, Nutrition and Biotechnology**. New York. Marcel Dekker, 2002. 1998 p.

14. CARDOSO, D.R.; OLSEN, K.; SKIBSTED, L. H. Mechanism of deactivation of triplet-excited riboflavin by ascorbate, carotenoids, and tocopherols in homogeneous and heterogeneous aqueous food model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6285-6291, 2007.
15. MARTIN, H.D.; KOCK, S.; SCHERRERS, R.; LUTTER, K.; WAGENER, T.; HUNDSDÖRFER, C.; FRIXEL, S.; SCHAPER, K.; ERNST, H.; SCHRADER, W.; GÖRNER, H.; STAHL, W. 3,3'-Dihydroxyisorenieratene, a Natural Carotenoid with Superior Antioxidant and Photoprotective Properties. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 48, n.2, p. 400-403, 2009.
16. KRISTENSEN, D.; HEDEGAARD, R. V.; NIELSEN, J. H.; SKIBSTED, L. H. Oxidative stability of buttermilk as influenced by the fatty acid composition of cow's milk manipulated by diet. **Journal of Dairy Research**, v. 71, p. 46-50, 2004.
17. CARLSEN, C.U.; MOLLER, J. K. S.; SKIBSTED, L. H. Heme-iron in lipid oxidation. **Coordination Chemical Reviews**, v. 249, p. 485-498, 2005.
18. ALMEIDA, N. E. C.; HOMEM-DE-MELLO, P.; KEUKELEIRE, D.; CARDOSO, D. R. Reactivity of beer bitter acids toward the 1-hydroxyethyl radical as probed by spin-trapping electron paramagnetic resonance (epr) and electrospray ionization-tandem mass spectrometry (esi-ms/ms). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 4183-4191, 2011.
19. CRUZ, L.; BORGES, E.; SILVA, A. M. S. Synthesis of a new (+)-catechin-derived compound: 8 vinylcatechin. **Letters in Organic Chemistry**, v. 5, p. 530-536, 2008.
20. KARAGIANNIDOU, E.; STORSETH, T. R.; SLIWKA, H.; MALTERUD, K. E.; PROFESSOR, M. T. A. Synthesis of two modified carotenoids and their behaviour during light exposure. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, p. 419-426, 2003.
21. FACHE, F.; SUZAN, N.; PIVA, O. Total synthesis of cimracemate B and analogs. **Tetrahedron Letters**, v. 61, p. 5261-5266, 2005.
22. JIANG, Z. Y.; WANG, Y.G. A mild, efficient and selective deprotection of t-butyl dimethylsilyl-protected phenols using cesium carbonate. **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 3859-3861, 2003.
23. KAJJOUT, M.; ZEMMOURI, R.; ROLANDO, C. An expeditious synthesis of quercetin 3-O-b-D-glucuronide from rutin. **Tetrahedron Letters**, v. 52, n.37, p. 4738-4740, 2011.
24. BONDAREV, S. L.; KNYKSHTO, V. N. Fluorescence and phosphorescence of rutin. **Journal of Luminescence**, v. 142, p. 236-240, 2013.
25. THE MERCK Index - **An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. 13 ed. Whitehouse Station: Merck, 2001, p. 1464
26. WEAST, R. C.; ASTLE, M. J. **Handbook of chemistry and physics**: a ready-reference book of chemical and physical data. Cleveland: CRC, 1979, p. C-306.

27. PELILLO, M.; CUVELIER, M. E.; BIGUZZI, B.; TOSCHI, T. G.; BERSET, C.; LERCKER, G. Calculation of the molar absorptivity of polyphenols by using liquid chromatography with diode array detection: the case of carnosic acid. **Journal of Chromatography A**, v. 1023, n. 2, p. 225-229, 2004.
28. LO, K. K. N. L.; LAND, E. J.; TRUSCOTT, T. G. Primary intermediates in the pulsed irradiation of retinoids. **Photochemistry and Photobiology**, v. 36, p. 139-145, 1987.
29. FREDERIKSEN, A. M.; FESTERSEN, R. M.; ANDERSEN, M. L. Oxidative reactions during early stages of beer brewing studied by electron spin resonance and spin trapping. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8514-8520, 2008.
30. ALMEIDA, N. E. C.; AGUIAR, I.; ZAWADZKI, A.; CARDOSO, D. R. Kinetics and Thermodynamics of 1-Hydroxyethyl Radical Reaction with Unsaturated Lipids and Prenylflavonoids. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 49, p. 14278-14287, 2014.
31. ANDERSEN, M. L.; SKIBSTED, L. H. Electron spin resonance spin trapping identification of radicals formed during aerobic forced aging of beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1272-1275, 1998.
32. OGUSUCU, R.; RETTORI, D.; MUNHOZ, D. C.; NETTO, L. E. S.; AUGUSTO, A. Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 42, p. 326-334, 2007.
33. ANOUAR, E.; KOSINOVA, P.; KOSLOWSKI, D.; MOKRINI, R.; DUROUX, J. L.; TROUILLAS, P. New aspects of the antioxidant properties of phenolic acids: a combined theoretical and experimental approach. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 11, n. 35, p. 7659-68, 2009.
34. SAKIHAMA, Y.; COHEN, M. F.; GRACE, S. C.; YAMASAH, H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. **Toxicology**, v. 177, p. 67-80, 2002.
35. JORGENSEN, K.; SKIBSTED, L. H. Carotenoid scavenging of radicals. Effect of carotenoid structure and oxygen partial pressure on antioxidative activity. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung**, v. 196, p. 423-429, 1993.
36. FOCSAN, A. L.; BOWMAN, M. K.; SHAMSHINA, J.; KRZYANIAK, M. D.; MAGYAR, A.; POLYAKOV, N. E.; KISPERT, L. D. Epr study of the astaxanthin n-octanoic acid monoester and diester radicals on silica-alumina. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 44, p. 13200-13210, 2012.
37. CARDOSO, D. R.; LIBARDI, S. H.; SKIBSTED, L. H. Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality. **Food & Function**, v. 3, n. 5, p. 487-502, 2012.
38. JONES, W. E.; FOX, M. A. Determination of excited-state redox potentials by phase-modulated voltammetry. **Journal of Physical Chemistry**, v. 98, p. 5095, 1994.

39. ARCE, V. B.; BERTOLOTI, S. G.; OLIVEIRA, F. J. V. E.; AIROLDI, C.; GONZALEZ, M. C.; ALLEGRETTI, P. E.; MÁRTIRE, D. O. Safranine-t triplet-state quenching by modified silica nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 37, p. 18122-18130, 2011.
40. ISLAM, S. D. -M.; FUJITSUKA, M.; ITO, O. Photochemical reactions of triplet state of safranine-T studied by transient absorption spectroscopy in visible/near-IR regions. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v.1, n.16, p. 3737-3742, 1999.
41. GUHA, S. N.; MITTAL, J. P. Pulse radiolysis study of one-electron reduction of safranine T. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions**, v. 93, n. 20, p. 3647-3652, 1997.
42. FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; MENUCCI, B.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; CARITO, M.; LI, X.; HRATCHIAN, H. P.; IZMAYLOV, A. F.; BLOIONO, J.; ZHENG, G.; SONNENBERG, J. L.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKA, H.; VREVEN, T.; MONTGOMERY, J. A.; PERALTA, E.; OGLIARO, F.; BEARPARK, M.; HEYD, J. J.; DROTHERS, E.; KUNDIN, K. N.; STAROVEROV, V. N.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A.; BURANT, J. C.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; REGA, N.; MILLAM, J. M.; KLENE, M.; KNOX, J. E.; CROSS, B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; MARTIN, R. L.; MOROKUMA, K.; ZAKRZEWSKI, V. G.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; FARKAS, O.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CIOSLOWSKI, J.; FOX, D. J. **Gaussian 09**. Revision A.01. Wallingford, 2013. Programa de computador.

ANEXO I

Espectro de ^1H RMN 600 MHz do éster DFA em $\text{DMSO-}d_6$ à 25°C.

Espectro de ^1H RMN 600 MHz do éster DFA, na região de 1,0 a 2,2 ppm, em $\text{DMSO-}d_6$ à 25°C.

Espectro de ^1H RMN 600 MHz do éster DFA, na região de 3,5 a 6,0 ppm, $\text{DMSO-}d_6$ à 25°C.

Espectro de ^1H RMN 600 MHz do éster DFA, na região de 6,0 a 8,0 ppm, em $\text{DMSO-}d_6$ à 25°C.

Espectro de ^1H RMN 600 MHz do éster DFA, na região de 8,5 a 10,3 ppm, em $\text{DMSO-}d_6$ à 25°C.

Espectro de ¹H RMN 500 MHz do éster retinoato de epicatequina em CD₃OD à 25°C.

Espectro de ^{13}C RMN 126 MHz do éster retinoato de epicatequina em CD_3OD à 25°C .

Espectro de COSY do éster retinoato de epicatequina em CD_3OD à 25°C .

Espectro de HSQC do éster retinoato de epicatequina em CD₃OD à 25°C.

Espectro de HMBC do éster retinoato de epicatequina em CD₃OD à 25°C.

Espectro de ^1H RMN 500 MHz do éster retinoato de quercetina em CD_3OD à 25°C . Espectro de COSY do éster retinoato de epicatequina em CD_3OD à 25°C .

Espectro de HSQC do éster retinoato de epicatequina em CD₃OD à 25°C. Espectro de HMBC do éster retinoato de epicatequina em CD₃OD à 25°C.

Curva de decaimento do espectro eletrônico de diferença de absorção das espécies transients do retinoato de quercetina ($\lambda_{\text{obs}} = 420 \text{ nm}$). Tempo de aquisição (0-1000 μs), gráfico inserido (0-100 μs). Energia do laser 12 mJ e $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$.

Curva de decaimento do espectro eletrônico de diferença de absorção das espécies transients do retinoato de quercetina ($\lambda_{\text{obs}} = 420 \text{ nm}$). Tempo de aquisição (0-1000 μs), gráfico inserido (0-100 μs). Energia do laser 12 mJ e $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$.