

# ESTUDO VOLTAMÉTRICO DE CITROFLAVONÓIDES

Luciana Gaspar Isaque

Mestrado em Química

Departamento de Química

FCTUC

2010



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



# Estudo voltamétrico de citroflavonóides

Luciana Gaspar Isaque

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química,  
Processos Químicos Industriais

Professora Doutora Ana Maria Oliveira Brett

**Julho de 2010**

**Universidade de Coimbra**

# Agradecimentos

---

Quero agradecer à minha orientadora Professora Doutora Ana Maria Oliveira Brett pelos seus ensinamentos, apoio e disponibilidade.

Aos meus colegas de laboratório do Instituto Pedro Nunes, em especial ao Victor Diculescu, por toda a ajuda e companhia.

Aos meus amigos por todo o apoio e amizade.

Agradeço aos meus pais por todo o esforço, carinho e compreensão.

# Resumo

---

O objectivo deste trabalho foi o estudo voltamétrico de citroflavonóides utilizando métodos voltamétricos para esclarecer os seus mecanismos de oxidação. O estudo voltamétrico da diosmetina, hesperidina, isoroifolina e linarina foi efectuado e revelou tratarem-se de processos de oxidação complexos e dependentes do pH.

No estudo dos diferentes citroflavonóides, observou-se que os mecanismos de oxidação consistem na oxidação do grupo substituinte do anel B e do grupo resorcinol no anel A. Os picos de oxidação ocorrem para pH superior a 3.50 pois o grupo resorcinol é oxidado a potenciais mais elevados e em solução aquosa não é possível a sua detecção com um eléctrodo de carbono devido à decomposição do solvente. O processo de oxidação do grupo catecol é reversível e ocorre para valores mais baixos de potencial.

# Abstract

---

The objective of this work was the voltammetric study of several citrusflavonoids using voltammetric methods to establish their oxidation mechanisms. The voltammetric study of diosmetin, hesperidin, isorhoifolin and linarin was done and revealed a complex and pH dependent oxidation process.

In the study of different citrusflavonoids, it was observed that the oxidation mechanism involved the oxidation of the substituent of ring B and the resorcinol group in ring A. The oxidation peaks occur at pH greater than 3,50 because the resorcinol group is oxidized at higher potentials and in aqueous solution is not possible to detect with a carbon electrode due to the decomposition of the solvent. The process of oxidation of the catechol group is reversible and occurs for lower values of potential.

# Índice

---

<b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO</b>	1
<b>1.1 Compostos fenólicos</b>	2
1.1.1 Flavonóides	4
1.1.2 Estrutura química e classificação	5
1.1.3 Citroflavonóides	8
1.1.4 Propriedades antioxidantes	10
1.1.5 Ingestão, absorção e metabolismo	12
1.1.6 Formação de dímeros	13
<b>1.2 Princípios de electroquímica</b>	14
1.2.1 Técnicas voltamétricas	16
1.2.1.1 Voltametria cíclica (CV)	17
1.2.1.2 Voltametria de impulso diferencial (DP)	20
1.2.1.3 Voltametria de onda quadrada (SWV)	21
<b>CAPÍTULO 2: EXPERIMENTAL</b>	23
<b>2.1 Reagentes e materiais</b>	24
<b>2.2 Célula electroquímica e eléctrodos</b>	25
<b>2.3 Procedimento experimental</b>	27
<b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÃO.</b>	28
<b>3.1 Estudo voltamétrico do ferrocianeto de potássio</b>	29
<b>3.2 Estudo voltamétrico da diosmetina</b>	32
<b>3.3 Estudo voltamétrico da hesperidina</b>	36
<b>3.4 Estudo voltamétrico da isoroifolina e da linarina</b>	38
<b>CAPÍTULO 4: CONCLUSÕES</b>	41
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	43

# **CAPÍTULO 1**

---

## **INTRODUÇÃO**

## 1.1 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são todos aqueles que, não sendo azotados, têm um ciclo ou ciclos aromáticos e são principalmente derivados do metabolismo do ácido xiquímico e/ou acetato. Estes compostos são classificados como metabolitos secundários das plantas estando presentes em frutas e vegetais e conferindo-lhes cor e sabor, funções de defesa ante herbívoros e agentes patogénicos, suporte mecânico, atracção de polinizadores ou dispersores de frutos e absorção de radiação ultravioleta [1].

Existe um grande interesse nos compostos bioquímicos como componentes bioactivos dos alimentos uma vez que estes compostos têm um efeito positivo contra certas doenças, algumas formas de cancro e doenças coronárias tendo também efeitos antialérgicos, antibacterianos, antivirais e acções vasodilatadoras [2-4]. Os fenóis podem actuar como removedores de radicais livres neutralizando espécies perigosas de oxigénio reactivo e quelatos de iões metálicos. O consumo de vegetais, fruta e vinho tinto como forma de prevenção de doenças deve-se em grande parte aos seus constituintes polifenólicos que têm propriedades antioxidantes.

Os principais compostos fenólicos, classificados de acordo com o número de átomos de carbono do esqueleto base, são os ácidos fenólicos, os flavonóides e os compostos poliméricos lignina e taninos.

O nome “ácidos fenólicos” descreve fenóis que possuem a funcionalidade do ácido carboxílico. No entanto, quando são descritos metabolitos de plantas referem-se a diferentes grupos de ácidos orgânicos. Os ácidos fenólicos são caracterizados pela presença de um único anel benzénico na sua molécula monomérica. Estes dividem-se em duas classes: uma com estrutura hidroxibenzóica,  $C_6-C_1$ , e outra com estrutura hidroxicinâmica,  $C_6-C_3$ , como é mostrado na figura 1.1 Em muitos casos, aldeídos análogos são também agrupados como ácidos fenólicos [5].

Dado que a base permanece sempre a mesma, é o número e as posições dos grupos hidróxilo no anel aromático que originam as diferenças entre eles. Aqueles que possuem dois grupos hidróxilo na posição *orto*-, o ácido cafeico por exemplo, são facilmente oxidáveis a quinonas. Existem diferentes técnicas e metodologias para o estudo analítico dos ácidos fenólicos que estão indicadas na bibliografia [5-7].

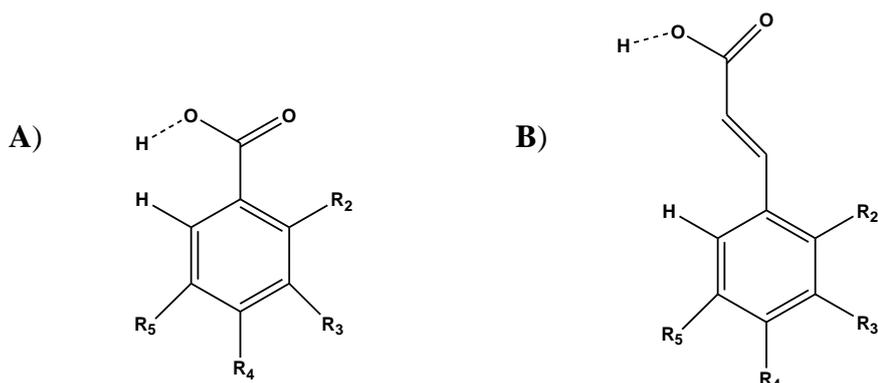


Figura 1.1 - Esquema geral das duas classes de ácidos fenólicos: A) estrutura hidroxibenzóica e B) estrutura hidroxicinâmica.

A estrutura química dos compostos fenólicos é especialmente adequada para exercer uma acção antioxidante (como dador de H ou electrões, ou como receptor de radicais livres). Em estudos *in vitro*, muitos compostos fenólicos naturais são melhor antioxidantes que as vitaminas E ou C. A sua capacidade de quelatar metais, especialmente cobre e ferro, faz com que actuem indirectamente como antioxidantes já que inibem a acção catalisadora dos metais na formação de radicais livres [8].

A remoção de radicais livres e as actividades antioxidantes dos compostos fenólicos dependem do arranjo dos grupos funcionais da estrutura nuclear do composto. A estrutura básica de todos os compostos fenólicos consiste na presença de um ou mais anéis benzeno hidroxilados. Tanto o número como a configuração desses grupos hidróxilo dadores de H são os fundamentos estruturais principais que influenciam na capacidade antioxidante dos polifenóis [9,10]. No entanto, as ligações duplas conjugadas, que permitem a deslocalização electrónica através da molécula, estabilizam o radical fenoxilo [11].

A actividade de um antioxidante determina-se por [1]:

- actividade como agente dador de H ou  $e^-$
- reactividade com outros antioxidantes
- potencial de transição metal-quelato
- local de interacção do radical antioxidante que é controlado pela sua habilidade para estabilizar e deslocalizar o electrão desemparelhado

O potencial dos compostos fenólicos para actuar como antioxidantes é determinado pelas suas actividades químicas em termos das suas propriedades redutoras como agentes dadores de H ou de electrões.

Vários estudos, entre os quais técnicas electroquímicas, foram realizados para estudar a actividade antioxidante dos compostos fenólicos [12-16].

Em geral a oxidação de compostos fenólicos produz radicais fenóxilo instáveis que podem ser oxidados a quinonas ou podem reagir entre eles para formar dímeros que depois polimerizam em compostos poliaromáticos [17].

A facilidade de oxidação dos compostos fenólicos é de grande importância para a sua eficiência como antioxidantes daí o estudo dos seus potenciais redox [18-21].

### **1.1.1 FLAVONÓIDES**

Flavonóide (do latim *flavus* “amarelo” é o termo genérico com que se identificam uma série de metabolitos secundários das plantas.

Os flavonóides são compostos fitoquímicos pertencentes à classe dos compostos fenólicos que se diferenciam entre si pela sua estrutura química e características particulares. Existem mais de 6000 flavonóides quimicamente diferenciáveis presentes naturalmente nas plantas. Estes compostos encontram-se em frutas, vegetais, sementes e flores, assim como em vários sumos e bebidas naturais, sendo importantes constituintes da dieta humana [22,23].

## 1.1.2 ESTRUTURA QUÍMICA E CLASSIFICAÇÃO

Os flavonóides pertencem a uma subclasse de polifenóis caracterizados por possuir 15 carbonos. A sua estrutura geral é formada por um anel A, derivado da cadeia policetídica, um anel B, derivado do ácido xiquímico e três átomos de carbono que unem os anéis A e B, correspondentes à parte alquílica do fenilpropano, figura 1.2. É por isso que são conhecidos como  $C_3-C_6-C_3$ .

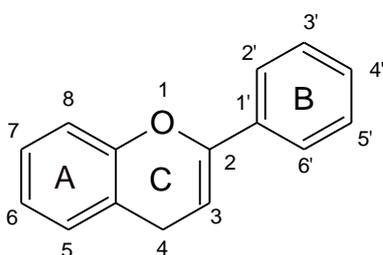


Figura 1.2 - Estrutura geral de um flavonóide.

A análise das estruturas de diferentes classes de flavonóides mostra claramente que na maioria dos flavonóides o anel A é um resorcinol enquanto que o anel B é um derivado do catecol, unidos por um anel pirano, figura 1.3.

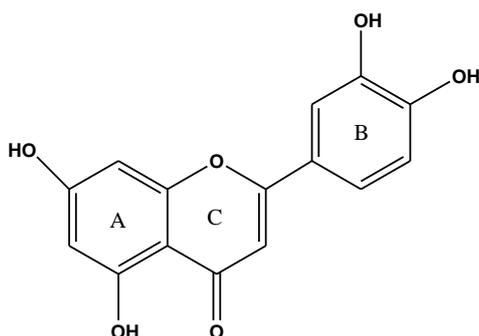
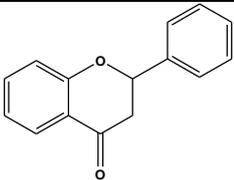
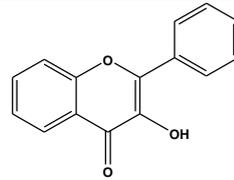
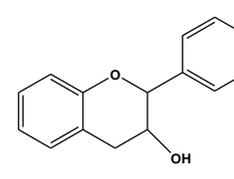
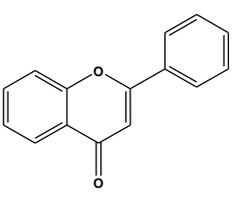
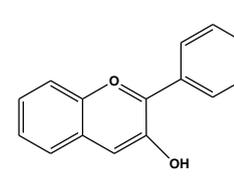
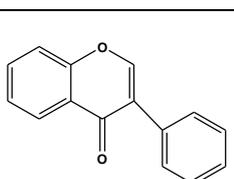


Figura 1.3 - Estrutura de um flavonóide onde se mostra o grupo catecol no anel B e o grupo resorcinol no anel A.

A estrutura pode conformar um heterociclo ( $\gamma$ -pironas) que é a mais abundante, ou uma cadeia aberta, as chalconas. A classificação dos flavonóides está baseada principalmente nas modificações existentes no anel C, particularmente no seu estado de oxidação. Esta classificação faz a distinção entre flavonol, flavanol, flavanona, flavona, isoflavona e antocianina [24-26].

A tabela 1.1 apresenta as seis principais subclasses de flavonóides bem como os seus compostos e fontes dietéticas.

Tabela 1.1 - Classificação dos flavonóides.

Subclasse	Estrutura	Exemplo	Fontes dietéticas
<b>flavanona</b>		hesperidina naringenina, neohesperidina .narirutina	laranja limão menta
<b>flavonol</b>		compferol quercetina mirecetina	cebola brócolos maçã cereja
<b>flavanol</b>		catequina epicatequina galocatequina procianidina	maçã chá verde chá preto coco
<b>flavona</b>		apigenina diosmina luteolina rutina	vinho tinto salsa aipo casca de frutas pimentão vermelho mel
<b>antocianidina</b>		cianidina delfinidina	cereja uva amora framboesa repolho
<b>isoflavona</b>		genisteína daidizeína	soja ervilhas

As principais características estruturais dos flavonóides responsáveis pelas suas propriedades redutoras são a substituição do grupo catecol no anel B, que conduz à formação de radicais fenóxilo estáveis, uma dupla ligação 2,3 insaturada com o grupo carbonilo no carbono na posição 4 no anel C e a presença combinada do grupo 3-hidróxilo com a dupla ligação por ressonância para a deslocalização electrónica [27].

Flavanona: As flavanonas apresentam o anel B unido ao anel C através de C<sub>2</sub>, um grupo cetónico na posição do C<sub>4</sub> e não apresenta insaturação no anel C.

Flavonol: Os flavonóis apresentam uma estrutura planar com uma dupla ligação na posição C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> do anel C o que confere insaturação ao anel; a conexão do anel B ao anel C ocorre através de C<sub>2</sub> e apresenta um grupo cetónico na posição C<sub>4</sub>.

Flavanol: Os flavanóis apresentam um grupo hidróxilo no C<sub>3</sub> e têm o anel B unido ao anel C através de C<sub>2</sub>. Não apresentam insaturação no anel C.

Dentro do grupo dos flavanóis existem as proantocianidinas, que são polímeros de catequinas. As proantocianidinas são compostos que liberta antocianidinas quando aquecidas em meio fortemente ácido e alcoólico, mediante a ruptura das ligações entre as unidades monoméricas. Consoante se liberte cianidina ou delfinidina, estas moléculas recebem o nome de procianidinas ou prodelfinidinas. As primeiras são polímeros de catequina e epicatequina e as segundas são constituídas por galocatequinas e epigalocatequinas [28].

Flavona: As características estruturais das flavonas são a dupla ligação entre os C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> que lhes conferem insaturação no anel C, um grupo cetónico no C<sub>4</sub>, e a união do anel B ao anel C através do C<sub>2</sub>.

Antocianidina: Apresentam o anel B ligado ao anel C através de C<sub>2</sub>, insaturação no anel C devido a duas ligações duplas, C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>, e um grupo hidróxilo no C<sub>3</sub>.

Isoflavona: Este tipo de flavonóides tem o anel B ligado ao anel C através de C<sub>3</sub>, apresenta insaturação no anel C devido à dupla ligação entre os C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> e também possui um grupo cetónico no C<sub>4</sub>.

Os flavonóis e as flavonas possuem açúcares unidos preferencialmente ao C<sub>3</sub>, ainda que também possam apresentar-se unidos ao C<sub>7</sub> do anel A, pelo que estes compostos encontram-se comumente como O-glicósidos sendo a D-glucose o resíduo açúcar mais frequente. Outros possíveis resíduos de açúcares são a D-galactose, a L-ramnose, a L-arabinose, a D-xilose, bem como o ácido D-glucurónico. A molécula sem açúcares ligados é conhecida como aglicona. Os compostos glicosilados são mais solúveis em água do que a sua respectiva aglicona [29].

### 1.1.3 CITROFLAVONÓIDES

Nas frutas cítricas, os flavonóides são identificados como flavanonas, flavonas e flavonas altamente metoxiladas, também conhecidas como polimetoxiladas (PMF). A figura 1.4 apresenta os principais flavonóides cítricos.

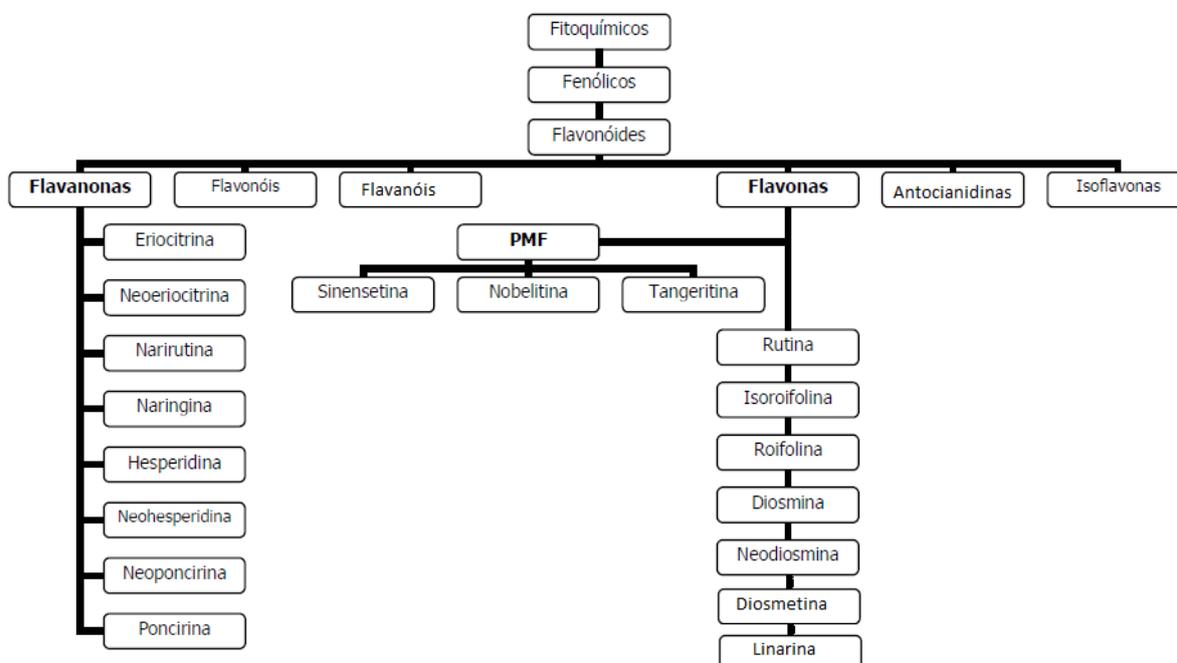


Figura 1.4 - Esquema dos principais flavonóides cítricos.

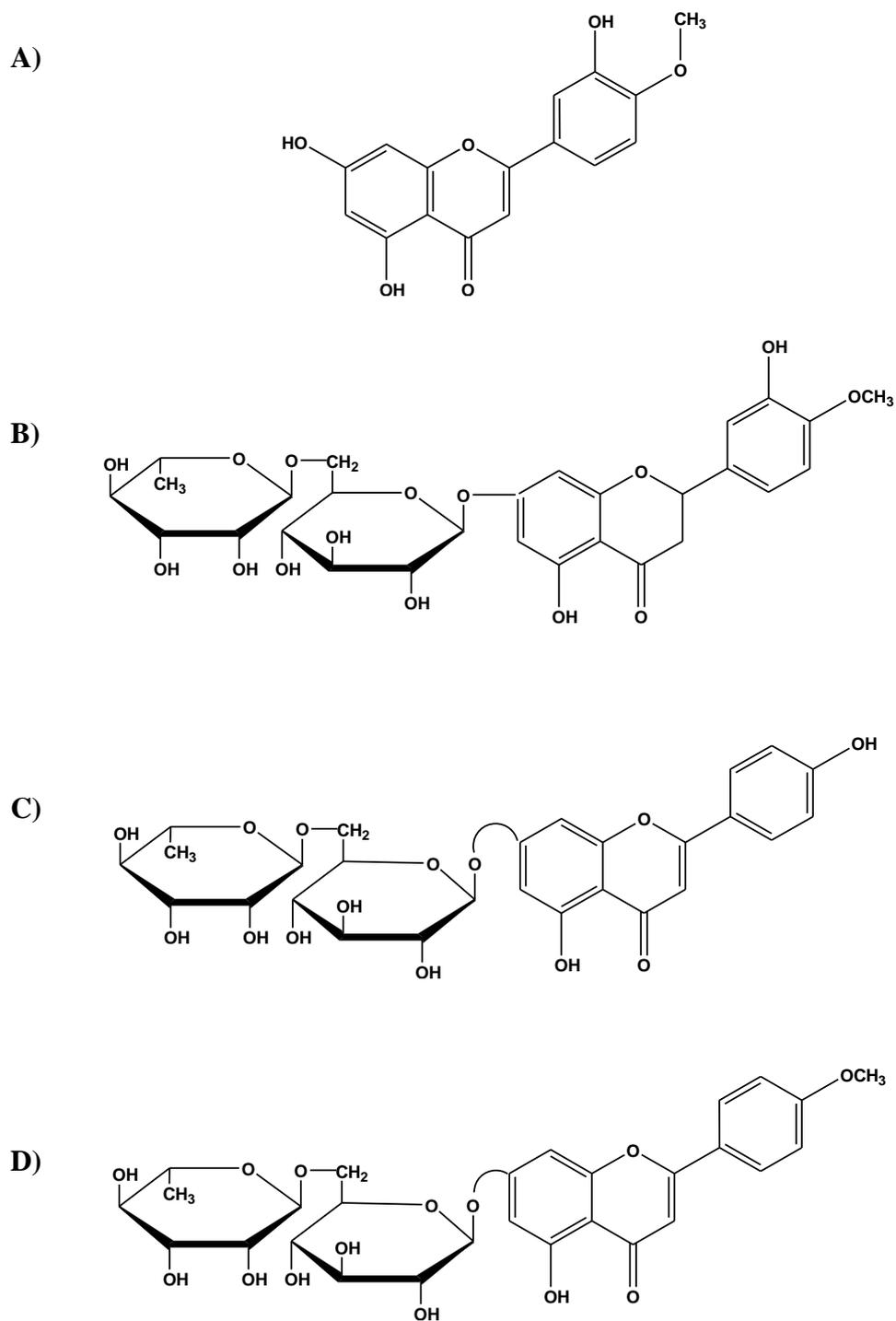


Figura 1.5 - Estruturas dos flavonóides cítricos estudados: A) diosmetina, B) hesperidina, C) isoroifolina, D) linarina.

No presente trabalho foram estudadas a flavanona hesperidina e as flavonas diosmetina, linarina e isoroifolina cujas estruturas se encontram representadas na figura 1.5

Estes compostos encontram-se nas diferentes partes da fruta e em diferentes concentrações. Estas concentrações variam de acordo com o clima, variedade da fruta, época da colheita entre outros factores [30].

A hesperidina, forma glicosilada da hesperitina, é o mais abundante flavonóide encontrado nas frutas cítricas, principalmente laranjas e tem-lhe sido atribuídas propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, anti-hipertensivas e hipolipidémicas.

#### **1.1.4 PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES**

Hoje em dia, os antioxidantes têm um papel importante para a saúde humana estando a ser levados em conta nas recomendações alimentares, no desenvolvimento de alimentos funcionais e na extracção de novos compostos potencialmente terapêuticos de plantas medicinais. Frutas, vegetais, cereais e certas bebidas são ricos em flavonóides, compostos da família polifenólica de fotoquímicos antioxidantes.

A capacidade dos flavonóides actuarem como antioxidantes em sistemas biológicos já foi reconhecida. Os flavonóides exibem actividades biológicas, incluindo acções anti-alérgicas, anti-virais, anti-inflamatórias e vasodilatadoras nas plantas [31-34].

Os flavonóides possuem estrutura ideal para a redução da formação de radicais livres sendo antioxidantes mais eficazes que as vitaminas C e E.

Na oxidação ocorre a transferência de electrões de um átomo para outro e representa uma parte essencial da vida aeróbia e do metabolismo humano. A respiração é um processo oxidativo importante na vida, onde a glucose e os ácidos gordos são transformados em energia. Esta transformação ocorre no interior da célula, na mitocôndria, onde é produzido ATP. Durante a respiração é consumido oxigénio e gerado ATP, ficando como resíduos dióxido de carbono e água. Neste processo são

também produzidas espécies reactivas de oxigénio denominadas radicais livres.

A actividade antioxidante dos flavonóides depende da sua estrutura e pode ser determinada por 5 factores:

- reactividade como agente doador de H e electrões
- estabilidade do radical flavanoil formado
- reactividade frente a outros antioxidantes
- capacidade de quelatar metais de transição
- solubilidade e interacção com as membranas

De um modo geral, quanto maior o número de hidroxilos, maior a actividade como agente doador de H e electrões. Flavonóides monohidroxilados apresentam actividade muito baixa. De entre os flavonóides dihidroxilados, destacam-se aqueles que possuem o grupo catecol (3',4'- dihidroxi) no anel B que confere maior estabilidade à forma radical e participa na deslocalização dos electrões. Os flavonóides com múltiplos hidroxilos como a quercetina, miricetina e luteolina possuem forte actividade antioxidante quando comparados ao  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico e  $\beta$ -caroteno.

O comportamento electroquímico dos flavonóides foi estudado por vários autores [35-40]. Os flavonóides podem ser electroquimicamente oxidados e a maioria mostra reacções de oxidação. O mecanismo de acção predominante é provavelmente através da doação de um electrão a um catião radical resultando na formação de uma semiquinona que pode doar mais electrões para formar a quinona, figura 1.6.

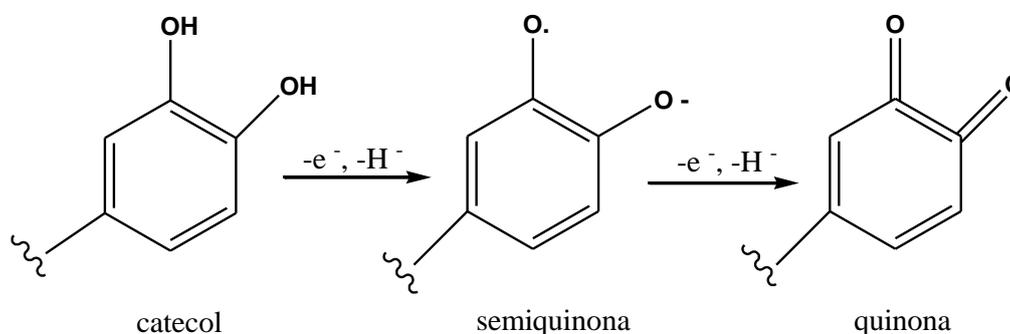


Figura 1.6 - Mecanismo de oxidação do anel B dos flavonóides.

Tendo em conta a informação encontrada na literatura sobre a relação entre o potencial de oxidação e o poder antioxidante dos flavonóides, *i.e.*, quanto mais baixo for o potencial de oxidação maior é o seu poder antioxidante, verificou-se que os flavonóides exibem diferentes potenciais de oxidação e conseqüentemente, dependendo da subclasse a que pertencem e dos grupos substituintes que possuem, apresentam diferente poder antioxidante.

Os métodos electroquímicos são muito importantes na caracterização destes antioxidantes. A capacidade dos antioxidantes para serem oxidados em eléctrodos inertes permite a sua monitorização usando técnicas electroquímicas em conjunto com as técnicas de separação por cromatografia.

### **1.1.5 INGESTÃO, ABSORÇÃO E METABOLISMO**

Os flavonóides são pigmentos naturais presentes em vegetais que protegem o organismo dos danos produzidos por agentes oxidantes como raios ultravioleta, poluição ambiental e substâncias químicas presentes nos alimentos. A ingestão humana estimada de flavonóides varia de 1 a 650 mg por dia e apesar de já reconhecida a sua importância biológica ainda não foram estabelecidas recomendações para a ingestão destes compostos. O que se tem observado em estudos actuais é que quanto maior a ingestão de flavonóides, menor é o risco de algumas doenças crónicas. Uma vez que organismo humano não pode produzir estas substâncias químicas protectoras estas devem ser obtidas através da alimentação ou na forma de suplementos estando amplamente distribuídas em plantas, frutas, verduras e em diversas bebidas. As fontes alimentares principais dos flavonóides são, entre outras, o chá preto, a cebola, a maçã, a pimenta preta e as bebidas alcoólicas como o vinho e a cerveja [41].

Os flavonóides não possuem as características das vitaminas: não são aminas e pertencem a outro grupo químico mas, apesar de serem considerados compostos não nutrientes, sabe-se que uma parte é absorvida pelo organismo e a parte não absorvida é excretada pela urina.

O mecanismo de absorção e acção dos flavonóides no organismo ainda não está totalmente esclarecido. No intestino delgado a absorção dos flavonóides parece ocorrer através da especificidade das enzimas intestinais pela molécula de açúcar ligada ao composto. No entanto, alguns estudo têm sugerido que parte dos flavonóides ingeridos são metabolizados pela microflora no cólon uma vez que a absorção é incompleta e até mesmo poderiam influenciar a composição da microflora intestinal. Então, uma parte dos flavonóides ingeridos seria absorvido e outra parte desempenharia a sua acção no próprio tracto intestinal [42].

### 1.1.6 FORMAÇÃO DE DÍMEROS

Geralmente a oxidação de compostos fenólicos produz radicais fenóxilo instáveis que podem ser oxidados a quinonas ou podem reagir entre eles e formar dímeros que depois polimerizam em compostos poliaromáticos. A maioria dos dímeros é formada por flavona-flavona, flavona-flavanona, flavanona-flavanona e mais raramente os dímeros de chalconas e de isoflavonas. Na figura 1.7 está representado um dímero de flavonóides.

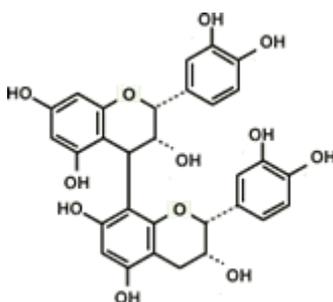


Figura 1.7 - Dímero de flavonóides.

Quando as duas unidades são iguais, constituem os bisflavonóides e quando as duas unidades são diferentes, os biflavonóides. As ligações entre as unidades flavonoídicas podem ser C-C ou C-O-C envolvendo os anéis A, B ou C dos monómeros. A primeira biflavona foi isolada em 1929 e é conhecida como gígentina [43].

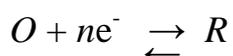
## 1.2 PRINCÍPIOS DE ELECTROQUÍMICA

Neste capítulo descrevem-se as técnicas electroquímicas que foram utilizadas no presente trabalho.

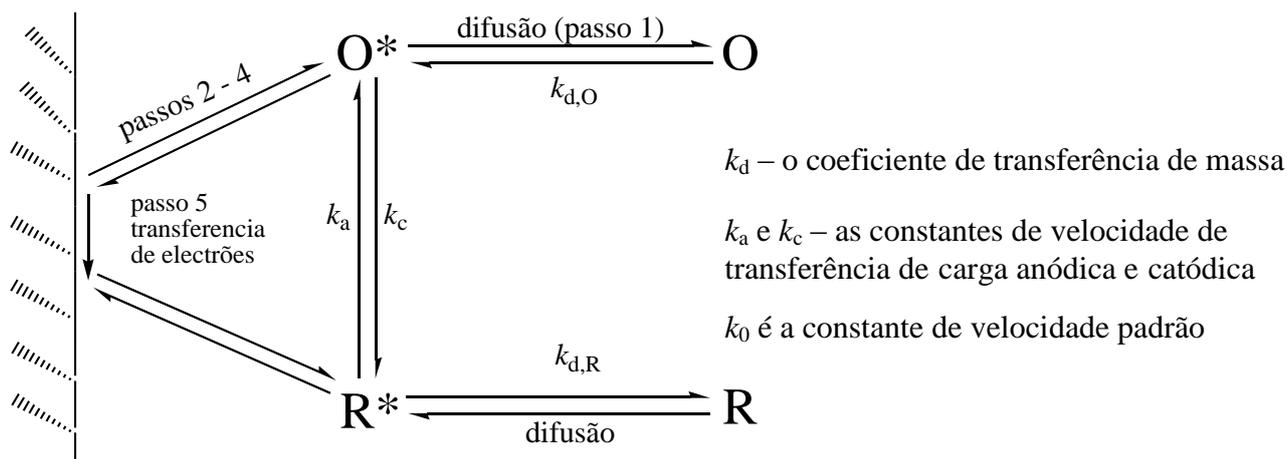
A electroquímica é o ramo da Química que estuda as alterações químicas provocadas pela passagem de corrente eléctrica e a produção de energia eléctrica associada à separação de carga que muitas vezes leva à transferência de carga. Esta transferência de carga pode ocorrer homogeneamente em solução (reacção de oxidação-redução) ou heterogeneamente na interface entre duas fases químicas (reacção de eléctrodo) [44,45].

Os eléctrodos encontram-se ligados por meios condutores, tanto na solução (através do *electrólito de suporte* – transporte iónico) como externamente (através de fios condutores) de modo a que a carga possa ser transportada. Em todos os processos electroquímicos o *eléctrodo de trabalho* é o eléctrodo onde ocorre a reacção electroquímica. O potencial deste eléctrodo é controlado através do *eléctrodo de referência* com a ajuda de um potenciostato. O eléctrodo de referência usado na experiência deverá possuir uma impedância elevada de tal modo a não passar corrente por ele. A corrente da célula electroquímica flui entre o eléctrodo de trabalho e o *eléctrodo auxiliar* através do electrólito de suporte.

Numa experiência electroquímica deverá ser considerado o transporte das espécies para a superfície do eléctrodo e a reacção de transferência de electrão que aí ocorre. A maioria dos processos de transferência de carga envolve a transferência de electrões. No caso das espécies oxidadas, *O* e reduzidas, *R*, a reacção de redução é representada da seguinte maneira:



Onde  $O$  recebe  $n$  electrões para se transformar em  $R$ . O par  $O | R$  tem uma energia denominada por energia redox,  $E_{\text{redox}}$  que pode ser relacionada com o potencial de eléctrodo.



Passo 1 - difusão

Passo 2 - rearranjo da atmosfera iónica

Passo 3 - reorientação dos dipolos do solvente

Passo 4 - alterações nas distâncias entre o ião central e os ligandos

Passo 5 - transferência do electrão

Figura 1.8 - Esquema da transferência de electrão num eléctrodo.

Considera-se, em todas as experiências electroquímicas, que durante a reacção de oxidação o eléctrodo de trabalho funciona como receptor de electrões transferidos e a corrente aplicada, corrente anódica,  $I_a$ , tem um valor positivo. Durante a reacção de redução o eléctrodo de trabalho funciona como dador de electrões e a corrente registada, corrente catódica,  $I_c$ , tem um valor negativo.

## 1.2.1 TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS

A voltametria consiste na medição da corrente que flui através do eléctrodo de trabalho em função de um potencial aplicado. Este potencial dá origem a uma corrente faradaica,  $I_f$ , que está directamente relacionada a transferência de carga e a uma corrente capacitiva  $I_c$ , necessária para organizar as moléculas e os iões presentes na dupla camada do eléctrodo.

A corrente total registada é:

$$I_t = I_c + I_f$$

A forma como o potencial é aplicado e, conseqüentemente, a forma como o sinal analítico (corrente) é adquirido irá denominar o tipo de técnica voltamétrica em questão sendo as mais comuns a voltametria cíclica e as voltametrias de onda quadrada e de impulso diferencial. A forma de resposta da corrente destas técnicas está representada na tabela 1.2.

Tabela 1.2 - Forma de aplicação do potencial para cada tipo de voltametria.

Tipo de voltametria	Sinal de excitação	Corrente resultante
<b>Voltametria cíclica</b>		
<b>Voltametria de impulso diferencial</b>		
<b>Voltametria de onda quadrada</b>		

### 1.2.1.1 VOLTAMETRIA CÍCLICA (CV)

A voltametria cíclica (CV – “Cyclic Voltammetry”) é a técnica mais usada para obter informações qualitativas sobre os processos electroquímicos. Esta técnica fornece informações acerca da termodinâmica de processos redox, da cinética de reacções heterogéneas de transferência de electrões e de reacções químicas acopladas a processos adsorptivos. Nesta técnica, quando se atinge um valor de potencial máximo,  $E_{\text{máx}}$ , o sentido do varrimento inicial é invertido, figura 1.9.

O potencial aplicado ao eléctrodo varia de forma linear a uma velocidade de varrimento constante,  $v = dE / dt$ , entre um potencial inicial ( $E_i$ ), e um potencial final ( $E_f$ ), previamente escolhidos. O varrimento prossegue assim, variando entre  $E_i$  e  $E_f$ . O sentido de varrimento do potencial pode ser positivo ou negativo.

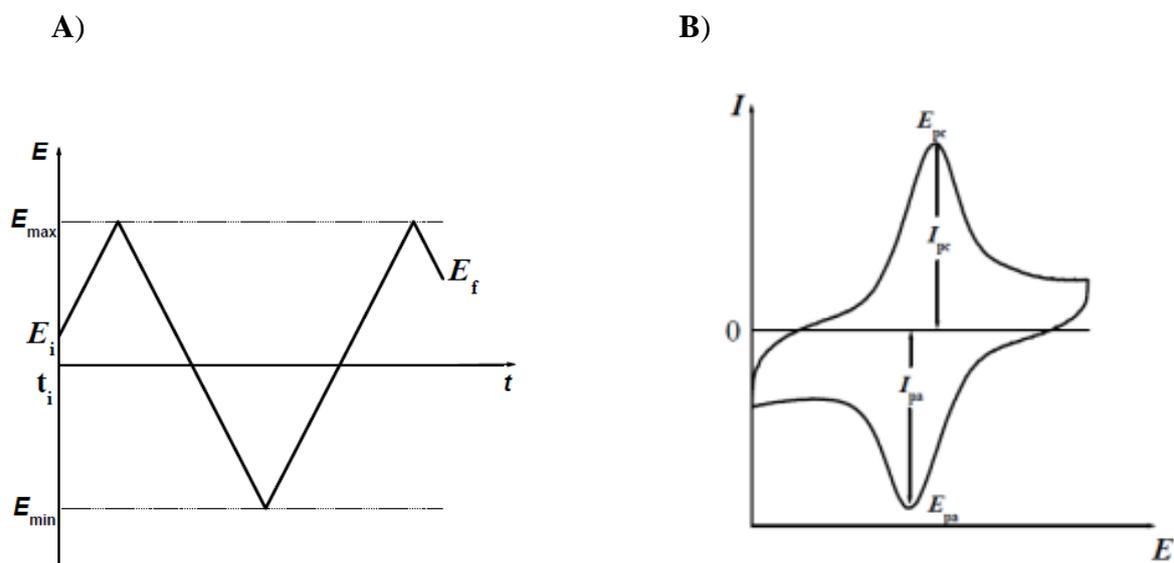


Figura 1.9 - A) Variação do potencial com o tempo em voltametria cíclica.  $E_i$  – potencial inicial,  $E_f$  – potencial final,  $E_{\text{max}}$  – potencial máximo,  $E_{\text{min}}$  – potencial mínimo; B) Voltamograma cíclico para uma reacção reversível.

A figura 1.9 A) mostra a função de potencial aplicada ao eléctrodo de trabalho nas técnicas voltamétricas de varrimento linear. O sentido de varrimento do potencial pode ser positivo ou negativo.

O gráfico resposta, corrente em função do potencial, chama-se *voltamograma cíclico*. Na figura 1.9 B) está representado um voltamograma típico para um processo de eléctrodo reversível. Os respectivos parâmetros característicos, que podem ser obtidos graficamente com relativa facilidade são chamados potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ); intensidade máxima de corrente que resulta da reacção de oxidação ou pico de corrente anódica ( $I_{pa}$ ); potencial de pico catódico ( $E_{pc}$ ) e intensidade máxima de corrente que resulta da reacção de redução ou pico de corrente catódica ( $I_{pc}$ ). As correntes de pico têm uma relação de proporcionalidade com a velocidade da reacção de transferência de carga e com a concentração em solução da espécie que sofre essa reacção.

A voltametria cíclica permite fazer o diagnóstico da reversibilidade, da presença de passos químicos associados às transferências electrónicas e verificar a ocorrência de adsorção do reagente ou dos produtos no eléctrodo de trabalho. A principal utilização tem sido para diagnosticar mecanismos de reacções electroquímicas e para a identificação de espécies presentes em solução.

#### a) TRANSFERÊNCIA ELECTRÓNICA REVERSÍVEL

Certas condições são necessárias para que um determinado sistema electroquímico possa ser considerado como tendo um comportamento reversível. Os critérios de diagnóstico para as reacções reversíveis são:

$$I_p \sim v^{1/2}$$

$E_p$  independente de  $v$

$$\Delta E_p = | E_{pa} - E_{pc} | = 57/n \text{ (mV)}$$

$$| E_p - E_{p/2} | = 56,6/n \text{ (mV)}$$

$$| I_{pa} / I_{pc} | = 1$$

O valor de  $57/n$  (mV) do terceiro critério é o valor ideal medido quando  $E_\lambda$  ultrapassa, pelo menos em 150 mV, o valor de  $E_{pc}$ . Na realidade, o valor experimental

de  $\Delta E_p$  vem muitas vezes afectado por distorções nos picos devidas aos efeitos da resistência da solução. Este efeito torna-se mais importante quando são utilizadas velocidades de varrimento elevadas.

A aplicação dos critérios de reversibilidade permite calcular o número de electrões transferidos no processo. Por outro lado, se a reacção for reversível, o potencial formal de redução,  $E^{\circ}$ , pode ser estimado facilmente:

$$E^{\circ} = \frac{E_{pc} + E_{pa}}{2}$$

#### b) TRANSFERÊNCIA ELECTRÓNICA IRREVERSÍVEL

Se a velocidade da reacção de transferência electrónica for lenta relativamente à escala de tempo da experiência (e relativamente à velocidade de transporte de massa por difusão) então, as concentrações das espécies intervenientes na reacção de eléctrodo não são *Nernstianas*. O efeito qualitativo será o desvio do pico catódico para potenciais mais negativos e do pico anódico para potenciais mais positivos.

Por isso, um sistema que a baixa velocidade de varrimento se comporta como reversível, pode mostrar-se não-reversível quando a velocidade de varrimento aumenta.

Os critérios de diagnóstico para reacções irreversíveis são [58]:

$$\left| E_p - E_p/2 \right| = 47,7/(\alpha n') \text{ (mV)}$$

$$\left| \partial E_{pa}/\partial \log v \right| = (29,6/\alpha n) \text{ mV}$$

O voltamograma cíclico de um sistema electroquímico irreversível pode apresentar picos de corrente que não têm associados qualquer pico no varrimento inverso. A região de escala de tempo (ou de  $v$ ) intermédia entre a dos processos reversível e irreversível é denominada de *quasi-reversível*. Em sistemas quasi-reversíveis, observa-se um pico reverso, mas com  $\Delta E_p > 57/n$  mV.

### 1.2.1.2 VOLTAMETRIA DE IMPULSO DIFERENCIAL (DPV)

Na voltametria de impulso diferencial (DPV - “*Differential Pulse Voltammetry*”) são aplicados ao eléctrodo de trabalho, pequenos impulsos de amplitude crescente,  $\Delta E_p$ , com aumentos sempre iguais sobrepostos a uma escada de potencial com degrau  $\Delta E_s$ , figura 1.10. A corrente é medida duas vezes, uma imediatamente antes da aplicação do impulso e outra no final deste. A diferença entre as duas correntes é o valor de corrente registado num voltamograma de impulso diferencial. Sendo esta voltametria uma técnica diferencial, a resposta assemelha-se à primeira derivada de um voltamograma diferencial, ou seja, um pico. O potencial de pico  $E_p$ , pode ser identificado aproximadamente com  $E_{1/2}$ .

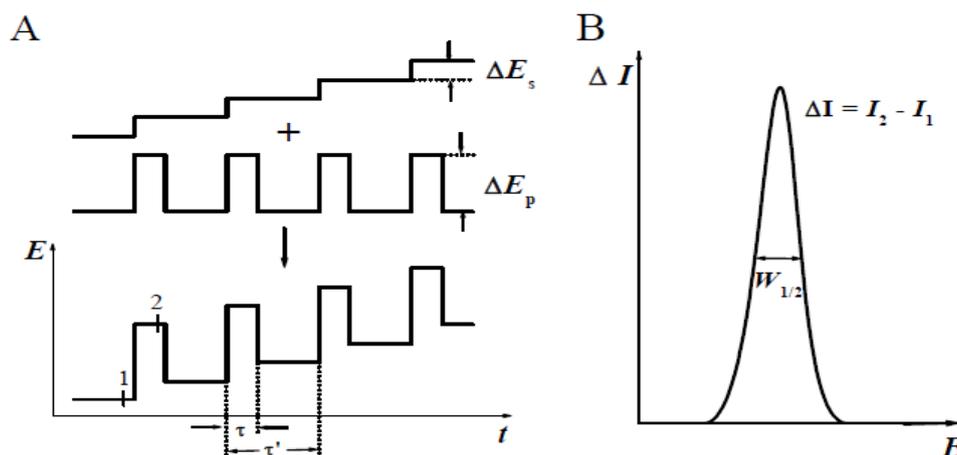


Figura 1.10 - DPV. A) Esquema de aplicação de potenciais; B) Resposta típica.

À medida que a irreversibilidade aumenta,  $E_p$  afasta-se de  $E_{1/2}$  e o pico torna-se mais largo havendo uma diminuição da sua altura.

Para se escolher a amplitude do impulso a aplicar, deve ter-se em consideração a reacção em estudo e a sensibilidade exigida. Amplitudes elevadas geram correntes capacitivas residuais que podem impossibilitar a detecção da corrente faradaica.

Para amplitudes de impulso pequenas, a largura a meia altura do pico de corrente,  $W_{1/2}$ , é inversamente proporcional ao número de electrões transferidos:

$$W_{1/2} = 3,52RT / nF$$

o que permite caracterizar o mecanismo da reacção de transferência de carga. A intensidade do pico de corrente  $I_p$  é proporcional à concentração do analito, mas também depende da velocidade da reacção electroquímica.

### 1.2.1.3. VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA (SWV)

A voltametria de onda quadrada (SWV - “*Square Wave Voltammetry*”) é uma técnica que tem a vantagem de poder fazer análises a velocidades elevadas com velocidades de varrimento efectivas da ordem de  $1 \text{ Vs}^{-1}$ , diminuindo o consumo das espécies electroactivas a analisar e reduzindo o bloqueio da superfície do eléctrodo sem haver perda da resolução dos picos, figura 1.11.

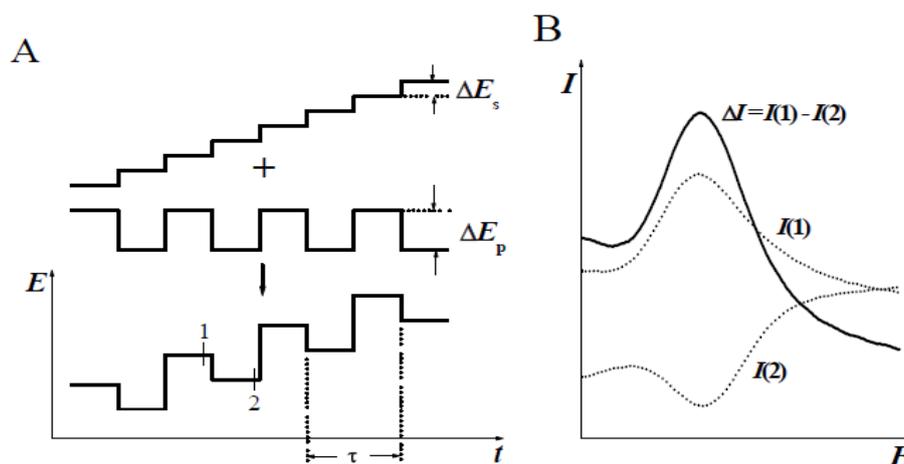


Figura 1.11 - SWV. A) Esquema de aplicação de potenciais; B) Resposta típica.

Nesta técnica é aplicado ao eléctrodo, durante a primeira metade do ciclo, um impulso de potencial positivo seguindo-se da aplicação de um impulso de potencial negativo na restante metade. A leitura da corrente é medida antes do fim de ambos os impulsos (positivo e negativo) em cada ciclo.

A *corrente total*,  $\Delta I = I_t$  registada corresponde à diferença entre a corrente registada no final do impulso de potencial directo  $I(1)$  – corrente directa ( $I_f$  – forward current) e a corrente registada no final do impulso inverso  $I(2)$  – corrente inversa ( $I_b$  – backward current). Uma vez que  $I(2)$  possui sinal contrário a  $I(1)$ , para sistemas reversíveis,  $\Delta I = I(1) - I(2)$  é maior que  $I(1)$ .

# **CAPÍTULO 2**

---

## **EXPERIMENTAL**

## 2.1 REAGENTES E MATERIAIS

Neste capítulo apresenta-se uma descrição dos reagentes, soluções e condições experimentais utilizadas ao longo deste trabalho, nomeadamente, para o estudo voltamétrico do ferrocianeto de potássio e citroflavonóides por voltametria cíclica, voltametria de impulso diferencial e voltametria de onda quadrada.

O ferrocianeto de potássio,  $K_4[Fe(CN_6)].3H_2O$ , usado como modelo, foi adquirido à Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha.

Os citroflavonóides hesperidina, hesperetin-7-O-rutinoside, de 98,5% de pureza; isoroifolina, apigenin-7-O-rutinoside, 98,5% pureza; diosmetina, 3',5,7-trihydroxy-4-methoxyflavone, 99% pureza e linarina, acacetin-7-O-rutinoside, 99% pureza foram adquiridos à Extrasintese, França.

Todos os reagentes necessários para preparar as soluções tampão, assim como o etanol utilizado eram da Merck, de qualidade analítica.

As soluções tampão foram preparadas usando água desionizada ultrapura obtida pelo sistema Millipore Milli-Q System (condutividade  $< 0,1 \mu S \text{ cm}^{-1}$ ), Millipore S.A., Molsheim, França.

As soluções padrão de flavonóides de concentração  $10 \mu M$  foram preparadas em etanol/água 50:50 (v:v).

A solução padrão de ferrocianeto de potássio tinha uma concentração de 10 mM.

Todas as experiências voltamétricas foram efectuadas à temperatura ambiente e o pH das soluções utilizadas foi medido utilizando um medidor de pH Crison GLP-21, Instruments S.A., Barcelona, Espanha, com um eléctrodo de vidro combinado Crison. As soluções tampão de electrólito de suporte de diferentes valores de pH foram preparadas em conformidade com a Tabela 2.1 a partir de reagentes de pureza analítica.

Tabela 2.1 - Composição das soluções de electrólito de suporte.

Electrólito de suporte	pH
0,2 M KCl + 0,2 M HCl	1,73
0,2 M NaOAc + 0,2 M HOAc	3,50
0,2 M NaOAc + 0,2 M HOAc	3,79
0,2 M NaOAc + 0,2 M HOAc	5,02
0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,83
0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,07
0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,00
0,025 M Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> .10H <sub>2</sub> O + 0,1 M NaOH	9,11
0,2 M KCl + 0,2 M NaOH	12,39

Na medição de  $\mu$ -volumes (20-1000  $\mu$ L) para preparar as diferentes soluções foram utilizadas micropipetas Gilson, SAS.

## 2.2 CÉLULA ELECTROQUÍMICA E ELÉCTRODOS

No decorrer do trabalho experimental os ensaios voltamétricos foram realizados numa célula electroquímica de um único compartimento com uma capacidade volumétrica máxima de 2 mL, Cypress System, Inc., USA. Utilizaram-se como eléctrodo de trabalho um eléctrodo de carbono vítreo – GCE ( $\varnothing = 1,5$  mm), eléctrodo de referência um eléctrodo Ag/AgCl (sat.KCl) e eléctrodo auxiliar um fio de platina. O eléctrodo de trabalho foi polido usando para esse fim spray de diamante seguido de uma lavagem com água desionizada.

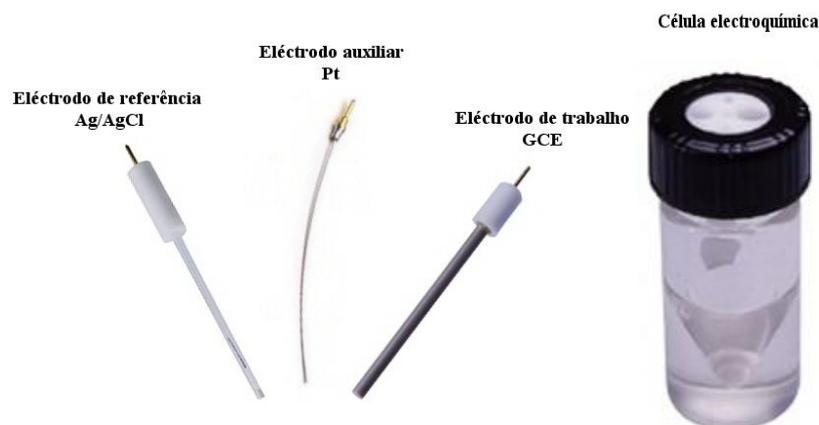


Figura 2.1 - Célula electroquímica e eléctrodos utilizados nos estudos electroquímicos.

A limpeza da superfície do eléctrodo foi comprovada através do registo de vários voltamogramas na solução de electrólito de suporte até que a resposta electroquímica permanecesse inalterada.

Durante os ensaios a célula electroquímica esteve ligada a um potenciostato/galvanostato Autolab, da Metrohm, Utrecht, Holanda ou a um potenciostato/galvanostato PalmSens, electrochemical sensor Interface, da Palm Instruments BV, Houten, Holanda, funcionando no modo potenciostático.

O controlo dos parâmetros voltamétricos, a aquisição e o tratamento dos dados obtidos, foi efectuado por intermédio do software GPES (General Purpose Electrochemical System) versão 4.9, da Metrohm, Utrecht, Holanda e do Software PSLite.

Para a apresentação dos voltamogramas e gráficos foi usado o Software Microcal Origin (version 6.0).

As medidas voltamétricas por voltametria cíclica (CV) foram realizadas utilizando um degrau de potencial,  $\Delta E_s$  de 2 mV e velocidades de varrimento entre 10 e 1000  $\text{mVs}^{-1}$ .

As medidas por voltametria de impulso diferencial fizeram-se a uma largura de impulso de 70 ms, amplitude de impulso de 50 mV e velocidade de varrimento 5  $\text{mVs}^{-1}$ .

Por sua vez para as medidas voltamétricas por onda quadrada realizaram-se a um degrau de potencial de 2 mV, amplitude de impulso de 50 mV, frequência de impulso entre 10 e 300 Hz e velocidade efectiva entre 100 e 300 mVs<sup>-1</sup>.

## **2.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

A diluição do composto foi efectuada na própria célula electroquímica a partir da solução padrão. Aplicaram-se as técnicas de voltametria cíclica, impulso diferencial e onda quadrada nas condições indicadas anteriormente. Entre cada técnica limpou-se a superfície do eléctrodo para retirar os possíveis produtos de oxidação do composto que possam ter ficado adsorvidos na superfície e que poderiam influenciar o primeiro varrimento de cada uma das técnicas.

# **CAPÍTULO 3**

---

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

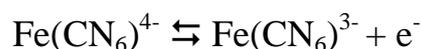
### 3.1 ESTUDO VOLTAMÉTRICO DO FERROCIANETO DE POTÁSSIO

O ferrocianeto de potássio,  $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$  é um composto complexo que resulta da combinação do anião complexo  $[Fe(CN)_6]^{4-}$  com o catião potássio. O sal cristalino é solúvel em água e tem uma cor amarela.

O ião ferrocianeto,  $[Fe(CN)_6]^{4-}$ , é o anião do ácido ferrocianídrico,  $H_4[Fe(CN)_6]$ , e os sais deste ácido são denominados de ferrocianetos. A sua forma oxidada é o anião ferricianeto, um anião do ácido ferricianídrico,  $H_3[Fe(CN)_6]$ .

As soluções aquosas de ferrocianeto de potássio apenas são estáveis quando guardadas ao abrigo da luz uma vez que sofrem decomposição ao fim de algumas horas, apresentando uma cor azul. Esta mudança de cor é devida à presença de quantidades ínfimas do ião ferricianeto [46]

A electrólise da solução do ião ferrocianeto origina o ferricianeto no ânodo:



sendo o potencial de oxidação,  $E^0 = + 0,36 \text{ V}$ .

O ferrocianeto de potássio é largamente usado nas indústrias farmacêutica e metalúrgica. Também é usado em testes laboratoriais para a detecção de percentagens de ferro em pigmentos de ocre pois, quando em meio ácido, reage com iões ferro e dá origem ao azul da Prússia [47]. O ferrocianeto de potássio é muito utilizado em diversas análises clínicas, nomeadamente na detecção de anomalias relacionadas com a carência de ferro. Também é usado na preparação de vários pigmentos entre os quais o azul da Prússia, um pigmento produzido industrialmente a partir da primeira metade do século XIX.

Uma vez que as soluções aquosas de ferrocianeto de potássio são bastante estáveis este complexo é usado como modelo em muitos estudos electroquímicos.

Foi usada uma solução de 10 mM de ferrocianeto de potássio numa solução tampão de força iónica 1M (1M de acetato de sódio + 1M de ácido acético), pH 4,11.

Os testes de voltametria cíclica foram realizados a velocidades de varrimento entre 10 e 1000  $\text{mVs}^{-1}$ , figura 3.1.

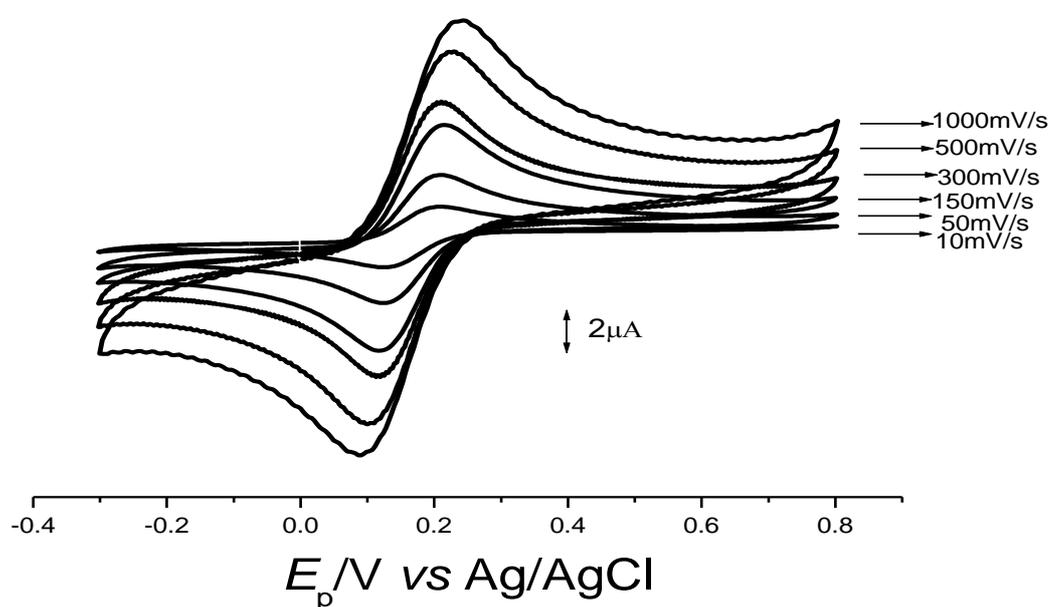


Figura 3.1 - Voltamograma cíclico do ferrocianeto de potássio 1 mM em tampão acetato 1 M, pH 4,11. Velocidades de varrimento entre 10 e 1000  $\text{mVs}^{-1}$ .

O valor do potencial anódico ao qual se dá a transferência electrónica é praticamente constante para as diferentes velocidades de varrimento e não existe um afastamento significativo dos picos de corrente anódica e catódica.

Os varrimentos de potencial para a voltametria de onda quadrada foram feitos a velocidades de varrimento entre 10 e 300  $\text{mVs}^{-1}$ , figura 3.2. O comportamento voltamétrico revela um carácter reversível, esperado para este tipo de sistema, uma vez que existe uma concordância no potencial dos picos que correspondem aos varrimentos directo e inverso e independência do pH da solução.

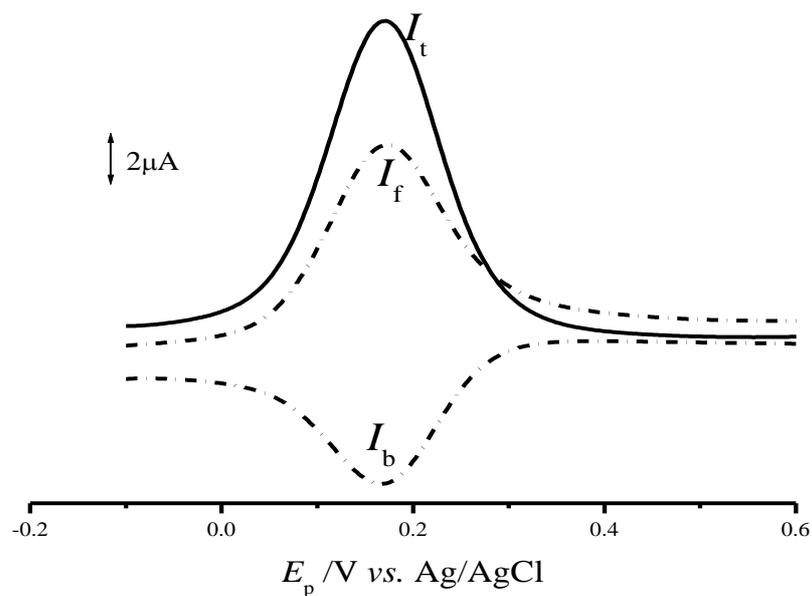


Figura 3.2 - Voltamograma de onda quadrada do ferrocianeto de potássio 1 mM em solução tampão acetato 1 M, pH 4,11. Frequência 25 Hz.  $I_t$  – corrente total,  $I_f$  – corrente directa,  $I_b$  – corrente inversa.

A voltametria de impulso diferencial foi feita em várias soluções tampão para diferentes valores de pH, figura 3.3 e a uma velocidade de varrimento fixa igual a  $5 \text{ mVs}^{-1}$ . Não se verifica a dependência do pH da solução.

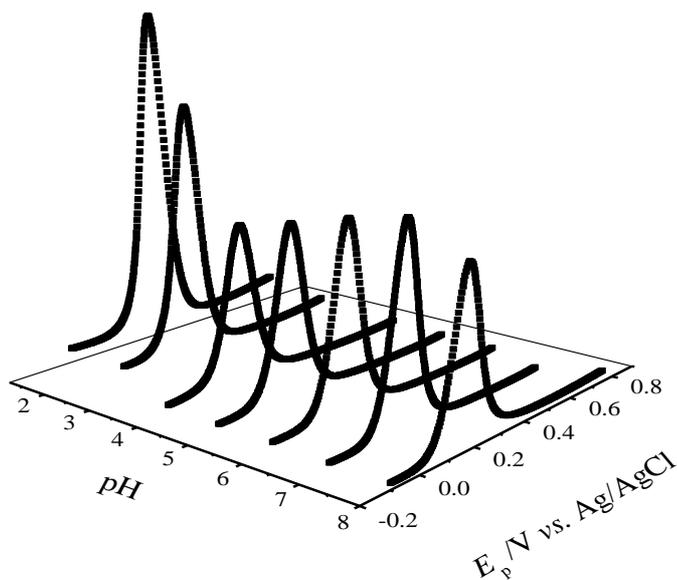


Figura 3.3 - Voltamograma de impulso diferencial do ferrocianeto de potássio 1 mM em diferentes soluções tampão. Velocidade de varrimento  $5 \text{ mVs}^{-1}$ .

### 3.2 ESTUDO VOLTAMÉTRICO DA DIOSMETINA

A estrutura electroquímica da flavona diosmetina (3',5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona) apresenta um grupo funcional no anel A que é electroquimicamente activo. A presença da dupla ligação nos carbonos 2-3 confere ao anel B uma coplanaridade com os anéis A e C devido ao efeito da conjugação.

As principais fontes alimentares da diosmetina, bem como do resto das flavonas, são a pele das maçãs, os brócolos, as uvas, as azeitonas, as cebolas e as alfaces.

#### a) VOLTAMETRIA CÍCLICA

Foi efectuado o estudo por voltametria cíclica, figura 3.4 da diosmetina.

O intervalo de pH em que foi estudada a flavona teve início a pH 1,73 mas só a partir de pH 3,50 apareceu o pico correspondente à oxidação do grupo resorcinol do anel B presente na molécula.

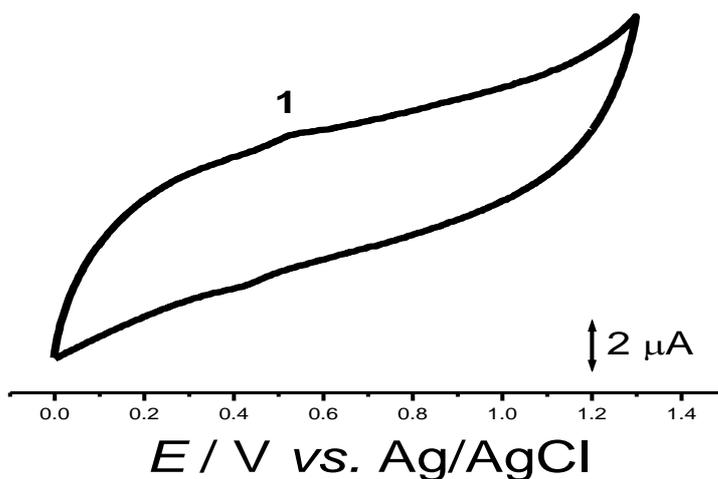


Figura 3.4 - CV para diosmetina a  $10 \mu\text{M}$  a pH 3.79 em tampão acetato. Velocidade de varrimento  $500 \text{ mVs}^{-1}$ .

Os varrimentos foram realizados numa janela de potencial entre 0 e 1,4 V. Os picos de oxidação ocorrem para pH superiores a 3,50 pois o grupo resorcinol é oxidado a potenciais mais elevados e em solução aquosa de pH menor que 3,50 não é possível a sua detecção com um eléctrodo de carbono devido à decomposição do solvente.

O voltamograma cíclico a pH 3,79, figura 3.4, mostrou um único pico reversível de oxidação ao potencial de +0,55 V. Para valores de pH mais elevados que 7,07 não foi possível verificar nenhum pico de oxidação. Este pico corresponde à oxidação do grupo 3' hidroxilo do anel B.

#### *b) VOLTAMETRIA DE IMPULSO DIFERENCIAL*

Foi efectuado o estudo por voltametria de impulso diferencial, figura 3.5 da diosmetina no intervalo de pH de 1,79 a 12,39. Da mesma forma que por voltametria cíclica, só a partir de pH 3,5 foram observados os picos de oxidação.

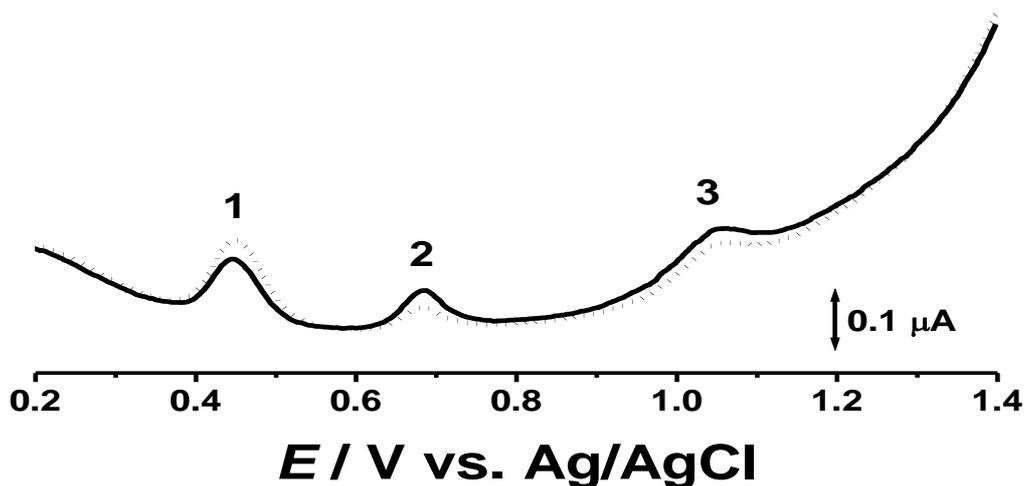


Figura 3.5 - DPV para diosmetina 10  $\mu\text{M}$  a pH 3,79 em tampão acetato.

(—) 1º varrimento, (....) 2º varrimento

Velocidade de varrimento 5  $\text{mVs}^{-1}$ .

O voltamograma de impulso diferencial a pH 3,79, figura 3.5 mostra o pico 1, a  $E^1 = +0,45$  V, o pico 2, a  $E^2 = +0,70$  V e o pico 3 a  $E^3 = +1,06$  V

Tal como no caso da voltametria cíclica, verificou-se a ocorrência de um pico de oxidação a +0.45 V devido grupo 3' hidroxilo do anel B. Também foi identificado um pico de oxidação a +0.70 V correspondente à oxidação do grupo resorcinol. O pico a +1.06 V é devido a oxidação dos produtos de oxidação. O grupo resorcinol reage para potenciais de oxidação mais elevados que o grupo catecol.

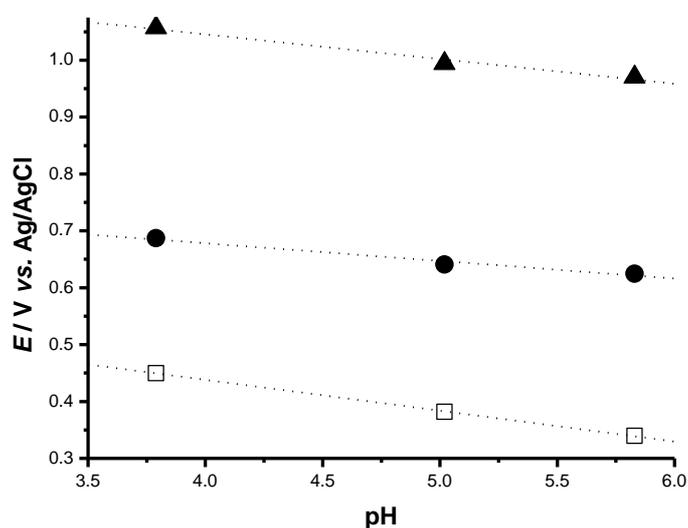


Figura 3.6 - Dependência de  $E_p$  para os 3 picos de oxidação com o pH para a diosmetina

(□) pico 1, (●) pico 2, (▲) pico 3.

No gráfico de  $E_p$  vs. pH, figura 3.6, observa-se uma dependência linear do pH até 5,83. A partir deste pH o seu potencial de oxidação ocorre a valores mais elevados.

c )VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA

A voltametria de onda quadrada, figura 3.7, confirmou o observado anteriormente por CV e DPV.

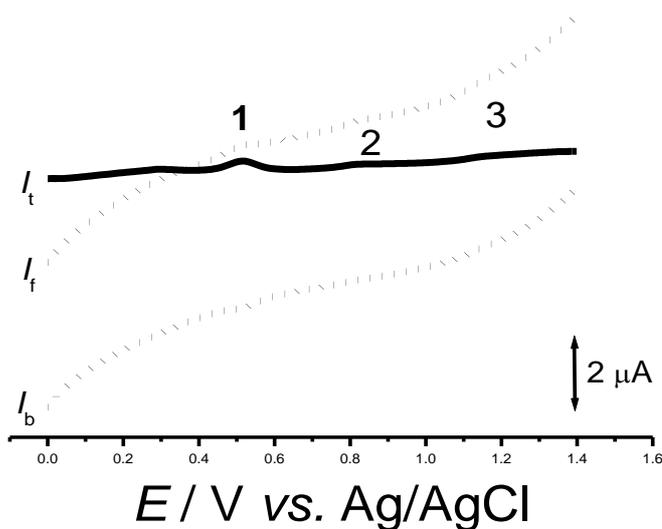


Figura 3.7 - SWV da diosmetina 10  $\mu\text{M}$  a pH 3,79, tampão acetato. Frequência do varrimento 50 Hz, velocidade efectiva 100  $\text{mVs}^{-1}$ .  $I_t$ - corrente total,  $I_f$ - corrente directa,  $I_b$ - corrente inversa.

Tal como no caso da CV verificou-se a ocorrência de um pico de oxidação devido ao catecol. Para além disto, as curvas de corrente directa e ( $I_f$ ) e inversa ( $I_b$ ) confirmaram a reversibilidade do processo de oxidação do grupo catecol. O voltamograma mostrou que a oxidação do catecol a pH 3,79 ocorre para valores baixos de potencial.

### 3.3 ESTUDO VOLTAMÉTRICO DA HESPERIDINA

A hesperidina (hesperetin-7-O-rutinoside), é das flavanonas mais comuns encontrando-se em abundância nos frutos cítricos. Apresenta o anel B ligado ao anel C através de C<sub>2</sub>, um grupo cetônico na posição C<sub>4</sub> e não apresenta insaturação no anel C.

#### a) VOLTAMETRIA DE IMPULSO DIFERENCIAL

Foi efectuado o estudo por voltametria de impulso diferencial, figura 3.8, da hesperidina no intervalo de pH de 1,79 a 12,39.

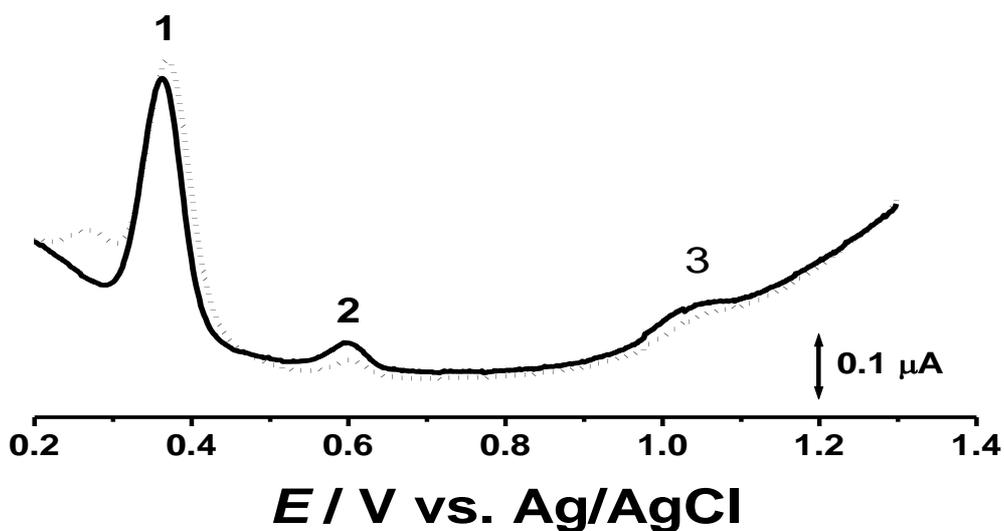


Figura 3.8 - DPV para hesperidina 10  $\mu\text{M}$  a pH 3,79 em tampão acetato.

(—) 1º varrimento, (....) 2º varrimento

Velocidade de varrimento 5  $\text{mVs}^{-1}$ .

O voltamograma de impulso diferencial a pH 3,79, figura 3.8, mostra o pico 1, a  $E^1 = +0,35$  V, o pico 2, a  $E^2 = +0,60$  V e o pico 3 a  $E^3 = +1,09$  V.

Tal como no caso da diosmetina, verificou-se a ocorrência de um pico de oxidação a +0,35 V devido ao grupo 3' hidroxilo do anel B. Também foi identificado um pico de oxidação a +0,60V correspondente à oxidação do grupo resorcinol. O grupo resorcinol tal como verificado anteriormente reage para potenciais de oxidação mais elevados que o grupo catecol. O pico a +1.09 V é devido à oxidação dos produtos de oxidação.

Não foi possível observar picos de oxidação para valores de pH inferiores a 3,50.

#### b) VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA

A voltametria de onda quadrada, figura 3.9, confirmou o observado por voltametria de impulso diferencial.

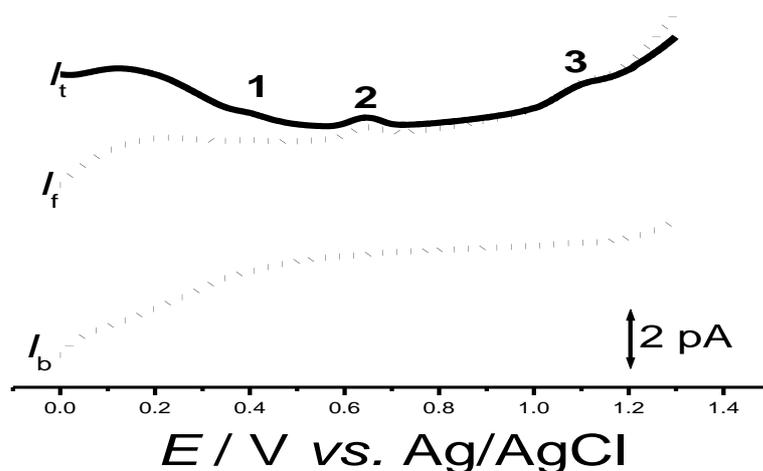


Figura 3.9 - SWV da hesperidina  $10 \mu\text{M}$  a pH 3,79, tampão acetato. Frequência do varrimento 50 Hz, velocidade efectiva  $100 \text{ mVs}^{-1}$ .  $I_t$ - corrente total,  $I_f$ - corrente directa,  $I_b$ - corrente inversa.

Tal como no caso da voltametria de impulso diferencial, verificou-se a existência de 3 picos de oxidação. O pico 1, a um valor de +0,40 V corresponde à oxidação do grupo catecol, o pico 2, a +0,60 V corresponde à oxidação do grupo resorcinol e o pico 3 a +1,10 V deve-se à oxidação dos produtos de oxidação. O grupo resorcinol reage para

potenciais de oxidação mais elevados e as curvas de corrente directa ( $I_f$ ) e corrente inversa ( $I_b$ ) confirmam a irreversibilidade do processo de oxidação deste grupo.

### 3.4 ESTUDO VOLTAMÉTRICO DA ISOROIFOLINA E DA LINARINA

Efectuou-se o estudo voltamétrico das flavonas isoroifolina e da linarina no intervalo de pH de 1,79 e foi feita a comparação com a flavona diosmetina e a flavanona hesperidina, figura 3.11.

A figura 3.10 mostra a dependência de  $E_p$  do primeiro pico de oxidação com o pH para os diferentes flavonóides estudados

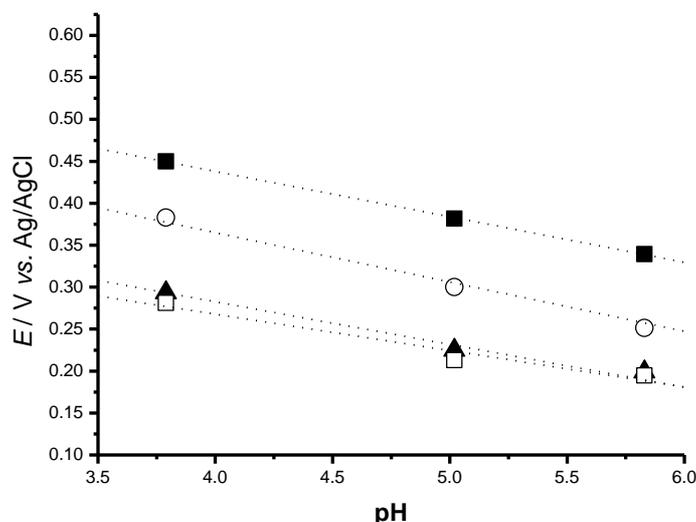


Figura 3.10 - Dependência de  $E_p$  para o pico 1 com o pH  
(■) diosmetina, (○) hesperidina (▲) isoroifolina, (□) linarina

No gráfico da figura 3.10 é possível observar-se uma dependência linear até ao pH 5,83 para todos os citroflavonóides a partir do qual o potencial de oxidação é independente do pH. O declive para as rectas de hesperidina, isoroifolina e diosmetina é de 0,05 V por unidade de pH o que nos indica o mesmo número de prótons e de electrões no processo de oxidação. Para a recta de linarina o declive é de 0,04 V por unidade de pH.

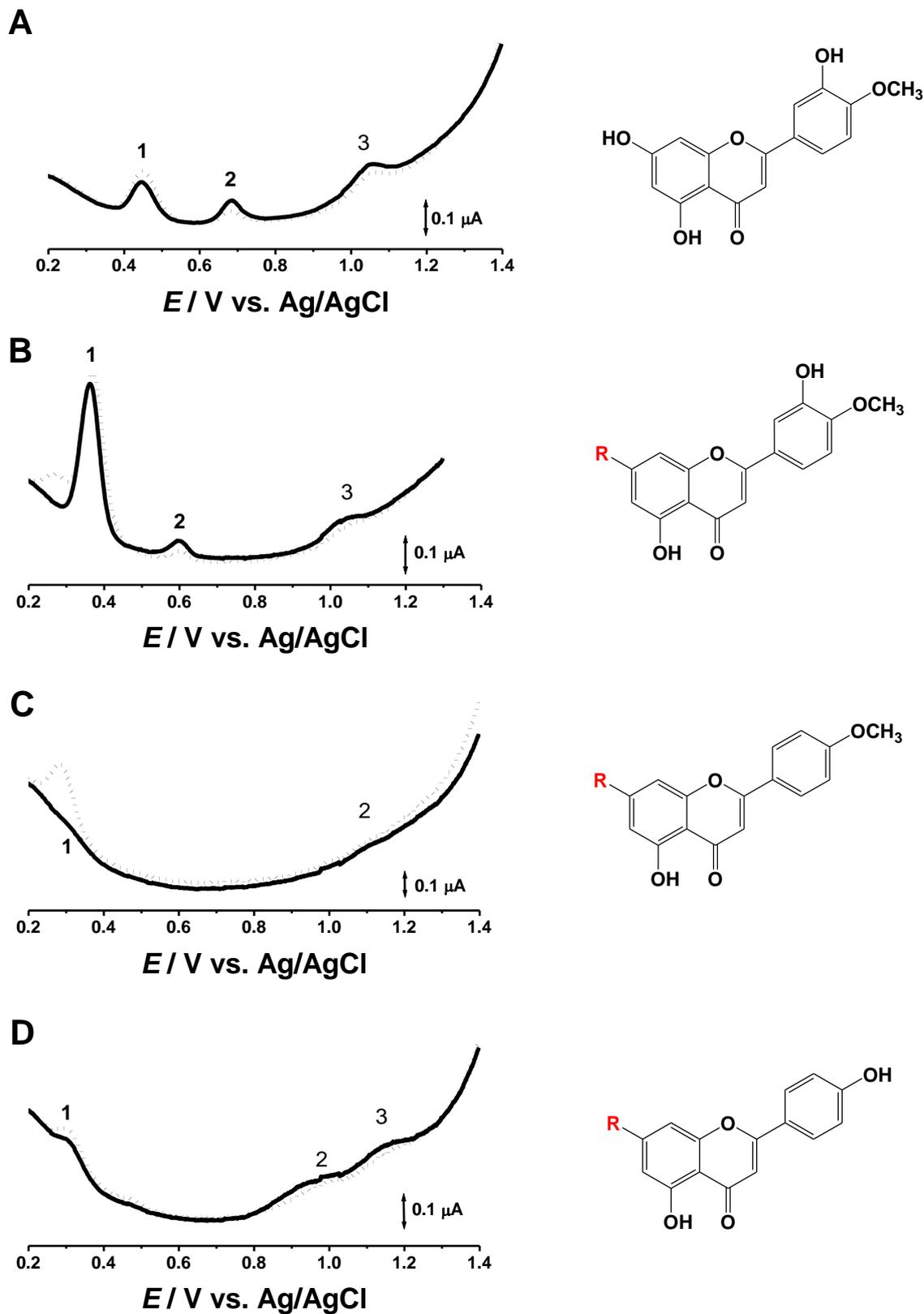


Figura 3.11 - DPV para A) diosmetina, B) hesperidina, C) linarina e D) isoroifolina 10  $\mu\text{M}$  a pH 3,79 em tampão acetato. Velocidade de varrimento 5  $\text{mVs}^{-1}$ .

Tal como nos estudos efectuados anteriormente a isoroifolina apresenta um pico de oxidação devido ao grupo catecol a +0,30 V, um pico 2 a +0,9 V devido à oxidação do grupo resorcinol e um terceiro pico correspondente à oxidação dos produtos de oxidação. A linarina por sua vez, não possui grupo catecol, sendo possível identificar um pico de oxidação do grupo resorcinol a +0,30 V.

# **CAPÍTULO 4**

---

## **CONCLUSÕES**

O complexo de ferrocianeto de potássio e de uma série de compostos fitoquímicos pertencentes às diferentes subclasses de citroflavonóides foram estudados usando várias técnicas electroquímicas de modo a investigar os seus mecanismos de oxidação.

O estudo das reacções de transferência de carga do ferrocianeto de potássio,  $K_4[Fe(CN_6)].3H_2O$ , um composto modelo, foi feito através de técnicas de voltametria cíclica, de impulso diferencial e de onda quadrada, concluindo-se que este composto apresenta um comportamento reversível em meio ácido, afastando-se da reversibilidade em meio básico.

O mecanismo de oxidação da diosmetina é um processo que apresenta três picos de oxidação. Os picos de oxidação estão associados ao grupo resorcinol substituinte no anel A e ao grupo catecol substituinte no anel B ambos electroactivos e à oxidação dos produtos de oxidação. Os produtos de oxidação também são electroactivos. A oxidação do grupo do anel B, grupo 3' hidroxilo dador de electrões ao anel B ocorre a potenciais positivos baixos e é uma reacção onde estão envolvidos um electrão e um protão. Os grupos hidroxilo nas posições 5 e 7 no anel A também têm um efeito de doação de electrões sendo a sua oxidação uma reacção irreversível e que ocorre a potenciais positivos mais elevados.

O mecanismo de oxidação da hesperidina é um processo que apresenta três picos de oxidação sendo o primeiro correspondente à oxidação do grupo catecol, o segundo à oxidação do grupo resorcinol e um terceiro pico correspondente à oxidação dos produtos de oxidação.

O flavonóide cítrico isoroifolina apresentou um comportamento semelhante. Aos anteriores. A flavona linarina não possui um grupo catecol no anel B e só foram observados 2 picos de oxidação. O primeiro pico corresponde à oxidação do grupo resorcinol cujo valor de potencial foi inferior aos valores dos compostos que apresentam grupo catecol. O segundo pico corresponde à oxidação de produtos de oxidação.

Os citroflavonóides estudados mostraram uma dependência linear dos potenciais de oxidação com o pH até 5,83. A partir deste valor os potenciais de oxidação são independentes do pH.

# **BIBLIOGRAFIA**

---

1. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G: **Antioxidant properties of phenolic compounds.** *Trends in plant science* 1997, **2**:152-159.
2. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC: *The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer.* *Pharmacol. Rev.* 2000, **52**:673-751.
3. Havsteen BH: **The biochemistry and medical significance of the flavonoids.** *Pharmacology & Therapeutics* 2002, **96**:67-202.
4. Visioli F, Borsani L, Galli C: **Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals.** *Cardiovascular Research* 2000, **47**:419-425.
5. Robbins RJ: Phenolic Acids in Foods: **An Overview of Analytical Methodology.** *J. Agric. Food Chem.* 2003, **51**:2866-2887.
6. Silva FAM, Borges F, Guimarães C, Lima JLFC, Matos C, Reis S: **Phenolic Acids and Derivatives: Studies on the Relationship among Structure, Radical Scavenging Activity, and Physicochemical Parameters.** *J. Agric. Food Chem.* 2000, **48**:2122-2126.
7. Naczki M, Shahidi F: **Extraction and analysis of phenolics in food.** *J. Chromatography A* 2004, **1054**:95-111.
8. Conner EM, Grisham MB: *Inflammation, Free Radicals, and Antioxidants.* *Nutrition* 1996, **12**:274-277.
9. Pannala AS, Chan TS, O'Brien PJ, Rice-Evans CA: **Flavonoid B-ring Chemistry and Antioxidant Activity: Fast Reaction Kinetics.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001, **282**:1161-1168.
10. Cao G, Sofic E, Prior RL: **Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships.** *Free Radical Biol. Med.* 1997, **22**:749-760.
11. Graf E: **Antioxidant potential of ferulic acid.** *Free Radical Biol. Med.* 1992, **13**:435-448.
12. Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T: **Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions.** *Mutation Research* 2005.
13. Taubert D, Breitenbach T, Lazar A, Censarek P, Harlfinger S, Berkels R, Klaus W, Roesen R: **Reaction rate constants of superoxide scavenging by plant antioxidants.** *Free Radical Biology & Medicine* 2003, **35**:1599-1607.

14. Foti M, Ingold KU, Lusztyk J: **The surprisingly high reactivity of phenoxyl radicals.** *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116.
15. Hotta H, Nagano S, Ueda M, Tsujino Y, Koyama J, Osakai T: **Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation.** *Biochimica et Biophysica Acta* 2002, 1572.
16. Balasundram N, Sundram K, S: **Phenolic compounds in plants and agri- industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses.** *Food Chemistry* 2005.
17. Gattrell M, Kirk DW: **A study of the oxidation of phenol at platinum and preoxidized platinum surfaces.** *J. Electrochem. Soc.* 1993, **140**:1534-1540.
18. Born M, Carrupt PA, Zini R, Brée F, Tillement JP, Hostettmann K, Testa B: **Electrochemical behaviour and antioxidant activity of some natural polyphenols.** *Helvetica Chimica Acta* 1996, **79**:1147-1158.
19. Steenken S, Neta P: **One-electron redox potentials of phenols. Hydroxy and aminophenols and related compounds of biological interest.** *J. Phys. Chem.* 1982, **86**:3661-3667.
20. Andreescu S, Andreescu D, Sadik OA: **A new electrocatalytic mechanism for the oxidation of phenols at platinum electrodes.** *Electrochem. Commun.* 2003, **5**:681-688.
21. Hotta H, Sakamoto H, Nagano S, Osakai T, Tsujino Y: **Unusually large numbers of electrons for the oxidation of polyphenolic antioxidants.** *Biochimica et Biophysica Acta* 2001, **1526**:159-167.
22. Beecher GR: **Flavonoids in Foods in Antioxidant Food Supplements in Human Health.** Edited by Packer L, Hiramatsu M, Yoshikawa T. **Hardbound: Academic press; 1999.**
23. Peterson J, Dwyer J: Flavonoids: *Dietary occurrence and biochemical activity.* *Nutrition Research* 1998, **18**:1995-2018.
24. Erlund I: **Review of the flavonoids quercetin, hesperetin and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology.** *Nutr. Res.* 2004, **24**:851-874.
25. van Acker SABE, van der Berg DJ, Tromp MNJL, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJF, Bast A: **Structural aspects of antioxidants activity of flavonoids.** *Free Radical Biol. Med.* 1996, **20**:331-342.

26. Taylor LP, Grotewold E: **Flavonoids as developmental regulators**. *Current Opinion in Plant Biology* 2005, **8**:317-323.
27. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G: **Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids**. *Free Radical Biology and Medicine* 1996, **20**:933-956.
28. Ricardo da Silva JM: *Estrutura e composição das procianidinas da uva e do vinho. Efeitos potenciais na saúde. In 3º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo; Évora, Portugal 1995:343-355.*
29. Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ: **Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes**. *Nutr. Hosp.* 2002, **17**:271-278.
30. Nogata, Y; Sakamoto, K. **Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species**. *Biosci Biotechnol.* 2006, **70**:178-192.
31. Middleton E, Kandaswami C: **The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer**. In *The flavonoids: advances in research since 1986*. Edited by Harborne JB: Chapman and Hall 1993. 619-652.
32. Evers DL, Chao CF, Wang X, Zhang Z, Huong SM, Huang ES: *Human cytomegalovirus-inhibitory flavonoids: Studies on antiviral activity and mechanism of action*. *Antiviral Research*.
33. Harborne JB, Williams CA: **Advances in flavonoid research since 1992**. *Phytochemistry* 2000, **55**:481-504.
34. Padilla E, Ruiz E, Redondo S, Gordillo-Moscoso A, Slowing K, Tejerina T: **Relationship between vasodilation capacity and phenolic content of Spanish wines**. *European Journal of Pharmacology* 2005, **517**:84-91.
35. Hodnick WF, Roettger WJ, Kung FS, Bohmont CW, Pardini RS: *Progress in Clinical and Biological Research*. Edited by Cody V, Middleton E, Harborne JB: Alan R. Liss 1986, **213**.
36. Kilmartin PA: **Electrochemical detection of natural antioxidants: principles and protocols**. *Antioxidants & Redox Signaling* 2001, **3**:941-955.
37. Rapta P, Misik V, Stasko A, Vrabel I: **Redox intermediates of flavonoids and caffeic acid esters from propolis: an EPR spectroscopy and cyclic voltammetry study**. *Free Radical Biology & Medicine* 1995, **18**:901-908.
38. Blasco AJ, Gonzalez MC, Escarpa A: **Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: towards an electrochemical index of natural antioxidants**. *Anal. Chim. Acta* 2004, **511**:71-81.

39. Blasco AJ, Rogerio MC, Gonzalez MC, Escarpa A: **"Electrochemical Index" as a screening method to determine "total polyphenolics" in foods: a proposal.** *Anal. Chim. Acta* 2005, **539**:237-244.
40. Yang B, Kotani A, Arai K, Kusu F: **Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials.** *Analytical Sciences* 2001, **17**:599-604.
41. Beecher GR: *Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake in. In "The Third International Scientific Symposium on Tea and Human Health: Role of flavonoids in the diet"; Tufts University, Boston, Edited by Sciences ASfN* 2003:3248S-3254S.
42. Rimm ER, Katan MB, Ascherio A, Stampfer M, Willet W: **Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals.** *Ann.Intern. Med.* 1996, **125**:384-389.
43. Suzart L, Daniel J, Carvalho M, **Biodiversidade flavonoídica e aspectos farmacológicos em espécies dos géneros Ochnaceae.** *Quim. Nova* 2007, **30**:984-987.
44. Brett CMA, Oliveira Brett AM: *Electrochemistry: Principles, Methods and Applications.* Oxford: Oxford Science Publications 1993.
45. Brett CMA, Oliveira Brett AM: *Electroanalysis.* Oxford: Oxford Science Publications; 1998.
46. Matos CMF, *Microeléctrodos e suas Aplicações em Química Analítica,* Universidade do Minho 1990.
47. Feller RL, *Artist's Pigments.* Oxford University Press, Oxford 1986, **3**

