

Márcia Andreia Nogueira Manaia

**MECANISMOS REDOX RELATIVOS À
ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DE
SISTEMAS FENÓLICOS**

Mestrado em Química

Departamento de Química

FCTUC

Setembro de 2011



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Márcia Andreia Nogueira Manaia

**MECANISMOS REDOX RELATIVOS À
ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DE
SISTEMAS FENÓLICOS**

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

Orientadora: Prof. Dra. Ana Maria Coelho Ferreira de Oliveira Brett

Setembro de 2011

Universidade de Coimbra

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar os meus sinceros agradecimentos à Professora Doutora Ana Maria Oliveira-Brett, minha orientadora de mestrado, pela oportunidade concedida, pela orientação científica ao longo de todo o trabalho e pela permanente disponibilidade demonstrada.

Ao Doutor Victor Constantin Diculescu agradeço, por toda a ajuda prestada, por pacientemente responder às minhas mais variadas questões, por todos os sábios e experientes conselhos, pelo auxílio, pela orientação, por ter sido uma peça fundamental na minha integração e desempenho ao longo de todo o mestrado.

A todos os membros do Laboratório de Electroquímica e Corrosão do Instituto Pedro Nunes, um muito obrigada pela amizade, simpatia, auxílio e ânimo constantes.

Agradeço de uma forma especial aos meus amigos, a todos aqueles que marcam os meus dias, que me fazem sorrir... Agradeço pelo incentivo incondicional, ajuda, paciência e compreensão, especialmente ao longo desta etapa.

Um agradecimento a toda a minha família por estarem sempre presentes em todos os momentos.

Um obrigada ao meu irmão por fazer de mim a irmã mais orgulhosa do mundo! Obrigada pelo exemplo de carácter, pela amizade e pelo apoio incondicional em todas as minhas decisões, é bom saber que estás por perto!

Aos meus pais por tudo aquilo que sou! Sem eles nada teria sido possível! Obrigada por fazerem de mim uma pessoa feliz!

ÍNDICE

Notação: Símbolos Principais.....	i
Subscritos.....	i
Abreviaturas.....	i
Constantes Físicas.....	ii
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Capítulo 1: Introdução.....	1
1.1. Compostos Fenólicos.....	2
1.1.1. Ácido Ferúlico.....	4
1.1.2. Capsaicina e Dihidrocapsaicina.....	6
1.1.3. Curcumina.....	8
1.2. Princípios de Electroquímica.....	10
1.2.1. Técnicas de Voltametria.....	12
1.2.1.1. Voltametria Cíclica.....	13
<i>Transferência electrónica reversível</i>	15
<i>Transferência electrónica irreversível</i>	16
<i>Espécies adsorvidas</i>	17
1.2.1.2. Voltametria de Impulso Diferencial.....	17
1.2.1.3. Voltametria de Onda Quadrada.....	19
Capítulo 2: Experimental.....	21
2.1. Reagentes e Soluções.....	22
2.2. Instrumentação.....	23
2.3. Parâmetros Voltamétricos.....	24
2.4. Célula Electroquímica.....	24
2.5. Tratamento de Dados.....	25
Capítulo 3: Estudo voltamétrico do ácido ferúlico.....	26
3.1. Comportamento electroquímico do ácido ferúlico.....	27
3.1.1. Voltametria Cíclica.....	27
3.1.2. Voltametria de Impulso Diferencial.....	31
3.1.3. Voltametria de Onda Quadrada.....	36
3.2. Mecanismo de oxidação do ácido ferúlico.....	38

3.3. Conclusões.....	39
Capítulo 4: Estudo voltamétrico da capsaicina e da dihidrocapsaicina.....	40
4.1. Estudo electroquímico da capsaicina.....	41
4.1.1. Voltametria Cíclica.....	41
4.1.2. Voltametria de Impulso Diferencial	43
4.1.3. Voltametria de Onda Quadrada.....	47
4.2. Estudo electroquímico da dihidrocapsaicina.....	49
4.2.1. Voltametria Cíclica.....	49
4.2.2. Voltametria de Impulso Diferencial.....	50
4.2.3. Voltametria de Onda Quadrada.....	54
4.3. Mecanismos de oxidação propostos.....	55
4.4. Conclusões.....	56
Capítulo 5: Estudo voltamétrico da curcumina.....	58
5.1. Estudo electroquímico da curcumina.....	59
5.1.1. Voltametria Cíclica.....	59
5.1.2. Voltametria de Impulso Diferencial.....	62
5.1.3. Voltametria de Onda Quadrada.....	67
5.2. Mecanismo de oxidação da curcumina.....	68
5.3. Conclusões	68
Capítulo 6: Conclusões.....	70
Bibliografia.....	73

NOTAÇÃO: SÍMBOLOS PRINCIPAIS

		<i>Unidades</i>
E	potencial de eléctrodo	V
	E_p potencial de pico	
	ΔE_s degrau de potencial	
E_{redox}	energia do par redox	eV
f	frequência	Hz
I	corrente eléctrica	A
	I_c corrente capacitiva	
	I_f corrente faradaica	
	I_p corrente de pico	
k	constante de velocidade heterogénea	m s^{-1}
	k_a constante de velocidade de oxidação	
	k_c constante de velocidade de redução	
n	número de electrões transferidos	—
t	tempo	s
T	temperatura	K
$W_{1/2}$	largura a meia-altura do pico	mV

SUBSCRITOS

a	anódico
c	catódico
max	valor máximo
min	valor mínimo
p	pico

ABREVIATURAS

CV	voltametria cíclica (<i>Cyclic Voltammetry</i>)
DNA	ácido desoxiribonucleico (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
DPV	voltametria de impulso diferencial (<i>Differential Pulse Voltammetry</i>)

GCE	eléctrodo de carbono vítreo (<i>Glassy Carbon Electrode</i>)
HIV	vírus da imunodeficiência humana (<i>Human Immunodeficiency vírus</i>)
NOS	espécies reactivas de nitrogénio (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)
ROS	radicais reactivos de oxigénio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SWV	voltametria de onda quadrada (<i>Square Wave Voltammetry</i>)

CONSTANTES FÍSICAS

F	constante de Faraday	$9,648 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$
R	constante dos gases ideais	$8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$

RESUMO

Os danos induzidos pelos radicais livres podem afectar muitas moléculas biológicas incluindo os lípidos, as proteínas, os hidratos de carbono e as vitaminas presentes nos alimentos. Uma vez que, os compostos fenólicos podem participar *in vivo* em várias reacções redox entre diferentes espécies é fundamental a clarificação dos mecanismos de transferência de carga através de métodos electroquímicos que, por sua vez, têm a capacidade de fornecer informações para a determinação das causas que levam os compostos biológicos a exercer as suas actividades fisiológicas.

O presente trabalho teve por objectivo, o estudo do mecanismo de oxidação do ácido ferúlico, da capsaicina, da dihidrocapsaicina e da curcumina, que são compostos com alta relevância biológica. Os mecanismos redox destes compostos com propriedades antioxidantes foram estudados utilizando técnicas electroquímicas como a voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada e de impulso diferencial, num eléctrodo de carbono vítreo.

O comportamento electroquímico do ácido ferúlico mostrou que este composto pode ser oxidado num processo irreversível dependente do pH, em duas etapas de transferência de dois electrões e dois protões para cada uma. A oxidação do ácido ferúlico origina um produto de oxidação que sofre reacções redox reversíveis, dependentes do pH, com a transferência de dois electrões e de dois protões.

O estudo voltamétrico da capsaicina e da dihidrocapsaicina mostrou que ambos os compostos sofrem oxidação num processo irreversível e dependente do pH. O mecanismo de oxidação da capsaicina e da dihidrocapsaicina consiste num processo que ocorre num só passo, correspondente à transferência de dois electrões e de dois protões; com a formação de um produto de oxidação. O produto de oxidação dos dois capsaicinóides sofre um processo de oxidação reversível e dependente do pH, envolvendo a transferência de dois electrões e de dois protões.

A oxidação da curcumina revelou que o seu mecanismo de oxidação ocorre em duas etapas irreversíveis, dependentes do pH do electrólito de suporte. O mecanismo de oxidação envolve a transferência de dois electrões e de dois protões para cada uma das etapas. O produto de oxidação resultante é posteriormente oxidado com a transferência de dois electrões e de dois protões num processo reversível e dependente do pH.

ABSTRACT

The harmful effects caused by free radicals inside the living cells affect many biological molecules, such as lipids, proteins, carbohydrates and vitamins. Phenolic compounds present anti-oxidant properties reducing the effect caused by free radicals. Since phenolic compounds may participate in several redox reactions *in vivo*, the clarification of these charge transfer mechanisms assumes a major importance. Furthermore, the elucidation of such mechanisms may also be useful for a better understanding of the physiological processes in which these biological compounds are implicated.

The aim of this work was to investigate the electrochemical oxidation mechanisms of four biological compounds known by their antioxidant properties: ferulic acid, capsaicin, dihydrocapsaicin and curcumin. The redox mechanisms associated to these compounds were studied in a wide pH range using cyclic, square wave and differential pulse voltammetry, with a glassy carbon electrode (GCE), in different supporting electrolytes.

The electrochemical oxidation of ferulic acid occurs in an irreversible, pH-dependent, two-step mechanism, where two electrons and two protons are transferred in each step. The product of ferulic acid oxidation is also electroactive and is reversibly oxidized in a pH-dependent reaction, with the transfer of two electrons and two protons.

The voltammetric study of capsaicin and dihydrocapsaicin revealed that both compounds are irreversibly oxidized in a pH-dependent reaction, which occurs with the transfer of two electrons and two protons. The products of capsaicin and dihydrocapsaicin oxidation reactions undergo further oxidation through reversible, pH-dependent mechanisms, where two electrons and two protons are transferred.

Curcumin is electrochemically oxidized at the GCE surface in an irreversible two-step reaction. Both steps of the curcumin oxidation mechanism are pH-dependent and each involves the transfer of two electrons and two protons. The oxidation product formed at the GCE surface is further oxidized in an reversible, pH-dependent reaction, in which two electrons and two protons are transferred.

Capítulo 1

Introdução

1.1. Compostos Fenólicos

Nos dias de hoje, há um crescente interesse no estudo de compostos fitoquímicos como componentes bioativos dos alimentos. Estes compostos são substâncias biologicamente activas presentes em plantas, frutas, legumes e cereais, que contribuem para o seu sabor, cor e odor. Estudos recentes têm revelado que a ingestão de frutas e legumes de forma frequente contribui para a prevenção de doenças. A capacidade demonstrada pelos compostos fitoquímicos na prevenção de doenças foi atribuída essencialmente, às propriedades antioxidantes dos seus constituintes fenólicos [1-3].

Os compostos fenólicos são classificados como metabolitos secundários sintetizados pelas plantas, tanto no seu desenvolvimento normal, como em resposta a condições externas à planta [2, 4, 5]. Desempenham funções antimicrobianas, antivirais e anti-inflamatórias juntamente com elevadas capacidades antioxidantes. Algumas das características demonstradas pelos compostos fenólicos tornam-os de grande interesse nutricional pela sua forte contribuição na manutenção da saúde humana [2, 6-8].

Os compostos fenólicos, presentes em grandes quantidades nas plantas, são uma parte essencial da dieta humana que ao longo dos tempos tem suscitado um crescente interesse devido aos seus efeitos antivirais, antibacterianos, antialérgicos e vasodilatadores, bem como pelas suas propriedades antioxidantes [3, 9-14].

Estes compostos caracterizam-se por possuírem na sua estrutura um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxilo. As suas estruturas podem variar desde uma molécula simples, de baixo peso molecular, até polímeros complexos de elevado peso molecular. A estrutura molecular, em particular o número, a posição dos

grupos hidroxilo no anel aromático e a natureza dos seus substituintes, têm uma grande importância na actividade antioxidante dos compostos fenólicos [3, 8, 15-17].

A actividade de um antioxidante é determinada pela sua reactividade como agente dador de protões ou de electrões; pelo local de interacção do radical antioxidante resultante que é controlado pela sua habilidade para estabilizar e deslocar o electrão desemparelhado; pela sua reactividade com outros antioxidantes; e pela possibilidade de quelatar iões metálicos [18].

O grande interesse demonstrado no estudo da actividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se em grande parte à sua capacidade de retardar ou inibir as lesões provocadas pelos radicais livres nas células, evitando a propagação de reacções de oxidação em cadeia [19].

Diversos estudos têm salientado que o consumo de substâncias antioxidantes na dieta diária pode produzir uma acção protectora efectiva contra os processos oxidativos que ocorrem naturalmente no organismo, essencialmente devido à sua capacidade de proteger o DNA contra os danos induzidos pelos radicais livres. Por outro lado, estudos recentes evidenciam a possibilidade dos compostos fenólicos produzirem efeitos pró-oxidantes que podem implicar potencial toxicidade e assim constituir a base de certas acções mutagénicas e citotóxicas para o organismo [19-21].

O envelhecimento das células, dos tecidos e do organismo como um todo, é uma acção dos radicais livres e os seus efeitos sobre o organismo são, de uma maneira geral, nocivos, estando relacionados com diversas condições clínicas, como por exemplo, o cancro, doenças cardiovasculares e alterações no sistema nervoso [22]. O papel dos radicais livres nas doenças humanas, biologia, toxicologia e na deterioração de alimentos tornou-se deste modo uma área de investigação de grande interesse. Assim, diversos métodos químicos, biológicos e electroquímicos têm sido propostos e aplicados nesta área de investigação [20].

Embora muitos compostos naturais e sintéticos apresentem uma actividade antioxidante de elevada importância essencialmente para aplicação em farmacologia, a lista de aditivos autorizados é bastante limitada o que se deve essencialmente à falta de conhecimentos sobre a sua composição molecular, quantidades de composto activo presente no material de origem, disponibilidade de dados relevantes sobre toxicidade e ainda devido a problemas de solubilidade [23, 24].

O objectivo deste trabalho é o estudo das propriedades antioxidantes de

compostos fenólicos, por métodos electroquímicos, de modo a analisar os seus potenciais redox tendo em conta que a sua facilidade em oxidar-se será de grande importância para a eficiência como antioxidante. As técnicas voltamétricas *e. g.* voltametria cíclica, onda quadrada e impulso diferencial são muito utilizadas para o estudo de processos de oxidação redução em vários meios, adsorção em superfícies de eléctrodo e mecanismos de transferência de diversos compostos biológicos. Assim, este trabalho consiste no estudo do comportamento electroquímico o ácido ferúlico, da capsaicina, do seu análogo dihidrocapsaicina e da curcumina, para uma ampla gama de electrólitos de suporte de diferentes valores de pH na superfície de um eléctrodo de carbono vítreo. Informações sobre o seu comportamento electroquímico, a partir dos resultados obtidos em diferentes pHs desempenham um papel crucial para a compreensão das suas propriedades, e do seu metabolismo num sistema biológico.

1.1.1. Ácido Ferúlico

O ácido ferúlico ($C_{10}H_{10}O_4$, Figura 1.1) é um composto fenólico, presente nos tecidos vegetais e considerado um importante ingrediente bioactivo de muitos alimentos. Muitos dos alimentos básicos que constituem a alimentação diária, como por exemplo, cereais integrais, farelo de trigo, citrinos, banana, café, repolho, espinafres, brócolos, beterraba, são importantes fontes de ingestão ricas em ácido ferúlico [25].

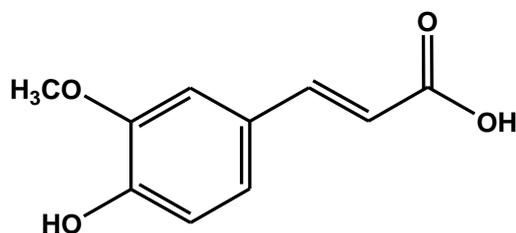


Figura 1.1 – Estrutura do ácido ferúlico.

Foi isolado pela primeira vez a partir de uma resina comercial, em 1866, e quimicamente sintetizado em 1925. Contudo, os seus efeitos biológicos só começaram a

ser assinalados em 1970, quando investigadores japoneses descobriram as propriedades antioxidantes de esteres de ácido ferúlico extraídos de óleo de arroz. Os dados promissores, encontrados durante os estudos iniciais, proporcionaram um elevado interesse no estudo e compreensão dos seus efeitos biológicos [25].

Durante os últimos anos têm sido atribuídas ao ácido ferúlico propriedades anti-carcinogénicas e radioprotectoras, antimicrobianas, antioxidantes, hipotensivas, anti-inflamatórias e ainda propriedades fotoprotectoras, concedendo-lhe um potencial bastante promissor no tratamento de um elevado número de patologias [25-27].

As propriedades antioxidantes são dos efeitos biológicos atribuídos ao ácido ferúlico que têm recebido uma maior atenção. A actividade antioxidante demonstrada por si permite a defesa do DNA e dos lípidos contra a oxidação por acção de espécies reactivas de oxigénio (ROS). Assim, o ácido ferúlico pode ser considerado benéfico na prevenção e/ou tratamento de distúrbios ligados ao stress oxidativo, incluindo a doença de Alzheimer, diabetes, cancro, hipertensão e aterosclerose. A forte ligação entre a inflamação e o stress oxidativo sugere ainda a eficácia do ácido ferúlico contra doenças inflamatórias [25, 28-30].

Estudos recentes avaliaram a capacidade do ácido ferúlico na eliminação de radicais livres em culturas de neurónios e sistemas de sinaptossomas expostos a radicais hidroxilo e peróxido. Estes estudos demonstraram que a presença do ácido ferúlico reduz significativamente os danos provocados pelos radicais livres nos sistemas de células neuronais, sem provocar a morte celular, produzindo efeitos mais significativos do que os obtidos em tratamentos com compostos químicos semelhantes, ácido vanílico, cumárico e cinâmico. Os resultados apresentados sugerem a importância do ácido ferúlico na metodologia de intervenção terapêutica contra doenças neurodegenerativas em que o stress oxidativo é o principal implicado [31].

Considerando o elevado número de propriedades farmacológicas atribuídas ao ácido ferúlico é de extrema importância o desenvolvimento de mais estudos que clarifiquem as suas propriedades e os seus mecanismos de acção de modo a proporcionar uma melhor compreensão e desenvolvimento de aplicações futuras.

1.1.2. Capsaicina e Dihidrocapsaicina

A pimenta do género *Capsicum* está entre uma das especiarias mais consumidas no mundo, particularmente no Sudoeste Asiático e países latino-americanos. O sabor ardente da pimenta é induzido por compostos derivados de alcalóides, os capsaicinóides. A capsaicina (Figura 1.2) e o seu derivado dihidrocapsaicina, que possui a cadeia lateral totalmente saturada (Figura 1.3), são os capsaicinóides que possuem uma maior pungência e compreendem 80-90% dos capsaicinóides encontrados nas pimentas [32-35].

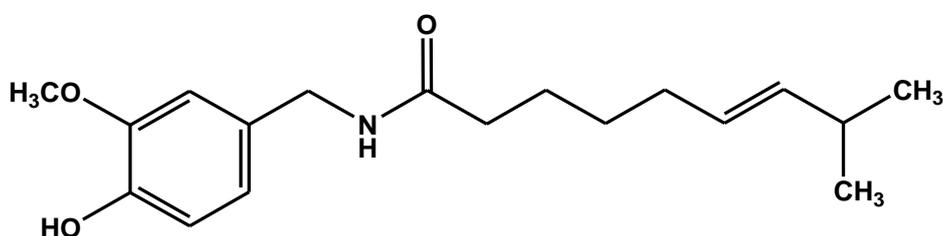


Figura 1.2 – Estrutura da capsaicina

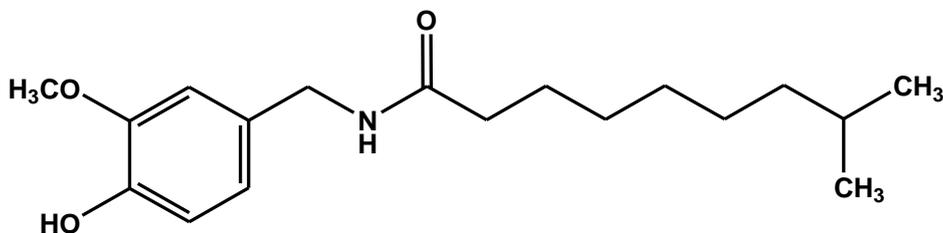


Figura 1.3 – Estrutura da dihidrocapsaicina

A capsaicina, $C_{18}H_{27}NO_3$ e a dihidrocapsaicina, $C_{18}H_{29}NO_3$, são alcalóides naturais derivados da pimenta vermelha, introduzida na Europa, após a viagem de Colombo ao Novo Mundo, em 1494. São substâncias resinosas picantes encontradas nas sementes e membranas dos frutos do género *Capsicum*, responsáveis pela sensação de ardor e dor na mucosa bucal. A capsaicina e a dihidrocapsaicina são moléculas hidrofóbicas, inodoras e de sabor pungente. Para a sua dissolução são usados álcoois e outros solventes orgânicos [33, 36].

A capsaicina possui uma grande aplicação como aditivo alimentar em diversos géneros de cozinha, sendo actualmente cada vez mais utilizada para fins terapêuticos. Tem também vasta utilização como produto da indústria bélica, na confecção de sprays para defesa pessoal, “peper spray” e “peper foam” [32].

Considerando o consumo frequente de capsaicina como aditivo alimentar e a sua aplicação para fins terapêuticos, é importante o desenvolvimento dos estudos de modo a ter uma avaliação correcta e precisa da toxicidade deste composto, das suas propriedades funcionais e dos seus efeitos nocivos para a saúde pública.

Esta molécula apresenta propriedades farmacológicas de acção na dissolução de coágulos, como expectorante, descongestionante, indutor da termogénese (efeito de transformar parte das calorias dos alimentos em calor), além de actuar como antibacteriana e de ter um forte poder antioxidante [33, 36-38].

Alguns estudos revelaram a acção da capsaicina com efeito protector de mucosa gástrica inibindo a produção de mediadores inflamatórios em doenças gástricas. Foram também obtidos grandes êxitos clínicos com o uso da capsaicina contra a dor e a inflamação em patologias como artrite reumatóide e osteoartrite. No entanto, a sua ingestão primária pode causar ardor na boca e na garganta, secreção nasal e lacrimejamento, e quando em excesso pode mesmo causar inflamações, náuseas, vómitos, dor abdominal e diarreia [33, 39, 40].

Uma das propriedades fisiológicas mais conhecidas da capsaicina é a sua selectividade para efeitos sobre a parte periférica do sistema nervoso sensorial, particularmente sobre os neurónios. É um composto conhecido por reagir com o neurotransmissor dos impulsos dolorosos como a substância P dos terminais do nervo sensorial, o que fornece uma fundamentação para a sua utilização como ferramenta experimental versátil no estudo dos mecanismos da dor e também para aplicações farmacológicas, no tratamento de alguns estados periféricos dolorosos, como a artrite reumatóide, síndrome da dor pós-mastectomia e diabetes [34, 36, 40-42].

Alguns estudos têm revelado efeitos da capsaicina como antimutagénica, antigenotóxica e efeitos anticarcinogénicos, sugerindo que este composto é um importante dietético fitoquímico com uma potencial actividade quimiopreventiva [37]. Outros relataram que a capsaicina foi aplicada para inibir mutações cromossómicas, quebras no DNA, e ligações covalentes de potentes agentes cancerígenos. O pré-tratamento com capsaicina de vários tecidos tem mostrado resultados na diminuição dos

danos por radicais livres, mediados por substâncias exógenas [43]. Em contra partida, alguns estudos revelam a possibilidade da capsaicina ser carcinogénica e genotóxica. Levando a que capsaicina seja sujeita a uma extensa investigação [37, 44].

Tendo em conta a grande variedade de estudos efectuados pode concluir-se que, a capsaicina apresenta uma grande diversidade de efeitos benéficos assim como um potencial bastante significativo no tratamento de múltiplas doenças que resultam do stress oxidativo. Os efeitos protectores da capsaicina, assim como do seu análogo, dihidrocapsaicina, são atribuídos às suas propriedades antioxidantes que devem ser extensamente investigadas para uma melhor compreensão das suas propriedades em aplicações futuras.

1.1.3. Curcumina

A curcumina [1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3, 5-diona], Figura 1.4, é um fitoquímico natural de cor amarela, isolado do rizoma da planta *Curcuma longa* L., que é uma planta medicinal amplamente usada na China, Índia e no Sudoeste Asiático, também conhecida por turmeric e açafrão-da-índia. É considerada uma preciosa especiaria, muito usado na culinária como corante e conservante natural de alimentos.

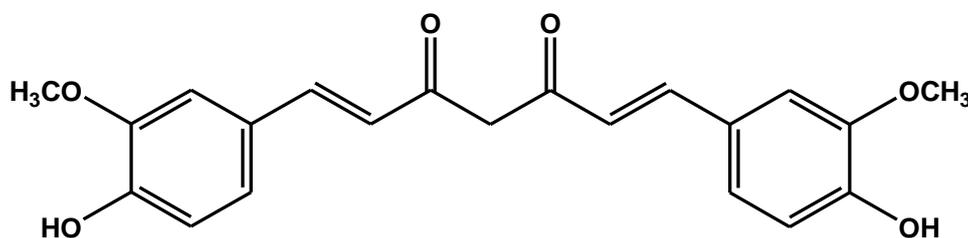


Figura 1.4 – Estrutura da curcumina.

A curcumina tem atraído um considerável interesse nos últimos anos devido ao elevado potencial medicinal apresentado. Assim, a curcumina é aplicada no tratamento

de várias doenças devido a uma vasta gama de propriedades farmacológicas, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antibacterianas, hipocolesterolémicas, anticancerígenas e quimiopreventivas [45-56]. O potencial uso da curcumina na prevenção do cancro e no tratamento da infecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) é objecto de intensa pesquisa laboratorial e clínica [24, 56, 57].

Recentemente foi demonstrado que a curcumina regula tanto a via clássica como a via alternativa de activação do sistema nervoso, inibindo as suas maiores vias centrais de activação. O que a torna de elevada importância no tratamento de pacientes com Alzheimer, Esclerose Múltipla e demência provocada pelo HIV, pois são doenças do sistema nervoso central associadas com a activação da via do sistema complementar [58]. Age, ainda como agente antibacteriano, promovendo a destoxificação do fígado através da inibição da actividade da glutathione S-transferase [55, 59].

Um dos factores mais importantes responsável por todas as actividades da curcumina é a sua capacidade em captar radicais livres de oxigénio (ROS) e nitrogénio (NOS) reactivos. Esta exibe uma forte actividade antioxidante, comparável com a actividade antioxidante apresentada pela vitamina C e D. O que torna a investigação do seu processo de oxidação-redução e da sua actividade catalítica de elevado interesse biológico [48, 50, 51, 60].

Estudos recentes evidenciam que vários metais actuam como catalisadores na deterioração oxidativa de macromoléculas biológicas. A toxicidade demonstrada por estes metais pode dever-se em parte à sua capacidade em gerar radicais livres. Uma vez que a curcumina é uma dicetona, e que as capacidades quelantes de dicetonas têm sido amplamente investigadas para um grande número de iões metálicos, esta pode ser de grande importância no tratamento de intoxicação por metais. Esta capacidade de ligação da curcumina com alguns metais de transição, e.g. ferro e cobre, é considerada bastante útil no tratamento da doença de Alzheimer. Foi mostrado que entre as populações indígenas a utilização regular de açafrão podia ser um dos motivos responsáveis pela redução do risco de doença de Alzheimer [50, 61].

A curcumina é também aplicada na investigação da oxidação electrocatalítica de alcóois simples, glicose e alguns aminoácidos, em eléctrodos de carbono vítreo modificados com Ni-curcumina. Estes estudos baseiam-se na oxidação-redução do par Ni(III) / Ni(II) com o complexo Ni(II)-curcumina como centro catalítico [47, 62, 63].

A curcumina é bem absorvida pelo organismo, tanto *in vitro* como *in vivo*

[64, 65]. Do ponto de vista toxicológico é relativamente inerte, não apresentando assim, quaisquer efeitos tóxicos tanto para os animais como para os seres humanos, mesmo em doses bastante elevadas. Apesar da sua segura eficácia, a curcumina ainda não foi aprovada como agente terapêutico. Os principais problemas apontados são a sua baixa solubilidade em água, biodisponibilidade relativamente limitada e ainda a sua coloração intensa [49-51].

Em conclusão, a curcumina apresenta uma variedade de efeitos benéficos e parece ter um potencial bastante promissor no tratamento de múltiplas condições patológicas com forte incidência em patologias que resultam do stress oxidativo. Os efeitos protectores da curcumina são atribuídos principalmente às suas propriedades antioxidantes, tornando imperativo avaliar o seu poder antioxidante e os mecanismos pelos quais a curcumina exerce a sua actividade, numa tentativa de correlacionar a actividade antioxidante com as características estruturais da molécula.

1.2. Princípios de Electroquímica

Ao longo deste trabalho, os mecanismos de oxidação do ácido ferúlico, da capsaicina, da dihidrocapsaicina e da curcumina vão ser investigados recorrendo a métodos electroquímicos. Assim, nesta secção apresenta-se uma breve descrição dos fundamentos teóricos dos diferentes métodos aplicados nos estudos efectuados.

A electroquímica envolve o estudo de fenómenos químicos associados à separação de cargas. Muitas vezes esta separação de cargas pode levar à transferência de carga, ocorrendo homogeneamente em solução, ou heterogeneamente na superfície do eléctrodo. De modo a assegurar a electroneutralidade, têm lugar duas ou mais reacções de transferência de carga, em direcções opostas. Com excepção das reacções redox homogéneas, as reacções de transferência de carga estão separadas no espaço, ocorrendo geralmente em eléctrodos diferentes imersos em solução numa célula electroquímica [66].

Em todos os processos electroanalíticos a célula electroquímica contém três eléctrodos: o *eléctrodo de trabalho*, o *eléctrodo de referência* e o *eléctrodo auxiliar*. O *eléctrodo de trabalho* é o eléctrodo onde ocorre a reacção electroquímica e cujo

potencial é controlado através do *eléctrodo de referência* com a ajuda de um potencióstato. A corrente da célula electroquímica flui entre o *eléctrodo de trabalho* e o *eléctrodo auxiliar* através do electrólito de suporte. O *eléctrodo de referência* utilizado numa experiência electroquímica deve possuir uma impedância elevada de forma a por ele não possa passar corrente, mantendo o seu potencial constante. Os eléctrodos estão ligados por meios condutores, tanto na solução (através do *electrólito de suporte* – transporte iónico) como externamente (através de fios condutores) de tal modo que possa ser possível o transporte de carga [66].

O conhecimento e compreensão dos processos que ocorrem no eléctrodo de trabalho e a escolha da técnica electroquímica têm um papel muito importante na obtenção e explicação dos dados obtidos experimentalmente.

A maioria dos processos de transferência de carga envolve a transferência de electrões e no caso das espécies oxidadas O , e reduzidas R , a reacção redox pode ser representada esquematicamente por:



onde O , espécie oxidada, recebe n electrões para dar origem a R , espécie reduzida. O par O/R tem uma energia associada, energia redox, E_{redox} , que pode ser relacionada com o potencial de eléctrodo.

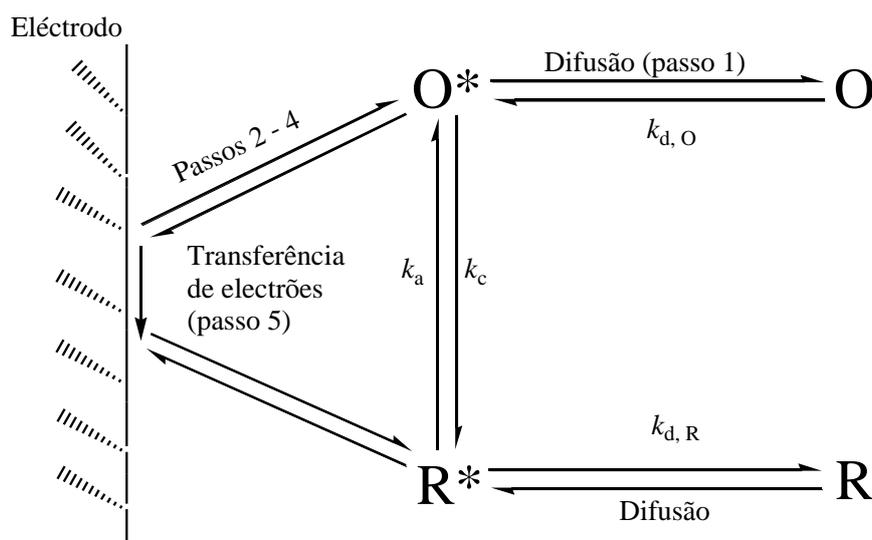


Figura 1.5 – Esquema de um processo de transferência de electrão num eléctrodo [66]; passo 1 – Difusão das espécies; passo 2 – Rearranjo da atmosfera iónica; passo 3 – Reorientação dos dipolos do solvente; passo 4 – Alterações nas distâncias entre o ião central e os ligandos; passo 5 – Transferência do electrão.

Durante uma experiência electroquímica, ao ser aplicado um potencial conhecido ao eléctrodo de trabalho, as espécies electricamente carregadas são atraídas electrostaticamente para a superfície do eléctrodo. Ao mesmo tempo, outras espécies presentes em solução podem também interagir com a superfície do eléctrodo de trabalho através da adsorção. Assim, de modo a descrever um processo de eléctrodo, tem de se ter em consideração o transporte das espécies para a superfície do eléctrodo bem como a reacção de transferência de electrão que ocorre na superfície do eléctrodo.

Na proximidade da superfície do eléctrodo (*camada de difusão*) o transporte das espécies só ocorre por difusão. Na Figura 1.5 encontra-se uma representação esquemática dos processos de eléctrodo relativos à transferência de electrão.

A dupla camada é a região interfacial que consiste num ordenamento de cargas positivas ou negativas na superfície do eléctrodo e num ordenamento em quantidade igual e de carga oposta na solução para neutralizar a carga do eléctrodo. É a parte da solução próxima do eléctrodo e a mais afectada pelas reacções de eléctrodo.

Nas experiências electroquímicas, considera-se que durante a reacção de oxidação o eléctrodo de trabalho funciona como receptor de electrões transferidos, gerando uma corrente positiva, ou seja, uma corrente anódica, I_a . Ao contrário, considera-se que, durante a reacção de redução o eléctrodo de trabalho actua como dador de electrões e a corrente registada, a corrente catódica, I_c , tem um valor negativo [66].

1.2.1. Técnicas de Voltametria

A voltametria é uma técnica electroquímica onde as informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química são obtidas a partir do registo de curvas corrente-potencial, feitas durante a electrólise dessa espécie. No decorrer de cada experiência voltamétrica, tanto o potencial aplicado como a corrente registada variam com o tempo. A curva de intensidade de corrente (I), em Amperes (A), em função do potencial aplicado (E), em Volts (V), obtida é designada por voltamograma. A variação de potencial ao longo do tempo designa-se por velocidade de varrimento, v .

A aplicação de um potencial a um eléctrodo origina uma corrente faradaica, I_f ,

que está directamente relacionada com a transferência de carga, e uma corrente capacitiva, I_c , necessária para organizar as moléculas e os iões presentes na dupla camada do eléctrodo [66, 67]. A corrente total registada, I_t , é descrita pela equação:

$$I_t = I_c + I_f$$

Das técnicas voltamétricas existentes as utilizadas no presente trabalho são: voltametria cíclica, que é uma técnica de varrimento cíclico de potencial, e que consiste na aplicação de um potencial, ao eléctrodo de trabalho, que varia ciclicamente com o tempo; voltametria de impulso diferencial e voltametria de onda quadrada, que são técnicas voltamétricas de degrau e impulso e que consistem na aplicação ao eléctrodo de trabalho de um degrau de potencial ou de corrente, alterando instantaneamente o sistema electroquímico.

1.2.1.1. Voltametria Cíclica (CV)

A voltametria cíclica (*Cyclic Voltammetry*, CV) é uma técnica muito utilizada para obter informação qualitativa de uma reacção electroquímica, permitindo o diagnóstico dos mecanismos da reacção electroquímica, identificação de espécies electroactivas presentes em solução ou análise semi-quantitativa da cinética das reacções. Quando se recorre ao estudo electroquímico de um novo sistema, é muitas vezes a primeira técnica a ser aplicada, uma vez que permite obter de forma rápida a informação sobre os potenciais a que ocorrem os eventuais processos de transferência de carga [66].

Esta técnica consiste na aplicação de um potencial ao eléctrodo de trabalho, que varia de uma forma linear a uma velocidade de varrimento constante, $\nu = dE / dt$. O potencial aplicado varia entre um potencial inicial (E_i), e um potencial final (E_f), previamente escolhidos, oscilando ciclicamente entre um valor de potencial máximo (E_{max}) e um valor de potencial mínimo (E_{min}), Figura 1.6. Podendo o sentido do varrimento do potencial ser positivo ou negativo [66].

A corrente faradaica, I_f , devida à reacção de eléctrodo, é registada na zona relevante de potencial onde ocorre a reacção de eléctrodo, juntamente com uma

contribuição capacitiva, I_c . Com o varrimento de potencial a carga da dupla camada varia e a contribuição capacitiva aumenta com o aumento da velocidade de varrimento [66].

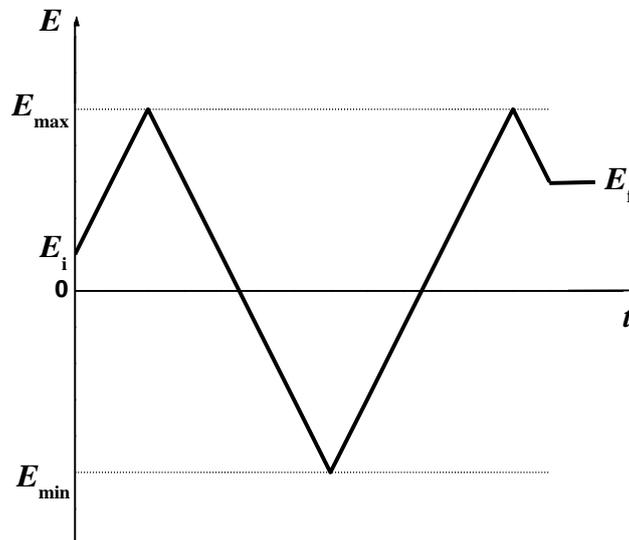


Figura 1.6 – Variação do potencial aplicado em função do tempo numa experiência de voltametria cíclica. E_i - potencial inicial; E_f - potencial final; E_{\max} - potencial máximo; E_{\min} - potencial mínimo.

Os parâmetros fundamentais a considerar em voltametria cíclica são:

- O potencial inicial – E_i
- O sentido inicial do varrimento
- A velocidade de varrimento, ν , dada por $\nu = |dE/dt|$
- O potencial máximo – E_{\max}
- O potencial mínimo – E_{\min}
- O potencial final - E_f

A variação da corrente em função do potencial aplicado ao sistema é representada num gráfico, ao qual se dá o nome de voltamograma cíclico. Este apresenta o registo de picos de corrente que correspondem às semi-reacções de oxidação e/ou redução no eléctrodo.

A CV permite fazer um 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.

Transferência electrónica reversível

Na Figura 1.7, encontra-se representado um voltamograma cíclico típico para um processo de transferência de carga reversível, assim como os parâmetros característicos que permitem a caracterização do processo de eléctrodo do sistema em estudo. Estes parâmetros são: o potencial de pico anódico (E_{pa}), a intensidade máxima de corrente que resulta da reacção de oxidação ou pico de corrente anódica (I_{pa}), o potencial de pico catódico (E_{pc}), e a intensidade máxima de corrente que resulta da reacção de redução ou pico de corrente catódico (I_{pc}) [66].

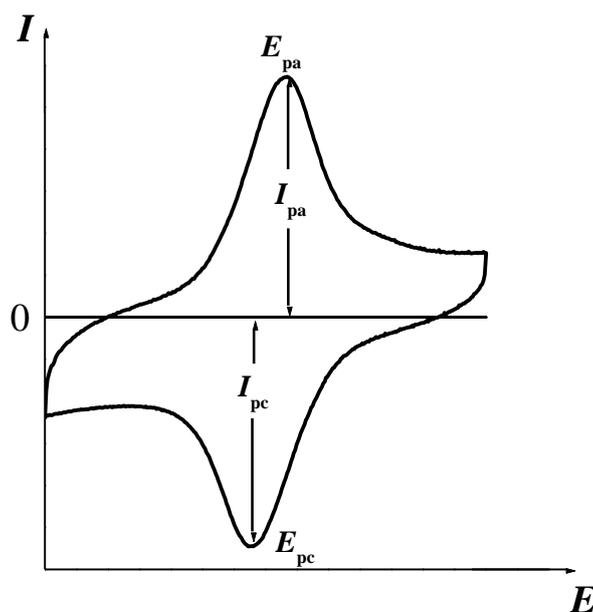


Figura 1.7 – Voltamograma cíclico típico para uma reacção reversível. E_{pa} – potencial de pico anódico; I_{pa} – corrente de pico anódico; E_{pc} – potencial de pico catódico; I_{pc} – corrente de pico catódico.

Existem várias relações entre os parâmetros definidos e a velocidade de varrimento de potencial, que fornecem informações tanto de natureza termodinâmica como cinética e que permitem caracterizar o sistema em estudo.

De modo a que um determinado sistema electroquímico seja considerado como

tendo um comportamento reversível através de voltametria cíclica, este deve obedecer as seguintes condições de diagnóstico [1]:

- $I_p \sim v^{1/2}$
- E_p independente de v
- $\Delta E_p = |E_{pa} - E_{pc}| = 57/n$ (mV)
- $|E_p - E_{p/2}| = 56,6/n$ (mV)
- $|I_{pa} / I_{pc}| = 1$

A aplicação dos critérios de reversibilidade acima descritos, permite calcular o número de electrões transferidos no processo electroquímico.

Transferência electrónica irreversível

Quando não se verificam as condições necessárias para que se caracterize um sistema como reversível, este pode ser considerado como irreversível ou quasi-reversível.

A extensão da irreversibilidade de um sistema intensifica-se com o aumento da velocidade de varrimento, verificando-se ao mesmo tempo, que os valores de I_{pa} e I_{pc} se tornam bastante diferentes. Em comparação com o caso reversível, verifica-se ainda uma crescente separação entre picos anódicos e catódicos e a diminuição das correntes de pico. Assim, um sistema que a baixa velocidade de varrimento se comporta como reversível, pode mostrar-se como não-reversível quando se aumenta a velocidade de varrimento.

Os critérios de diagnóstico para que um sistema electroquímico seja considerado irreversível são [66]:

- $|E_p - E_{p/2}| = 47,7 / (\alpha n^2)$ (mV)
- E_p dependente de v
- $|dE_p / d \log v| = 29,6 / (\alpha n)$ (mV)

O voltamograma cíclico de um sistema electroquímico irreversível pode apresentar picos de corrente que não têm picos inversos associados no varrimento do potencial no sentido inverso. Entre os processos de eléctrodo reversíveis e irreversíveis, encontram-se os processos quasi-reversíveis, em que se observam picos inversos aquando do varrimento oposto, mas com $\Delta E_p > 57/n$ (mV).

Espécies adsorvidas

A resposta voltamétrica de um sistema electroquímico é influenciada substancialmente pela adsorção do reagente ou dos produtos de reacção na superfície do eléctrodo de trabalho. As moléculas orgânicas, devido ao carácter hidrofóbico, adsorvem facilmente na superfície de eléctrodos sólidos. A adsorção por parte das moléculas orgânicas deve-se em parte, ao facto de estas apresentarem ligações duplas na sua constituição. As moléculas orgânicas podem adquirir uma orientação na superfície do eléctrodo seguindo uma geometria específica das várias orientações, dependendo do potencial aplicado ao eléctrodo ou da concentração na solução da substância em estudo. Independentemente da orientação das moléculas adsorvidas, os resultados electroquímicos vão ser influenciados pelo fenómeno de adsorção.

Os efeitos da adsorção na resposta voltamétrica de um sistema electroquímico são vários, desde o efeito catalítico da reacção redox até ao fenómeno mais comum que é o bloqueamento da superfície do eléctrodo de trabalho. Consequentemente, verifica-se uma alteração da forma da onda voltamétrica.

1.2.1.2. Voltametria de Impulso Diferencial (DPV)

O desenvolvimento das técnicas de impulso de potencial teve por principal objectivo, diminuir o efeito da corrente capacitiva na corrente total. Depois de se aplicar um impulso de potencial, a corrente capacitiva extingue-se mais rapidamente do que a corrente faradaica, assim, a corrente é medida no fim do impulso [66]

A voltametria de impulso diferencial (*Differential Pulse Voltammetry*, DPV) consiste na aplicação de impulsos de potencial sucessivos com uma amplitude de impulso ΔE_p (amplitude de impulso), em intervalos periódicos de tempo τ , sobre uma

escada de potencial com degrau ΔE_s , a corrente é medida imediatamente antes da aplicação do impulso e no fim deste, Figura 1.8 A). A diferença entre estas correntes é o valor de corrente registado num voltamograma de impulso diferencial, Figura 1.8 B).

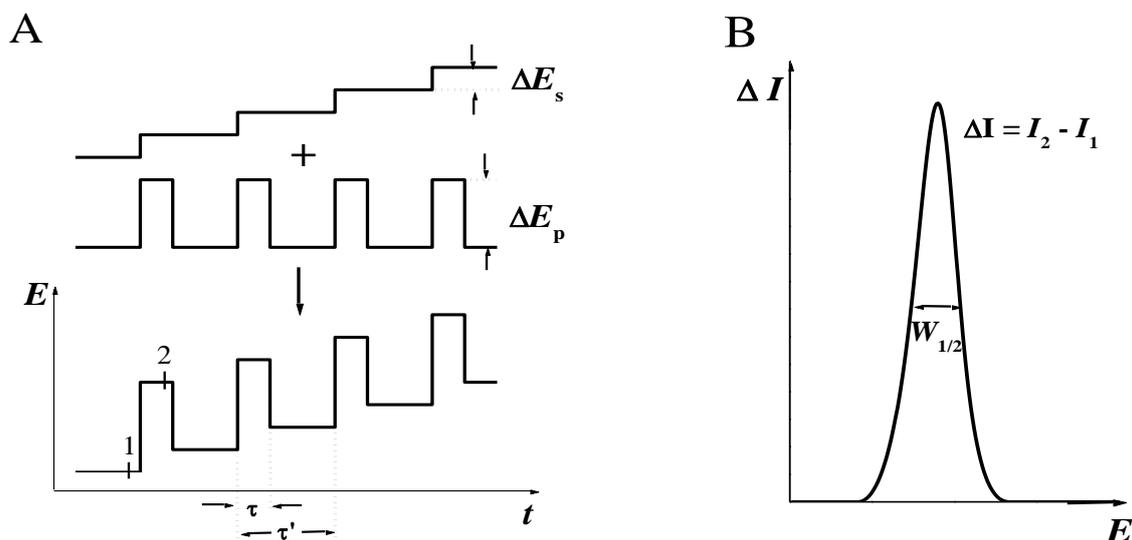


Figura 1.8 – Voltametria de impulso Diferencial. **A)** Esquema de aplicação de potenciais; **B)** resposta típica.

A velocidade de varrimento é determinada pelo tempo de intervalo entre duas aplicações sucessivas de impulso conjuntamente com o valor de ΔE_s : $\nu = \tau \Delta E_s$. Normalmente, a velocidade de varrimento efectiva varia entre 1 e 10 mV s^{-1} .

Como a voltametria de impulso diferencial é uma técnica diferencial, a resposta é semelhante à primeira derivada de um voltamograma diferencial, isto é, um pico.

A amplitude escolhida para o impulso de potencial ΔE_p , deve ter em conta a reacção em estudo e a sensibilidade exigida, pois grandes amplitudes geram correntes capacitivas residuais que podem diminuir 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; no entanto, também depende da velocidade da reacção electroquímica.

1.2.1.3. Voltametria de Onda Quadrada (SWV)

Em voltametria de onda quadrada (*Square Wave Voltammetry, SW*) a forma de onda utilizada combina uma onda quadrada de amplitude de impulso ΔE_p de larga amplitude com uma escala de potencial com degraus de amplitude ΔE_s . O resultado é uma corrente que pode ser obtida a elevadas velocidades efectivas de varrimento. Devido à construção da onda, durante cada ciclo de frequência $f = \tau^{-1}$, é aplicado ao eléctrodo um impulso de potencial positivo durante metade do ciclo seguindo-se a aplicação de um impulso de potencial negativo na restante metade. O tipo de onda de potencial e a resposta típica de um sistema reversível são os representados na Figura 1.9, [66].

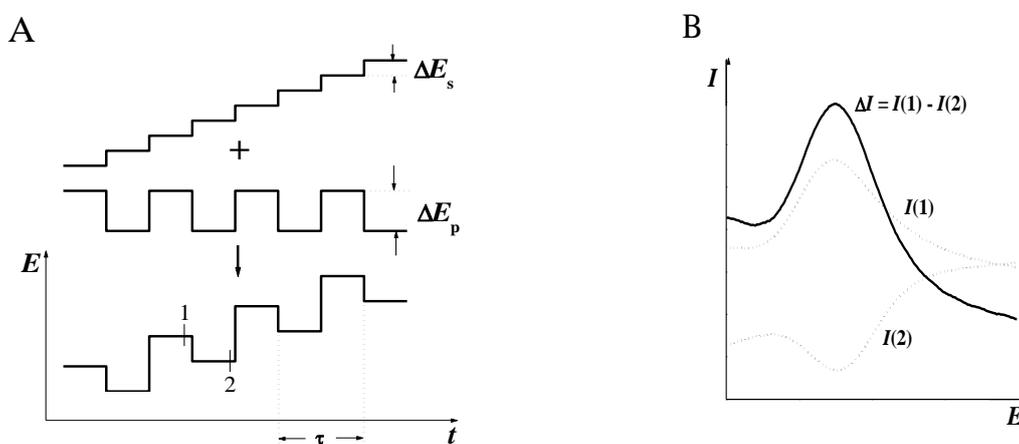


Figura 1.9 – Voltametria de pulso Diferencial. **A)** Esquema de aplicação de potenciais; **B)** resposta típica.

Nesta técnica, a amostragem da corrente é efectuada antes do fim de ambos os impulsos, positivo e negativo, em cada ciclo (pontos 1 e 2 na Figura 1.9 A). A *corrente total*, $\Delta I (I_t)$ que é registada resulta da diferença entre a corrente $I(1)$ registada no final

do impulso de potencial directo – *corrente directa* (I_f – *forward current*), e a corrente $I(2)$ registada no final do impulso inverso – *corrente inversa* (I_b – *backward current*). Como $I(2)$ possui sinal contrário $I(1)$, para sistemas reversíveis $\Delta I = I(1) - I(2)$ é maior que $I(1)$, Figura 1.9 B).

Este tipo de amostragem e tratamento da corrente é responsável por uma maior sensibilidade desta técnica comparativamente com a voltametria de impulso diferencial.

A voltametria de onda quadrada tem também por vantagem a possibilidade de serem realizadas análises a velocidades elevadas com velocidades efectivas da ordem de 1 Vs^{-1} , diminuindo assim o consumo de espécies electroactivas a analisar, quando comparado com a voltametria de impulso diferencial, reduzindo ainda problemas que advêm do bloqueio da superfície do eléctrodo [66].

Capítulo 2

Experimental

Ao longo deste capítulo é apresentada uma descrição do procedimento experimental, incluindo a preparação de soluções de reagentes, bem como das diferentes metodologias envolvidas na preparação e execução das experiências; da instrumentação electroquímica utilizada e dos parâmetros experimentais associados a cada uma das técnicas aplicadas, assim como do tratamento e apresentação dos resultados obtidos ao longo deste trabalho experimental.

2.1. Reagentes e Soluções

Na execução experimental utilizou-se para o estudo electroquímico curcumina, $C_{21}H_{20}O_6$, capsaicina, $C_{18}H_{27}NO_3$ e dihidrocapsicina, $C_{18}H_{29}NO_3$; que foram adquiridos à Extrasynthese, França. Foi ainda usado ácido ferúlico, $C_{10}H_{10}O_4$, adquirido à Sigma-Aldrich.

As soluções padrão dos compostos estudados electroquimicamente foram preparadas em etanol (C_2H_5OH), de qualidade analítica e guardadas a $4^\circ C$ até ao momento da sua utilização. As concentrações específicas usadas durante o estudo voltamétrico encontram-se descritas ao longo do trabalho, tendo a sua preparação sido feita directamente na célula electroquímica a partir das soluções mãe por diluição no electrólito de suporte desejado.

Para a medição de micro-volumes (2-1000 μL) das soluções preparadas e usadas ao longo de todo o trabalho experimental foram utilizadas pipetas ajustáveis Pipetman da Gilson S. A., Villiers-le-Bel, França.

Todas as soluções de electrólito de suporte foram preparadas de acordo com a Tabela 2.1, a partir de reagentes de pureza analítica em água desionizada ultrapura obtida através de um sistema Millipore Milli-Q System (condutividade $\leq 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$), Millipore S. A., Molsheim, França. As medidas de pH das soluções tampão de electrólito de suporte foram realizadas utilizando um medidor de pH Crison micropH 2001, Barcelona, Espanha, com um eléctrodo de vidro combinado Ingold.

Tabela 2.1 - Composição das soluções tampão de electrólito de suporte.

Electrólito de suporte	pH
0,2 M KCl + 0,2 M HCl	1,3
0,2 M KCl + 0,2 M HCl	2,0
0,2 M NaAcO + 0,2 M HAcO	3,5
0,2 M NaAcO + 0,2 M HAcO	4,3
0,2 M Na_2HPO_4 + 0,2 M NaH_2PO_4	6,1
0,2 M Na_2HPO_4 + 0,2 M NaH_2PO_4	6,9
0,2 M Na_2HPO_4 + 0,2 M NaH_2PO_4	8,1
2 M NH_3 + 2 M NH_4Cl	9,9
0,2 M KCl + 0,2 M NaOH	12,0

Todas as medidas experimentais foram realizadas à temperatura ambiente ($25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$).

2.2. Instrumentação

As medidas voltamétricas foram realizadas utilizando um potencióstato/galvanóstato Autolab PGSTAT 10, da Autolab Electrochemical Instruments, Utrecht, Holanda, funcionando no modo potenciostato, controlado por um

computador com Software GPES (*General Purpose Electrochemical System*), versão 4.9 da Eco-chemie, Utrecht, Holanda, Figura 2.1.



Figura 2.1 – Potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 10.

2.3. Parâmetros Voltamétricos

Os parâmetros voltamétricos em cada um dos ensaios realizados, bem como a aquisição e o tratamento dos dados obtidos foram controlados com o recurso ao programa GPES, versão 4.9 da Eco-chemie, Utrecht, Holanda.

Para a avaliação por DPV, em todos os ensaios realizados, os parâmetros experimentais foram os seguintes: largura do impulso de 70 ms, amplitude de impulso de 50 mV e velocidade de varrimento de 5 mVs^{-1} .

No estudo por SWV foi aplicado um degrau de potencial de 2 mV, uma amplitude de impulso de 50 mV e uma frequência de impulso de 50 Hz, correspondendo a uma velocidade efectiva de 100 mVs^{-1} . Nas medidas por CV foram aplicadas velocidades de varrimento num intervalo de velocidades entre 0.01 e 2 Vs^{-1} .

2.4. Célula Electroquímica

Todos os estudos electroquímicos foram efectuados numa célula electroquímica de um único compartimento com capacidade volumétrica máxima de 2 mL, da Cypress System, Inc., EUA, constituída por três eléctrodos: um eléctrodo de referência de Ag/AgCl (3 M KCl), um eléctrodo de trabalho de carbono vítreo (GCE) de 1,5 mm de diâmetro e um fio de platina como eléctrodo auxiliar, Figura 2.2.



Figura 2.2 – Eléctrodos e célula electroquímica.

Antes de cada ensaio electroquímico a superfície do GCE foi polida numa placa de polimento com *spray* de diamante com partículas de 1 μm (Kemet International Ltd, Reino Unido) e de seguida lavado com água milli-Q. Depois de efectuado o procedimento anterior, realizou-se o condicionamento electroquímico da superfície do eléctrodo através do registo de vários voltamogramas na solução tampão de electrólito de suporte, até se obter uma resposta electroquímica estável.

Todas as experiências foram realizadas à temperatura ambiente de 25 ± 1 °C.

2.5. Tratamento dos Dados

A apresentação de todos os gráficos e voltamogramas electroquímicos, bem como o tratamento dos dados obtidos ao longo deste trabalho experimental, foram executados usando o software Origin, versão 6.0, da Microcal Software, Inc. USA.

Para a representação das estruturas químicas das moléculas estudadas foi utilizado o programa ChemDraw Ultra, versão 8.0 da Cambridge Soft Corporation, EUA.

Capítulo 3

Estudo voltamétrico do ácido ferúlico

Ao longo deste capítulo é efectuada uma descrição do comportamento electroquímico do ácido ferúlico, investigado para uma vasta gama de electrólitos de suporte.

3.1. Comportamento electroquímico do ácido ferúlico

O mecanismo de oxidação electroquímica do ácido ferúlico na superfície do GCE foi investigado por CV, DPV e SWV no intervalo de pH indicado na Tabela 2.1. Para os estudos por CV foi usada uma solução de ácido ferúlico 100 μM e para os estudos por DPV e SWV foi usada uma solução de ácido ferúlico 10 μM .

3.1.1. Voltametria Cíclica

Os resultados obtidos numa solução de 100 μM para pH 4,3 com um GCE, Figura 3.1, mostram que num primeiro voltamograma se observou, no varrimento anódico, o aparecimento de dois picos de oxidação, pico 1_a e 2_a, a um potencial de $E_{p1a} = + 0,535 \text{ V}$ e de $E_{p2a} = + 0,670 \text{ V}$, respectivamente. Os picos observados foram atribuídos à oxidação do ácido ferúlico. Quando o sentido do varrimento foi invertido, no varrimento catódico observou-se o aparecimento de um pico de redução, pico 3_c, a um potencial de $E_{p3c} = + 0,354 \text{ V}$. O aparecimento do pico 3_c foi atribuído à redução das espécies formadas na superfície do eléctrodo após a oxidação do ácido ferúlico. Com o

registo de um segundo varrimento observou-se o aparecimento de um novo pico de oxidação, pico 3_a , a $E_{p3a} = +0,306$ V. Este pico foi atribuído à oxidação dos produtos de oxidação do ácido ferúlico. O aparecimento dos picos 3_a e 3_c , evidenciou a reversibilidade da reacção redox dos produtos de oxidação do ácido ferúlico.

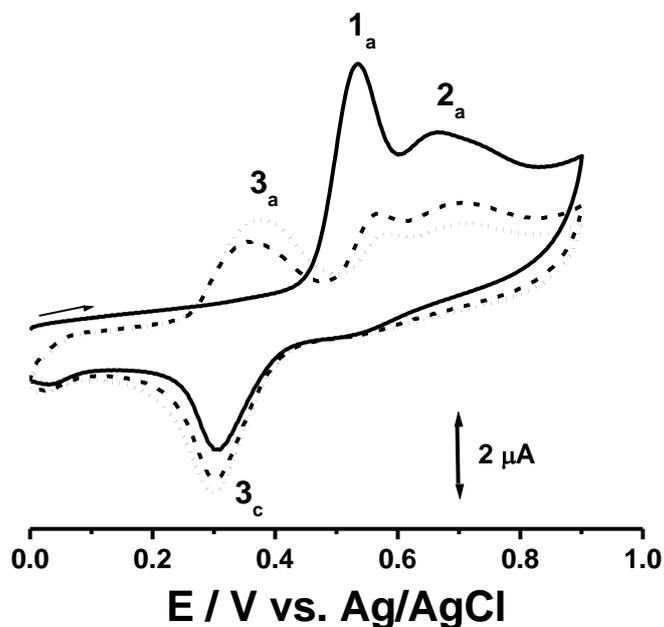


Figura 3.1 – Voltamogramas cíclicos obtidos numa solução de ácido ferúlico $100 \mu\text{M}$, em tampão acetato, pH 4,3, a uma velocidade de varrimento de $0,50 \text{ Vs}^{-1}$; (—) primeiro, (- - -) segundo e (•••) terceiro varrimentos.

Com o registo de voltamogramas sucessivos, verificou-se, que com o aumento do número de varrimentos, a corrente dos picos 1_a e 2_a tende a diminuir, enquanto que, a corrente dos picos 3_a e 3_c aumenta com o aumento do número de varrimentos, Figura 3.1. Esta observação é explicada pela adsorção dos produtos de oxidação do ácido ferúlico na superfície do GCE ao longo dos varrimentos sucessivos, levando a uma diminuição da sua área electroactiva livre.

Com o intuito de perceber qual dos picos, 1_a ou 2_a , levava à formação dos produtos de oxidação de ácido ferúlico foram registados voltamogramas cíclicos, onde o sentido do varrimento foi invertido imediatamente após o aparecimento do pico 1_a , Figura 3.2. Constatou-se que os picos 3_a e 3_c correspondentes à oxidação e redução das

espécies formadas durante a oxidação do ácido ferúlico se devem aos produtos formados no pico 1_a .

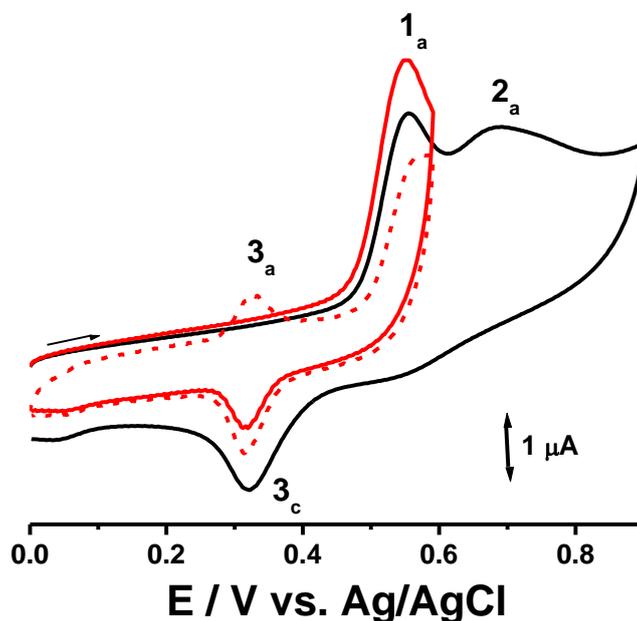


Figura 3.2 – Voltamogramas cíclicos obtidos numa solução de ácido ferúlico $100 \mu\text{M}$, em tampão acetato, pH 4,3, a uma velocidade de varrimento entre $0,50 \text{ Vs}^{-1}$; (—) primeiro varrimento entre 0,0 V e 0,9 V; (—) primeiro e (- - -) segundo varrimentos entre 0,0 V e 0,59 V.

Pela equação $|E_{pa} - E_{pc}| = 57 / n \text{ (mV)}$, onde E_{pa} é o potencial do pico anódico, E_{pc} o potencial do pico catódico e n o número de electrões transferidos, para processos reversíveis, e considerando que a diferença entre os potenciais dos picos anódico e catódico do produto de oxidação do ácido ferúlico é de 30 mV, verificou-se que o mecanismo redox que origina o par de picos $3_a - 3_c$ envolve a transferência de dois electrões [66].

De modo a estudar simultaneamente a influência da velocidade de varrimento e do pH no comportamento electroquímico de uma solução de ácido ferúlico, foram registados voltamograma cíclicos a diferentes velocidades de varrimento para toda a gama de electrólitos de suporte presente na Tabela 2.1. O estudo por voltametria cíclica foi realizado para velocidades de varrimento entre $0,01$ e $1,00 \text{ Vs}^{-1}$.

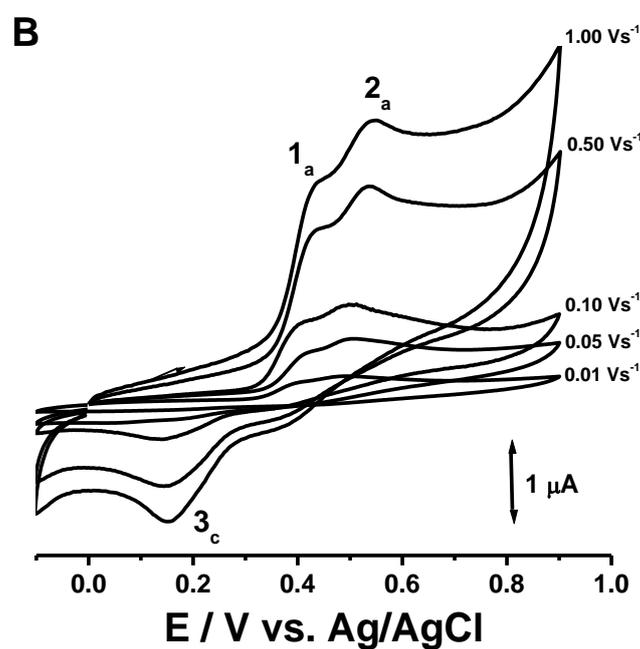
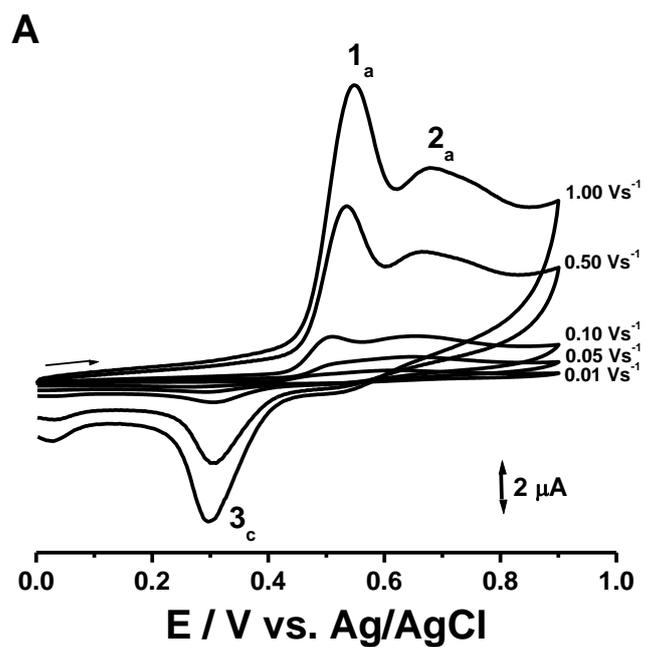


Figura 3.3 – Voltamogramas cíclicos obtidos numa solução de ácido ferúlico 100 μM , a velocidades de varrimento entre 0,01 – 1,00 Vs^{-1} : **A)** em tampão acetato pH 4,3; **B)** em tampão fosfato pH 6,9.

Observou-se, por análise dos resultados obtidos para pH 4,3 e pH 6,9, Figura 3.3, que o valor da intensidade da corrente aumenta com o aumento da velocidade de varrimento de uma forma linear sem variação do respectivo potencial de oxidação, para ambos os valores de pH do electrólito de suporte. De facto, verificou-se um comportamento similar para toda a gama de electrólitos de suporte estudada.

Para ambos os valores de pH verificou-se uma dependência do valor do potencial de oxidação com o pH, este tende a adquirir valores menos positivos com o aumento do pH do electrólito de suporte.

A dependência do mecanismo de oxidação do ácido ferúlico foi verificada para electrólitos de suporte com $\text{pH} < 9,0$. Esta observação evidenciou que o mecanismo de oxidação do ácido ferúlico envolve transferência de electrões e de protões.

Para electrólito de suporte com valores de pH superiores a 9,0, o mecanismo de oxidação mostrou-se independente do valor do pH, uma vez que, o potencial dos picos se manteve constante, evidenciando apenas a transferência de electrões.

3.1.2. Voltametria de Impulso Diferencial

De modo a estudar a influência do pH do electrólito de suporte no mecanismo de oxidação do ácido ferúlico foram registados voltamogramas para soluções de ácido ferúlico 10 μM em cada um dos electrólitos de suporte estudados.

Nos primeiros voltamogramas registados, Figura 3.4, verificou-se para todos os valores de pH, o aparecimento do pico 1_a e do pico 2_a, correspondentes à oxidação do ácido ferúlico. Observou-se também, que com o aumento do valor do pH do electrólito de suporte se verifica uma redução da intensidade de corrente dos picos assim como uma maior separação entre eles.

Para electrólitos de suporte com pH inferior a 9,0, o potencial do pico 1_a e do pico 2_a foi deslocado para valores menos positivos com o aumento do pH, Figura 3.4. Com a representação do valor do potencial em função do pH do electrólito de suporte, Figura 3.5, para os dois picos, observou-se uma dependência linear entre o potencial de oxidação e o valor do pH do electrólito de suporte. Para o pico 1_a a dependência segue a relação $E_{p1a} \text{ (V)} = 0,767 - 0,060 \text{ pH}$, com uma recta de inclinação de 60 mV por unidade de pH. Esta observação permitiu concluir que a reacção de oxidação que dá

origem ao pico 1_a envolve a transferência do mesmo número de electrões e de protões. Para o pico 2_a , observou-se uma relação linear de E_{p2a} (V) = 0,822 – 0,060 pH. O declive da recta de 60 mV por unidade de pH, permitiu concluir que, tal como aconteceu para o pico 1_a , o passo do mecanismo que dá origem ao pico 2_a envolve não só a transferência de electrões como também de igual número de protões. Pela largura a meia altura $W_{1/2} \approx 60$ mV de ambos os picos de oxidação do ácido ferúlico concluiu-se que as reacções de oxidação dos picos 1_a e 2_a envolvem, cada uma, a transferência de dois electrões e de dois protões.

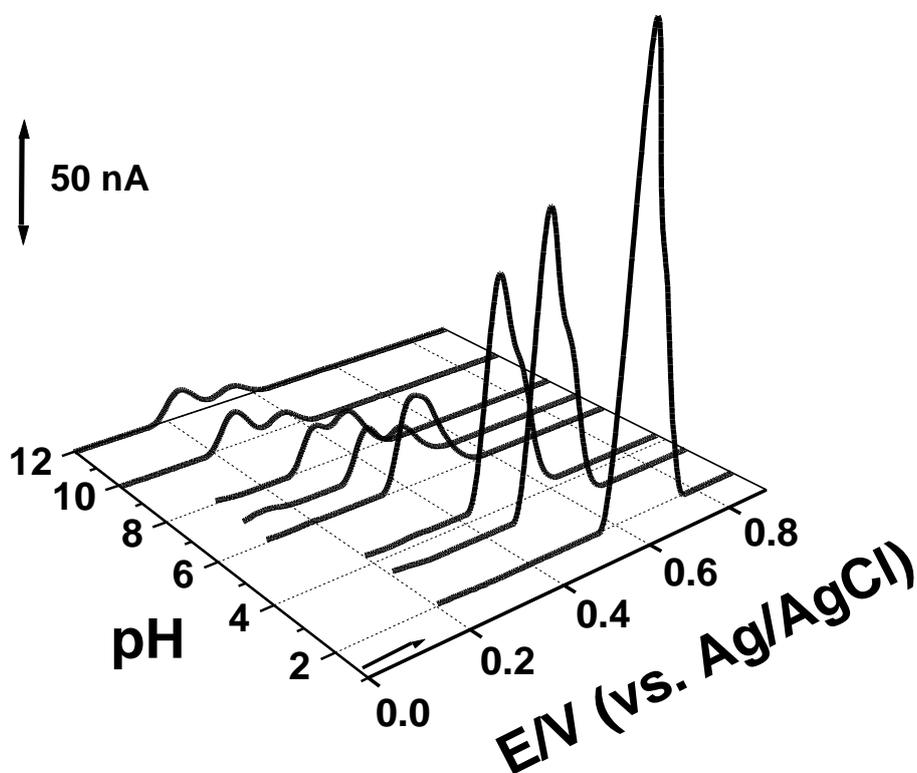


Figura 3.4 – Representação gráfica 3D de voltamogramas de impulso diferencial, obtidos num primeiro varrimento em soluções de ácido ferúlico 10 μ M, nos diferentes electrólitos de suporte, em função do pH

Para electrólitos de suporte com valores de pH superiores a 9,0, o potencial dos picos 1_a e 2_a manteve-se constante, indicando que as suas reacções de oxidação são independentes do pH, envolvendo apenas a transferência de electrões.

Pela intersecção da recta com inclinação de 60 mV por unidade de pH com a recta horizontal, determinou-se para o ácido ferúlico o valor de $pK_a \approx 9,0$.

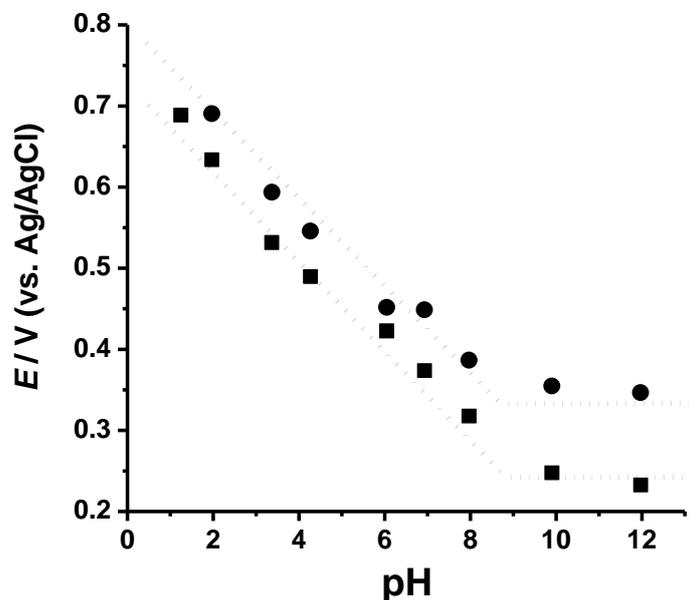


Figura 3.5 – Representação gráfica do potencial dos picos (■) 1a e (●) 2a, em função do pH; primeiro varrimento.

Voltamogramas de impulso diferencial foram também sucessivamente registados. Os resultados obtidos para pH 6,9, Figura 3.6, mostraram, num primeiro varrimento, o aparecimento de dois picos de oxidação, o pico 1_a a um potencial de $E_{p1a} = +0,372$ V e o pico 2_a a um potencial de $E_{p2a} = +0,447$ V. Com o registo de um segundo varrimento, observou-se o aparecimento de um novo pico de oxidação, pico 3_a, a um potencial de $E_{p3a} = +0,196$ V. A ocorrência de um novo pico a potenciais mais baixos do que os verificados para os picos 1_a e 2_a, foi atribuído à oxidação das espécies formadas durante a oxidação do ácido ferúlico.

Com o registo de varrimentos sucessivos, observou-se uma diminuição progressiva da intensidade de corrente do pico 1_a e do pico 2_a, com o aumento do número de varrimentos. Esta observação é atribuída à adsorção dos produtos de oxidação do ácido ferúlico à superfície do GCE, que leva a uma diminuição da sua área electroactiva livre. De facto, para o pico 3_a observou-se um aumento gradual da sua intensidade de corrente, com o aumento do número de varrimentos. A adsorção do

produto de oxidação do ácido ferúlico foi também demonstrada quando, no fim da realização de três varrimentos sucessivos na solução de ácido ferúlico, o eléctrodo foi retirado da solução e lavado com um jacto de água desionizada. Após este procedimento, foram registados vários voltamogramas no electrólito de suporte, mostrando apenas o pico 3_a característico da oxidação dos produtos redox do ácido ferúlico.

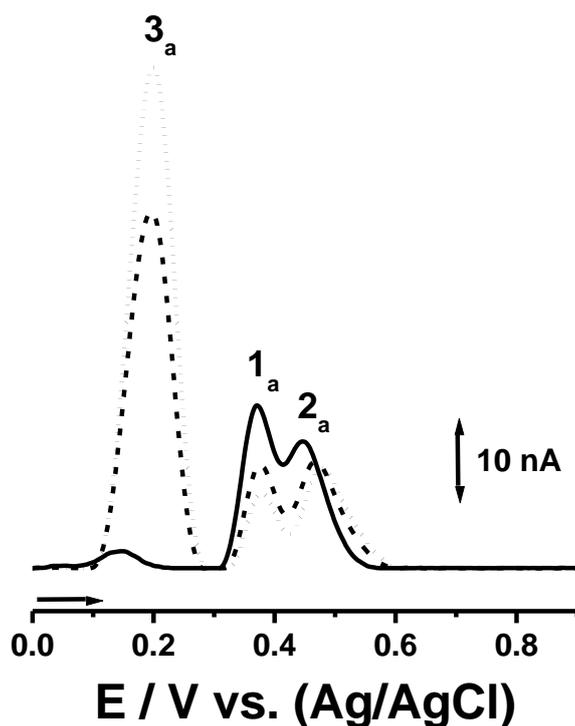


Figura 3.6 – Voltamogramas de impulso diferencial obtidos numa solução de ácido ferúlico $10 \mu\text{M}$, em tampão fosfato, pH 6,9: (—) primeiro, (- - -) segundo e (···) terceiro varrimentos.

De modo a estudar a dependência dos produtos de oxidação do ácido ferúlico em função do pH do electrólito de suporte, foi registado um segundo varrimento sucessivo em cada uma das soluções investigadas, Figura 3.7.

Para soluções com pH inferior a 9,0, o potencial do pico 3_a foi deslocado para valores menos positivos com o aumento do pH, Figura 3.8. Observando-se, uma dependência linear do potencial do pico 3_a com o pH, segundo a relação $E_{p3a} (\text{V}) = 0,602 - 0,060 \text{ pH}$, e o declive, 60 mV por unidade de pH, é indicativo de um

mecanismo de reacção com a transferência do mesmo número de electrões e de protões. Pelo que se pode concluir que a reacção subjacente ao pico 3_a envolve a transferência de dois electrões e de dois protões.

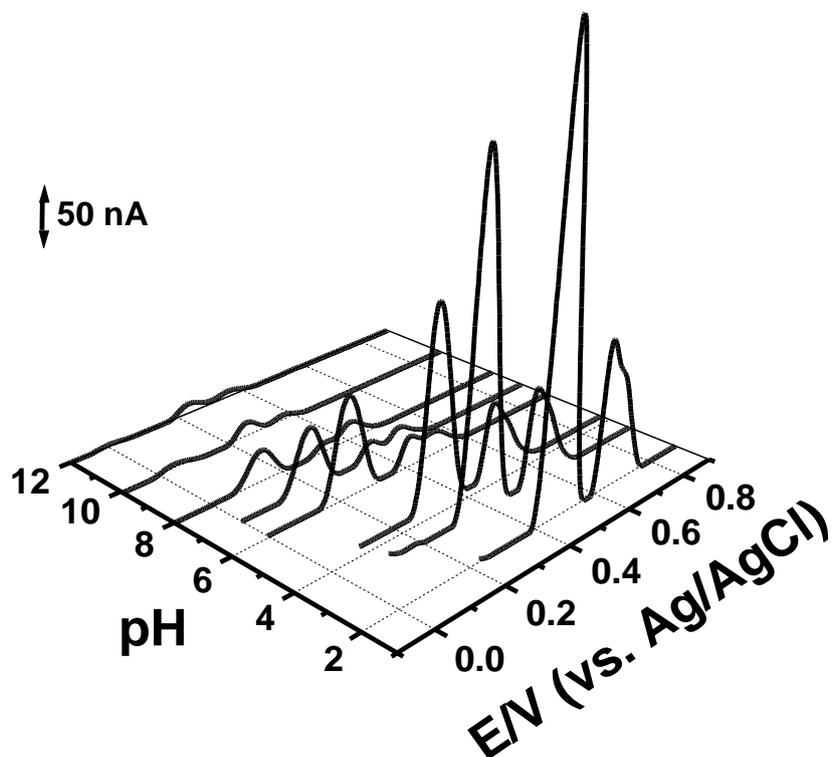


Figura 3.7 – Representação gráfica 3D de voltamogramas de impulso diferencial, obtidos num segundo varrimento em soluções de ácido ferúlico 10 μ M, nos diferentes electrólitos de suporte, em função do pH.

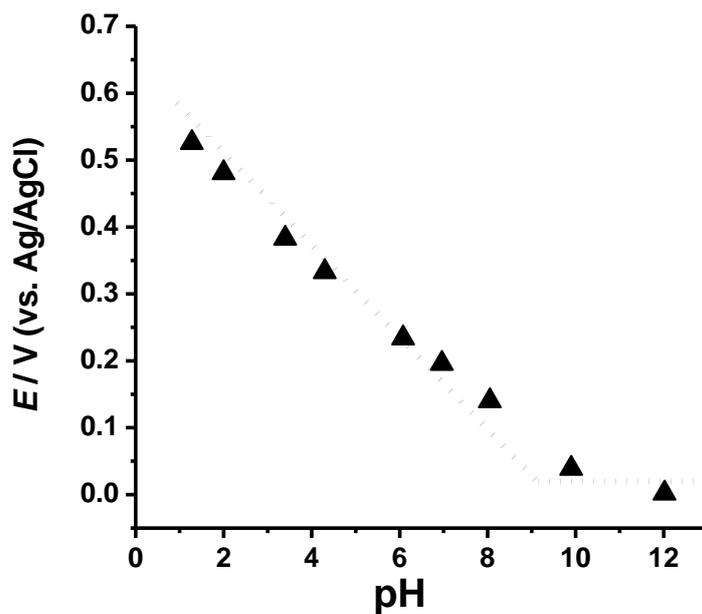


Figura 3.8 – Representação gráfica do potencial do pico (\blacktriangle) 3_a, em função do pH; segundo varrimento.

Para soluções com pH superior a 9,0, não foi verificada qualquer dependência do potencial do pico 3_a em relação ao pH do electrólito de suporte. Assim, para electrólitos alcalinos, o mecanismo de reacção é independente do pH e envolve apenas a transferência de dois electrões, Figura 3.8.

Foi também verificada a diminuição da intensidade de corrente do pico 3_a com o aumento do pH, Figura 3.7.

3.1.3. Voltametria de Onda Quadrada

Com o intuito de melhor caracterizar o comportamento electroquímico do ácido ferúlico, foram realizadas experiências de SWV.

O estudo por SWV revelou resultados similares aos obtidos por CV e DPV, confirmando o aparecimento, num primeiro varrimento, dos picos 1_a e 2_a e em varrimentos subsequentes o aparecimento do pico 3_a .

Os resultados obtidos para pH 4,3 mostraram, que no primeiro varrimento ocorreu a oxidação do ácido ferúlico com o aparecimento do pico 1_a a $E_{p1a} = + 0,536$ V e do pico 2_a a $E_{p2a} = + 648$ V, Figura 3.9 A). Através da desconvolução da corrente total nas suas componentes, directa e inversa, verificou-se que a reacção de oxidação do ácido ferúlico à superfície do GCE é uma reacção irreversível, uma vez que a corrente directa apresenta dois picos anódicos com correntes semelhantes às da corrente total, enquanto que a corrente inversa não apresenta qualquer pico catódico.

Com o registo de um segundo varrimento sucessivo na mesma solução, sem limpar a superfície do GCE, observou-se o aparecimento do pico 3_a , a $E_{p3a} = + 0,366$ V, Figura 3.9 B). Verificou-se a reversibilidade do pico 3_a uma vez que as correntes anódicas e catódicas são iguais. Observou-se ainda a diminuição da corrente dos picos 1_a e 2_a devido à adsorção das espécies formadas no primeiro varrimento à superfície do GCE.

Nos resultados obtidos numa solução de ácido ferúlico em tampão fosfato pH 6,9, Figura 3.10, confirmou-se o comportamento irreversível dos picos 1_a e 2_a , assim como a reversibilidade dos produtos de oxidação obtidos, pico 3_a .

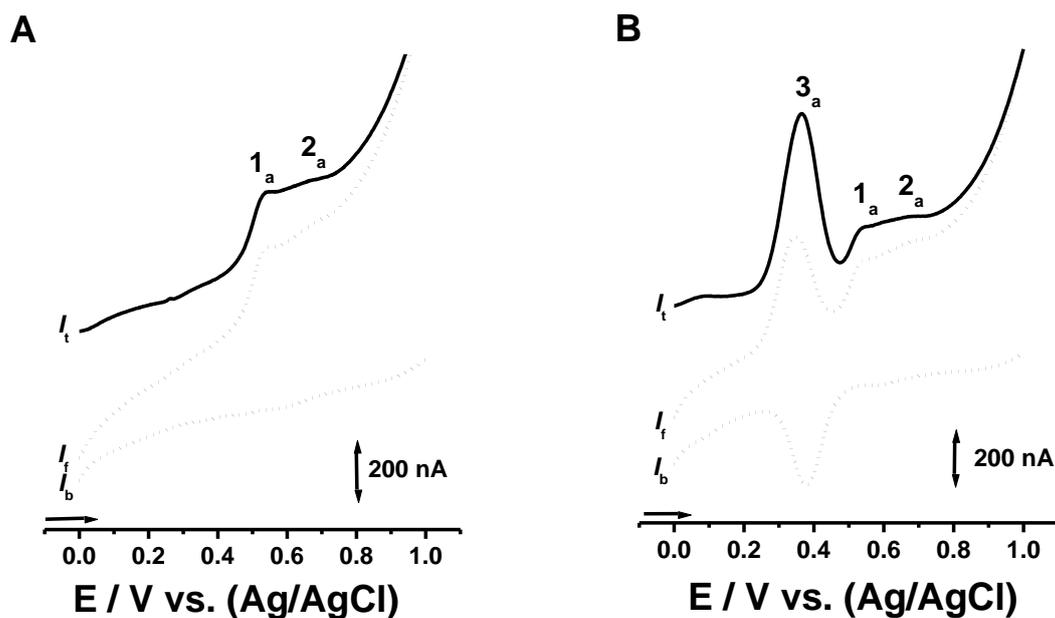


Figura 3.9 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos numa solução de ácido ferúlico $10 \mu\text{M}$, em tampão acetato, pH 4,3, a uma frequência de 50 Hz; **A)** 1º varrimento; **B)** 2º varrimento; I_t – corrente total, I_f – corrente directa, I_b – corrente inversa.

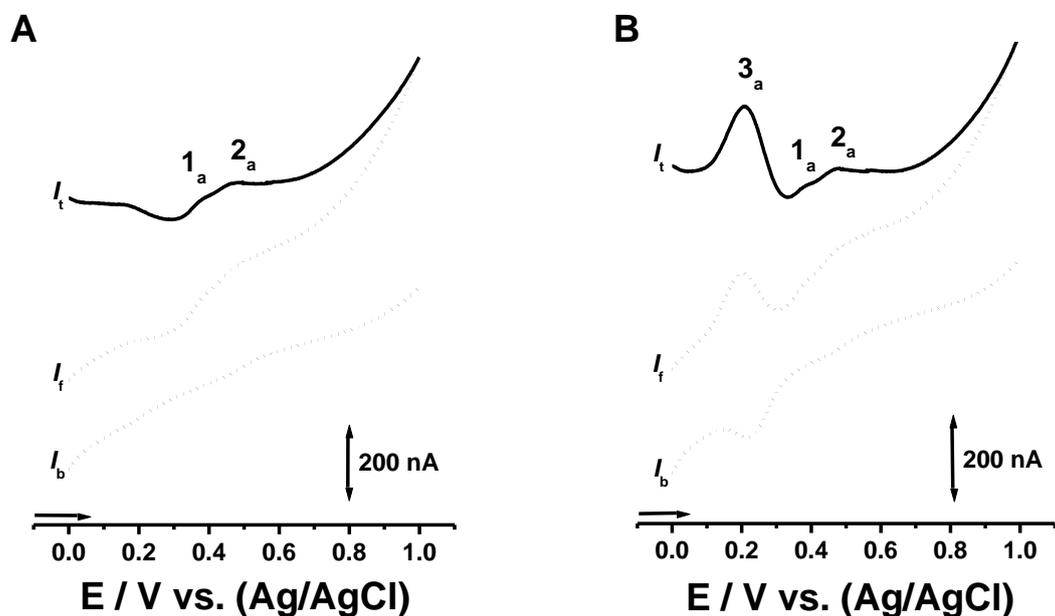
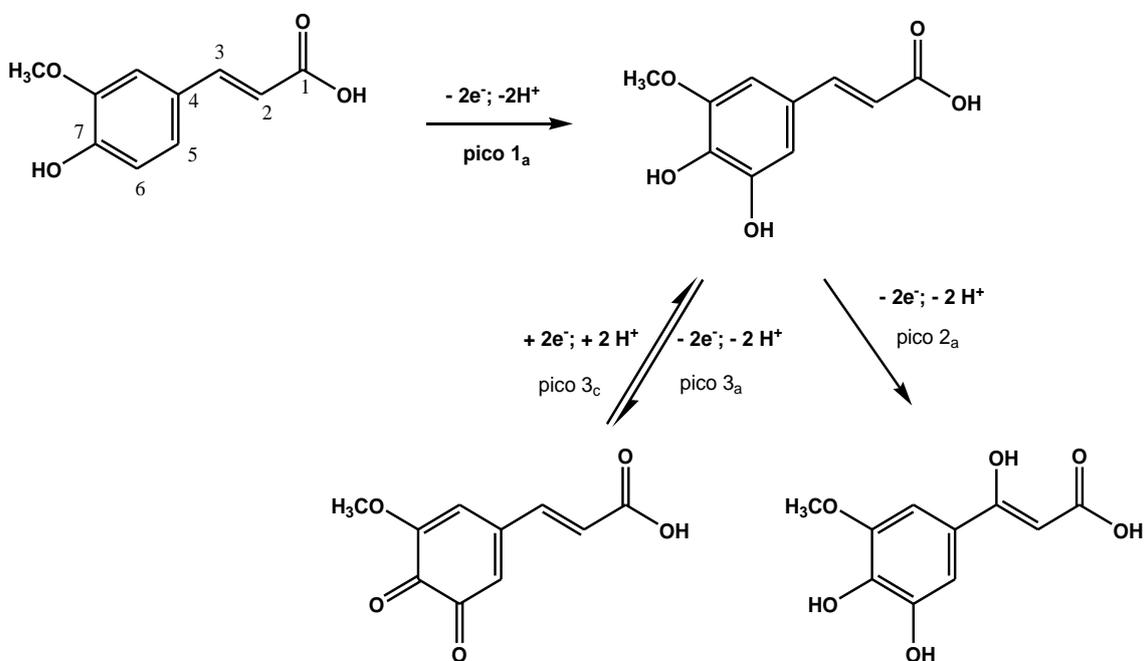


Figura 3.10 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos numa solução de ácido ferúlico $10 \mu\text{M}$, em tampão fosfato, pH 6,9, a uma frequência de 50 Hz; **A)** 1º varrimento; **B)** 2º varrimento; I_t – corrente total, I_f – corrente directa, I_b – corrente inversa.

Os estudos por voltametria de onda quadrada confirmaram, para toda a gama de electrólitos de suporte estudada, a irreversibilidade dos picos 1_a e 2_a, atribuídos à oxidação do ácido ferúlico; e a reversibilidade do pico 3_a, atribuído à oxidação dos produtos de oxidação do ácido ferúlico.

3.2. Mecanismo de oxidação do ácido ferúlico

Considerando todos os resultados electroquímicos obtidos para a oxidação do ácido ferúlico concluiu-se que a primeira etapa, pico 1_a, do seu mecanismo de oxidação, corresponde à oxidação do anel aromático com a adição de um grupo hidroxilo no carbono C₆ dando lugar à formação de uma *orto*-hidroquinona, Esquema 3.1. O produto de oxidação, resultante da oxidação do ácido ferúlico sofre oxidação electroquímica de maneira reversível, num mecanismo redox que envolve a perda de dois electrões e dois protões, pico 3_a.



Esquema 3.1 – Mecanismo proposto para a oxidação do ácido ferúlico e dos seus produtos de oxidação.

Numa reacção subsequente ocorre a oxidação na ligação dupla existente entre o carbono C₂ e o carbono C₃ da molécula de ácido ferúlico [68]; assim, o pico 2_a, corresponde à quebra da ligação dupla C₂-C₃ com a remoção de dois electrões e de dois protões e adição de um grupo hidroxilo ao carbono C₃.

O mecanismo proposto para o processo de oxidação do ácido ferúlico e dos seus produtos de oxidação está representado no Esquema 3.1.

3.3. Conclusões

O comportamento electroquímico do ácido ferúlico foi investigado por voltametria cíclica, de impulso diferencial e de onda quadrada em soluções de electrólito de suporte com diferentes valores de pH utilizando um GCE. Baseado nos resultados obtidos, foi proposto um mecanismo para a oxidação do ácido ferúlico.

Os resultados voltamétricos obtidos permitiram concluir que a oxidação electroquímica do ácido ferúlico é uma reacção irreversível, dependente do pH até valores próximos do seu pK_a e ocorre em duas etapas sucessivas, com a transferência de dois electrões e de dois protões, em cada uma das etapas.

Para valores de pH superiores a 9,0 observou-se que o ácido ferúlico passa por um processo de oxidação independente do pH e que ocorre apenas com a transferência de dois electrões para cada uma das duas etapas. Assim, o valor de pK_a ≈ 9,0 foi determinado para o ácido ferúlico.

O registo de voltamogramas sucessivos demonstrou que a oxidação do ácido ferúlico na superfície do GCE leva à formação de um produto de oxidação, pico 3_a, que sofre um mecanismo de oxidação por meio de uma reacção reversível com a transferência de dois electrões e de dois protões.

Capítulo 4

Estudo voltamétrico da capsaicina e da dihidrocapsaicina

Neste capítulo apresenta-se uma descrição do comportamento electroquímico da capsaicina e da dihidrocapsaicina em diferentes electrólitos de suporte.

4.1. Estudo electroquímico da capsaicina

O comportamento electroquímico da capsaicina foi estudado por CV, DPV e SWV, no intervalo de pH indicado na Tabela 2.1. Nos estudos por CV foi usada uma solução de capsaicina 10 μM , e para os estudos por DPV e SWV foi usada uma solução de capsaicina 1 μM .

4.1.1. Voltametria Cíclica

O estudo do comportamento electroquímico da capsaicina foi iniciado com experiências de CV, com um GCE, em soluções de capsaicina 10 μM preparadas em diferentes electrólitos suporte.

O voltamograma cíclico numa solução de capsaicina 10 μM em tampão acetato, pH 4,3, Figura 4.1, apresentou, num primeiro varrimento, um pico de oxidação, pico 1_a a $E_{p1a} = + 0,589 \text{ V}$, atribuído à oxidação da capsaicina. Quando o sentido do varrimento foi invertido, verificou-se o aparecimento de um novo pico, pico 3_c, a $E_{p3c} = + 0,309 \text{ V}$. O aparecimento do pico 3_c foi atribuído à redução das espécies formadas durante o varrimento anódico.

Com o registo de um segundo varrimento sucessivo, na mesma solução, sem limpar a superfície do GCE, observou-se o aparecimento de um novo pico de oxidação, pico 3_a , a $E_{p3a} = + 0,335$ V. O aparecimento do pico 3_a foi atribuído à oxidação dos produtos de oxidação da capsaicina, reduzidos durante o varrimento catódico. O valor de $E_{pa} - E_{pc}$ de aproximadamente 30 mV indicou um mecanismo redox reversível e que envolve a transferência de dois electrões.

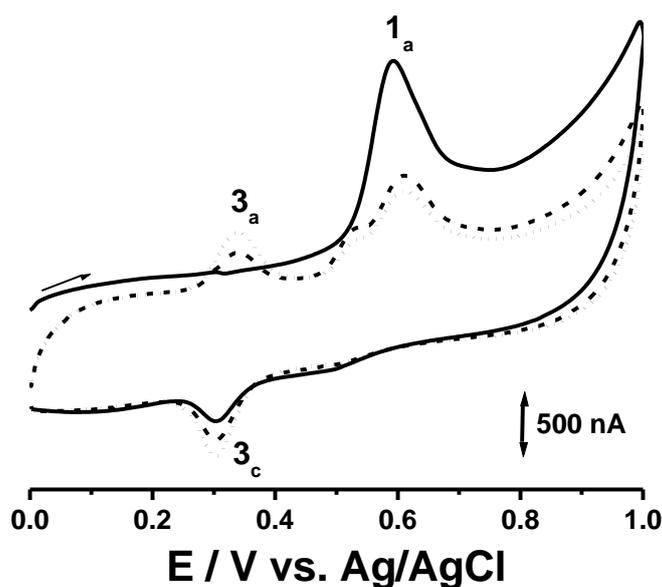


Figura 4.1 – Voltamogramas cíclicos obtidos numa solução de capsaicina $10 \mu\text{M}$, em tampão acetato pH 4,3, a uma velocidade de varrimento de $0,50 \text{ Vs}^{-1}$: (—) primeiro, (- - -) segundo e (•••) terceiro varrimentos.

Com realização de voltamogramas sucessivos, Figura 4.1, observou-se que a corrente do pico 1_a tende a diminuir com o aumento do número de varrimentos. Em relação aos picos 3_a e 3_c , observou-se que sua intensidade de corrente aumenta significativamente com o aumento do número de varrimentos sucessivos. Estas observações são consequência da adsorção dos produtos de oxidação da capsaicina à superfície do GCE, levando a uma diminuição da sua área electroactiva livre.

4.1.2. Voltametria de Impulso Diferencial

Com o intuito de avaliar a influência do pH do electrólito de suporte no comportamento electroquímico da capsaicina foram realizadas experiências de DPV em electrólitos com diferentes valores de pH.

No primeiro varrimento, verificou-se a presença do pico 1_a em todos os voltamogramas registados, independentemente do pH do electrólito de suporte, Figura 4.2. Foi também verificada uma diminuição da intensidade de corrente do pico 1_a com o aumento do pH, a corrente máxima foi registada para valores de pH mais ácido.

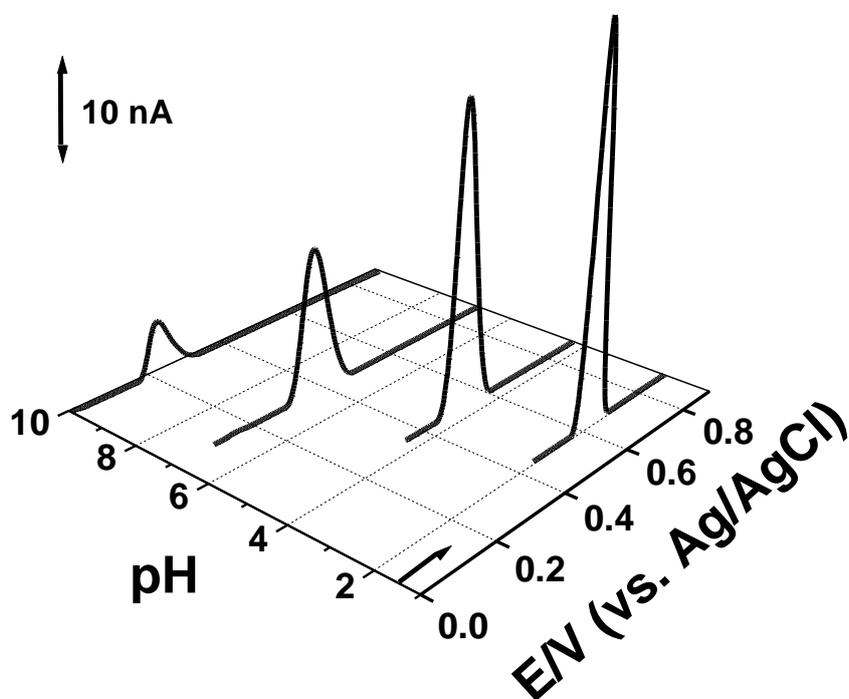


Figura 4.2 – Representação gráfica 3D de voltamogramas de impulso diferencial, obtidos num primeiro varrimento em soluções de capsaicina 1 μ M, nos diferentes electrólitos de suporte, em função do pH.

Observou-se, no primeiro varrimento, que o aumento do pH esteve sempre associado ao deslocamento do potencial de oxidação do pico 1_a para valores menos positivos, Figura 4.3. A dependência foi linear e seguiu a equação $E_{p1a} \text{ (V)} = 0,79 - 0,06 \text{ pH}$. O declive de 60 mV por unidade de pH mostrou que a

reação de oxidação que origina o pico 1_a envolve a transferência do mesmo número de electrões e de protões. Tendo em conta o valor da largura a meia altura do pico 1_a, $W_{1/2} \approx 67$ mV, conclui-se que a reacção envolve a transferência de dois electrões e de dois protões.

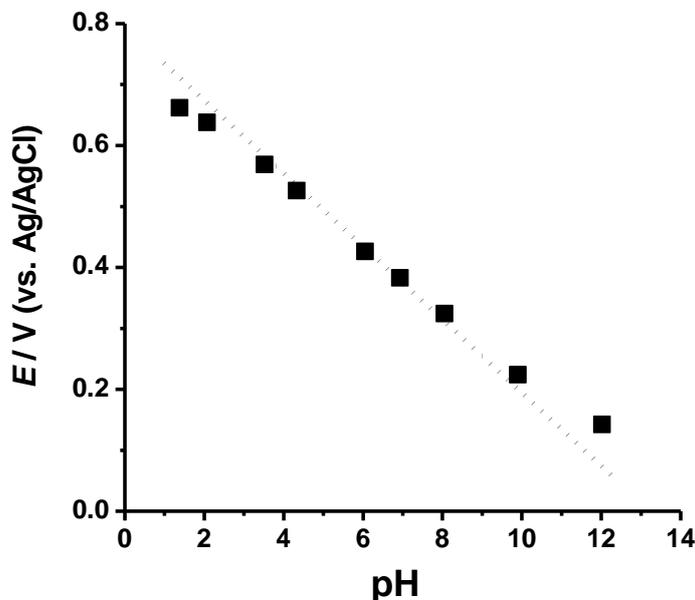


Figura 4.3 – Representação gráfica do potencial do pico (■) 1_a, em função do pH; primeiro varrimento.

Os voltamogramas obtidos para pH 6,9, Figura 4.4, apresentaram, no primeiro varrimento, o aparecimento de um pico de oxidação, pico 1_a, a $E_{p1a} = + 0,383$ V. o aparecimento do pico 1_a corresponde à oxidação da capsaicina. Com o registo de um segundo varrimento observou-se o aparecimento de um novo pico de oxidação para potenciais mais baixos do que os verificados para o pico 1_a. O novo pico observado no segundo varrimento, pico 3_a, a $E_{p3a} = + 0,157$ V, foi atribuído à oxidação das espécies formadas durante o primeiro varrimento.

O registo de voltamogramas sucessivos, Figura 4.4, permitiu observar uma diminuição progressiva da corrente do pico 1_a a partir do segundo varrimento. Em contra partida, verificou-se um aumento da intensidade de corrente do pico 3_a com o aumento do número de varrimentos sucessivos. Esta observação é atribuída a uma consequência da forte adsorção dos produtos de oxidação da capsaicina à superfície do

GCE, não permitindo a chegada por difusão da capsaicina à superfície do GCE para ser oxidada.

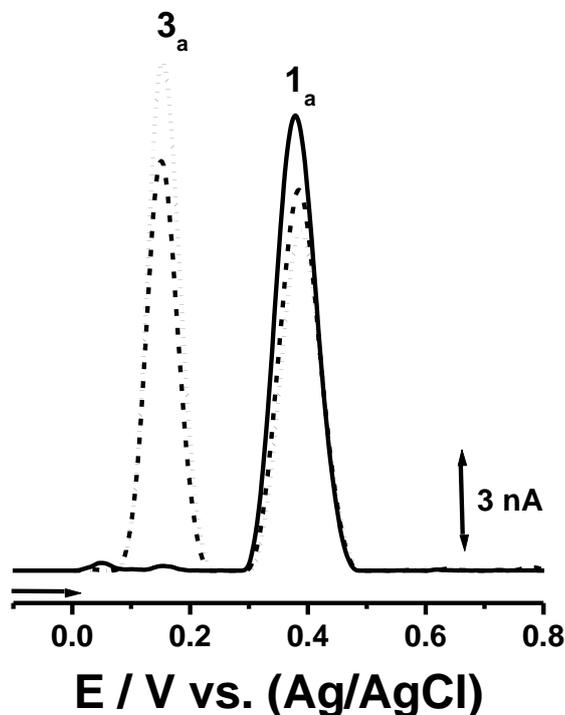


Figura 4.4 – Voltamogramas de impulso diferencial obtidos numa solução de capsaicina 1 μM , em tampão fosfato, pH 6,9: (—) primeiro, (- - -) segundo e (•••) terceiro varrimentos.

Com o registo do segundo varrimento sucessivo verificou-se o aparecimento do pico 3_a para todos os valores de pH estudados, Figura 4.5.

Observou-se o deslocamento do potencial do pico 3_a para valores menos positivos com o aumento do pH, Figura 4.6. Verificou-se uma dependência linear do potencial do pico 3_a com o pH, que segue a relação linear, $E_{p3a} \text{ (V)} = 0,57 - 0,06 \text{ pH}$, com uma recta de inclinação 60 mV por unidade de pH, o que permitiu concluir que o mecanismo de oxidação dos produtos de oxidação da capsaicina envolve a transferência do mesmo número de electrões e de protões. Sendo a largura a meia altura do pico 3_a de aproximadamente 65 mV tem-se que a reacção envolve a transferência de dois electrões e dois protões.

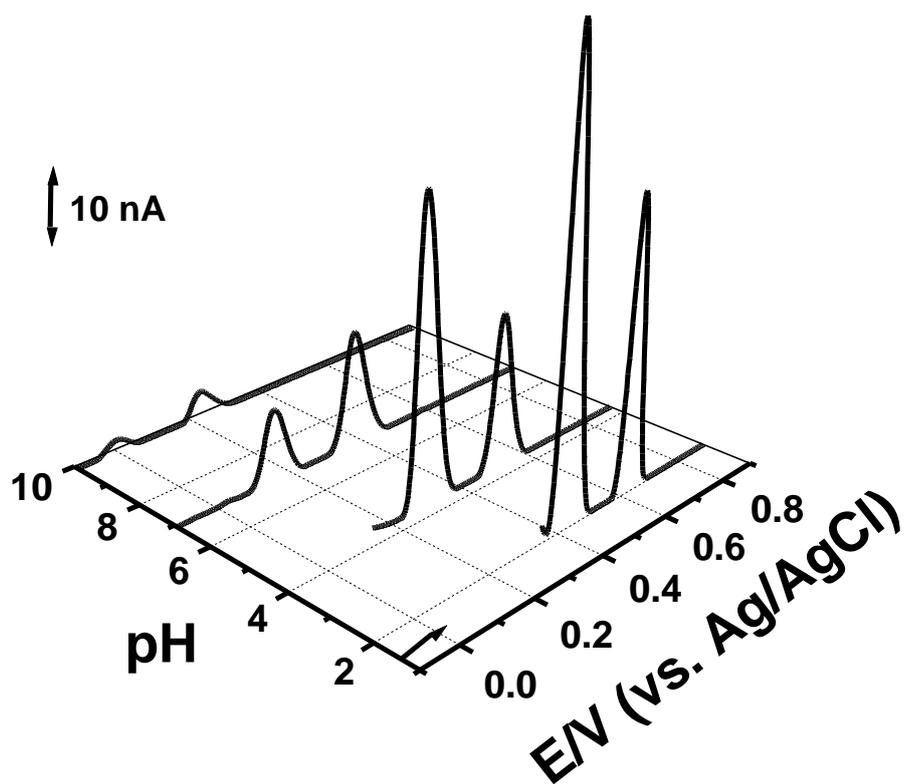


Figura 4.5 – Representação gráfica 3D de voltamogramas de impulso diferencial, obtidos num segundo varrimento em soluções de capsaicina 1 μM, nos diferentes electrólitos de suporte, em função do pH.

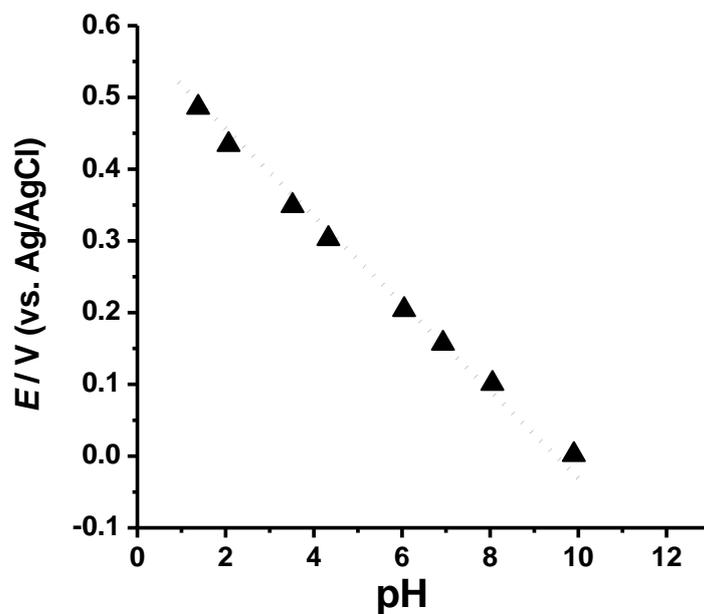


Figura 4.6 – Representação gráfica do potencial do pico (▲) 3a, em função do pH; segundo varrimento.

Foi também verificado que a intensidade de corrente do pico 3_a tende a diminuir com o aumento do pH do electrólito de suporte.

4.1.3. Voltametria de Onda Quadrada

O estudo por SWV foi efectuado em soluções de capsaicina 1 μM preparadas nos diferentes electrólitos de suporte estudados.

Esta técnica apresentou resultados similares com os obtidos por CV e DPV. Confirmando a oxidação da capsaicina, num primeiro varrimento, com o aparecimento do pico 1_a e o aparecimento do pico 3_a, pico da oxidação dos produtos de oxidação da capsaicina, com a realização de um segundo varrimento sucessivo.

Nos voltamogramas obtidos a pH 4,3 observou-se no primeiro varrimento, o aparecimento do pico 1_a, a $E_{p1a} = + 0,547 \text{ V}$, Figura 4.7 A). Através da comparação entre as correntes total, directa e inversa, verificou-se que a reacção de oxidação da capsaicina à superfície do GCE, pico 1_a, é um processo irreversível.

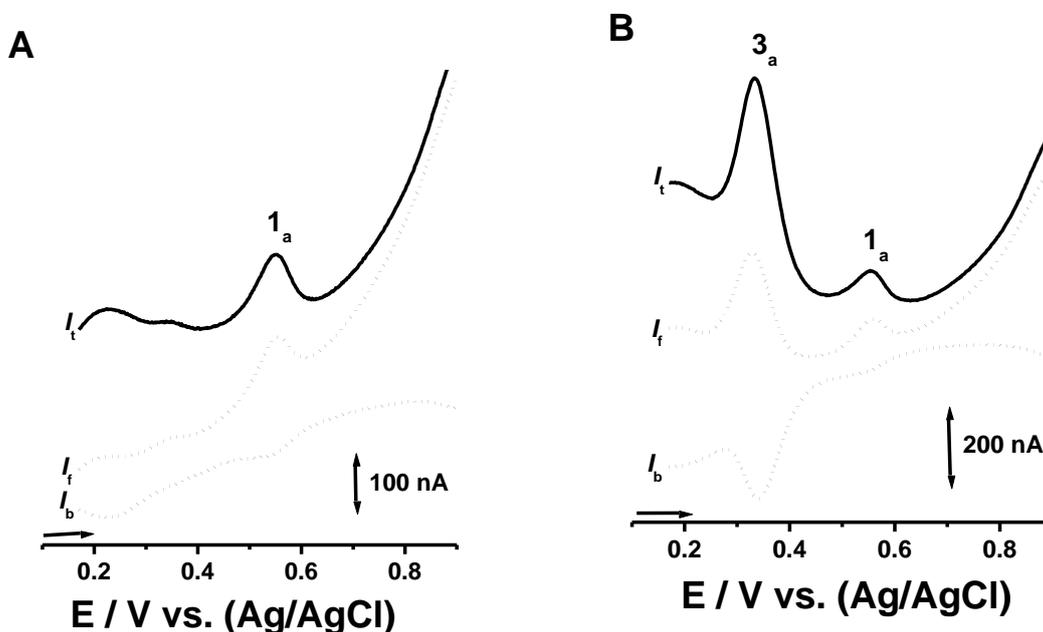


Figura 4.7 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos numa solução de capsaicina 1 μM , em tampão acetato pH 4,3, a uma frequência de 50 Hz; **A)** 1^o varrimento; **B)** 2^o varrimento; I_t – corrente total, I_f – corrente directa, I_b – corrente inversa.

No segundo varrimento registado na mesma solução, observou-se o pico 3_a a um potencial de $E_{p3a} = + 0,337$ V, Figura 4.7 B). Por análise dos resultados obtidos para o pico 3_a verificou-se a reversibilidade do mecanismo da reacção de oxidação do pico observado, uma vez que as correntes de oxidação e de redução são equivalentes.

Nos resultados obtidos em tampão acetato pH 6,9, confirmou-se o aparecimento do pico 1_a por meio de um processo irreversível, no primeiro varrimento, Figura 4.8 A). No segundo voltamograma registado, confirmou-se o aparecimento do pico 3_a , assim como a sua irreversibilidade, Figura 4.8 B).

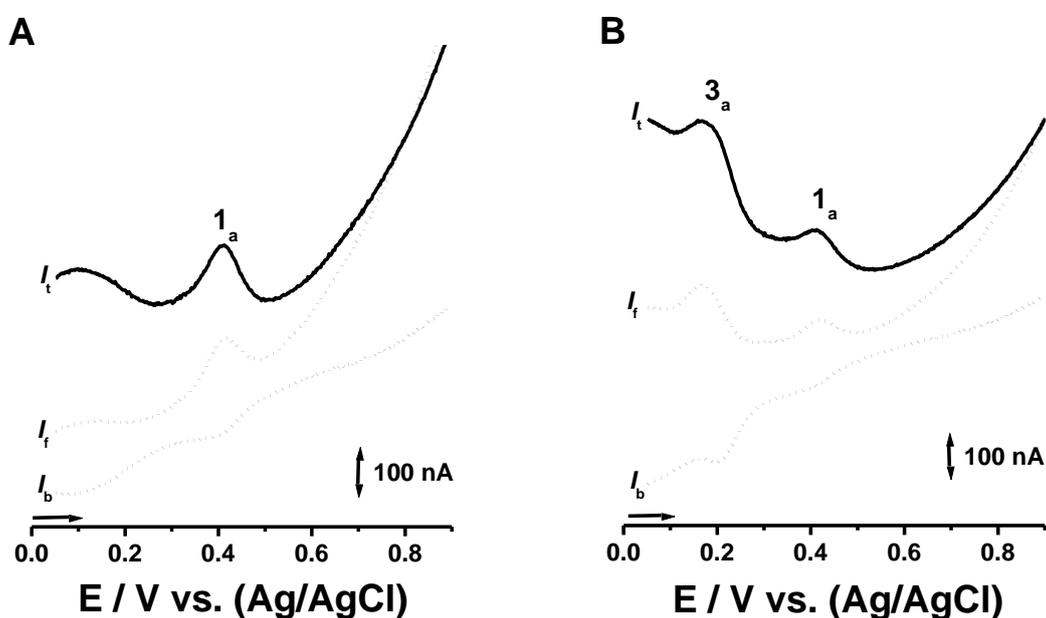


Figura 4.8 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos numa solução de capsaicina $1 \mu\text{M}$, em tampão fosfato pH 6,9, a uma frequência de 50 Hz; **A)** 1º varrimento; **B)** 2º varrimento; I_t – corrente total, I_f – corrente directa, I_b – corrente inversa.

Para todas as experiências realizadas por SW foi verificada a diminuição da intensidade de corrente dos picos 1_a e 3_a com o aumento do pH do electrólito de suporte. Assim como o deslocamento do potencial dos picos 1_a e 3_a para valores mais negativos com o aumento do pH. Observou-se também a diminuição gradual da intensidade de corrente do pico 1_a , assim como o aumento da intensidade de corrente do pico 3_a , com o aumento do número de varrimentos sucessivos.

4.2. Estudo electroquímico da dihidrocapsaicina

O estudo do comportamento electroquímico da dihidrocapsaicina foi efectuado por CV, DPV e SW para electrólitos de suporte com diferentes valores de pH. Nas experiências de CV foi usada uma solução de dihidrocapsaicina 10 μM e nas experiências de DPV e SW foi usada uma solução de 1 μM .

4.2.1. Voltametria Cíclica

Os estudos por CV de uma solução de dihidrocapsaicina 1 μM confirmam os resultados obtidos para o comportamento electroquímico do seu análogo capsaicina. Verificou-se a irreversibilidade do mecanismo de oxidação do pico 1_a e a reversibilidade do processo de oxidação dos produtos de oxidação da dihidrocapsaicina.

Nos voltamogramas cíclicos obtidos em tampão acetato pH 4,3, Figura 4.9, observou-se, a oxidação da dihidrocapsaicina com o aparecimento, no sentido anódico do primeiro varrimento, do pico 1_a, a $E_{p1a} = + 0,587 \text{ V}$.

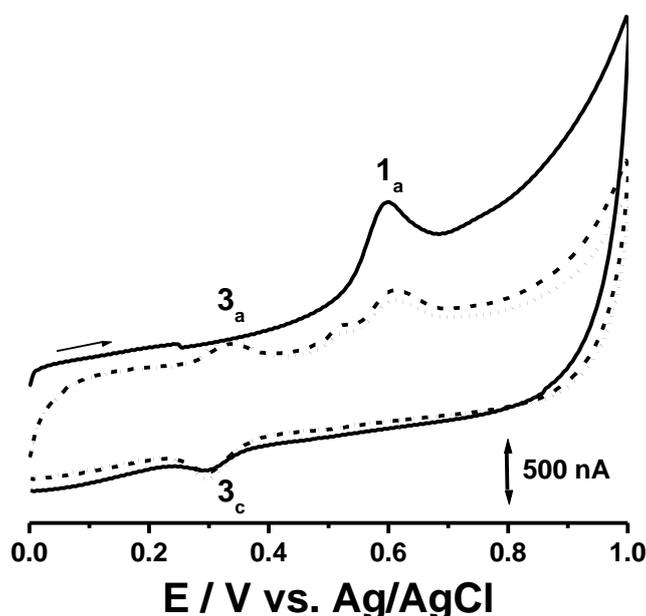


Figura 4.9 – Voltamogramas cíclicos obtidos numa solução de dihidrocapsaicina 10 μM , em tampão acetato pH 4,3, a uma velocidade de varrimento de 0,50 Vs^{-1} : (—) primeiro, (- - -) segundo e (•••) terceiro varrimentos.

Quando se inverteu o sentido do varrimento, verificou-se o aparecimento de um novo pico de redução, pico 3_c, a $E_{p3c} = + 0,302$ V. No segundo voltamograma, o seu correspondente anódico pico 3_a ocorreu a um potencial de $E_{p3a} = + 0,333$ V. A diferença entre os potenciais dos dois picos, $E_{pa} - E_{pc}$ foi de aproximadamente 31 mV o que indicou que a reacção redox atribuída ao pico 3 ocorre por meio de um processo reversível que envolve a transferência de dois electrões.

Com o registo de voltamogramas sucessivos verificou-se uma diminuição da intensidade de corrente do pico 1_a com o aumento do número de varrimentos. Para os picos 3_a e 3_c verificou-se um aumento da sua intensidade de corrente com o aumento do número de varrimentos, Figura 4.9. Estas observações são explicadas como uma consequência da adsorção dos produtos de oxidação da dihidrocapsaicina à superfície do GCE que levam a uma diminuição da sua área electroactiva livre.

Os resultados obtidos por CV para uma solução de dihidrocapsaicina confirmam os resultados obtidos para os mesmos estudos realizados em soluções de capsaicina.

4.2.2. Voltametria de Impulso Diferencial

O efeito do pH do electrólito de suporte no potencial e na corrente de oxidação da dihidrocapsaicina foi estudado em diferentes electrólitos de suporte com diferentes valores de valores de pH, entre 1,3 e 12,0, por DPV.

Para um primeiro varrimento efectuado numa solução de dihidrocapsaicina observou-se a presença do pico 1_a para todos os valores de pH estudados, Figura 4.10. Verificou-se também um deslocamento do potencial de oxidação do pico 1_a para valores mais negativos com o aumento do pH. Com o registo dos valores do potencial de oxidação em função do pH, Figura 4.11, observou-se uma dependência linear que segue a relação E_{p1a} (V) = 0,79 – 0,06 pH. O declive de 60 mV por unidade de pH permitiu concluir que o mecanismo de oxidação da dihidrocapsaicina envolve a transferência do mesmo número de electrões e protões. A largura a meia altura registada para o pico 1_a foi de $W_{1/2} \approx 60$ mV, o que levou à conclusão de que a reacção subjacente ao pico 1_a envolve a transferência de dois electrões e de dois protões.

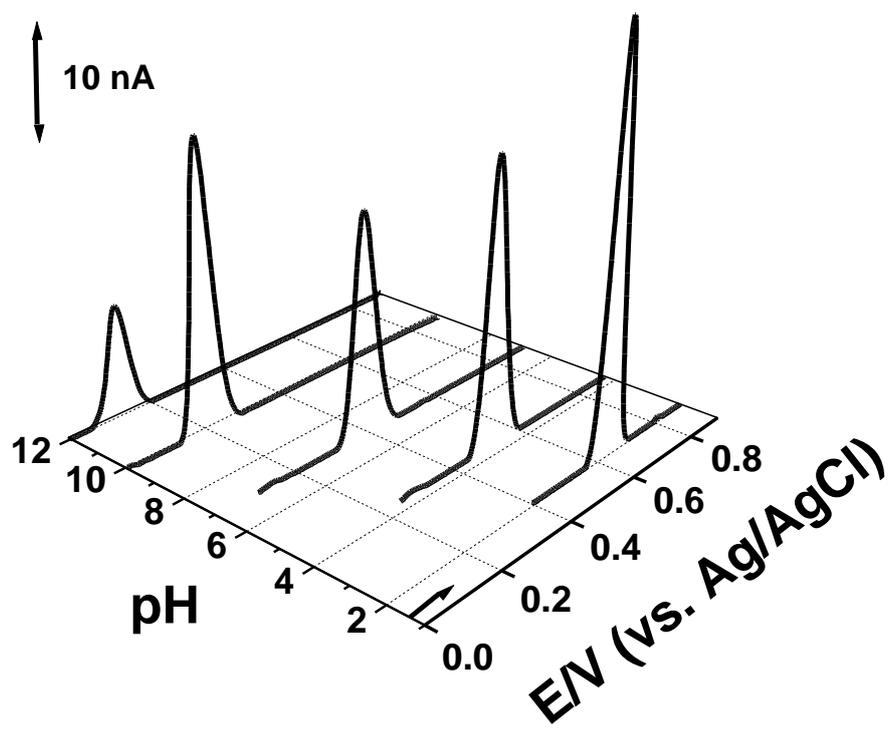


Figura 4.10 – Representação gráfica 3D de voltamogramas de impulso diferencial, obtidos em soluções de dihidrocapsaicina $1 \mu\text{M}$, nos diferentes electrólitos de suporte, em função do pH, primeiro varrimento.

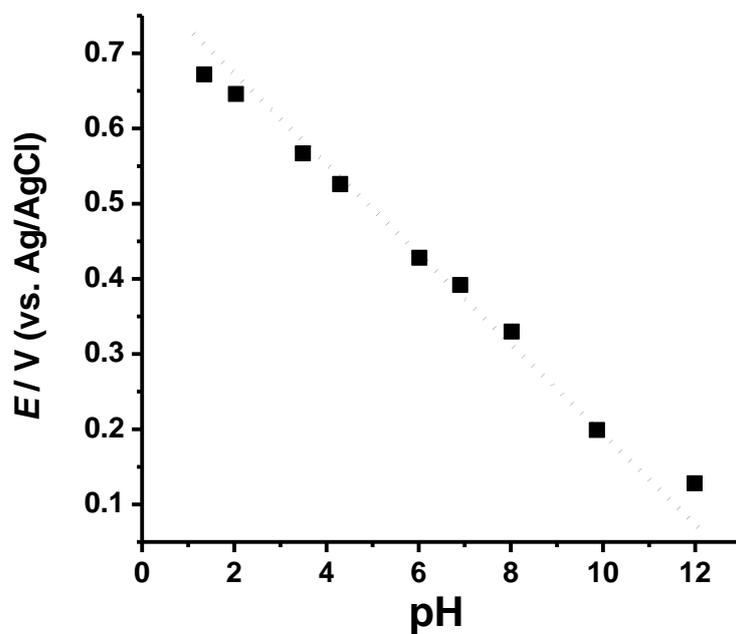


Figura 4.11 - Representação gráfica do potencial do pico (■) 1_a , em função do pH; primeiro varrimento.

Os resultados obtidos para uma solução de dihidrocapsaicina em tampão fosfato, pH 6,9, Figura 4.12, mostraram o aparecimento do pico 1_a , a $E_{p1a} = + 0,390$ V, correspondente à oxidação da dihidrocapsaicina, no primeiro varrimento.

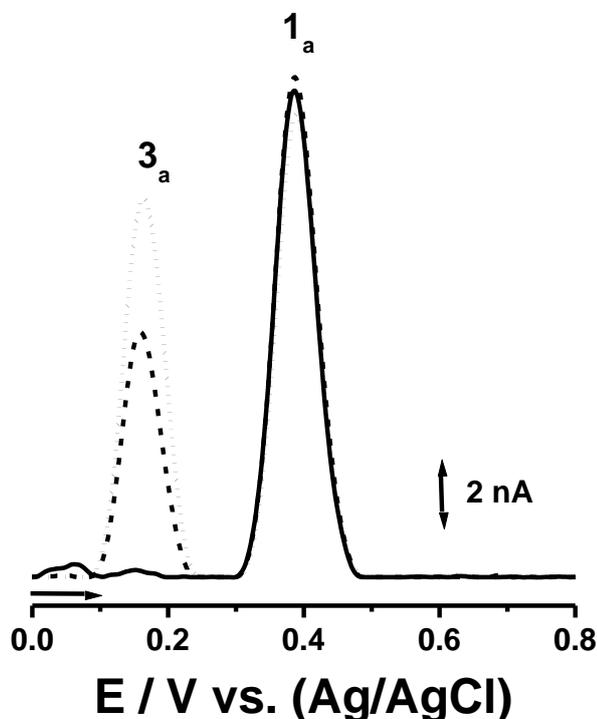


Figura 4.12 – Voltamogramas de impulso diferencial obtidos numa solução de dihidrocapsaicina $1 \mu\text{M}$, em tampão fosfato pH 6,9: (—) primeiro, (- - -) segundo e (•••) terceiro varrimentos.

Num segundo varrimento, observou-se o aparecimento de um novo pico de oxidação correspondente à oxidação dos produtos de oxidação da dihidrocapsaicina, pico 3_a , a $E_{p3a} = + 0,161$ V. Com o aumento do número de varrimentos sucessivos verificou-se um aumento da intensidade de corrente do pico 3_a , devido à formação de uma maior quantidade de produto de oxidação da dihidrocapsaicina à superfície GCE, Figura 4.12.

Com o intuito de estudar o comportamento electroquímico dos produtos de oxidação da dihidrocapsaicina foram registados voltamogramas sucessivos, para cada uma das soluções preparadas nos diferentes electrólitos de suporte estudados.

Verificou-se, com o registo do segundo varrimento, o aparecimento do pico 3_a , que, como mencionado anteriormente, corresponde à oxidação dos produtos de

oxidação da dihidrocapsaicina formado à superfície do GCE durante o primeiro varrimento, Figura 4.13.

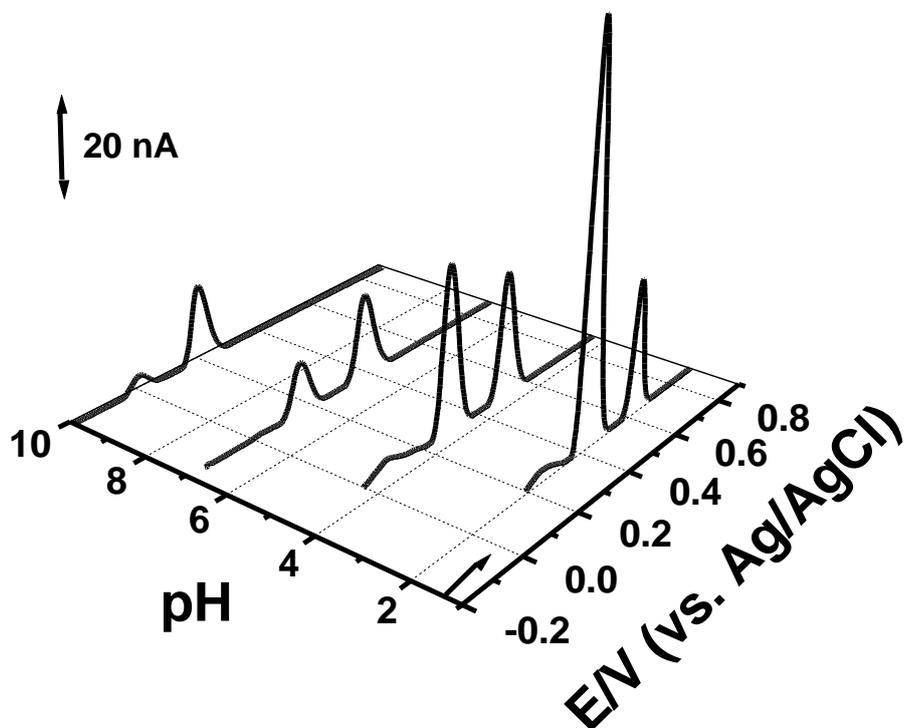


Figura 4.13 – Representação gráfica 3D de voltamogramas de impulso diferencial, obtidos num segundo varrimento em soluções de dihidrocapsaicina 1 μM, nos diferentes electrólitos de suporte estudados, em função do pH.

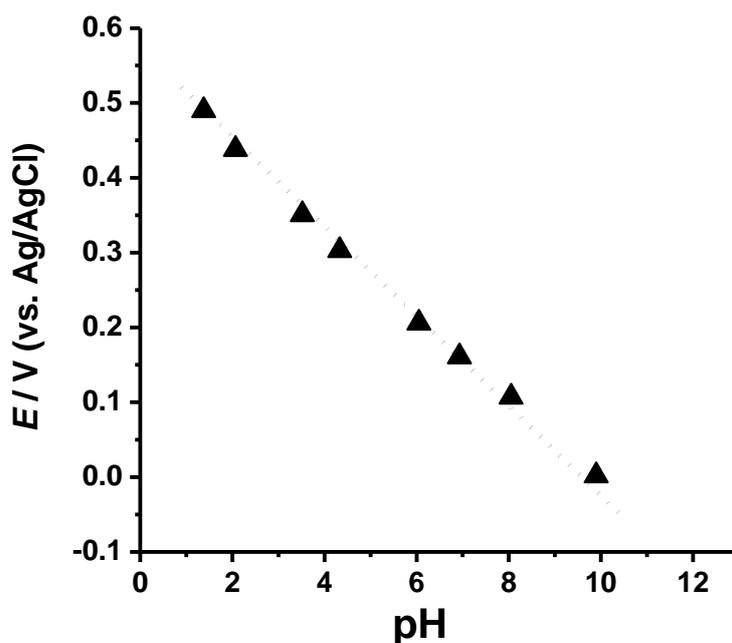


Figura 4.14 – Representação gráfica do potencial do pico (▲) 3_a, em função do pH; segundo varrimento.

Verificou-se uma dependência linear do potencial de oxidação do pico 3_a em função do pH, este tende a adquirir valores menos positivos com o aumento do pH. A dependência linear do pico 3_a segue a relação linear $E_{p3a} \text{ (V)} = 0,57 - 0,06 \text{ pH}$, o declive da recta de 60 mV por unidade de pH sugere que o mecanismo de oxidação subjacente ao pico 3_a envolve a transferência de dois electrões e de dois protões, Figura 4.14.

4.2.3. Voltametria de Onda Quadrada

O comportamento electroquímico de uma solução de dihidrocapsaicina 1 μM para diferentes electrólitos de suporte foi investigado por SWV.

No primeiro varrimento efectuado em tampão acetato a pH 4,5, verificou-se a ocorrência de um único pico, pico 1_a, a $E_{p1a} = + 0,427 \text{ V}$, que mostrou ser irreversível, Figura 4.15 A). No segundo varrimento registado na mesma solução, sem limpar a superfície do GCE, observou-se o aparecimento do pico 3_a, a $E_{p3a} = + 0,191 \text{ V}$, Figura 4.15 B). Através da comparação entre as correntes total, directa e inversa, confirmou-se a reversibilidade da reacção de oxidação dos produtos de oxidação da dihidrocapsaicina.

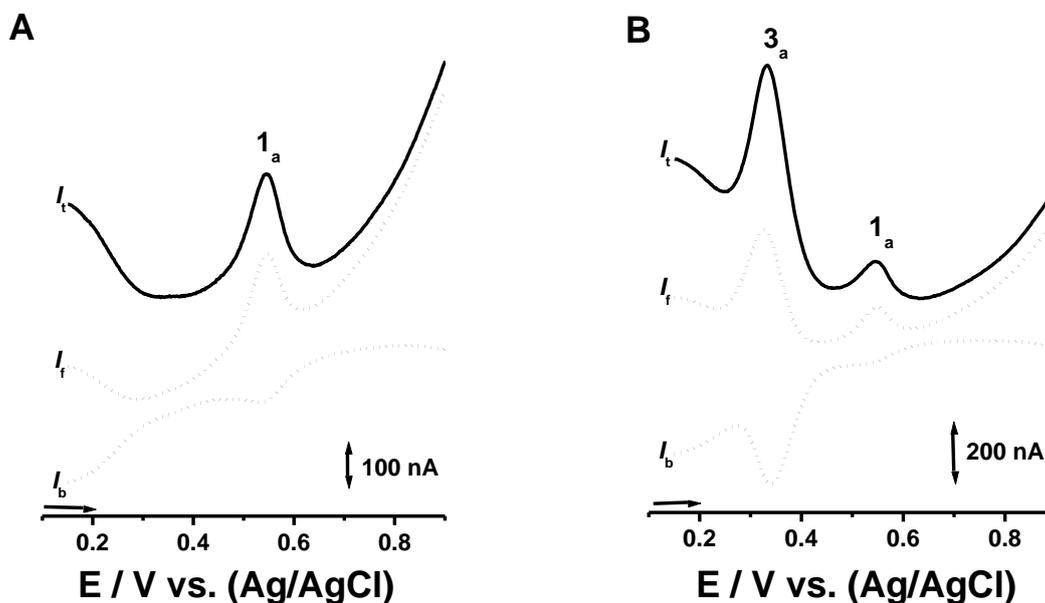


Figura 4.15 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos numa solução de dihidrocapsaicina 1 μM , em tampão acetato pH 4,3, a uma frequência de 50 Hz; **A)** 1º varrimento; **B)** 2º varrimento; I_t – corrente total, I_f – corrente directa, I_b – corrente inversa.

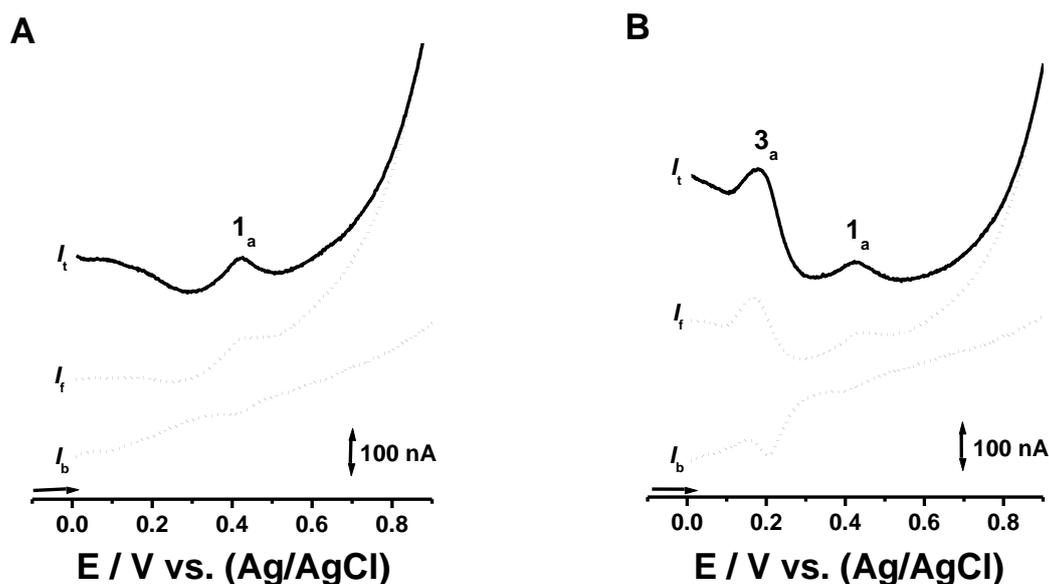


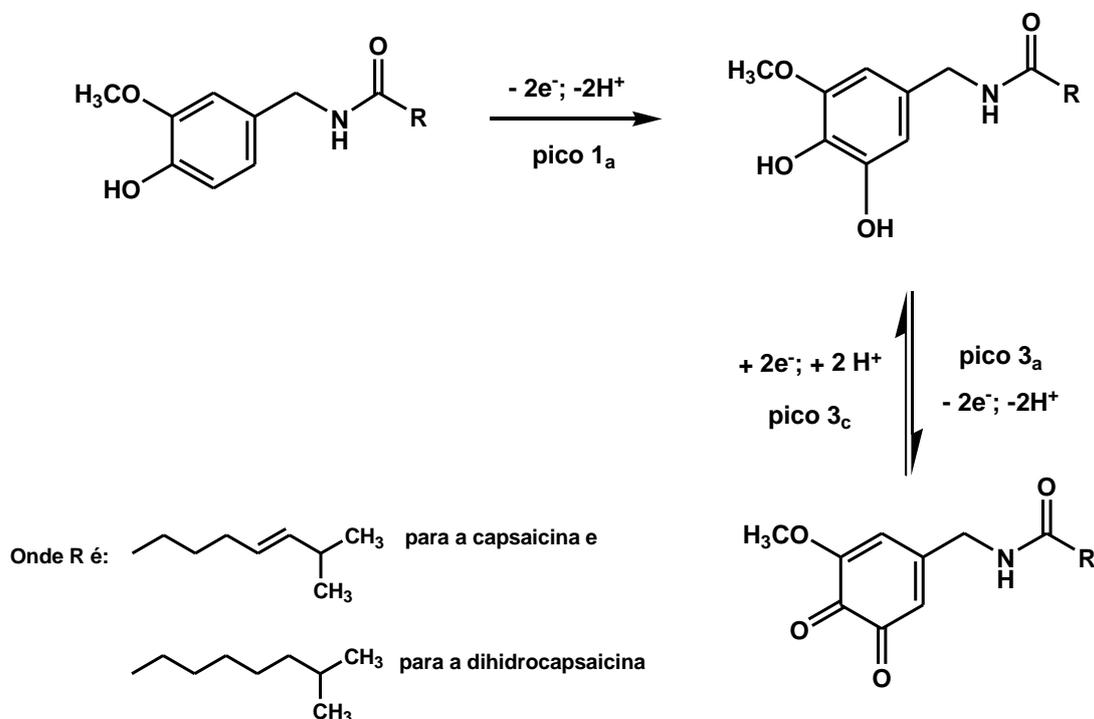
Figura 4.16 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos numa solução de dihidrocapsaicina $1 \mu\text{M}$, em tampão fosfato pH 6,9, a uma frequência de 50 Hz; **A**) 1º varrimento; **B**) 2º varrimento; I_t – corrente total, I_f – corrente directa, I_b – corrente inversa.

Nos resultados obtidos em tampão acetato, pH 6,9, foi confirmada a irreversibilidade da reacção de oxidação da dihidrocapsaicina, atribuída ao pico 1_a , obtido no primeiro varrimento, Figura 4.16 A). Assim como, a reversibilidade mostrada pelo produto de oxidação da dihidrocapsaicina, pico 3_a , no seu processo de oxidação, Figura 4.16 B).

4.3. Mecanismos de oxidação propostos

Considerando os resultados voltamétricos obtidos para a oxidação da capsaicina e da dihidrocapsaicina e tendo em conta as semelhanças tanto estruturais como na resposta electroquímica e o ácido ferúlico, estudado no capítulo anterior (Capítulo3), o mecanismo proposto para a oxidação da capsaicina e da dihidrocapsaicina, tem por base o mecanismo de oxidação proposto para a oxidação do anel aromático com a adição de um grupo hidroxilo, dando lugar à formação de uma *orto*-hidroquinona. Os produtos de

oxidação resultantes da oxidação tanto da capsaicina como da dihidrocapsaicina sofrem oxidação electroquímica por meio de uma reacção redox reversível envolvendo a perda de dois electrões e de dois protões.



Esquema 4.1 – Mecanismo proposto para a oxidação da capsaicina e da dihidrocapsaicina.

O mecanismo proposto para o processo de oxidação da capsaicina e da dihidrocapsaicina, incluindo dos seus produtos de oxidação, está representado no Esquema 4.1.

4.4. Conclusões

Após a realização dos estudos por CV, DPV e SWV em soluções de electrólito de suporte com diferentes valores de pH utilizando um CGE, foi possível propor um mecanismo de reacção que explica a oxidação da capsaicina e da dihidrocapsaicina.

As experiências efectuadas revelaram que os dois capsaicinóides sofrem um processo de oxidação irreversível, dependente do pH que ocorre com a transferência de dois electrões e de dois protões.

Os resultados obtidos com o registo de voltamogramas sucessivos indicaram que a oxidação electroquímica da capsaicina e da dihidrocapsaicina envolve a formação de um produto de oxidação, pico 3_a, por uma reacção reversível e dependente do pH onde ocorre a transferência de dois electrões e de dois protões.

Capítulo 5

Estudo voltamétrico da curcumina

Ao longo deste capítulo é feita uma descrição do comportamento electroquímico da curcumina para uma vasta gama de electrólitos de suporte.

5.1. Estudo electroquímico da curcumina

O estudo da oxidação electroquímica da curcumina à superfície do GCE foi efectuado por CV, DPV e SWV no intervalo de pH indicado na Tabela 2.1. Para CV os estudos foram realizados numa solução de curcumina 500 μM . Nos estudos por DPV e SWV foi usada uma solução de curcumina 10 μM .

5.1.1. Voltametria Cíclica

Os voltamogramas cíclicos obtidos em tampão acetato pH 4,3, a uma velocidade de varrimento de $0,50 \text{ Vs}^{-1}$, Figura 5.1, mostraram que num primeiro voltamograma se observou, no varrimento anódico, o aparecimento de dois picos de oxidação, o pico 1_a a $E_{p1a} = + 0,591 \text{ V}$ e o pico 2_a a $E_{p2a} = + 0,688 \text{ V}$. O aparecimento dos picos 1_a e 2_a foi atribuído ao processo de oxidação da curcumina. No varrimento catódico, verificou-se o aparecimento de um terceiro pico 3_c, a um potencial de redução $E_{p3c} = 0,347 \text{ V}$, correspondente à redução das espécies formadas durante o varrimento anódico.

Nos voltamogramas subsequentes observou-se o aparecimento de um novo pico, pico 3_a, no varrimento anódico a um potencial de $E_{p3a} = + 0,371 \text{ V}$. Este pico foi atribuído à oxidação das espécies formadas durante a oxidação da curcumina, Figura 5.1.

Sendo o valor de $E_{pa} - E_{pc}$ para o pico 3 de aproximadamente 24 mV, verificou-se que o mecanismo redox subjacente ao par de picos $3_a - 3_c$ é um processo reversível que envolve a transferência de dois electrões.

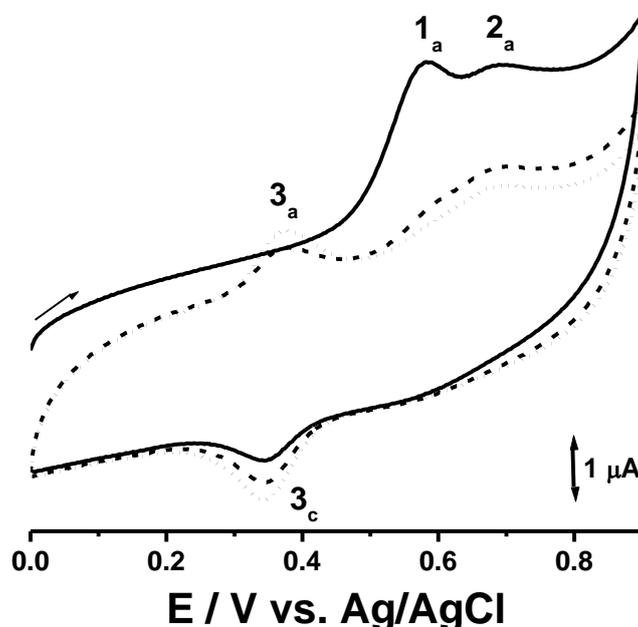


Figura 5.1 – Voltamogramas cíclicos obtidos numa solução de curcumina 500 μM , em tampão acetato pH 4,3, a uma velocidade de varrimento de 0,50 Vs^{-1} : (—) primeiro, (- - -) segundo e (•••) terceiro varrimentos.

Foi também observado, que com o aumento do número de varrimentos a intensidade de corrente dos picos 3_a e 3_c aumenta, enquanto que para o pico 1_a e 2_a se verificou uma diminuição da intensidade de corrente. Esta observação pode ser explicada como sendo uma consequência da adsorção dos produtos de oxidação da curcumina sobre a superfície do eléctrodo ao longo dos varrimentos sucessivos.

Nos voltamogramas cíclicos obtidos a pH 4,3 observou-se a irreversibilidade do pico 1_a e 2_a e a reversibilidade do pico 3_a , Figura 5.1. Esta observação foi verificada para toda a gama de electrólitos de suporte estudada ao longo deste trabalho.

De modo a estudar simultaneamente a influência da velocidade de varrimento e do pH do electrólito de suporte na oxidação electroquímica da curcumina, foram registados voltamogramas cíclicos a diferentes velocidades de varrimento,

entre $0,01 - 2,00 \text{ Vs}^{-1}$. Observou-se, por análise dos voltamogramas obtidos em pH 4,3 e pH 6,9, Figura 5.2, um aumento da intensidade de corrente com o aumento da velocidade de varrimento de uma forma linear sem variação do seu potencial de oxidação.

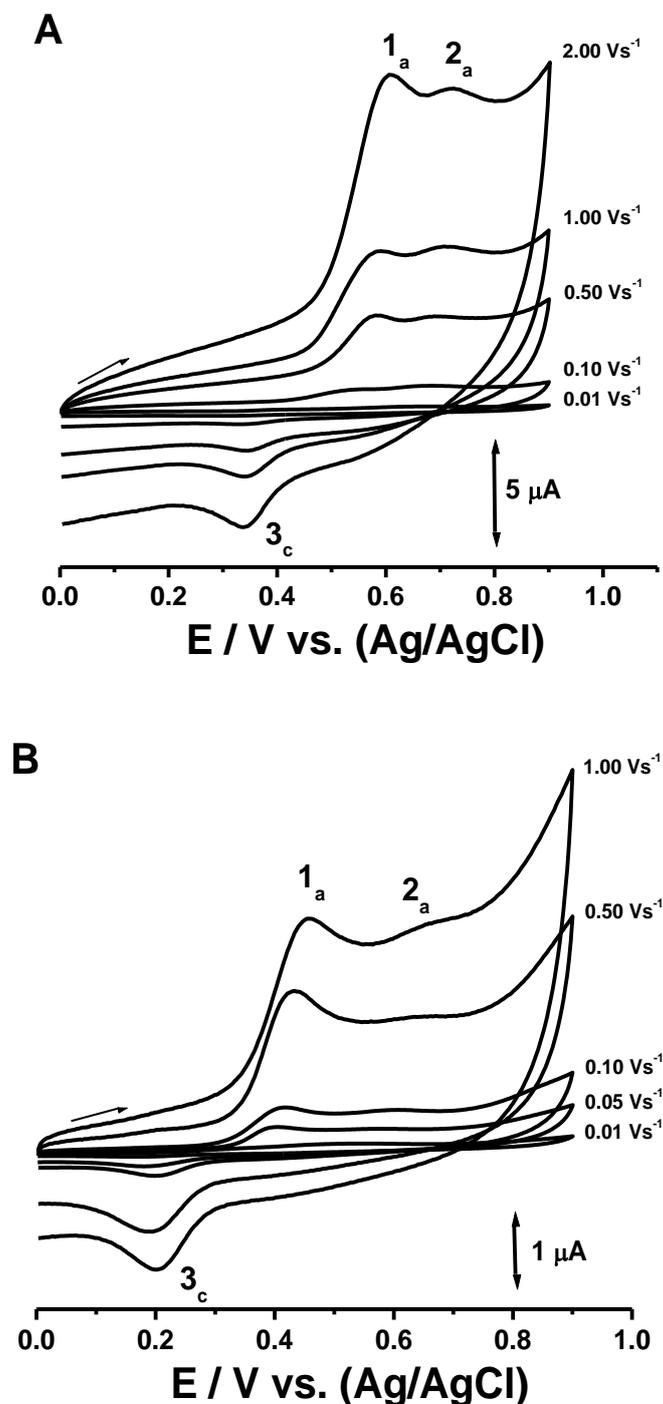


Figura 5.2 – Voltamogramas cíclicos obtidos numa solução de curcumina $500 \mu\text{M}$, a velocidades de varrimento entre $0,01 - 2,00 \text{ Vs}^{-1}$: A) em tampão acetato, pH 4,3; B) em tampão fosfato, pH 6,9.

Verificou-se também que com o aumento do valor do pH do electrólito de suporte, os potenciais de oxidação tendem a adquirir valores menos positivos.

5.1.2. Voltametria de Impulso Diferencial

O efeito do pH sobre o comportamento electroquímico da curcumina foi investigado por DPV num intervalo de pH entre 1,3 e 12,0.

No primeiro varrimento, verificou-se para todos os electrólitos de suporte o aparecimento do pico 1_a e do pico 2_a, atribuídos à oxidação da curcumina, Figura 5.3.

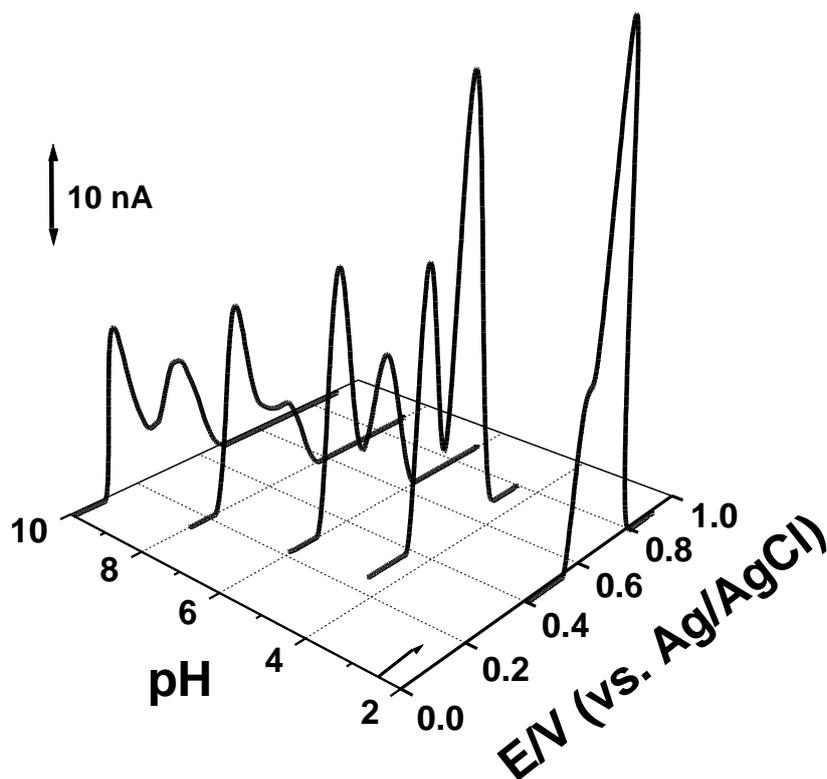


Figura 5.3 – Representação gráfica 3D de voltamogramas de impulso diferencial, obtidos num primeiro varrimento em soluções de curcumina 10 μ M, nos diferentes electrólitos de suporte, em função do pH.

Para valores de pH inferiores a 9,0, verificou-se que o potencial do pico 1_a e do pico 2_a é dependente do valor do pH do electrólito de suporte, e que este se desloca

progressivamente para valores menos positivos com o aumento do pH, Figura 5.3. Pelo gráfico do potencial em função do pH, Figura 5.4, observou-se uma dependência linear entre o potencial de oxidação e o valor do pH do electrólito de suporte, para os dois picos observados no primeiro varrimento. Esta variação do potencial com o pH sugere a envolvimento na reacção não só de electrões como também de protões. Para o pico 1_a verificou-se uma dependência linear que segue a relação de $E_{p1a} \text{ (V)} = 0,72 - 0,06 \text{ pH}$, com uma recta de inclinação de 60 mV por unidade de pH, o que permitiu concluir que o mecanismo da reacção envolve a transferência do mesmo número de electrões e de protões. Para o pico 2_a observou-se uma relação linear de $E_{p2a} \text{ (V)} = 0,88 - 0,06 \text{ pH}$, com uma recta de declive de 60 mV por unidade de pH, o que, tal como para o pico 1_a, permitiu concluir que o mecanismo da reacção envolve a transferência de igual número de electrões e de protões. A largura a meia altura registada para os dois picos foi de $W_{1/2} \approx 60 \text{ mV}$. Assim, concluiu-se que as reacções de oxidação dos picos 1_a e 2_a envolvem, cada uma, a transferência de dois electrões e de dois protões.

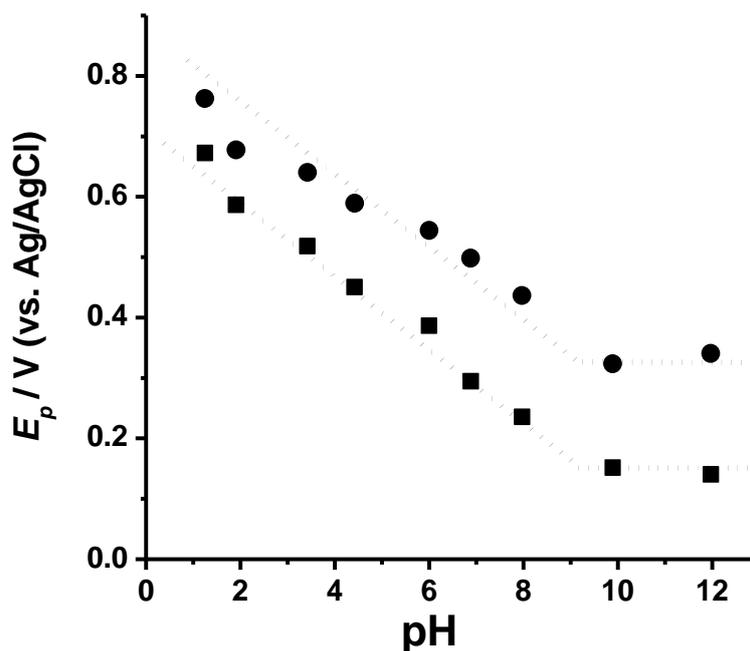


Figura 5.4 – Representação gráfica do potencial dos picos (■) 1_a e (●) 2_a, em função do pH; primeiro varrimento.

Para valores de pH superiores a 9,0 observou-se que o potencial do pico 1_a e do pico 2_a não sofre alterações, tendo-se assim que, a oxidação da curcumina é

independente do pH do electrólito de suporte, envolvendo apenas a transferência de electrões, Figura 5.4. Assim, determinou-se o valor de $pK_a \approx 9,0$ para a curcumina.

Voltamogramas de impulso diferencial foram também sucessivamente registados. Nos voltamogramas obtidos em tampão fosfato, pH 6,9, Figura 5.5, observou-se, no primeiro varrimento, a existência de dois picos de oxidação, pico 1_a e 2_a , correspondentes à oxidação da curcumina, a um potencial de $E_{p1a} = + 0,302$ V e $E_{p2a} = + 0,496$ V. Nos varrimentos subsequentes, observou-se o aparecimento de um novo pico de oxidação, pico 3_a , a um potencial de oxidação de $E_{p3a} = + 0,198$ V. O aparecimento do novo pico, pico 3_a , foi atribuído à oxidação das espécies formadas durante a oxidação da curcumina, num primeiro varrimento.

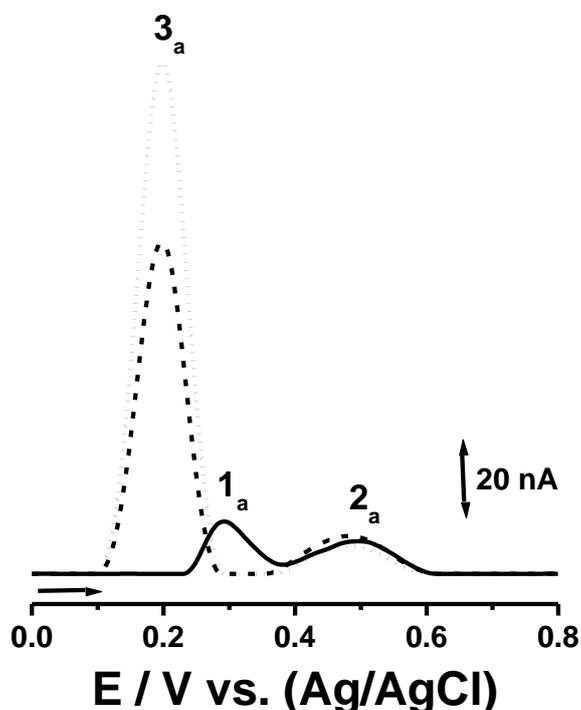


Figura 5.5 – Voltamogramas de impulso diferencial obtidos numa solução de curcumina $10 \mu\text{M}$, em tampão fosfato, pH 6,9: (—) primeiro, (- - -) segundo e (•••) terceiro varrimentos.

Com o registo de voltamogramas sucessivos na mesma solução (Figura 5.5), sem limpar a superfície do GCE, verificou-se um aumento da intensidade de corrente do pico 3_a e a diminuição progressiva da intensidade de corrente do pico 1_a e 2_a . Esta

observação é uma consequência da adsorção dos produtos de oxidação da curcumina à superfície do eléctrodo de carbono vítreo, levando a uma diminuição da sua área electroactiva livre. De facto, a adsorção do produto de oxidação de curcumina foi demonstrada quando, no fim de três varrimentos sucessivos na solução de curcumina o eléctrodo foi retirado da solução e a sua superfície lavada com um jacto de água desionizada. Após este procedimento, o eléctrodo foi mergulhado no electrólito e vários voltamogramas foram registados mostrando apenas o pico 3_a característico da oxidação dos produtos redox da curcumina.

Com o intuito de estudar a dependência dos produtos de oxidação da curcumina em função do pH do electrólito de suporte, foram registados voltamogramas sucessivos em cada uma das soluções investigadas, Figura 5.6.

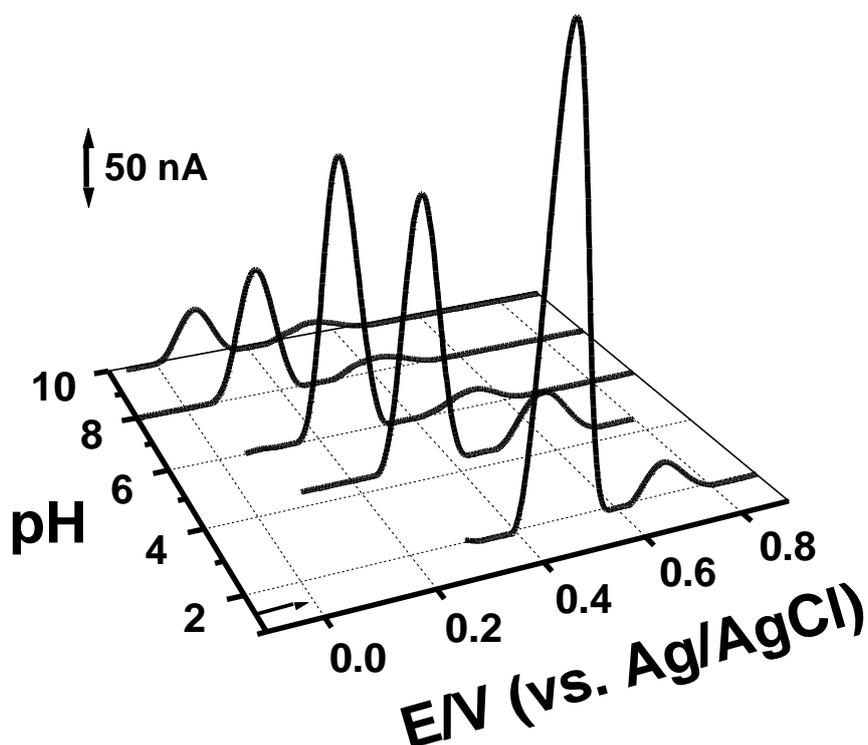


Figura 5.6 – Representação gráfica 3D de voltamogramas de impulso diferencial, obtidos num segundo varrimento em soluções de curcumina 10 μ M, nos diferentes electrólitos de suporte, em função do pH.

Verificou-se que o potencial dos produtos de oxidação da curcumina possui uma dependência linear com o pH, deslocando-se para valores menos positivos com o aumento do pH, segundo a relação $E_{p3a} \text{ (V)} = 0,62 - 0,06 \text{ pH}$, a inclinação da recta de 60 mV, sugere que este processo envolve a transferência de dois electrões e de dois prótons Figura 5.7.

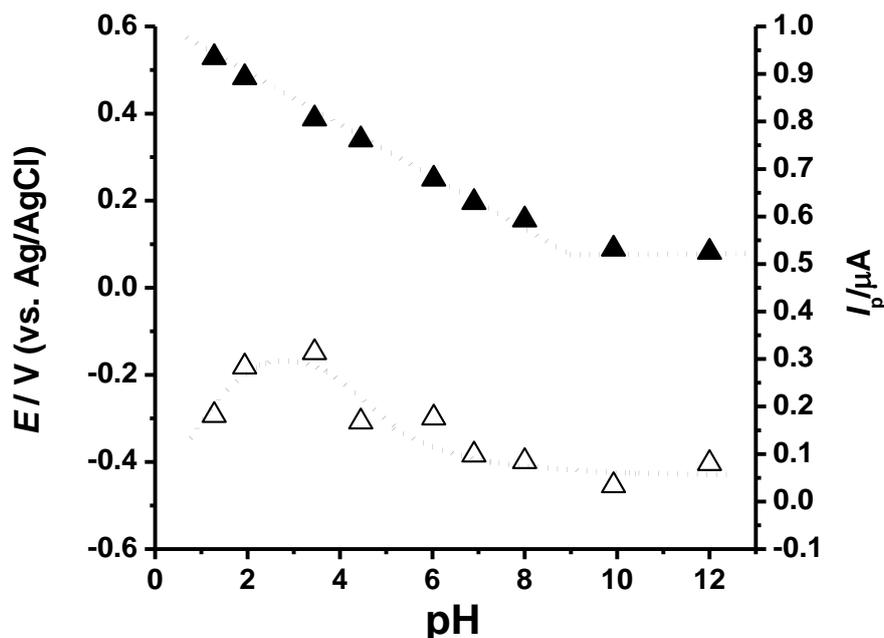


Figura 5.7 – Representação gráfica do potencial (▲) e da corrente (Δ) do pico 3_a , em função do pH, segundo varrimento.

Para electrólitos de suporte com $\text{pH} > 9,0$, observou-se que o potencial do pico 3_a manteve-se constante, ou seja, o seu mecanismo de oxidação é independente do pH do electrólito de suporte, envolvendo unicamente a transferência de dois electrões. Tendo por base os resultados obtidos, determinou-se o valor de $\text{pK}_a \approx 9,0$ para os produtos de oxidação da curcumina.

Observou-se também que a corrente do pico 3_a apresenta valores mais altos para electrólitos de suporte com valores de pH do electrólito de suporte mais baixos, Figura 5.7.

5.1.3. Voltametria de Onda Quadrada

O estudo por SWV foi efectuado para uma solução de curcumina 10 μM numa vasta gama de valores de pH. Este estudo apresentou resultados similares aos obtidos para CV e DPV, confirmando o aparecimento do pico 1_a e 2_a num primeiro varrimento e nos varrimentos subsequentes o aparecimento do pico 3_a .

Nos voltamogramas obtidos para pH 6,9, observou-se num primeiro varrimento a oxidação da curcumina com o aparecimento do pico 1_a a um potencial de $E_{p1a} = + 0,354\text{V}$ e do pico 2_a a um potencial de $E_{p2a} = + 0,550\text{ V}$, Figura 5.8 A). Verificou-se que a oxidação da curcumina é um processo irreversível, pois a componente directa da corrente dos dois picos, apresenta picos anódicos de corrente semelhante à corrente total, enquanto que a componente inversa não apresenta qualquer pico catódico.

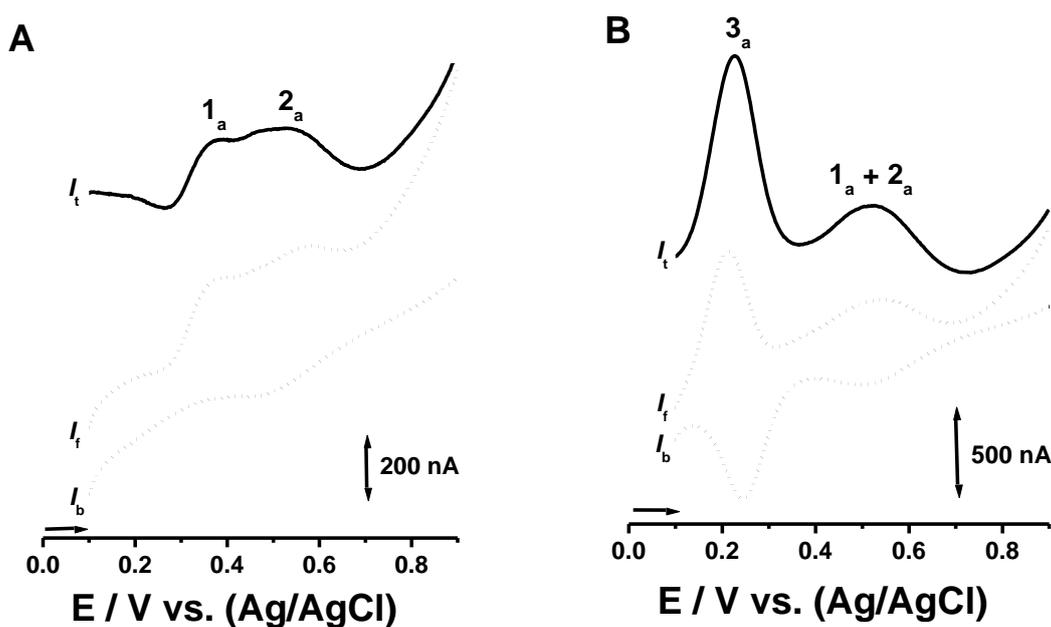


Figura 5.8 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos numa solução de curcumina 10 μM , em tampão acetato, pH 6,9, a uma frequência de 50 Hz; **A)** 1º varrimento; **B)** 2º varrimento; I_t – corrente total, I_f – corrente directa, I_b – corrente inversa.

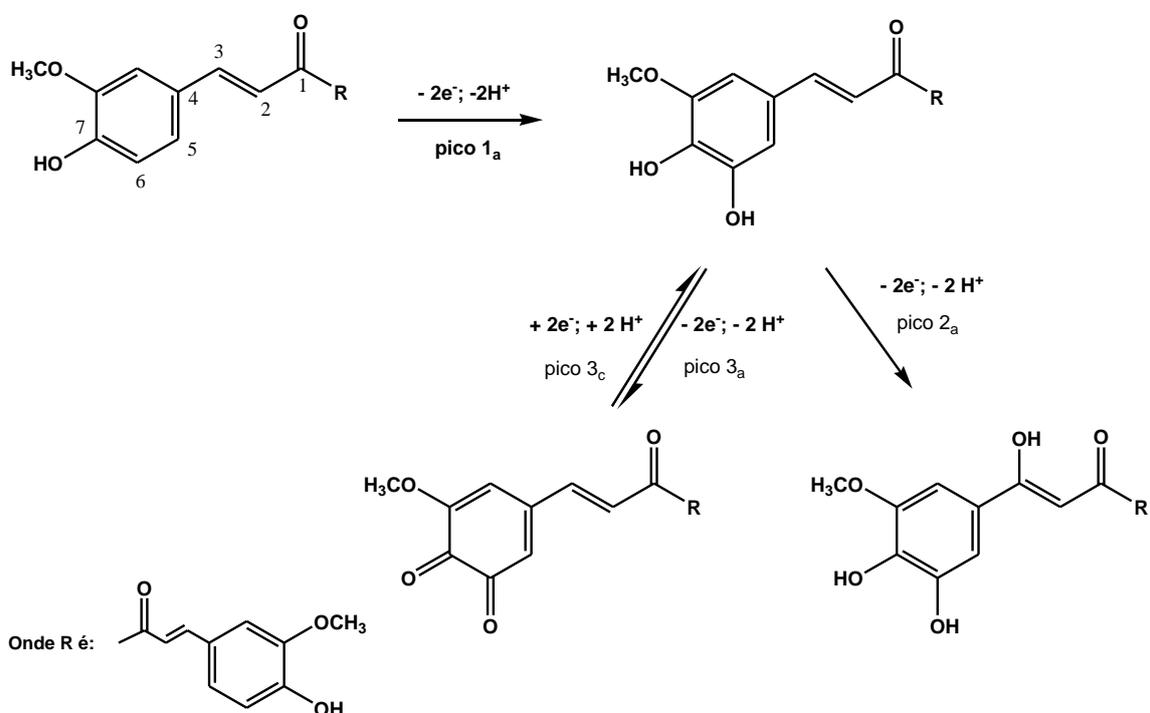
Com o registo de um segundo varrimento observou-se o aparecimento do pico 3_a , a um potencial de $E_{p3a} = + 0,224\text{ V}$, correspondente à oxidação dos produtos

formados durante a oxidação da curcumina, Figura 5.8 B). Através da separação da corrente total nas suas componentes, directa e inversa, verificou-se a reversibilidade do pico 3_a, uma vez que as correntes anódicas e catódicas são iguais.

A irreversibilidade dos picos 1_a e 2_a foi verificada por SWV para toda a gama de electrólitos de suporte usada. Também a reversibilidade do pico 2_a foi comprovada em toda a faixa de electrólitos de suporte aplicada ao longo do trabalho.

5.2. Mecanismo de oxidação da curcumina

De uma maneira geral, o comportamento electroquímico verificado para a curcumina foi semelhante ao comportamento electroquímico do ácido ferúlico, estudado anteriormente (Capítulo 3). Tendo em conta as semelhanças verificadas, o mecanismo de oxidação proposto para a curcumina está baseado no mecanismo previamente apresentado para a oxidação do ácido ferúlico.



Esquema 5.1 – Mecanismo proposto para a oxidação da curcumina e dos seus produtos de oxidação.

O mecanismo proposto para a oxidação da curcumina, está representado no Esquema 5.1.

5.3. Conclusões

Com a realização do estudo do comportamento electroquímico da curcumina por CV, DPV e SWV em soluções de electrólito de suporte com diferentes valores de pH utilizando um CGE, foi possível propor um mecanismo de oxidação para a oxidação electroquímica da curcumina.

Os resultados electroquímicos obtidos revelaram que a curcumina apresenta um mecanismo de oxidação que ocorre em duas etapas, por meio de um processo irreversível e dependente do pH até valores de pH próximos do seu pK_a , envolvendo a transferência de dois electrões e de dois protões para cada uma das etapas. Para valores de pH superiores ao valor de pK_a o processo de oxidação da curcumina tornou-se independente do pH do electrólito de suporte, envolvendo apenas a transferência de dois electrões, para cada uma das etapas.

Após a realização de voltamogramas sucessivos, verificou-se que a oxidação da curcumina origina a formação de um produto de oxidação electroquimicamente activo. O produto de oxidação da curcumina demonstrou ter um processo de oxidação reversível, dependente do pH envolvendo a transferência de dois electrões e de dois protões. Para valores de pH mais alcalinos a reacção de oxidação do produto formado mostrou ser um processo independente do pH com a transferência de dois electrões.

Capítulo 6

Conclusões

A investigação efectuada ao longo deste trabalho teve como objectivo o estudo do comportamento electroquímico do ácido ferúlico, da capsaicina, da dihidrocapsaicina e da curcumina na superfície do GCE, numa ampla gama de pH aplicando técnicas voltamétricas.

Concluiu-se que o ácido ferúlico sofre oxidação por meio de um processo que ocorre em duas etapas irreversíveis. Para electrólitos com $\text{pH} < 9,0$ a oxidação do ácido ferúlico é dependente do pH e ocorre com a transferência de dois electrões e de dois prótons em cada uma das etapas.. Para valores de pH superiores a 9,0 foi observada apenas a transferência de dois electrões em cada uma das etapas. Verificou-se ainda que a oxidação do ácido ferúlico origina a formação de um produto de oxidação que é posteriormente oxidado, numa reacção reversível, dependente do pH e envolvendo a transferência de dois electrões e de dois prótons.

As experiências realizadas com os dois capsaicinóides, capsaicina e dihidrocapsaicina, permitiram determinar que estes sofrem um processo de oxidação, por intermédio de uma única etapa, com perda de dois electrões e de dois prótons; numa reacção dependente do pH. Verificou-se que a oxidação da capsaicina e da dihidrocapsaicina apresentou a formação de um produto de oxidação que é posteriormente oxidado com a transferência de dois electrões e de dois prótons. Este processo mostrou ser reversível e dependente do pH.

Após o estudo do comportamento electroquímico da curcumina nos diferentes electrólitos de suporte utilizados, concluiu-se que a curcumina sofre oxidação electroquímica na superfície do GCE por um processo irreversível, dependente do pH do electrólito de suporte até valores próximos do seu pK_a , ocorrendo em duas etapas,

com a transferência de dois electrões e de dois protões, para cada uma delas. Para valores superiores ao valor de pK_a a reacção de oxidação passou a ser independente do pH deixando de existir transferência protónica.

A oxidação da curcumina originou a formação de um produto de oxidação reversivelmente oxidado. O produto de oxidação da curcumina mostrou um pico de oxidação correspondente a uma reacção que envolve a transferência de dois electrões e de dois protões, num processo dependente do pH.

Tabela 6.1 – Potenciais de oxidação do ácido ferúlico, capsaicina, dihidrocapsaicina e da curcumina obtidos em pH 6,9 por DPV.

	Pico 1_a	Pico 2_a	Pico 3_a
Ácido Ferúlico	0,372 V	0,447 V	0,196 V
Capsaicina	0,383 V	-	0,157 V
Dihidrocapsaicina	0,390 V	-	0,161 V
Curcumina	0,302 V	0,496 V	0,198 V

Baseados na semelhança verificada entre a electroactividade do ácido ferúlico, da capsaicina, da dihidrocapsaicina e da curcumina, Tabela 6.1, foram propostos mecanismos para a oxidação de cada um dos compostos fenólicos estudados assim como para a oxidação dos produtos de oxidação formados.

As técnicas electroquímicas são de grande utilidade para a análise do comportamento electroquímico de compostos fenólicos devido à sua actividade electroactiva, com reacções de transferência electrónica de oxidação e redução. Tornando-se esta informação de grande importância para a compreensão da sua actividade como antioxidantes.

Sendo os compostos fenólicos estudados importantes componentes bioactivos dos alimentos e devido às suas capacidades em participar em várias reacções *in vivo* foi importante o estudo dos seus potenciais de oxidação e dos seus mecanismos. Informações sobre o comportamento electroquímico do ácido ferúlico, da capsaicina, da dihidrocapsaicina e da curcumina, a partir dos resultados obtidos neste trabalho desempenham um papel crucial para a compreensão das suas propriedades e do seu metabolismo num sistema biológico.

BIBLIOGRAFIA

1. Rice-Evans CA, Miller N. J. and Paganga G, Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, 1997. 2(4): p. 152-159.
2. Naczki M. and Shahidi F., Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and biomedical analysis*, 2006. 41(5): p. 1523-1542.
3. Balasundram N., Sundram K. and Samman S., Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 2006. 99: p. 191-203.
4. Beckman C.H., Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defense responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2000. 57(3): p. 101-110.
5. Nicholson R.L. and Hammerschmidt R., Phenolic Compounds and Their Role in Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 1992. 30: p. 369-389.
6. Ritter L., Report of a panel on the relationship between public exposure to pesticides and cancer. *Cancer*, 1997. 80(10): p. 1887-1888.
7. Naczki M. and Shahidi F., Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 2004. 1054: p. 95-111.
8. Bravo L., Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 1998. 56(11): p. 317-333.
9. Kong Y. et al., Cajanuslactone, a new coumarin with anti-bacterial activity from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves. *Food Chemistry*, 2010. 121(4): p. 1150-1155.
10. Radovanović A., Radovanović B. and Jovančićević B., Free radical scavenging and antibacterial activities of southern Serbian red wines. *Food Chemistry*, 2009. 117(2): p. 326-331.
11. Visavadiya N.P., Soni B. and Dalwadi N., Free radical scavenging and antiatherogenic activities of *Sesamum indicum* seed extracts in chemical and biological model systems. *Food and Chemical Toxicology*, 2009. 47(10): p. 2507-2515.
12. Saha R.K. et al., Antiviral effect of strictinin on influenza virus replication. *Antiviral Research*, 2010. 88(1): p. 10-18.
13. Panichayupakaranant P., Tewtrakul S. and Yuenyongsawad S., Antibacterial, anti-inflammatory and anti-allergic activities of standardised pomegranate rind extract. *Food Chemistry*, 2010. 123(2): p. 400-403.

14. Dong X. et al., Synthesis and biological evaluation of novel hybrid chalcone derivatives as vasorelaxant agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2010. 45(9): p. 3986-3992.
15. Ignat I., Volf I. and Popa V. I., A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 2011. 126: p. 1821-1835.
16. Born M. et al., Electrochemical Behaviour and Antioxidant Activity of Some Natural Polyphenols. *Helvetica Chimica Acta*, 1996. 79: p. 1147-1158.
17. Rice-Evans C.A., Miller N. J. and Paganga G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology e Medicine*, 1996. 20(7): p. 933-956.
18. Rice-Evans C.A., Miller N. J. and Paganga G., Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, 1997. 2(4): p. 152-159.
19. Hallwell B. et al., The Characterization of Antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 1995. 33(7): p. 601-617.
20. Brenna O.V. and Pagliarini E., Multivariate analysis of antioxidant power and polyphenolic composition in red wine. *Journal of Agriculture and food Chemistry*, 2001. 49: p. 4841-4844.
21. Lambert J.D. and Elias R.J., The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2010. 501(1): p. 65-72.
22. Langseth L., Oxidant, antioxidant and disease prevention. ILSI Europe, 1995.
23. Gaspar A. et al., New insights into the antioxidant activity of hydroxycinnamic acids: Synthesis and physicochemical characterization of novel halogenated derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2009. 44(5): p. 2092-2099.
24. Jayaprakasha G. K., Jaganmohan R. L. and Sakariah K. K., Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Chemistry*, 2006. 98(4): p. 720-724.
25. Zhao Z. and Moghadasian M. H., Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chemistry*, 2008. 109(4): p. 691-702.
26. Baskaran N. et al., Chemopreventive potential of ferulic acid in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary carcinogenesis in Sprague-Dawley rats. *European Journal of Pharmacology*. 637(1-3): p. 22-29.
27. Prasad N. R. et al., Ferulic acid inhibits UV-B-induced oxidative stress in human lymphocytes. *Nutrition Research*, 2007. 27(9): p. 559-564.

28. Andreassen M. F. et al., Antioxidant Effects of Phenolic Rye (*Secale cereale* L.) Extracts, Monomeric Hydroxycinnamates, and Ferulic Acid Dehydrodimers on Human Low-Density Lipoproteins. *Journal of Agriculture and food Chemistry*, 2001. 49(8): p. 4090-4096.
29. Kikuzaki H. et al., Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Related Compounds. *Journal of Agriculture and food Chemistry*, 2002. 50(7): p. 2161-2168.
30. Balasubashini M. S. et al., Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats. *Phytotherapy Research*, 2004. 18(4): p. 310-314.
31. Kanski J. et al., Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure-activity studies. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2002. 13(5): p. 273-281.
32. Supalkova V. et al., Study of Capsaicin Content in Various Parts of Pepper Fruit by Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *Acta Chimica Slovenica*, 2007. 54: p. 55-59.
33. Hayman M. and Kam P. C. A., Capsaicin: A review of its pharmacology and clinical applications. *Current Anaesthesia & Critical Care*. 19(5-6): p. 338-343.
34. Surh Y.-J. and Lee S. S., Capsaicin, a double-edged sword: Toxicity, metabolism, and chemopreventive potential. *Life Sciences*, 1995. 56(22): p. 1845-1855.
35. Coultate T. P., *Food: The chemistry of its components*. 5ª edição ed. Vol. The Royal Society of Chemistry. 2009.
36. Grégio A. M. T. et al., Capsaicina e sua aplicação em odontologia. *Arquivos em odontologia*, 2008. 44(1): p. 45-48.
37. Surh Y.-J., Lee E. and Lee J. M., Chemoprotective properties of some pungent ingredients present in red pepper and ginger. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1998. 402(1-2): p. 259-267.
38. Salimath B. P., Sundaresh C. S. and Srinivas L., Dietary components inhibit lipid peroxidation in erythrocyte membrane. *Nutrition Research*, 1986. 6(10): p. 1171-1178.
39. Moreno G. C., Caviedes J. and González J. M., Efecto de la capsaicina sobre la proliferación y ciclo celular de fibroblastos pulpaes humanos. *Revista de la Federación Odontológica Colombiana*, 2002. 203: p. 5-13.
40. Surh Y. J. and Lee S. S., Capsaicin in hot chili pepper: Carcinogen, co-carcinogen or anticarcinogen? *Food and Chemical Toxicology*, 1996. 34(3): p. 313-316.
41. Monsereenusorn Y., Kongsamut S. and Pezalla P. D., Capsaicin - A literature Survey. *Critical Reviews in Toxicology*, 1982. 10(4): p. 321-339.

42. Purkiss J. et al., Capsaicin-stimulated release of substance P from cultured dorsal root ganglion neurons: involvement of two distinct mechanisms. *Biochemical Pharmacology*, 2000. 59(11): p. 1403-1406.
43. Singh S. et al., Oxidative DNA damage by capsaicin and dihydrocapsaicin in the presence of Cu(II). *Cancer Letters*, 2001. 169(2): p. 139-146.
44. López-Carnillo L., Avila M. H. and Dubrow R., Chili Pepper Consumption and Gastric Cancer in Mexico: A Case-Control Study. *American Journal of Epidemiology*, 1994. 139(3): p. 263-271.
45. Morin D. et al., Curcumin induces the mitochondrial permeability transition pore mediated by membrane protein thiol oxidation. *FEBS Letters*, 2001. 495(1-2): p. 131-136.
46. Stanić Z., Voulgaropoulos A. and Girousi S., Electroanalytical Study of the Antioxidant and Antitumor Agent Curcumin. *Electroanalysis*, 2008. 20(11): p. 1263-1266.
47. Zheng L. and Song J.-F., Curcumin multi-wall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode and its electrocatalytic activity towards oxidation of hydrazine. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2009. 135(2): p. 650-655.
48. Priyadarsini K. I. et al., Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin. *Free Radical Biology and Medicine*, 2003. 35(5): p. 475-484.
49. Anand P. et al., Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochemical Pharmacology*, 2008. 76(11): p. 1590-1611.
50. Serpi C., Stanić Z. and Girousi S., Electroanalytical study of the interaction between dsDNA and curcumin in the presence of copper(II). *Talanta*. 81(4-5): p. 1731-1734.
51. Maheshwari R. K. et al., Multiple biological activities of curcumin: A short review. *Life Sciences*, 2006. 78(18): p. 2081-2087.
52. Ak T. and Gülçin I., Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interactions*, 2008. 174(1): p. 27-37.
53. Cousins M. et al., Antioxidant capacity of fresh and dried rhizomes from four clones of turmeric (*Curcuma longa* L.) grown in vitro. *Industrial Crops and Products*, 2007. 25(2): p. 129-135.
54. Liu F., Ooi V. E. C. and Chang S. T., Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sciences*, 1997. 60(10): p. 763-771.
55. Hayeshi R. et al., The inhibition of human glutathione S-transferases activity by plant polyphenolic compounds ellagic acid and curcumin. *Food and Chemical Toxicology*, 2007. 45(2): p. 286-295.

56. Parthasarathy V. A., Chempakam B. and Zachariah T. J., *Chemistry of Spices*. 2008: CAB International.
57. Varalakshmi C. et al., Immunomodulatory effects of curcumin: In-vivo. *International Immunopharmacology*, 2008. 8(5): p. 688-700.
58. Kulkarni A. P., Murthy K. H. and Kotwal G. J., Study of interaction of curcumin, a potential antineuroinflammatory agent, with C3 and C3b using QCM-D technology. *Molecular Immunology*, 2007. 44(147-266).
59. Downham A. and Collins P., Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science & Technology*, 2000. 35(1): p. 5-22.
60. Toda S. et al., Natural antioxidants. III. Antioxidative components isolated from rhizome of *Curcuma longa* L. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1985. 33(4): p. 1725-1728.
61. Calabrese V., Butterfield D. A. and Stella A. M., Nutritional antioxidants and the heme oxygenase pathway of stress tolerance: novel targets for neuroprotection in Alzheimer's disease. *Italian Journal of Biochemistry* 2003. 52(4): p. 177-181.
62. Majdi S. et al., Electrocatalytic oxidation of some amino acids on a nickel-curcumin complex modified glassy carbon electrode. *Electrochimica Acta*, 2007. 52(14): p. 4622-4629.
63. Ciszewski A. et al., Electrocatalytic Properties of Electropolymerized Ni(II)curcumin Complex. *Electroanalysis*, 2003. 15(5-6): p. 518-523.
64. Ravindranath V. and Chandrasekhara N., Absorption and tissue distribution of curcumin in rats. *Toxicology*, 1980. 16(3): p. 259-265.
65. Chan M. M.-Y. et al., In Vivo Inhibition of Nitric Oxide Synthase Gene Expression by Curcumin, a Cancer Preventive Natural Product with Anti-Inflammatory Properties. *Biochemical Pharmacology*, 1998. 55(12): p. 1955-1962.
66. Brett C. M. A. and Oliveira Brett A. M., *Electrochemistry: Principles, Methods and Applications*. 1993, Oxford: Oxford Science Publications.
67. Brett C. M. A. and Oliveira Brett A. M., *Electroanalysis*. 1998, Oxford: Oxford Science Publications.
68. Riahi S. et al, Development of a new combined chemometrics method, applied in the simultaneous voltammetric determination of cinamic acid and 3,4-dihydroxy benzoic acid. *Current Analytical Chemistry*, 2009. 5: p. 42-47.

