



Pedro Manuel da Cunha Catalão Pires dos Santos

Licenciado em Engenharia Química

Mecanismos de degradação de compostos de relevância biológica por radicais oxidantes

Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em Química,
especialidade Química Orgânica.

Orientador: Abel José de Sousa Costa Vieira
Professor Associado, Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: João Paulo Nunes Cabral Telo
Professor Auxiliar, Instituto Superior Técnico da
Universidade Técnica de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Ana Maria Félix Trindade Lobo
Arguentes: Prof. Doutora Eduarda das Graças Rodrigues Fernandes
Prof. Doutor Rui Ferreira Alves Moreira
Vogais: Prof. Doutora Maria de Lurdes Afonso Barreira Alves de Mira
Prof. Doutor Abel José de Sousa Costa Vieira
Prof. Doutor João Paulo Nunes Cabral Telo



Julho de 2010

Mecanismos de degradação de compostos de relevância biológica por radicais oxidantes

Copyright © Pedro Manuel da Cunha Catalão Pires dos Santos, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

"Puxou-o para fora e viu então que era um polvinho,
não o monstro marinho contra o qual combatera"

Pepetela, Geração da Utopia

À Vera

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Abel Vieira, orientador deste trabalho, quero agradecer em primeiro lugar a confiança que depositou em mim quando, por seu convite, dei os primeiros passos nesta aventura pelos meandros da Química Radicalar ainda no milénio passado. Agradeço ainda todo o apoio científico, a supervisão experimental e o inesgotável encorajamento e disponibilidade que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

Ao Professor Doutor João Paulo Telo, igualmente orientador deste trabalho, quero agradecer os sábios conselhos e sugestões que me deu, e o auxílio imprescindível nas experiências de Ressonância Paramagnética Electrónica efectuadas no Instituto Superior Técnico.

A todos os membros e colaboradores do grupo de *Química Orgânica Física – Química Radicalar*, em particular à Doutora Alexandra Antunes pelo auxílio na realização de algumas experiências deste trabalho e na interpretação dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear, ao Professor Doutor João Paulo Noronha pelo apoio nas técnicas de cromatografia gasosa e ao Doutor Gonçalo Justino pela ajuda prestada nos cálculos teóricos. Quero expressar igualmente o meu agradecimento a todos os jovens investigadores do grupo que partilharam comigo muitas horas de laboratório, em especial o Saúl Silva, com quem tive o prazer de trabalhar directamente.

À Doutora Maria Luísa Botelho, responsável pelo grupo *Tecnologias de Radiação: Processos e Produtos* do Instituto Tecnológico e Nuclear, quero expressar o meu agradecimento por ter disponibilizado a instalação semi-industrial com uma fonte de ^{60}Co para as experiências de radiólise estacionária.

Ao Professor Doutor Fernando Pina e ao seu grupo de investigação, em particular o Professor Doutor Jorge Parola e o Carlos Pinheiro, quero agradecer o amável apoio nas experiências de voltametria cíclica efectuadas no seu laboratório.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia, pelo financiamento deste trabalho através da Bolsa de Doutoramento SFRH/BD/2867/2000.

A todos os meus amigos que acompanharam este meu percurso, pela companhia e a confiança que sempre tiveram em mim. Quero agradecer muito em particular à Ana Rita Canário, cuja determinação, dedicação e força de vontade foram um exemplo, e de cuja amizade nunca esquecerei.

Aos meus pais, pela compreensão e apoio que me deram de forma incondicional e a todos os níveis, sem o qual não teria sido possível concluir este trabalho.

Quero expressar ainda um agradecimento muito especial à *minha* Sara, pela eterna paciência e compreensão, e por ter suportado com sacrifício as minhas ausências nestes últimos meses.

Resumo

A reacção de compostos de relevância biológica com os radicais oxidantes hidroxilo (HO^\bullet) e anião sulfato ($\text{SO}_4^{\bullet-}$), gerados por via química, fotoquímica ou radiolítica, leva à formação de vários produtos finais estáveis identificados por HPLC, GC-MS e RMN.

Estudou-se a reparação das formas de oxidação monoelectrónica de xantinas por outras xantinas observando a variação da concentração de misturas binárias destes compostos após reacção com o radical anião $\text{SO}_4^{\bullet-}$ em função do tempo de reacção. Obteve-se uma escala de capacidade antioxidante relativa destes compostos confirmada por resultados de voltametria cíclica e cálculos DFT. Em meio fisiológico, a 1-metilxantina revelou-se como o antioxidante mais eficaz.

A oxidação da teofilina pelo radical HO^\bullet a pH 7 conduz à formação de produtos de desmetilação, em particular a 1-metilxantina, para além da esperada formação de ácido 1,3-dimetilúrico. Possuindo a 1-metilxantina um carácter mais antioxidante que o seu precursor, a reacção de desmetilação pode constituir um primeiro passo de uma cascata antioxidante.

A capacidade antioxidante de anti-inflamatórios não esteróides (pirazolonas derivadas da antipirina) avaliou-se através da identificação dos seus produtos de oxidação pelo radical HO^\bullet . Estes compostos reagem maioritariamente por desmetilação sucessiva em N^4 e por hidroxilação no anel aromático. A reacção da aminoantipirina com o radical anião $\text{SO}_4^{\bullet-}$ dá origem a produtos de desmetilação e, em maior extensão, a um produto de abertura do anel heterocíclico. No caso da antipirina forma-se unicamente um aducto de sulfato.

A reacção do ácido cinâmico e seus derivados com o radical HO^\bullet em meio neutro dá origem a produtos de hidroxilação tanto no anel benzénico como na cadeia exocíclica e a produtos de descarboxilação. Estes obtêm-se igualmente por oxidação dos mesmos substratos com o radical anião $\text{SO}_4^{\bullet-}$.

A caracterização dos intermediários radicalares efectuou-se por espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica (RPE). Dado o tempo de vida muito curto destas espécies, apenas foi possível obter espectros de radicais iões.

Os resultados obtidos para as três classes de compostos avaliadas mostram a sua potencial capacidade antioxidante como protectores contra a degradação oxidativa de alvos biológicos.

Abstract

The reaction of biologically relevant compounds with the oxidising radicals hydroxyl (HO^\bullet) and sulphate anion ($\text{SO}_4^{\bullet-}$), generated by chemical, photochemical or radiolytic ways, leads to the formation of several stable final products, identified by HPLC, GC-MS and NMR.

The repair of one-electron oxidised forms of xanthines by other xanthines was studied by following the concentration changes in binary mixtures of these compounds upon reaction with $\text{SO}_4^{\bullet-}$ radical anion as a function of irradiation time. An order of relative antioxidising capacity was obtained for these compounds, which was confirmed by cyclic voltammetry results and DFT calculations data. In physiological medium, 1-methylxanthine appeared to be the most effective antioxidant.

The oxidation of theophylline by HO^\bullet radical at pH 7 leads to the formation of demethylation products, especially 1-methylxanthine, beyond the expected formation of 1,3-dimethyluric acid. Since 1-methylxanthine is a stronger antioxidant than its precursor, the demethylation reaction may embody the first step of an antioxidising cascade.

The antioxidant capacity of non-steroidal anti-inflammatory drugs – NSAIDs – (pyrazolone derivatives of antipyrine) was evaluated by identifying their oxidation products by HO^\bullet radical. These compounds react mainly by successive demethylation at N^4 and by hydroxylation on the aromatic ring. The reaction of 4-(*N,N*-dimethyl)-aminoantipyrine with $\text{SO}_4^{\bullet-}$ radical anion yields demethylation products and, at a higher extension, a heterocyclic ring opening product. In the case of antipyrine only a sulphate adduct is formed.

Cinnamic acid and its derivatives react with HO^\bullet radical, in neutral medium, to give hydroxylation products, whether on the benzene ring or on the exocyclic chain, and decarboxylation products. These latter are also obtained after oxidation of the same substrates by the $\text{SO}_4^{\bullet-}$ radical anion.

The characterisation of radical intermediates was performed by Electron Spin Resonance (ESR) spectroscopy. Due to the short lifetime of these species, only the spectra of radical ions were obtained.

The results obtained for the three classes of compounds studied show their potential antioxidising capacity as protectors against oxidative stress on biological targets.

Glossário de símbolos e abreviaturas

α -TO	Alfa-tocoferol (vitamina E)
ΔG	Varição de energia livre de Gibbs
ΔG^0_{aq}	Varição de energia livre de Gibbs em fase aquosa
ΔG^0_g	Varição de energia livre de Gibbs em fase gasosa
$\Delta G^0_{desprot,aq}$	Varição de energia livre de Gibbs de desprotonação em fase aquosa
$\Delta G^0_{desprot,g}$	Varição de energia livre de Gibbs de desprotonação em fase gasosa
$\Delta G^0_{reacção,aq}$	Varição de energia livre de Gibbs da reacção de reparação em fase aquosa
ΔG^0_{solv}	Varição de energia livre de Gibbs de solvatação
ΔH	Varição de entalpia
δ	Desvio químico
ϵ	Coefficiente de extinção molar
Φ	Rendimento quântico
λ	Comprimento de onda
$\lambda_{m\acute{a}x}$	Comprimento de onda (do máximo de absorvância)
$\bar{\nu}_{m\acute{a}x}$	Número de onda (banda mais intensa)
1,3-DiMeX	1,3-Dimetilxantina (Teofilina)
1,7-DiMeX	1,7-Dimetilxantina (Paraxantina)
1,9-DiMeX	1,9-Dimetilxantina
1-MeX	1-Metilxantina
3,7-DiMeX	3,7-Dimetilxantina (Teobromina)
3,9-DiMeX	3,9-Dimetilxantina
3-MeX	3-Metilxantina
4-SPyNO	<i>N</i> -óxido de 4-mercaptopiridina
7-MeX	7-Metilxantina
9-MeX	9-Metilxantina
AAPH	Di-cloridrato de 2,2'-azobis(2-amidino-propano)
ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico
Ade	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ado	Adenosina
AINE	Anti-inflamatório não esteróide
Asc ^{•-}	Radical ascorbilo
AscH ⁻	Ácido ascórbico (base conjugada)
c.r.	Coordenada reaccional

Caf	Ácido cafeico
Cin	Ácido cinâmico
COSMO	<i>Conductor Like Screening Model</i>
D	Debye
d	Comprimento de ligação
d	Dubleto
DFT	Teoria da densidade funcional (<i>Density Functional Theory</i>)
DHA	Ácido desidroascórbico
DMPO	<i>N</i> -óxido de 5,5-dimetil-1-pirrolina
DPPH [•]	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
D _T	Energia de dissociação (à temperatura T (Kelvin))
E	Potencial eléctrico
E _a	Energia de activação
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EI	Impacto electrónico (<i>Electron Impact</i>)
E _i	Energia (da espécie i)
E _i ⁰	Potencial de redução da espécie i
ENH	Eléctrodo normal de hidrogénio
E _p	Potencial do pico anódico
ESC	Eléctrodo saturado de calomelanos
ESI-	Ionização por <i>electrospray</i> (negativa)
ESI+	Ionização por <i>electrospray</i> (positiva)
esu	Unidade electrostática (<i>electrostatic unit</i>)
ET	Energia do estado de transição
eV	Electrão-Volt
exp	Exponencial
e ⁻	Electrão
e ⁻ _{aq}	Electrão solvatado (em água)
e ⁻ _{se}	Electrão de subexcitação
e ⁻ _t	Electrão térmico
F	Constante de Faraday
G	Gauss
G	Rendimento radiolítico (por 100 eV de energia absorvida)
GC	Cromatografia gasosa (<i>Gas Chromatography</i>)
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
G _D	Factor "g" (deutério)

g_H	Factor "g" (hidrogénio)
Gy	Gray
H ₂ O*	Molécula de água excitada
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
I	Número quântico de <i>spin</i>
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>k</i>	Constante de velocidade
<i>K</i>	Constante de equilíbrio
<i>K_a</i>	Constante de acidez
LC	Cromatografia líquida (<i>Liquid Chromatography</i>)
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa
LET	Transferência linear de energia (<i>Linear Energy Transfer</i>)
ln	Logaritmo neperiano
M	Molar
<i>m</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MeV	10 ⁶ Electrão-Volt
MSTFA	<i>N</i> -metil- <i>N</i> -trimetilsililtrifluoroacetamida
N	População
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido (forma reduzida)
n.d.	Não determinado
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
oxid.	Oxidação
<i>p</i> Cum	Ácido <i>p</i> -cumárico
pH	-log [H ⁺]
p <i>K_a</i>	- log <i>K_a</i>
p <i>K_{a,calc}</i>	p <i>K_a</i> calculado
p <i>K_{a,corr}</i>	p <i>K_a</i> corrigido
p <i>K_{a,exp}</i>	p <i>K_a</i> experimental
PM6	<i>Parametric Method 6</i>
ppm	Partes por milhão
prod.	Produtos
R	Constante dos gases perfeitos

R [•]	Radical livre (designação genérica)
reag.	Reagentes
red.	Redução
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROO [•]	Radical peroxilo
ROS	Espécies reactivas de oxigénio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RNS	Espécies reactivas de azoto (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)
RPE	Ressonância paramagnética electrónica
s	Singleto
T	Temperatura absoluta (Kelvin)
t	Tripleto
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>
TMS	Trimetilsililo
TOF-MS	Espectrometria de massa por tempo de voo (<i>Time Of Flight</i>)
u.a.	Unidades arbitrárias
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visível
VC	Voltametria cíclica
Xan	Xantina
Xao	Xantosina
X _i	Designação genérica de uma xantina
\overline{X}_i	Concentração total de uma xantina

Índice

Agradecimentos.....	vii
Resumo	ix
Abstract	xi
Glossário de símbolos e abreviaturas.....	xiii
Índice	xvii
Índice de Figuras.....	xxi
Índice de Tabelas	xxvii
Índice de Esquemas	xxix
1. Objectivo e enquadramento do trabalho.....	1
2. Introdução.....	7
2.1. Radicais livres e <i>stress</i> oxidativo	9
2.2. Geração <i>in vivo</i> do radical hidroxilo	10
2.2.1. Formação por via química.....	10
2.2.2. Radiação ionizante	13
2.2.3. Radiação ultravioleta	13
2.2.4. Ozono	14
2.3. Propriedades e reactividade do radical hidroxilo	14
2.4. Geração <i>in vitro</i> do radical hidroxilo	19
2.4.1. Métodos radiolíticos	19
2.4.2. Processos fotolíticos	25
2.4.2.1. Fotólise de peróxido de hidrogénio	25
2.4.2.2. Fotólise de <i>N</i> -óxido de 4-mercaptopiridina	25
2.4.3. Reacção de Fenton.....	26
2.5. Métodos de detecção do radical hidroxilo	28
2.6. Radical anião sulfato	29
2.6.1. Propriedades.....	29
2.6.2. Reactividade.....	29
2.6.3. Métodos de geração	30
2.7. Antioxidantes	32

2.7.1.	Antioxidantes proteicos	32
2.7.2.	Antioxidantes de baixa massa molecular	33
2.7.3.	Métodos padrão de avaliação da capacidade antioxidante	35
2.8.	Tipos de antioxidantes estudados	36
2.8.1.	Xantinas e ácidos hidroxicinâmicos	36
2.8.2.	Derivados de antipirina	37
	Bibliografia	39
3.	Parte Experimental.....	51
3.1.	Reagentes	53
3.2.	Sínteses	55
3.2.1.	<i>N</i> -óxido de 4-mercaptopiridina	55
3.2.2.	4-(<i>N</i> -metil)-aminoantipirina	55
3.3.	Preparação de soluções	56
3.4.	Geração de radicais	56
3.4.1.	Fotólise UV	56
3.4.2.	Reacção de Fenton	57
3.4.3.	Irradiação gama	58
3.5.	Sistemas cromatográficos.....	59
3.5.1.	Cromatografia líquida de alta eficiência analítica	59
3.5.1.1.	Sistema Shimadzu	59
3.5.1.2.	Sistema Thermo Finnigan.....	60
3.5.1.3.	Sistema Waters	61
3.5.2.	Cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa.....	61
3.5.3.	Cromatografia gasosa com detecção mássica	62
3.5.3.1.	Preparação das amostras.....	62
3.5.3.2.	Sistema Agilent	62
3.5.3.3.	Sistema Carlo Erba	63
3.6.	Espectrometria de massa por injeção directa	63
3.7.	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	64
3.8.	Espectroscopia de Infravermelho	64
3.9.	Voltametria cíclica	64
3.10.	Espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica.....	65

3.11. Cálculos teóricos	66
Bibliografia	67
4. Estrutura e propriedades redox dos radicais derivados da oxidação de xantinas	69
4.1. Introdução	71
4.2. Caracterização das xantinas	72
4.2.1. Propriedades ácido-base e tautomerismo	72
4.2.2. Espectros electrónicos	74
4.3. Estudo da capacidade antioxidante relativa de xantinas.....	76
4.3.1. Tautómeros dos radicais formados	79
4.3.2. Efeito do grupo metilo na posição <i>N</i> (1).....	83
4.3.3. Efeito da posição do grupo metilo nos derivados monometilados.....	83
4.3.4. Efeito indutivo do substituinte em <i>N</i> (9)	86
4.3.5. Teobromina e 3,9-dimetilxantina	86
4.3.6. Efeito do pH	87
4.4. Métodos computacionais.....	96
4.4.1. Equilíbrios em meio ácido.....	96
4.4.2. Cálculo dos valores de pK_a de radicais neutros	100
4.4.3. Equilíbrios em meio fisiológico (pH 7)	103
4.5. Determinação dos potenciais de redução por voltametria cíclica	107
4.6. Espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica	109
4.7. Desmetilação da teofilina a 1-metilxantina	111
4.7.1. Oxidação da teofilina pelo radical hidroxilo	111
4.7.2. Oxidação da teofilina em meio fortemente básico (radical anião $O^{\bullet-}$).....	114
4.7.3. Efeito do oxigénio molecular	116
4.7.4. Cálculos teóricos	117
4.8. Conclusões.....	118
Bibliografia.....	121
5. Degradação radicalar de derivados da antipirina.....	125
5.1. Introdução	127
5.2. Oxidação dos derivados da aminoantipirina pelo radical hidroxilo.....	129
5.2.1. Caracterização dos produtos mono-hidroxilados da aminoantipirina	131

5.2.2. Outros produtos de hidroxilação	136
5.2.3. Produtos de hidroxilação com abertura do anel heterocíclico.....	140
5.2.4. Oxidação da antipirina pelo radical hidroxilo	142
5.2.5. Mecanismos de hidroxilação e de desmetilação	144
5.2.6. Espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica	145
5.3. Oxidação pelo radical anião sulfato.....	148
5.4. Conclusões	151
Bibliografia	153
6. Reacção de derivados do ácido cinâmico com radicais oxidantes	155
6.1. Introdução	157
6.2. Oxidação pelo radical hidroxilo	158
6.3. Oxidação pelo radical anião sulfato.....	167
6.4. Efeito protector sobre a degradação oxidativa da adenina	171
6.5. Conclusões	174
Bibliografia	175
Apêndices.....	179
Apêndice A	181
Apêndice B.....	185
Apêndice C.....	187

Índice de Figuras

Figura 2.1 – Representação esquemática da radiólise da água.	21
Figura 2.2 – Antioxidantes de baixa massa molecular.	34
Figura 3.1 – Montagem para fotólise UV de soluções aquosas. A distância mínima permitida ao centro da lâmpada é de 2,5 cm.	57
Figura 4.1 – Tautômeros possíveis para a xantina.	73
Figura 4.2 – Espectros UV da xantina e seus derivados metilados, em solução aquosa a pH 3, obtidos por HPLC com detector de fotodíodos.	75
Figura 4.3 – Cromatogramas de HPLC (sistema Shimadzu) a 265 nm obtidos após vários tempos de irradiação UV de uma solução aquosa de 7-MeX e 9-MeX 0,5 mM cada com $K_2S_2O_8$ 20 mM a pH3.	79
Figura 4.4 – Representação gráfica da evolução das concentrações de 7-MeX e de 9-MeX 0,5 mM cada, numa solução aquosa a pH 3 com $K_2S_2O_8$ 20mM e sujeita a diferentes tempos de irradiação UV.	79
Figura 4.5 – Fotólise de misturas binárias de xantinas 0,5 mM cada e $K_2S_2O_8$ 20 mM a pH 3. Efeito do grupo metilo em <i>N</i> (1).	84
Figura 4.6 – Fotólise de misturas binárias de xantinas 0,5 mM cada e $K_2S_2O_8$ 20 mM a pH 3. Efeito da posição do grupo metilo nos derivados monometilados.	85
Figura 4.7 – Fotólise de misturas binárias de xantinas 0,5 mM cada e $K_2S_2O_8$ 20 mM a pH 3. Efeito indutivo do substituinte em <i>N</i> (9).	86
Figura 4.8 – Fotólise de misturas binárias de xantinas 0,5 mM cada e $K_2S_2O_8$ 20 mM a pH 3. Teobromina e 3,9-dimetilxantina.	87
Figura 4.9 – Contributores de ressonância dos radicais aniões das xantinas monometiladas que melhor ilustram a que tipo de radical correspondem. Os radicais aniões da xantina e da xantosina, $Xan(1H)^{\bullet-}$ e $Xao^{\bullet-}$, são do mesmo tipo de $1-MeX^{\bullet-}$ e $9-MeX^{\bullet-}$ respectivamente, pelo que foram omitidos.	91
Figura 4.10 – Fotólise UV da mistura binária de 1-MeX e Xan 0,5 mM cada com $K_2S_2O_8$ 20 mM a pH 7.	91
Figura 4.11 – Fotólise UV de misturas binárias de xantinas 0,5 mM cada com $K_2S_2O_8$ 20 mM a pH 7. Efeito reparador da 1-MeX sobre xantinas <i>N</i> (9)-substituídas.	92
Figura 4.12 – Fotólise UV de misturas binárias de xantinas 0,5 mM cada com $K_2S_2O_8$ 20 mM a pH 7. Ordem de capacidade antioxidante das xantinas <i>N</i> (9)-substituídas.	92
Figura 4.13 – Fotólise UV da mistura binária de 1-MeX e 1,9-DiMeX 0,5 mM cada com $K_2S_2O_8$ 20 mM a pH 7.	94
Figura 4.14 – Fotólise UV de misturas binárias de xantinas 0,5 mM cada com $K_2S_2O_8$ 20 mM a pH 7. Comparação entre xantinas <i>N</i> (3) e <i>N</i> (7)-substituídas.	95

Figura 4.15 – Fotólise de misturas binárias de xantinas 0,5 mM cada e K ₂ S ₂ O ₈ 20 mM a pH 7. Teobromina e 3,9-dimetilxantina.....	95
Figura 4.16 – Ciclo termodinâmico para o cálculo do valor da energia livre de Gibbs de desprotonação de um ácido HA em solução aquosa.....	100
Figura 4.17 – Voltamograma cíclico de uma solução aquosa de Xan 1 mM a pH 7 obtido com uma velocidade de varrimento de 40 mVs ⁻¹	108
Figura 4.18 – Espectros de RPE experimentais (lado esquerdo) e respectivas simulações (lado direito) dos radicais aniões (a) 1-MeX ^{•-} , (b) 3-MeX ^{•-} e (c) Xao ^{•-}	110
Figura 4.19 – Constantes de acoplamento hiperfino experimentais (e calculadas) dos radicais aniões dos derivados da xantina, obtidas por espectroscopia de RPE (valores em Gauss).....	110
Figura 4.20 – Cromatograma HPLC (sistema Shimadzu) após 4 min de irradiação UV de uma solução aquosa de teofilina 1 mM, H ₂ O ₂ 20 mM e tampão fosfatos 5 mM (reação com o radical HO [•] , pH 7).....	112
Figura 4.21 – Espectros de massa (sistema Agilent) dos produtos de desmetilação derivatizados obtidos após reação de teofilina como radical HO [•] (condições descritas na Figura 4.20).....	113
Figura 4.22 – Dependência da concentração em função do tempo de irradiação seguida por HPLC (sistema Shimadzu) na fotólise UV de misturas binárias de substratos 0,5 mM cada (adenina e antioxidante), H ₂ O ₂ 20 mM e tampão de fosfatos 5 mM (pH 7).....	114
Figura 4.23 – Cromatograma HPLC (sistema Shimadzu) após 25 min de irradiação UV de uma solução aquosa de teofilina 2 mM, N-óxido de 4-mercaptopiridina 0,5 mM e tampão fosfatos 5 mM (reação com o radical anião O ^{•-} , pH ≈ 13).....	115
Figura 4.24 – Perfis reaccionais para a abstracção de hidrogénio da teofilina a partir dos grupos metilo em N(1) e N(3), por reação com o radical HO [•]	118
Figura 5.1 – Estrutura da antipirina e seus derivados 4-aminossustituídos.....	127
Figura 5.2 – Cromatogramas HPLC (sistema Thermo Finnigan) com detecção óptica das misturas reaccionais de 4 (a), 3 (b) e 2 (c) com o radical HO [•] a pH 7; condições experimentais: substrato 10 mM, H ₂ O ₂ 10 mM, Fe ^{II} EDTA 2 mM, ácido ascórbico 1 mM (tampão fosfatos 5 mM); tempos de reação 12h, 9h e 6h respectivamente.....	130
Figura 5.3 – Cromatogramas HPLC (sistema Waters) com detecção óptica das misturas reaccionais de 4 com o radical HO [•] , condições experimentais: (a) substrato 10 mM, H ₂ O ₂ 10 mM, Fe ^{II} EDTA 2 mM, ácido ascórbico 1 mM, pH 7 (tampão fosfatos 5 mM), tempo de reação 4h30, (b) substrato 10 mM, H ₂ O ₂ 10 mM, FeSO ₄ 2 mM, pH 1 (meio HCl 0,1 M), tempo de reação 7h30.....	131
Figura 5.4 – Espectros de massa (ESI+) dos produtos de desmetilação (2 , 3) e de hidroxilação (A , B , C) obtidos na reação de 4 com o radical hidroxilo a pH 7 (perfil de HPLC da Figura 5.2a).....	132
Figura 5.5 – Espectros de ¹ H RMN dos produtos de hidroxilação (A , B , C) obtidos na reação de 4 com o radical hidroxilo a pH 7 (perfil de HPLC da Figura 5.2a).....	133

Figura 5.6 – Cromatogramas HPLC (sistema Waters) com detecção óptica das misturas reaccionais de 4 com o radical HO [•] , condições experimentais: (a) substrato 10 mM, H ₂ O ₂ 10 mM, Fe ^{II} EDTA 2 mM, ácido ascórbico 1 mM, pH 7 (tampão fostatos 5 mM), tempo de reacção 4h30, (b) substrato 10 mM, pH 7 (tampão fostatos 5 mM), solução saturada em N ₂ O irradiada numa fonte de ⁶⁰ Co (dose 2,7 kGy).	135
Figura 5.7 – Cromatogramas HPLC (sistema Thermo Finnigan) com a detecção mássica indicada das misturas reaccionais de 2 (a), 3 (b, c) e 4 (d, e) com o radical HO [•] a pH 7; condições experimentais: substrato 10 mM, H ₂ O ₂ 10 mM, Fe ^{II} EDTA 2 mM, ácido ascórbico 1 mM (tampão fostatos 5 mM).	137
Figura 5.8 – Espectros de massa (ESI+) dos produtos de mono-hidroxilação no anel aromático de 3 (A' , B' , C') e de 2 (A'' , B'' , C'').	138
Figura 5.9 – Cromatogramas HPLC (sistema Thermo Finnigan) com detecção mássica das misturas reaccionais de 2 (a, canal m/z = 238), 3 (b, canal m/z = 252) e 4 (c, canal m/z = 266) com o radical HO [•] a pH 7; condições experimentais: substrato 10 mM, H ₂ O ₂ 10 mM, Fe ^{II} EDTA 2 mM, ácido ascórbico 1 mM (tampão fostatos 5 mM). Os espectros de massa (ESI+) e respectivas estruturas de produtos de di-hidroxilação inseridos correspondem aos picos assinalados (↓).	139
Figura 5.10 – Cromatogramas HPLC (sistema Thermo Finnigan) com detecção mássica da mistura reaccional de 4 (canal m/z = 264) com o radical HO [•] a pH 7; condições experimentais: substrato 10 mM, H ₂ O ₂ 10 mM, Fe ^{II} EDTA 2 mM, ácido ascórbico 1 mM (tampão fostatos 5 mM). O espectro de massa (ESI+) e respectiva estrutura do produto de di-hidroxilação inseridos correspondem aos picos assinalados (↓).	140
Figura 5.11 – Cromatogramas HPLC (sistema Thermo Finnigan) com detecção mássica das misturas reaccionais de 2 (a, canal m/z = 236), 3 (b, canal m/z = 250) e 4 (c, canal m/z = 250) com o radical HO [•] a pH 7; condições experimentais: substrato 10 mM, H ₂ O ₂ 10 mM, Fe ^{II} EDTA 2 mM, ácido ascórbico 1 mM (tampão fostatos 5 mM). Os espectros de massa (ESI+) e respectivas estruturas de produtos de di-hidroxilação com abertura do anel heterocíclico inseridos correspondem aos picos maioritários.	141
Figura 5.12 – Cromatogramas HPLC (sistema Waters) com detecção óptica das misturas reaccionais de 1 com o radical HO [•] , condições experimentais: (a) substrato 10 mM, pH 7 (tampão fostatos 5 mM), solução saturada em N ₂ O irradiada numa fonte de ⁶⁰ Co (dose 2,7 kGy) (b) substrato 10 mM, H ₂ O ₂ 10 mM, Fe ^{II} EDTA 2 mM, ácido ascórbico 1 mM, pH 7 (tampão fostatos 5 mM), tempo de reacção 2h. O espectro de massa (ESI+) e respectivas estruturas possíveis dos produtos de hidroxilação inseridos correspondem aos picos assinalados (↓). Os produtos P foram igualmente detectados nas reacções de 2 , 3 e 4 com o radical HO [•]	143
Figura 5.13 – Espectro de RPE do radical catião da 4-(<i>N,N</i> -dimetil)-aminoantipirina, obtido por reacção de Fenton (4 30 mM, H ₂ O ₂ 30 mM, FeSO ₄ 0,5 mM, pH 1)	146
Figura 5.14 – Espectro de RPE do radical catião da 4-(<i>N,N</i> -di(trideuterometil))-aminoantipirina, obtido por reacção de Fenton (substrato deuterado 30 mM, H ₂ O ₂ 30 mM, FeSO ₄ 0,5 mM, pH 1).	146

Figura 5.15 – Cromatograma HPLC (sistema Waters) com detecção óptica da mistura reaccional de 4 com o radical anião $\text{SO}_4^{\bullet-}$. Condições experimentais: substrato 10 mM, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 50 mM, $\text{Fe}^{\text{II}}\text{EDTA}$ 2 mM, ácido ascórbico 1 mM, pH 7 (tampão fostatos 5 mM), tempo de reacção 5 min. O espectro de massa (ESI+) e respectiva estrutura possível do produto de oxidação inseridos correspondem ao pico assinalado (\downarrow). Os produtos P foram igualmente detectados nas reacções de 1 , 2 , 3 e 4 com o radical HO^\bullet	149
Figura 5.16 – Cromatogramas HPLC (sistema Waters) com detecção óptica das misturas reaccionais de 1 com os radicais HO^\bullet e $\text{SO}_4^{\bullet-}$. Condições experimentais: (a) substrato 10 mM, H_2O_2 10 mM, $\text{Fe}^{\text{II}}\text{EDTA}$ 2 mM, ácido ascórbico 1 mM, pH 7 (tampão fostatos 5 mM), tempo de reacção 2h (b) substrato 10 mM, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 50 mM, $\text{Fe}^{\text{II}}\text{EDTA}$ 2 mM, ácido ascórbico 1 mM, pH 7 (tampão fostatos 5 mM), tempo de reacção 2h. O espectro de massa (ESI+) e respectiva estrutura possível do produto de adição de sulfato inseridos correspondem ao pico assinalado (\downarrow).....	150
Figura 6.1 – Estrutura do ácido cinâmico e seus derivados.	158
Figura 6.2 – Cromatogramas HPLC (sistema Waters) com detecção óptica de soluções aquosas de 1(a) , 2(b) , 3(c) e 4(d) (2 mM, pH 7) saturadas em N_2O e irradiadas numa fonte de ^{60}Co (dose 2,7 kGy).	159
Figura 6.3 – Cromatograma GC-MS (sistema Carlo Erba) de uma amostra derivatizada da mistura reaccional de 1 com o radical HO^\bullet (gerado por radiólise)	160
Figura 6.4 – Cromatograma GC-MS (sistema Carlo Erba) de uma amostra derivatizada da mistura reaccional de 2 com o radical HO^\bullet (gerado por radiólise)	161
Figura 6.5 – Cromatograma GC-MS (sistema Carlo Erba) de uma amostra derivatizada da mistura reaccional de 3 com o radical HO^\bullet (gerado por radiólise)	162
Figura 6.6 – Cromatograma GC-MS (sistema Carlo Erba) de uma amostra derivatizada da mistura reaccional de 4 com o radical HO^\bullet (gerado por radiólise)	163
Figura 6.7 – Cromatograma GC-MS (sistema Carlo Erba) de uma amostra derivatizada da mistura reaccional de 5 com o radical HO^\bullet (gerado por radiólise). Os picos assinalados com asterisco são produtos de oxidação derivados de 4 (presente como impureza de 5).....	164
Figura 6.8 – Cromatograma GC-MS (sistema Carlo Erba) de uma amostra derivatizada da mistura reaccional de 1 com o radical anião $\text{SO}_4^{\bullet-}$ (gerado por radiólise).....	168
Figura 6.9 – Cromatogramas HPLC (sistema Waters) com detecção óptica das misturas reaccionais com o radical anião $\text{SO}_4^{\bullet-}$ a pH 2: (a) ácido 3-fenil-láctico 6 mM, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 60 mM, TiCl_3 5 mM, tempo de reacção 5 min, (b) ácido cinâmico 1 mM, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 40 mM, TiCl_3 0,5 mM, tempo de reacção 5 min.	169
Figura 6.10 – Cromatogramas HPLC (sistema Waters) com detecção óptica das misturas reaccionais com o radical HO^\bullet a pH 2: (a) ácido 3-fenil-láctico 6 mM, H_2O_2 40 mM, FeSO_4 1 mM, tempo de reacção 5 min, (b) ácido cinâmico 1 mM, H_2O_2 20 mM, FeSO_4 1 mM, tempo de reacção 5 min.....	170
Figura 6.11 – Dependência da concentração da adenina e de três ácidos cinâmicos em função do tempo de reacção com o radical HO^\bullet , seguida por HPLC (sistema Waters).	

Condições reaccionais: substrato 1 mM, H ₂ O ₂ 200 mM, Fe ^{II} EDTA 1 mM, ácido ascórbico 0,2 mM e tampão de fosfatos 5 mM (pH 7).....	172
Figura 6.12 – Efeito reparador dos ácidos cinâmico (Cin), <i>p</i> -cumárico (<i>p</i> Cum) e cafeico (Caf) sobre a degradação oxidativa da adenina (Ade) pelo radical HO [•] , seguido por HPLC (sistema Waters). Condições reaccionais: Ade e antioxidante 0,5 mM cada, H ₂ O ₂ 100 mM, Fe ^{II} EDTA 0,5 mM, ácido ascórbico 0,1 mM e tampão de fosfatos 5 mM (pH 7).	173
Figura A1 – Espectro ¹ H NMR da 4-(<i>N</i> -metil)-aminoantipirina (composto 3) em CDCl ₃	181
Figura A2 – Espectro ¹³ C NMR da 4-(<i>N</i> -metil)-aminoantipirina (composto 3) em CDCl ₃	181
Figura A3 – Espectro HMBC da 4-(<i>N</i> -metil)-aminoantipirina (composto 3) em CDCl ₃	182
Figura A4 – Espectro HMQC da 4-(<i>N</i> -metil)-aminoantipirina (composto 3) em CDCl ₃	182
Figura A5 – Espectro de massa da 4-(<i>N</i> -metil)-aminoantipirina (composto 3) obtido por GC-MS (EI).	183
Figura B1 – Espectro de massa da <i>p</i> -hidroxi-4-(<i>N,N</i> -dimetil)-aminoantipirina (produto A) obtido por injeção directa (ESI-).	185
Figura B2 – Espectro de massa da <i>o</i> -hidroxi-4-(<i>N,N</i> -dimetil)-aminoantipirina (produto B) obtido por TOF-MS (EI).	185
Figura B3 – Espectro de massa da <i>m</i> -hidroxi-4-(<i>N,N</i> -dimetil)-aminoantipirina (produto C) obtido por TOF-MS (EI).	186
Figura C1 – Espectro de massa do produto A1 (EI).	187
Figura C2 – Espectro de massa do produto B1 (EI).	187
Figura C3 – Espectro de massa do produto C1 (EI).	188
Figura C4 – Espectro de massa do produto 2 (EI).	188
Figura C5 – Espectro de massa do produto 3 (EI).	188
Figura C6 – Espectro de massa do produto 4 (EI).	189
Figura C7 – Espectro de massa do produto A2 (EI).	189
Figura C8 – Espectro de massa do produto B2 (EI).	189
Figura C9 – Espectro de massa do produto C2 (EI).	190
Figura C10 – Espectro de massa do produto D2 (EI).	190
Figura C11 – Espectro de massa do produto 6 (EI).	190
Figura C12 – Espectro de massa dos produtos A3 ou B3 (EI).	191
Figura C13 – Espectro de massa do produto C3 (EI).	191
Figura C14 – Espectro de massa do produto D3 (EI).	191
Figura C15 – Espectro de massa do produto A4 (EI).	192
Figura C16 – Espectro de massa do produto B4 (EI).	192
Figura C17 – Espectro de massa do produto C4 (EI).	192

Figura C18 – Espectro de massa do produto D4 (EI).....	193
Figura C19 – Espectro de massa do produto E4 (EI).....	193
Figura C20 – Espectro de massa do produto 5 (EI).....	193
Figura C21 – Espectro de massa dos produtos A5 ou B5 (EI).....	194
Figura C22 – Espectro de massa do produto C5 (EI).	194
Figura C23 – Espectro de massa do produto D5 (EI).	194
Figura C24 – Espectro de massa do produto E5 (EI).....	195

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 – Constantes de velocidade das reacções de recombinação das espécies radiolíticas da água [96].	22
Tabela 2.2 – Rendimentos radiolíticos dos produtos primários radicalares e dos produtos moleculares da radiólise da água a pH 7.	23
Tabela 2.3 – Potenciais de redução de pares redox de relevância biológica [67, 162-168].	34
Tabela 3.1 – Reagentes utilizados	53
Tabela 4.1 – Estrutura da xantina, sistema de numeração e derivados. Valores de pK_a para a formação do monoanião e respectiva posição de desprotonação. ^a [14, 15], ^b [16], ^c [17]; relativamente à 3,9-DiMeX, outros autores sugerem $pK_a = 8,6$ [18] ou $pK_a = 9,5$ [19].	72
Tabela 4.2 – Energias relativas e respectivas fracções dos tautómeros de cada espécie envolvida nos equilíbrios de xantinas a pH 3 e à temperatura ambiente (298 K).	98
Tabela 4.3 – Energias livres de Gibbs das reacções de reparação da xantina X_2 à custa da xantina X_1 correspondentes às misturas binárias irradiadas a pH 3.	99
Tabela 4.4 – Energias relativas e respectivas fracções dos tautómeros das espécies aniónicas envolvidas nos equilíbrios de xantinas a pH 7 e à temperatura ambiente (298 K).	102
Tabela 4.5 – Valores de pK_a (25°C) da xantina e seus derivados metilados determinados a partir das energias de cada espécie do equilíbrio ácido-base obtidas por cálculos DFT ($pK_{a,calc}$). Comparação entre valores calculados após correcção ($pK_{a,corr}$) e valores experimentais ($\Delta pK_a = pK_{a,corr} - pK_{a,exp}$).	103
Tabela 4.6 – Valores de pK_a (25°C) dos radicais da xantina e seus derivados monometilados determinados a partir das energias de cada espécie do equilíbrio ácido-base obtidas por cálculos DFT ($pK_{a,calc}$) e respectiva correcção ($pK_{a,corr}$) tendo como referência $pK_{a,exp}(Xan^{\bullet}) = 4,70$.	103
Tabela 4.7 – Fracções das espécies envolvidas nos equilíbrios de reparação de xantinas em meio fisiológico e a 25°C. Os valores de c_i e d_i das xantinas monometiladas foram obtidos a partir dos respectivos pK_a estimados por cálculos DFT.	104
Tabela 4.8 – Energias livres de Gibbs das reacções de reparação da xantina X_2 à custa da xantina X_1 correspondentes às misturas binárias irradiadas a pH 7, a partir dos Casos I e II.	107
Tabela 4.9 – Cargas parciais calculadas para o tautómero mais estável da teofilina ($N(7)H$).	118
Tabela 5.1 – Identificação espectroscópica dos produtos de hidroxilação da 4-(<i>N,N</i> -dimetil)-aminoantipirina.	134
Tabela 6.1 – Constantes de velocidade de reacção de ácidos cinâmicos e da adenina com o radical HO^{\bullet} a pH 7.	172

Índice de Esquemas

Esquema 2.1 – Produção de radical hidroxilo por fotólise de <i>N</i> -óxido de 4-mercaptopiridina.....	26
Esquema 2.2 – Transferência de carácter radicalar por acção sinérgica de dois antioxidantes.....	34
Esquema 4.1 – Oxidação monoelectrónica da xantina, com formação do respectivo radical catião seguido de desprotonação de <i>N</i> (7) (um dos possíveis tautómeros formados; ver 4.4)	77
Esquema 4.2 – Estruturas de ressonância dos radicais neutros de tipo A1 e A2 que resultam da desprotonação em <i>N</i> (1) de radicais catiões de xantinas que apresentem tautomerismo ou grupos substituintes em <i>N</i> (7) e <i>N</i> (9), respectivamente.....	80
Esquema 4.3 – Estruturas de ressonância dos radicais neutros de tipo B1 e B2 que resultam da desprotonação em <i>N</i> (3) de radicais catiões de xantinas que apresentem tautomerismo ou grupos substituintes em <i>N</i> (7) e <i>N</i> (9), respectivamente.....	81
Esquema 4.4 – Estruturas de ressonância dos radicais neutros de tipo C que resultam da desprotonação em <i>N</i> (7) ou <i>N</i> (9) dos radicais catiões de xantinas que formam tautómeros <i>N</i> (7) e <i>N</i> (9).....	82
Esquema 4.5 – Capacidade antioxidante relativa da xantina e seus derivados a pH 3 e pH 7, determinada por irradiação de misturas binárias de xantinas com persulfato de potássio. Para cada composto apresenta-se igualmente o valor do potencial de redução (E_p , V vs ESC) obtido por voltametria cíclica.	89
Esquema 4.6 – Mecanismo reaccional de desmetilação da teofilina a 1-metilxantina.	116
Esquema 5.1 – Desmetilação oxidativa da 4-(<i>N,N</i> -dimetil)-aminoantipirina.....	128
Esquema 5.2 – Mecanismo reaccional para a dupla adição de radical HO [•] com abertura do anel heterocíclico de 3 . O mecanismo é idêntico para o composto 2	142
Esquema 5.3 – Mecanismo reaccional para a adição de radical HO [•] na ligação dupla do anel heterocíclico de 1	143
Esquema 5.4 – Mecanismo reaccional para a desmetilação sucessiva de 4	144
Esquema 5.5 – Mecanismo reaccional de adição de radical HO [•] ao anel benzénico de 4 com formação dos respectivos derivados hidroxilados.....	145
Esquema 5.6 – Estrutura do radical catião de 4 centrado em <i>N</i> (1) e mecanismo reaccional para a sua redução com regeneração ao composto inicial.	148
Esquema 5.7 – Mecanismo reaccional para a formação do novo produto identificado por reacção de 4 com o radical anião SO ₄ ^{•-}	149
Esquema 5.8 – Mecanismo reaccional para a formação do aducto sulfato do composto 1	151
Esquema 6.1 – Mecanismo de hidroxilação no anel benzénico de ácidos cinâmicos.	159
Esquema 6.2 – Mecanismo geral de hidroxilação por adição à ligação C=C exocíclica de ácidos cinâmicos com formação dos produtos A e B	165

Esquema 6.3 – Mecanismo geral de hidroxilação por adição à ligação C=C exocíclica de ácidos cinâmicos seguida de descarboxilação com formação dos produtos C	166
Esquema 6.4 – Mecanismo geral de substituição <i>ipso</i> nos derivados hidroxilados do ácido 3-fenil-láctico com formação dos produtos D	166
Esquema 6.5 – Mecanismo geral de hidroxilação por adição à ligação C=C exocíclica de ácidos cinâmicos com formação dos produtos E	167
Esquema 6.6 – Mecanismo de oxidação com descarboxilação do ácido cinâmico (1) a fenilacetaldeído (C1).	168
Esquema 6.7 – Mecanismo de oxidação com descarboxilação do ácido 3-fenil-láctico a fenilacetaldeído pelo radical anião sulfato em meio ácido.	169
Esquema 6.8 – Formação de fenilacetaldeído.	171

1. Objectivo e enquadramento do trabalho

O termo "antioxidante", forma que o uso e, por que não dizer, a moda social atribui frequentemente ao termo quimicamente mais correcto "reductor", transcendeu em finais do século passado o mais estrito âmbito científico, para passar a fazer parte da linguagem comum do consumidor. O forte impacto deste termo está intimamente ligado à sua qualificação generalizada como "protector", o que em muito contribui para a necessidade do cidadão comum em certificar-se da presença de um "antioxidante" quando compra uma bebida, prepara as suas férias na praia ou, numa perspectiva menos imediata, se olha num espelho e se lembra que a sua vida não é eterna, para gáudio da indústria alimentar, cosmética e afins.

Esta incursão que os antioxidantes, de uma forma mais ou menos consciente ou consentida, vêm progressivamente a fazer na vida de cada um de nós, tem, embora muitos disso não se apercebam, uma origem científica. Ainda que uma correlação empírica entre o consumo de certos alimentos naturais e a prevenção ou diminuição da ocorrência de certos tipos de doenças tenha vindo a estabelecer-se há milénios, foi sobretudo na segunda metade do século XX que essa correlação se fundamentou em bases científicas. Para tal muito contribuiu a descoberta de que muitos processos patofisiológicos estavam relacionados com reacções de oxidação de que eram alvo muitos tipos de compostos de relevância biológica – em particular constituintes celulares –, a caracterização das espécies oxidantes responsáveis por modificações químicas com repercussões biológicas e, naturalmente, os muitos trabalhos de investigação que tal descoberta suscitou, tendentes à procura de moléculas capazes de inibir esses processos, que vieram a ser conhecidos pela designação geral de "*stress oxidativo*", ou minorar as consequências dos seus efeitos.

Nas últimas décadas do século passado, e ainda actualmente, muito do esforço de investigação de químicos, biólogos, fisiologistas e cientistas de áreas afins tem sido dedicado à pesquisa de antioxidantes, no sentido de os isolar, de os sintetizar, de os caracterizar, de avaliar a sua actividade protectora da degradação de alvos biológicos e, ainda que em menor extensão, conhecer os mecanismos das reacções em que se envolvem.

A extensa bibliografia actualmente disponível sobre o assunto mostra que, numa fase inicial, foi dada maior atenção à extracção e purificação de antioxidantes a partir de fontes naturais, a que se seguiu a tentativa de preparação desses compostos por via sintética ou a sua modificação química com vista ao melhoramento das suas propriedades antioxidantes. A sua caracterização físico-química foi também alvo de inúmeros trabalhos, em particular, e mais recentemente, com o contributo da química teórica.

A avaliação da capacidade antioxidante dos compostos eventualmente portadores dessa propriedade foi, sem dúvida, a actividade a que os investigadores têm vindo a dedicar a maior parte da sua atenção. A grande maioria dos trabalhos publicados neste âmbito tem como "filosofia" de partida uma comparação empírica das capacidades inibidoras que os vários candidatos a antioxidante apresentam. Tal é o caso da quantificação da captura de um radical por um determinado composto, ou, mais raramente, da avaliação da inibição que ele provoca na degradação oxidativa de um composto de relevância biológica. Este método de "avaliação" tem constituído a base dos muitos métodos padrão de determinação de actividade antioxidante, ainda actualmente em uso (Capítulo 2). No entanto, embora existam já alguns resultados publicados, muito menos se tem feito no sentido de esclarecer os mecanismos de actuação dos antioxidantes, isto é, como é que eles são oxidados e que produtos resultam dessas reacções.

Naturalmente, os numerosos resultados acumulados ao longo de décadas de investigação, conduziram a um melhor conhecimento dos vários tipos de antioxidantes e sua eficácia na prevenção e/ou inibição de situações de *stress* oxidativo. A própria definição de antioxidante é um conceito que sofreu alguma evolução. De um modo geral, um antioxidante é considerado como uma substância capaz de reagir com um agente responsável pelo *stress* oxidativo, por exemplo um radical oxidante, captando-o e impedindo-o assim de reagir com uma molécula biológica. Este é o conceito mais lato, e mais comum, de antioxidante – a que pode chamar-se efeito *scavenger* ou de captura –, aquele que "por defeito" se considera e a que se refere a grande maioria dos estudos efectuados sobre antioxidantes. Contudo, e mais relevante ainda a nível biológico, um antioxidante pode (e deverá numa situação extrema ideal) ser também um substância capaz de reduzir um composto de relevância biológica oxidado, voltando a reconstituir a molécula original – a que pode chamar-se efeito reparador.

De entre as muitas e variadas classes de antioxidantes já estudadas e que continuam a ser alvo dos actuais interesses de investigação, o presente trabalho é dedicado a três delas, como se explicita nos Capítulos seguintes.

Ainda que o objectivo deste trabalho seja o estudo de antioxidantes, não teria muito sentido efectuar-lo nas perspectivas mais "tradicionais" acima referidas. Apesar dos métodos padrão serem úteis para a quantificação de uma determinada propriedade de compostos na reacção com um radical específico (mas sem relevância biológica), como por exemplo a capacidade de abstracção de hidrogénio ou de transferência de electrão, não dão

indicação sobre a sua capacidade antioxidante em condições de *stress* oxidativo. Por exemplo, a capacidade antioxidante relativa de compostos obtida por estes métodos pode ser diferente quando se estuda o seu efeito protector sobre alvos biológicos na presença de uma determinada espécie reactiva de oxigénio. Nesta situação, esse efeito poderá ser exercido não só pelos compostos de partida como também pelos seus produtos de oxidação. Deste modo, a abordagem centra-se sobretudo nas reacções de oxidação dos antioxidantes, através da caracterização dos intermediários transientes envolvidos e da identificação dos produtos finais estáveis, com vista à proposta dos respectivos mecanismos reaccionais.

A dupla possibilidade de actuação de um antioxidante, como acima referido, por efeito de captura e/ou por efeito reparador é também uma das preocupações do modo de abordagem utilizado neste trabalho, pelo que a discussão dos resultados obtidas é feita, sempre que os dados experimentais assim o permitem, em termos dos dois modos de actuação.

2. Introdução

2.1. Radicais livres e *stress* oxidativo

O estudo dos radicais livres, sua formação, propriedades e reactividade, embora seja relevante nos mais variados domínios da Química, tem sido alvo de particular interesse nas últimas cinco décadas devido à sua importância no meio vivo. De facto, é devido ao enorme impacto da Química Radicalar no meio biológico que esta área de investigação tem atraído o interesse de muitos cientistas com as mais diversas formações, como o comprova o enorme número de publicações sobre as repercussões biológicas dos radicais livres, muitas das quais foram recentemente alvo de artigos de revisão exaustiva [1-14].

A relação que se tem estabelecido mais frequentemente entre os radicais livres e a Química da Vida é o envolvimento daqueles no chamado processo de *stress* oxidativo.

O *stress* oxidativo em tecidos vivos tem sido caracterizado, desde há muito tempo, como o resultado fisiológico das modificações químicas provocadas por espécies oxidantes endógenas e exógenas em moléculas biológicas. Alguns autores referem que a formação de espécies oxidantes é contrabalançada pelo seu consumo por antioxidantes; neste sentido, o *stress* oxidativo resultará no desvio deste equilíbrio oxidante/antioxidante no sentido de um aumento intracelular de espécies oxidantes [15]. Sabe-se, no entanto, que as espécies oxidantes em concentrações moderadas podem ter um papel importante como mediadoras nos processos de sinalização da regulação intracelular [16]. O *stress* oxidativo é assim um efeito químico, com repercussões biológicas, provocado por espécies oxidantes do meio ambiente sobre os tecidos vivos [17].

Os principais alvos biológicos do *stress* oxidativo são os enzimas responsáveis pelo transporte transmembranar na membrana celular (inactivação) [18], as proteínas [19-21] e os lípidos [22] do citoplasma (peroxidação), e, maioritariamente, o ADN do núcleo das células eucarióticas e seus constituintes (mutagénese) [23-25].

As condições que podem levar a um processo de *stress* oxidativo são de natureza radiativa ou química. No primeiro caso destacam-se as radiações ionizantes (raios gama, raios X ou electrões acelerados) que produzem danos biológicos por efeito directo (ionização, responsável por 30 a 40% das lesões celulares) e, sobretudo, por efeito indirecto (geração de radicais livres por radiólise da água, responsável por 60 a 70% das lesões celulares) [26, 27]. São também fontes de *stress* oxidativo a radiação UV e os ultrassons (sonoterapia). De natureza química referem-se agentes exógenos tais como poluentes da atmosfera, xenobióticos (incluindo medicamentos) [28, 29] e metabolitos, e mecanismos

endógenos de produção de radicais oxidantes que ocorrem em situações fisiológicas “anormais” como isquémia-reperfusão, inflamação e patologias diversas [30] e nas reacções de transporte electrónico mitocondrial, entre outros.

As espécies oxidantes responsáveis por este fenómeno podem ser não radicalares, como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o oxigénio singleto ($^1\text{O}_2$) e o peroxinitrito (ONO_2^-), mas são as radicalares as mais lesivas, tais como o radical anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o óxido nítrico (NO^\bullet) e, em especial, o radical hidroxilo (HO^\bullet).

2.2. Geração *in vivo* do radical hidroxilo

2.2.1. Formação por via química

O oxigénio molecular (ou dioxigénio, O_2) possui no seu estado fundamental dois electrões de *spin* paralelos (estado tripleto, $^3\Sigma_g^-$), cada um localizado numa orbital π^* antiligante. Um consequência importante desta distribuição electrónica é o facto de não poder aceitar um par de electrões de *spin* opostos. Esta restrição de *spin* justifica a baixa reactividade do O_2 com aminoácidos, ácidos nucleicos e outras biomoléculas, apesar de ser um di-radical. Para que este possa reagir rapidamente com um substrato, é necessário que a restrição de *spin* seja removida ou que a ligação O-O seja enfraquecida. Estas duas condições ocorrem em simultâneo quando o O_2 se encontra nos seus estados excitados singletos ($^1\Sigma_g^+$, que decai rapidamente para $^1\Delta_g$, de menor energia). A espécie $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ forma-se em reacções de fotossensibilização [31, 32], na fagocitose por neutrófilos [33] ou na recombinação de radicais peróxido [34]. No entanto, não há restrição de *spin* se o $\text{O}_2(^3\Sigma_g^-)$ aceitar um electrão de cada vez, pelo que reage principalmente com metais de transição ou com espécies radicalares, reduzindo-se.

Mais de 90% do O_2 consumido pelo corpo humano é utilizado pelo citocromo oxigenase mitocondrial como aceitador final de electrões no processo de respiração celular. Este enzima possui metais de transição nos centros activos (ferro e cobre) e reduz sequencialmente o O_2 a radical anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$, um electrão numa das orbitais π^*) e peróxido de hidrogénio (H_2O_2 , um electrão na outra orbital π^*), que por redução com dois electrões e quebra da ligação O-O forma duas moléculas de H_2O . As formas intermédias parcialmente reduzidas de O_2 ($\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2) estão firmemente ligadas ao enzima, pelo que não há libertação de espécies reactivas de oxigénio na sua vizinhança [35].

No entanto, existem outros componentes mitocondriais envolvidos no transporte de electrões que, por serem menos eficientes, deixam escapar electrões na forma de $O_2^{\bullet-}$, sendo esta a principal fonte deste radical no meio fisiológico [36]. Para além de outras vias enzimáticas, tal como pelas NADPH oxidases membranares de fagócitos [37, 38], a formação de $O_2^{\bullet-}$ pode ainda ocorrer por via não enzimática pela transferência directa de electrão ao O_2 por xenobióticos previamente reduzidos por enzimas [39].

Apesar da reactividade do radical anião $O_2^{\bullet-}$ ser bastante moderada, o aumento da sua concentração em situações de *stress* oxidativo leva à sua eliminação por dismutação em H_2O_2 e $O_2(^3\Sigma_g^-)$, uma reacção catalizada pelo enzima superóxido dismutase [40] que constitui a principal via de formação de H_2O_2 . Refira-se ainda a que resulta da conversão de xantina desidrogenase em xantina oxidase em condições de inflamação (hipóxia; aumento da concentração de xantina/hipoxantina), onde o H_2O_2 representa cerca de 95% das ROS formadas [41].

O peróxido de hidrogénio é uma espécie pouco reactiva que se difunde a longas distâncias e atravessa membranas rapidamente, pelo que está presente na maior parte das células do organismo [42]. Uma vez no meio intracelular, é reduzido por metais de transição através da conhecida reacção de Fenton, dando origem à forma oxidada do metal, a um ião hidróxido e à espécie mais lesiva de todas as ROS, o radical hidroxilo (HO^\bullet). Dos metais existentes *in vivo*, o ferro é o que maior importância tem nesta reacção [43] (equação (2.1)):



A velocidade desta reacção, para o caso do ferro e de outros metais que nela participem, é relativamente lenta, embora dependa da natureza da coordenação ao metal de transição e do pH do meio. A constante de velocidade obtida na presença de ligandos quelantes de Fe^{2+} relevantes em condições fisiológicas (tais como o ADN) e em meio neutro varia entre cerca de 5×10^3 e $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [44, 45].

Por outro lado, os níveis de ferro "livre" catalítico (Fe^{2+}) *in vivo* são normalmente insuficientes dado que este metal se encontra quelatado em diversas biomoléculas (e, portanto, inacessível), tais como a hemoglobina (à qual está ligado cerca de 65% do ferro do organismo), a mioglobina, citocromos e diversos enzimas, e a proteínas de armazenamento de ferro (que captam aproximadamente 25% deste metal) como a ferritina, um complexo proteico capaz de conter até cerca de 4500 iões férricos [8].

No entanto, o radical anião $O_2^{\bullet-}$ pode reduzir o Fe^{3+} da ferritina [46] e oxidar enzimas com centros de [4Fe-4S] [47], provocando a libertação de Fe^{2+} em ambos os casos, situações particularmente relevantes em condições de *stress* oxidativo. Além disso, a lesão proteica na hemoglobina induzida por H_2O_2 e outros peróxidos [48] pode igualmente aumentar os níveis de ferro catalítico em meio fisiológico.

A oxidação do centro heme da ferritina (por exemplo) pelo radical anião $O_2^{\bullet-}$ pode ser escrita genericamente pela reacção (2.2):



A soma desta reacção com a de Fenton é designada pela conhecida reacção de Haber-Weiss (equação (2.3)):



Esta reacção é muito lenta ($k = 0,5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, [49]) e por si só não tem expressão na produção de radical HO^\bullet , mas é acelerada na presença de iões metálicos, assumindo um papel importante em condições de *stress* oxidativo [22].

No entanto, a redução de Fe^{3+} (equação (2.2)) também pode ser efectuada por outros redutores presentes *in vivo* em maiores concentrações, tais como o ascorbato [50].

O radical HO^\bullet por ser gerado igualmente por outras vias, tais como por oxidação do radical anião $O_2^{\bullet-}$ pelo ácido hipocloroso (HOCl) produzido pelos neutrófilos, numa reacção análoga à de Haber-Weiss mas muito mais rápida ($k = 7,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, [51]) (equação (2.4)), ou ainda por reacção deste com iões metálicos, numa reacção análoga à de Fenton (equação (2.5)) [52]:



As espécies reactivas de oxigénio, em particular o radical anião $O_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 , são subprodutos inevitáveis do metabolismo aeróbio que possuem um papel benéfico quando presentes em concentrações baixas ou moderadas, como por exemplo na defesa contra agentes infecciosos e em diversos processos de sinalização celular. Contudo, a sua

sobreprodução em condições de *stress* oxidativo conduz a danos estruturais nas células e seus constituintes, incluindo lípidos e membranas, proteínas e ADN. Entre essas espécies, o radical HO[•] é de particular importância por ser extremamente reactivo (ver 2.3) e pouco selectivo para as moléculas alvo com que reage, e pelo facto do organismo não possuir nenhum mecanismo de defesa enzimático que o elimine [53]. Existem ainda outras fontes (exógenas) responsáveis pela produção do radical HO[•] *in vivo*, apresentadas a seguir.

2.2.2. Radiação ionizante

A principal via exógena de formação do radical hidroxilo resulta do efeito indirecto da radiação ionizante sobre os tecidos vivos, ou seja, da deposição e absorção da energia da radiação pela água, constituinte maioritário das células. Este processo (radiólise) conduz à excitação e ionização das moléculas de água com formação, entre outras, das espécies radicalares electrão solvatado, átomo de hidrogénio (H[•]), radical anião superóxido (O₂^{•-}) e radical hidroxilo (HO[•]), como se explica adiante com mais detalhe (ver 2.4.1).

A maior fonte de radiação ionizante provém da radiação cósmica, de elementos radioactivos presentes no solo que entram na cadeia alimentar e do radão. Outras fontes incluem métodos de diagnóstico e tratamento em medicina, tais como raios X, tomografia por emissão de positrões e radioterapia.

2.2.3. Radiação ultravioleta

A radiação ultravioleta (UV) de comprimento de onda inferior a 185 nm leva à decomposição da água por cisões homolíticas e ionizações de que resultam produtos comuns aos da radiólise, nomeadamente o radical HO[•]. O rendimento quântico deste radical aumenta à medida que o comprimento de onda da radiação diminui até ser unitário a 124 nm [54]. Contudo, contrariamente à radiólise, em que a penetração da radiação na água é uniforme numa escala linear de alguns milímetros, a fotólise é mais ineficiente devido ao coeficiente de extinção molar da água ($\epsilon = 100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 172 nm), pelo que terá pouca relevância em meio biológico.

No entanto, a gama de radiação UV a que o ser humano está exposto (290-380 nm) é suficiente para produzir oxigénio singleto através de fotossensibilizadores endógenos [55] ou de fármacos fotorreactivos [56], que se converte facilmente em radical anião superóxido

[57]. Como se referiu atrás, este radical participa na produção de radical hidroxilo através da reacção de Haber-Weiss catalisada por iões metálicos.

2.2.4. Ozono

O ozono é um gás localizado na estratosfera que protege os organismos da radiação UV. No entanto, a sua formação ao nível da superfície terrestre é altamente prejudicial pois da sua inalação pode resultar a oxidação de ácidos gordos insaturados com formação de aldeídos e peróxido de hidrogénio, destruindo membranas celulares do sistema respiratório [58, 59]. O ozono pode reagir por um outro mecanismo que envolve espécies redutoras (como por exemplo o glutatono) com formação do radical anião $O_3^{\bullet-}$ que se decompõe em meio ácido em O_2 e radical HO^{\bullet} [60]. Descobriu-se ainda recentemente que os anticorpos produzem ozono *in vivo* [61].

2.3. Propriedades e reactividade do radical hidroxilo

O radical hidroxilo é uma espécie com uma duração de vida extremamente curta. Estima-se que o seu tempo de meia vida *in vivo* seja de aproximadamente 10^{-9} s [62, 63], embora os dados obtidos a esse respeito sejam poucos e ainda algo controversos.

A ligação entre os átomos de hidrogénio e oxigénio tem um comprimento $d(O-H)$ de 0,97 Å e um momento dipolar de 2,2 D [64]. A energia de dissociação $D_{298}(O-H)$ é de 429,9 kJmol^{-1} , um pouco mais fraca que na água ($D_{298}(HO-H) = 497,1 \text{ kJmol}^{-1}$) [65].

O radical hidroxilo é um electrófilo que possui uma configuração electrónica com um electrão desemparelhado localizado numa das orbitais $2\pi_x$ ou $2\pi_y$. A absorção do radical hidroxilo em solução aquosa é fraca no UV, apresentando o seu espectro um máximo a 230 nm com $\epsilon = 665 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [66], o que torna difícil a sua detecção por este método espectroscópico.

O radical hidroxilo apresenta um forte carácter oxidante monoelectrónico, como se verifica pelos valores dos potenciais de redução em meio ácido (equação (2.6)) e neutro (equação (2.7)).



A sua acidez é fraca ($pK_a = 11,90$ [69], $11,54$ [70]), sendo a base conjugada, o radical anião $O^{\bullet-}$, uma espécie nucleofílica com menor potencial oxidante ($E_{ENH}^0(O^{\bullet-}/O^{2-}) = +1,1$ V [71]).

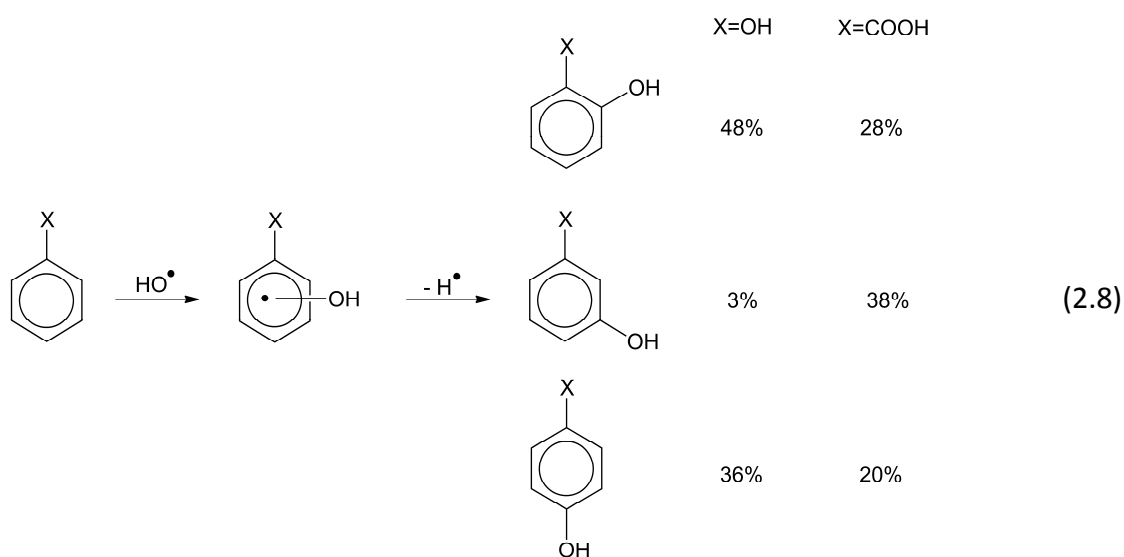
Estima-se que ocorram aproximadamente $1,5 \times 10^5$ ataques oxidativos por dia numa célula humana pelo radical hidroxilo e outras ROS [72], facto que justifica os inúmeros estudos sobre a reactividade deste radical com diversos compostos de interesse biológico, tais como aminoácidos, hidratos de carbono, lípidos e em particular o ADN e seus constituintes.

O radical hidroxilo é uma espécie extremamente lesiva a nível biológico, capaz de provocar modificações diversas em qualquer constituinte celular. Esta característica deve-se ao facto de reagir com a maior parte dos compostos orgânicos a velocidades entre 10^8 e $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [73], próximas do limite de difusão na água. No caso do ADN, reage com todos os seus constituintes, provocando modificações nas bases purínicas e pirimidínicas assim como no esqueleto fosfato-desoxirribose [23, 74], quebras de cadeia (simples ou duplas) e formação de ligações cruzadas. Estas modificações, quando permanentes, podem constituir o primeiro passo para fenómenos de mutagénese. Contudo, existem diversos mecanismos de reparação das bases modificadas do ADN por enzimas específicos [74] cuja expressão é muitas vezes regulada pela presença de ROS gerada em condições de *stress* oxidativo. Comparado com a do ADN nuclear, a capacidade de reparação do ADN mitocondrial parece ser inferior [75], dada a sua exposição a níveis mais elevados de oxigénio, o precursor das ROS, o que conduz a disfunções neste organelo e pode provocar doenças degenerativas.

O radical hidroxilo reage praticamente no local onde é formado, pois em solução aquosa difunde-se no máximo para uma distância equivalente a cerca de cinco vezes o seu diâmetro [62]. Como se referiu atrás, para além da radiação ionizante, a principal fonte de produção de radical HO^{\bullet} resulta da redução de H_2O_2 pelo ião ferroso "livre". Apesar da aparente inacessibilidade do ADN, o facto do Fe^{2+} se ligar eficazmente a locais específicos da sua cadeia [76] e do H_2O_2 ser uma espécie que se difunde e atravessa membranas com relativa facilidade permite que haja formação de radical HO^{\bullet} junto dos constituintes do ADN.

O radical hidroxilo reage por três tipos de mecanismos: adição a ligações duplas $C=C$ e $C=N$ de sistemas insaturados, abstracção de um átomo de hidrogénio, e oxidação por transferência de electrão.

A adição do radical HO^\bullet a uma ligação dupla de um composto orgânico insaturado ou aromático, apesar de ocorrer a velocidades próximas da difusão, é regioselectiva devido à sua natureza electrofílica [77]. Por exemplo, no caso de derivados de benzeno, a adição dar-se-á preferencialmente nas posições *orto* e *para* na presença de substituintes electrodoadores, enquanto que se verifica uma apreciável adição na posição *meta* quando os substituintes são electroattractores, como se observa para os casos do fenol [78] e do ácido benzóico [79], respectivamente (reacções (2.8)).

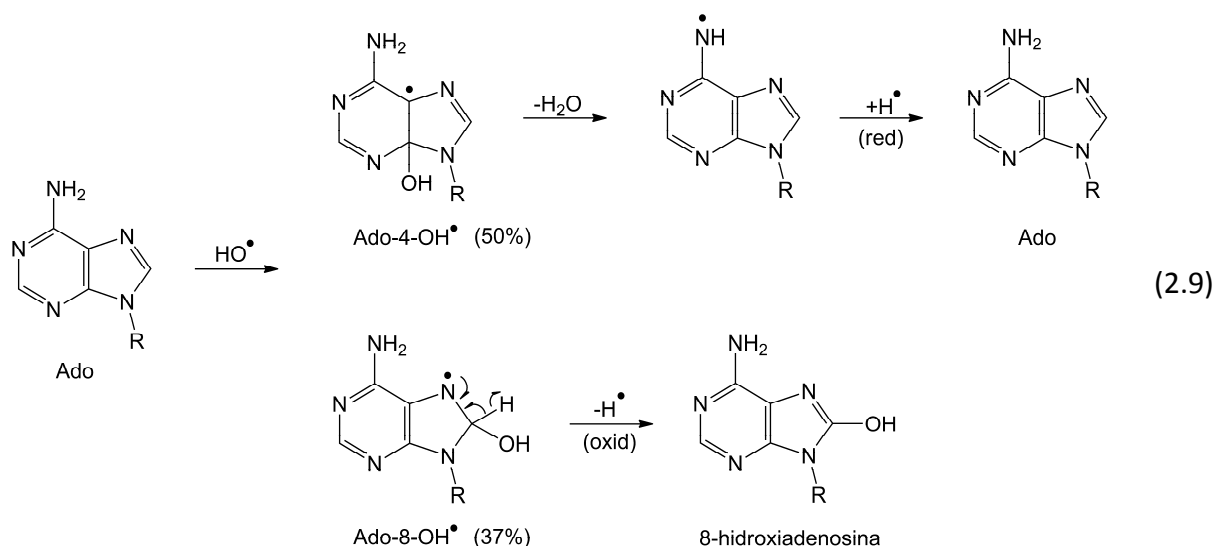


A substituição *ipso*, na presença de um substituinte volumoso, é desfavorecida. No entanto, representa cerca de 8% da adição do radical hidroxilo ao fenol [78]. Estudos teóricos conduzidos sobre esta reacção com o fenol vieram a demonstrar que, apesar de ter um estado de transição de energia mais elevada, o complexo intermediário formado *ipso* é mais estável do que nos casos da adição nas posições *meta* e *para* [80]. No caso da tirosina, a substituição *ipso* nas duas posições possíveis representa cerca de 10% dos produtos finais de oxidação [81].

Em compostos heterocíclicos, o radical HO^\bullet adiciona rapidamente a ligações duplas em posições específicas, como acontece no sistema purínico. No caso da adenosina (Ado), verifica-se que ocorre predominantemente nos átomos C(4) e C(8) com formação de dois aductos isoméricos, Ado-4- OH^\bullet e Ado-8- OH^\bullet [82] (reacções (2.9)).

Os dois aductos radicalares sofrem transformações unimoleculares de natureza diferente. O radical Ado-4- OH^\bullet desidrata dando origem a um outro radical neutro, mais oxidante, que ao reduzir-se regenera a adenosina. Por outro lado, o Ado-8- OH^\bullet sofre

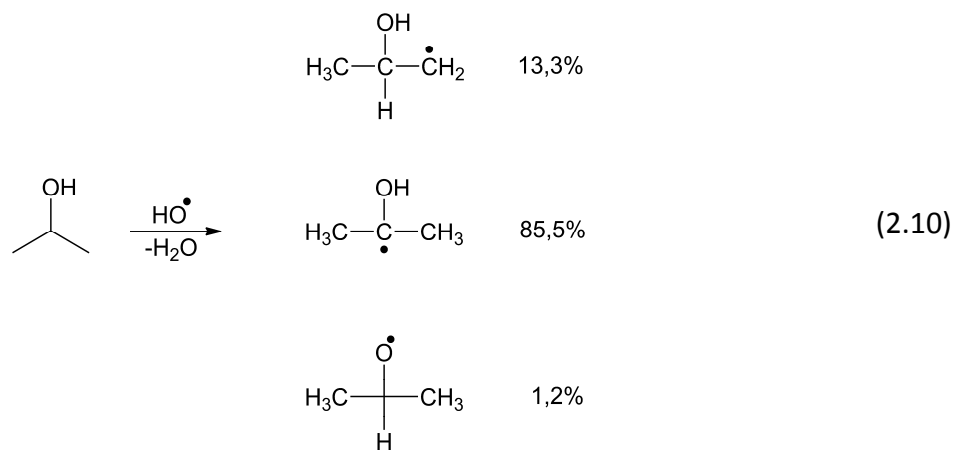
abertura do anel de imidazole em condições redutoras ou, num meio oxidante, dá origem a um produto final estável de oxidação por eliminação formal de um átomo de hidrogénio, a 8-hidroxiadenosina. Esta última reacção é comum a outras purinas, como por exemplo as xantinas, cujos principais produtos finais estáveis de oxidação, os ácidos úricos, resultam de uma hidroxilação em C(8).



A abstracção de um átomo de hidrogénio pelo radical hidroxilo é uma reacção termodinamicamente favorável, se se comparar a energia de dissociação HO-H da água ($497,1 \text{ kJmol}^{-1}$) com as energias de dissociação C-H de compostos saturados, mais fracas ($D_{298}((\text{CH}_3)_3\text{C-H}) = 404 \text{ kJmol}^{-1}$; $D_{298}(\text{H}_3\text{C-H}) = 439 \text{ kJmol}^{-1}$) [83]. No caso de compostos com átomos de hidrogénio vinílicos ou aromáticos, a ligação C-H é mais forte e a adição a ligações duplas é sempre favorecida.

No entanto, quando um substrato possui átomos de hidrogénio disponíveis ligados a átomos de carbono saturados e ligações duplas, geralmente a adição de HO^\bullet ocorre com muito maior probabilidade e constitui a via reaccional mais importante. O tolueno, onde a abstracção de hidrogénio do grupo metilo pelo radical hidroxilo tem um rendimento de apenas 6% [84], apesar da energia de dissociação consideravelmente baixa ($D_{298}((\text{C}_6\text{H}_5)\text{CH}_2\text{-H}) = 375 \text{ kJmol}^{-1}$ [83]), é um bom exemplo desta situação.

Apesar de termodinamicamente favorável, a abstracção de átomos de hidrogénio pelo radical hidroxilo é bastante selectiva. A probabilidade de abstracção de átomos de hidrogénio ligados a átomos de carbono primários é menor do que em átomos de carbono secundários, como se verifica para o caso do isopropanol [85], ilustrado na reacção (2.10).

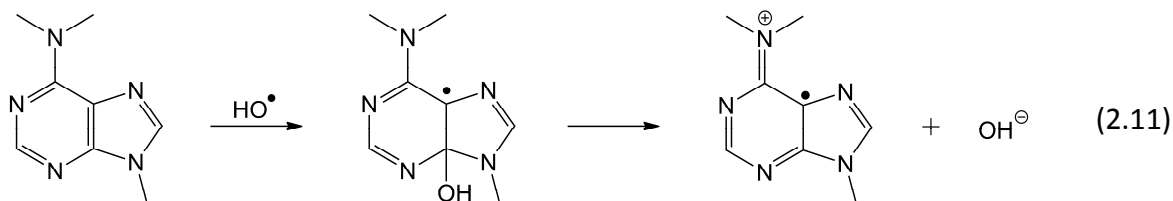


A formação de radicais alcoóxilo tem um baixo rendimento, uma vez que a energia de dissociação da ligação O-H é superior à da ligação C-H (por exemplo, $D_{298}(\text{CH}_3\text{O}-\text{H}) = 437,6 \text{ kJmol}^{-1}$ e $D_{298}(\text{H}-\text{CH}_2\text{OH}) = 402,1 \text{ kJmol}^{-1}$ [83]). Além disso, estes convertem-se rapidamente nos respectivos radicais α -hidroxialquilo [86].

O radical hidroxilo reage com catiões metálicos com menor potencial redox levando-os a estados de oxidação mais elevados. No entanto, apesar deste elevado potencial, raramente se observam reacções por transferência directa de electrão com compostos orgânicos. Um exemplo em que tal mecanismo ocorre é o caso da oxidação da glicina ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CO}_2^-$), da qual resultam como espécies primárias dois produtos de oxidação do grupo amino: um radical catião centrado no átomo de azoto ($\text{H}_2\text{N}^{*\cdot}-\text{CH}_2\text{CO}_2^-$) e um radical neutro ($\text{HN}^{\cdot}-\text{CH}_2\text{CO}_2^-$) com rendimentos de 63% e 37% respectivamente (ao referir-se a radicais catião e neutro, não se está a considerar a carga negativa do grupo carboxilato). Relativamente ao radical catião formado, não é claro se o mecanismo se dá por transferência directa de um dos electrões do par não partilhado do átomo de azoto ao radical hidroxilo ou se há formação de um aducto (de tempo de vida muito curto) seguido de eliminação de ião hidróxido [87].

Contudo, a formação de um radical catião de um composto orgânico insaturado por reacção com o radical hidroxilo é possível por um mecanismo de adição seguido de eliminação de ião hidróxido. Estudos efectuados por radiólise pulsada sobre a reacção do radical hidroxilo com aminas aromáticas permitiram observar a formação dos respectivos radicais catiões através desse mecanismo [88, 89]. Aliás, este mecanismo, que corresponde formalmente a uma oxidação monoelectrónica, ocorre com frequência em moléculas de interesse biológico. Por exemplo, em aductos análogos ao Ado-4-OH $^{\cdot}$ acima referido mas

sem hidrogénios ácidos, como no caso da $N^6, N^6, 9$ -trimetiladenina, observa-se a perda de ião hidróxido com formação de um radical catião [90] (reacção (2.11)).



2.4. Geração *in vitro* do radical hidroxilo

Das diversas formas de gerar o radical hidroxilo *in vitro* apenas se referem as que são utilizadas nas experiências realizadas neste trabalho.

2.4.1. Métodos radiolíticos

Entende-se por radiólise o conjunto de transformações químicas provocadas pela absorção de radiação de alta energia pela matéria. Esta absorção dá origem a ionização da matéria que a absorve ou provoca quebras de ligação entre átomos de uma molécula, pelo que se designa por radiação ionizante [91-94].

A radiação ionizante é constituída por partículas carregadas de alta velocidade como electrões, prótões, deuterões e outras partículas mais pesadas, partículas neutras como neutrões, e ainda por radiação electromagnética de elevada frequência - fotões de alta energia como os raios X e os raios gama (de energias superiores a cerca de 50 eV).

Os prótões e outros iões pesados transferem energia através de electrões secundários formados no meio absorvente, enquanto que os fotões de alta energia – raios X e γ – interactuam com a matéria essencialmente através dos electrões rápidos a que dão origem pelos efeitos fotoeléctrico, de Compton e de formação de pares. Para energias de fotões compreendidas entre 0,1 e 100 MeV (caso dos fotões γ de ^{60}Co – 1,25 MeV – utilizados neste trabalho) predomina largamente o efeito de Compton [95], em que o fotão colide com um electrão ao qual cede parte da sua energia, absorvendo este uma energia igual à sua energia de ligação e sendo ejectado com a energia cinética residual. Este processo vai-se repetindo até à perda total de capacidade de ionização, no chamado processo de transferência linear de energia (LET), originando as heterogeneidades radiolíticas onde ocorrem as transformações químicas da matéria irradiada.

Deste modo, o efeito provocado pela radiação ionizante é sempre essencialmente o resultante da interacção dos electrões formados ou absorvidos com a matéria. A dose de radiação absorvida num meio material é sempre devida à desaceleração dos electrões nesse meio. Assim, do ponto de vista radiolítico, não há qualquer diferença essencial entre o efeito de uma irradiação por um feixe de electrões, por outras partículas carregadas ou por radiação electromagnética de alta frequência.

A água tem sido o solvente (meio material absorvente de energia) mais utilizado em Química sob Radiação, quer pela larga gama de possibilidades de estudar, em solução aquosa, reacções induzidas por radiação ionizante em numerosos solutos orgânicos e inorgânicos, quer pelo facto de ser o constituinte maioritário nos sistemas biológicos, onde os compostos de interesse biológico se comportam como solutos de uma solução aquosa diluída.

Um dos aspectos mais importantes da Química sob Radiação em solução aquosa diluída é que a absorção da energia da radiação ionizante é feita essencialmente pelas moléculas do solvente, isto é, o efeito directo da radiação sobre o(s) soluto(s) é desprezável. A radiólise de soluções aquosas consiste pois num efeito indirecto, pelo qual as partículas reactivas (radicais e electrões) formadas pela absorção da energia pela água se difundem no seio da solução reagindo aí com as moléculas dos compostos dissolvidos.

Está hoje em dia claramente estabelecido que da radiólise da água líquida resulta a sua decomposição em espécies radicalares H^\bullet , HO^\bullet e e^-_{aq} , moleculares H_2O_2 e H_2 e iónicas H_3O^+ , que se processa em várias etapas como indicado na Figura 2.1 [96].

Na etapa primária a absorção de energia por uma molécula de água pode resultar na sua ionização com emissão de um electrão com determinada energia cinética (equação (2.12)) ou, no caso da transferência de energia ser inferior ao potencial de ionização da molécula, na excitação desta (equação (2.13)). Embora a contribuição destes dois processos para a decomposição da água não seja ainda completamente conhecida, sabe-se que a ionização é largamente preponderante [93, 96].



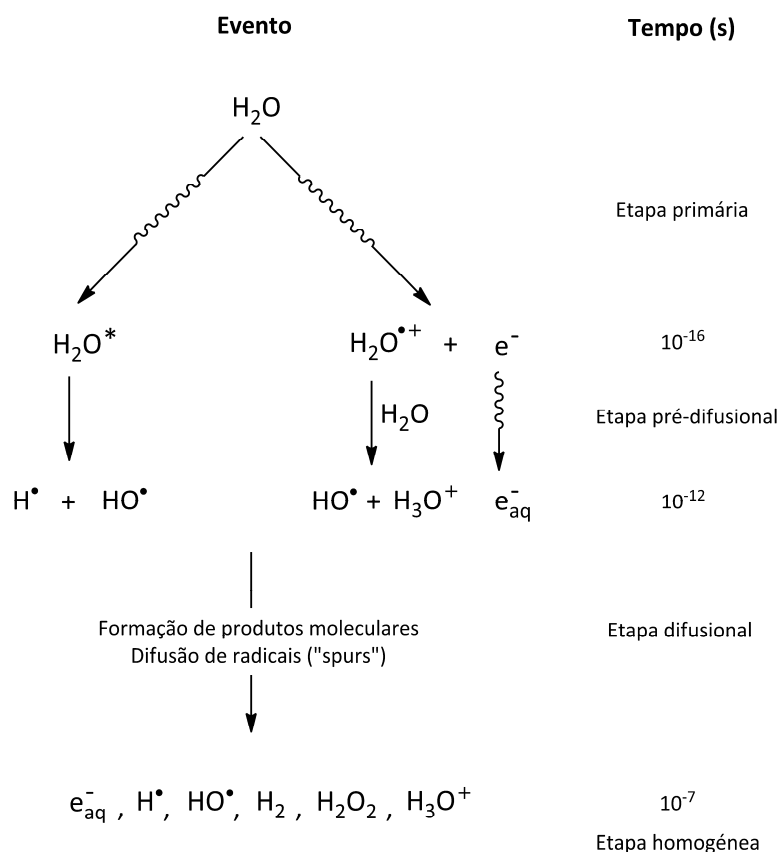
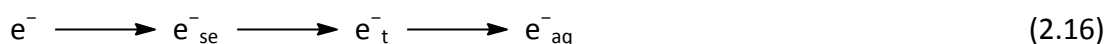


Figura 2.1 – Representação esquemática da radiólise da água.

Na etapa de pré-difusão as espécies $H_2O^{\bullet+}$ e H_2O^* transformam-se em espécies energeticamente mais estáveis (equações (2.14) e (2.15)) sem que ocorram contudo reacções, quer entre si, quer com outras espécies presentes em solução. Os electrões ejectados no processo de ionização inicial, e^- , perdem sucessivamente a sua energia até se solvatarem, e_{aq}^- (equação (2.16)). Em resumo, no final desta etapa obtêm-se as espécies HO^\bullet , H^\bullet , H_3O^+ e e_{aq}^- .



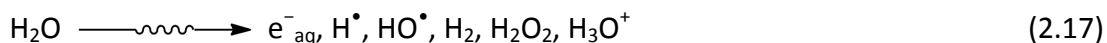
Na fase de difusão a concentração das espécies radiolíticas acima indicadas diminui nas zonas de heterogeneidade onde foram produzidas, primeiro por reacções de combinação favorecidas pela ainda elevada concentração local, depois por difusão até homogeneização no meio irradiado. As reacções de recombinação (indicadas na Tabela 2.1)

conduzem à regeneração da água na forma de H_2O ou OH^- e à formação dos produtos moleculares H_2O_2 e H_2 .

Tabela 2.1 – Constantes de velocidade das reacções de recombinação das espécies radiolíticas da água [96].

$e_{\text{aq}}^- + e_{\text{aq}}^-$	$\xrightarrow{2 \text{H}_2\text{O}}$	$\text{H}_2 + 2 \text{HO}^-$	$k = 5,4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
$e_{\text{aq}}^- + \text{HO}^\bullet$	\longrightarrow	HO^-	$k = 3,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
$e_{\text{aq}}^- + \text{H}_3\text{O}^+$	\longrightarrow	$\text{H}^\bullet + \text{H}_2\text{O}$	$k = 2,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
$e_{\text{aq}}^- + \text{H}^\bullet$	$\xrightarrow{\text{H}_2\text{O}}$	$\text{H}_2 + \text{HO}^-$	$k = 2,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
$\text{H}^\bullet + \text{H}^\bullet$	\longrightarrow	H_2	$k = 1,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
$\text{HO}^\bullet + \text{HO}^\bullet$	\longrightarrow	H_2O_2	$k = 5,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
$\text{HO}^\bullet + \text{H}^\bullet$	\longrightarrow	H_2O	$k = 3,2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
$\text{H}_3\text{O}^+ + \text{HO}^-$	\longrightarrow	$2 \text{H}_2\text{O}$	$k = 1,4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

O resultado final das três etapas anteriores é o aparecimento de espécies radicalares e moleculares (equação (2.17)) distribuídas de forma homogénea no meio irradiado – fase homogénea – alguns nanossegundos após a interacção com a radiação ionizante.



São estas espécies radiolíticas que irão reagir com o soluto ou solutos presentes em solução, conduzindo aos produtos finais de radiólise. A Tabela 2.2 quantifica a formação destas espécies por cada 100 eV de energia absorvida (rendimento radiolítico, G) [96, 97].

Pelos valores abaixo indicados pode concluir-se facilmente que na radiólise da água se formam aproximadamente iguais quantidades de radicais oxidantes e redutores, altamente reactivos com muitos compostos orgânicos e inorgânicos em solução. Para fins práticos, é muitas vezes conveniente ou mesmo indispensável trabalhar em condições exclusivamente oxidantes ou redutoras ou, mais especificamente ainda, investigar a reacção de uma espécie radiolítica particular com um determinado substrato. Através da utilização

de solutos captadores é possível desactivar certas espécies radiolíticas ou tirar partido da sua transformação em espécies diferentes, conseguindo-se assim condições experimentais particulares adequadas a um determinado objectivo específico.

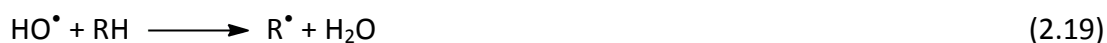
Tabela 2.2 – Rendimentos radiolíticos dos produtos primários radicalares e dos produtos moleculares da radiólise da água a pH 7.

Espécie	G (100 eV) ⁻¹
e ⁻ _{aq}	2,65
H [•]	0,55
HO [•]	2,70
H ₂	0,45
H ₂ O ₂	0,70

Um caso típico é o estabelecimento de condições oxidantes efectuando a radiólise de soluções aquosas saturadas em N₂O. Nestas condições o e⁻_{aq} é convertido no radical HO[•] (equação (2.18)) com um rendimento radiolítico global de 5,6 [98]. Dado que o átomo de hidrogénio reage muito mais lentamente com N₂O do que o electrão solvatado, numa solução saturada em N₂O ter-se-ão disponíveis, como espécies radicalares, cerca de 90% de HO[•] e 10% de H[•], a um valor de pH compreendido entre 3 e 11.



Para trabalhar em condições redutoras o método mais frequentemente empregue consiste em adicionar um soluto orgânico como um álcool para captar o radical HO[•] (equação (2.19)).



O radical R[•] obtido por abstracção de hidrogénio de um álcool é um radical fracamente redutor, menos reactivo do que e⁻_{aq} e H[•], podendo assim utilizar-se o álcool como soluto em soluções em que se pretende estudar as reacções com as espécies radiolíticas redutoras. O mais frequentemente utilizado é o *terc*-butanol, cujo radical [•]CH₂(CH₃)₂COH tem uma reactividade particularmente baixa.

Caso se pretenda estudar uma reacção isoladamente com o electrão solvatado pode utilizar-se o ião formato como captor dos radicais HO^\bullet e H^\bullet (equações (2.20) e (2.21)), uma vez que o radical anião $\text{CO}_2^{\bullet-}$ obtido é um redutor mais fraco e muito menos reactivo.

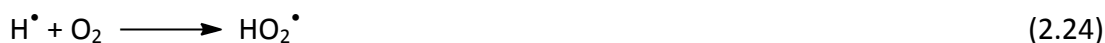


Finalmente, as reacções exclusivamente com o átomo de hidrogénio podem ser estudadas numa solução contendo *tert*-butanol como captor de HO^\bullet (equação (2.19)) e transformando o e^-_{aq} em H^\bullet a $\text{pH} < 3$ (equação (2.22)).



Para além das espécies primárias existem outras, cuja importância no caso de radiações de baixo LET (como a radiação γ) é muito reduzida. No entanto, em certos meios, formam-se espécies secundárias com efeito significativo. É o caso do radical anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e do seu ácido conjugado radical hidroperóxido (HO_2^\bullet), que se formam exclusivamente em soluções aquosas oxigenadas, e que é importante ter em conta na radiólise de sistemas biológicos.

Os radicais superóxido e hidroperóxido – par ácido-base conjugada (equação (2.25)); $\text{pK}_a = 4,4$ [91] – formam-se por reacção das espécies reductoras primárias com o oxigénio molecular (equações (2.23) e (2.24)), num processo de inversão redox em que espécies reductoras são convertidas em espécies fracamente oxidantes [91, 96].



O radical anião superóxido também pode ser obtido em solução aquosa de formato saturada com oxigénio [99]. O radical anião $\text{CO}_2^{\bullet-}$ formado por captura de HO^\bullet e H^\bullet pelo formato (equações (2.20) e (2.21)) reduz o oxigénio molecular a $\text{O}_2^{\bullet-}$ (com formação de CO_2), ao passo que o electrão solvatado remanescente é convertido em $\text{O}_2^{\bullet-}$ pelo O_2 (equação (2.23)).

2.4.2. Processos fotolíticos

2.4.2.1. Fotólise de peróxido de hidrogénio

Os peróxidos absorvem na gama do UV e decompõem-se rapidamente após fotoexcitação, gerando dois radicais centrados em oxigénio. O radical hidroxilo forma-se por fotólise de peróxido de hidrogénio, um composto estável à temperatura ambiente e com uma energia de dissociação HO-OH de $210 \pm 2,5 \text{ kJmol}^{-1}$ [100] (equação (2.26)).



Apesar do estado excitado ser dissociativo, o rendimento radicalar da formação de HO^\bullet é apenas 1,0 [101], ou seja, a eficiência é apenas 0,5 devido a reacções de recombinação dos radicais hidroxilo formados ($k = 4,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, [102]). Além disso, há ainda a considerar a reacção secundária dos radicais HO^\bullet formados com o peróxido de hidrogénio (equação (2.27)), embora seja pouco competitiva em relação à reacção do radical HO^\bullet com o soluto ($k \approx 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, como referido anteriormente).

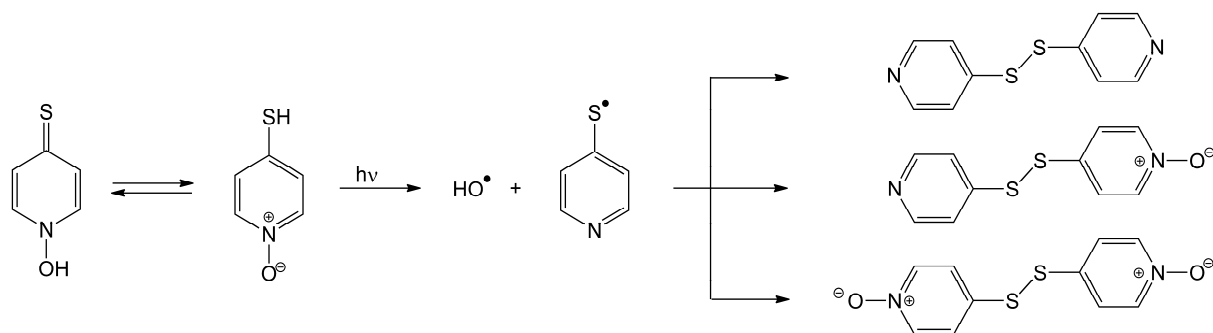


Dado que o peróxido de hidrogénio possui um coeficiente de extinção muito baixo ($\epsilon(\text{H}_2\text{O}_2)_{254\text{nm}} = 18,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, [104]) é necessário utilizá-lo em concentrações mais elevadas relativamente a outros substratos presentes em solução de forma a que possa competir de modo eficiente pelos fotões incidentes no meio aquoso.

2.4.2.2. Fotólise de *N*-óxido de 4-mercaptopiridina

A fotólise de *N*-óxido de 4-mercaptopiridina (4-SPyNO) em solução aquosa provoca a homólise da ligação N-O originando um radical HO^\bullet e um radical centrado em enxofre (Esquema 2.1) [105].

Este método fotolítico é uma via limpa para estudar as reacções do radical hidroxilo. O radical centrado em enxofre, além de ser muito menos reactivo do que o radical HO^\bullet , não interferindo nas suas reacções subsequentes, sofre acoplamento bimolecular que leva à formação de compostos estáveis dissulfureto.

Esquema 2.1 – Produção de radical hidroxilo por fotólise de *N*-óxido de 4-mercaptopiridina

A fotólise de 4-SPyNO como método de produção de radical HO• apresenta várias vantagens em relação a outros métodos não radiolíticos. Comparado com a fotólise de H₂O₂, o 4-SPyNO é fotolisado muito mais eficazmente permitindo usá-lo em mais baixas concentrações. Nas mesmas condições fotolíticas é fotolisado quantitativamente, enquanto que a fotólise de H₂O₂ é de apenas 10% [106], o que permite tempos de irradiação mais curtos e, deste modo, evitar ou minimizar a degradação fotoquímica dos substratos. Outra vantagem deste método é que o precursor do radical HO• não é uma espécie oxidante como o H₂O₂ ou redutora como o Fe^{II}EDTA usado no sistema no Fenton, reduzindo a ocorrência de reacções redox indesejadas com o intermediário a estudar.

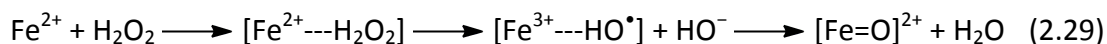
A estabilidade do 4-SPyNO a valores de pH elevados permite trabalhar em meio fortemente básico, o que não é possível quando se usa H₂O₂ devido à sua desproporcionação catalisada por base [107]. O meio básico permite estudar reacções com o radical anião O^{•-}, a base conjugada do radical HO• (pK_a = 11,9, [69]), um oxidante mais fraco do que o radical HO• que reage por abstracção de hidrogénio em vez de por adição [98].

2.4.3. Reacção de Fenton

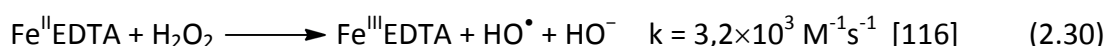
Embora as soluções aquosas de peróxido de hidrogénio sejam relativamente estáveis à temperatura e luz ambientes, na presença de catiões metálicos, em particular de metais de transição, o H₂O₂ decompõe-se observando-se a formação de produtos de oxidação de substratos orgânicos presentes. Esta observação constitui a base do método mais antigo conhecido para a geração do radical hidroxilo, a reacção de Fenton [108] (equação 2.28)).



Existe alguma controvérsia em relação ao mecanismo da reacção de Fenton no que respeita ao modo como se dá a transferência electrónica entre o catião metálico e o H_2O_2 [110]. Embora se aceite que haja uma coordenação inicial entre estes, admite-se que o radical HO^\bullet se difunde para a solução [111] ou permanece coordenado ao catião metálico na forma de ião ferrilo ($[\text{Fe}=\text{O}]^{2+}$) (equação 2.29) [112, 113].

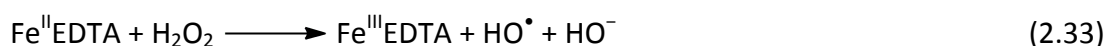


A velocidade da reacção de Fenton é significativamente acelerada quando se usa o Fe^{2+} complexado com um agente quelante como por exemplo o EDTA (equação 2.30)). Este efeito pode atribuir-se tanto à maior estabilização do Fe^{3+} pelo EDTA [114] como à diminuição do potencial redox do par $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ de +0,77 V (não complexado) para +0,12 V (complexado) [115].

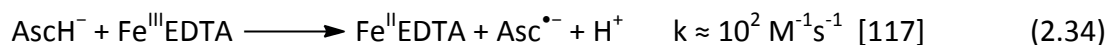


Além deste efeito catalítico na produção de radical HO^\bullet , a utilização de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{EDTA}$ permite evitar a formação de hidróxidos de Fe^{3+} em ensaios efectuados a pH fisiológico, bem como a complexação dos iões metálicos pelos substratos presentes na amostra.

Uma forma de aumentar o rendimento da produção de radical HO^\bullet pelo sistema de Fenton consiste em regenerar o $\text{Fe}^{\text{II}}\text{EDTA}$ por redução do $\text{Fe}^{\text{III}}\text{EDTA}$ com um redutor externo, uma vez que o $\text{Fe}^{\text{III}}\text{EDTA}$ não tem qualquer actividade catalítica na decomposição do H_2O_2 e que a produção de radical HO^\bullet com participação do radical anião $\text{O}_2^{\bullet-}$ (formado por oxidação do H_2O_2 pelo radical HO^\bullet , equação (2.31)) pela reacção de Haber-Weiss (equações (2.32) e (2.33)) é pouco eficiente.



Um redutor externo particularmente eficaz na regeneração de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{EDTA}$ é o anião ascorbato (AscH^-) (equação (2.34)). O radical anião ascorbilo ($\text{Asc}^{\bullet-}$) dismuta rapidamente a anião ascorbato e a ácido desidroascórbico (DHA) (equação (2.35)).



Neste sistema, devem utilizar-se concentrações de substrato superiores às de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{EDTA}$ e de ácido ascórbico uma vez que o radical hidroxilo reage muito rapidamente com estas espécies (equações (2.36) e (2.37)). Além disso, é conveniente que a concentração de ácido ascórbico seja baixa para que actue como pró-oxidante (produção de radical HO^\bullet) e não como antioxidante (redução do substrato oxidado).



A utilização do sistema de Fenton para a geração de radical hidroxilo, em comparação com métodos fotolíticos, tem a grande vantagem de poder ser empregue em misturas reaccionais de substratos fotodegradáveis. No entanto, é um sistema mais complexo, uma vez que alguns dos seus componentes podem ter interferência na reacção que se pretende estudar, nomeadamente ao reagirem com intermediários nela formados.

Os métodos químicos e fotolíticos, habitualmente designados em conjunto como métodos radiomiméticos, são utilizados, na maior parte dos casos, quando o método radiolítico não está acessível. Este constitui, de facto, a técnica mais limpa de produção de radicais. O seu único inconveniente é, caso se utilizem soluções muito concentradas, o efeito directo da radiação ionizante sobre o soluto, o que raramente acontece quando se efectua radiólise pulsada ou estacionária para estudos mecanísticos.

2.5. Métodos de detecção do radical hidroxilo

A detecção directa do radical hidroxilo é muito difícil devido à sua elevada reactividade, associada a um tempo de vida extremamente curto, o que leva a concentrações no estado estacionário na maior parte dos casos abaixo dos limites de detecção disponíveis.

A detecção por métodos espectroscópicos é também muito pouco fiável pelo facto de este radical ter um coeficiente de absorção muito baixo no UV (ver 2.3), pelo que a sua detecção se faz normalmente pela identificação de um ou mais dos seus produtos com uma

molécula alvo conhecida. De entre estas, referem-se como exemplos o ácido salicílico [119], que por reacção com o radical HO[•] dá origem maioritariamente aos ácidos 2,3- e 2,5-dihidroxibenzóico; o ácido tereftálico [120], cujo único produto de reacção é o ácido hidroxitereftálico; e a cumarina [121], cujos produtos são facilmente detectáveis por espectroscopia de fluorescência.

A detecção por espectroscopia de RPE também não é viável directamente devido às concentrações extremamente baixas em estado estacionário. No entanto, utilizando captadores de *spin* como por exemplo DMPO (*N*-óxido de 5,5-dimetil-1-pirrolina), é possível registar o espectro do respectivo aducto hidroxílico [1], devendo contudo excluir-se a hipótese de formação do radical anião superóxido cujo aducto hidroxílico pode decair para o que se obtém com o radical HO[•] obtendo-se o mesmo espectro de RPE [115].

2.6. Radical anião sulfato

2.6.1. Propriedades

O radical anião sulfato (SO₄^{•-}), apesar de não ter qualquer relevância biológica, é uma espécie radicalar muito útil para o estudo mecanístico de reacções de oxidação monoelectrónica, pois mimetiza o efeito directo da radiação ionizante, como no caso da formação de radicais catiões de purinas e pirimidinas do ADN [122-129]. Além disso, o seu elevado poder oxidante tem suscitado grande interesse na investigação e aplicação de métodos alternativos para a degradação de poluentes [130-132].

O radical anião SO₄^{•-} é uma espécie extremamente oxidante ($E_{\text{ENH}}^0(\text{SO}_4^{\bullet-}/\text{SO}_4^{2-}) = +2,43 \text{ V}$) [133], que absorve fracamente com $\lambda_{\text{máx}} = 450 \text{ nm}$ ($\epsilon = 1100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [134].

2.6.2. Reactividade

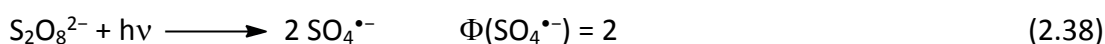
A reactividade do radical anião SO₄^{•-} caracteriza-se sobretudo pela transferência directa de electrão em compostos insaturados ou aromáticos [135, 136] ou através de um mecanismo de adição a uma ligação dupla seguido de eliminação de sulfato [137]. Em ambos os casos, a reacção com o radical anião SO₄^{•-} conduz à formação de um radical catião como espécie primária oxidada [138]. Embora as constantes de velocidade das reacções do radical anião SO₄^{•-} com compostos aromáticos sejam da mesma ordem de grandeza das das reacções do radical HO[•], a sua dependência da natureza de grupos substituintes em

compostos derivados do benzeno reflecte bem o seu carácter electrofílico mais selectivo, comparado com o do radical HO• [135].

O radical anião SO₄•⁻ pode ainda reagir por abstracção de hidrogénio [139], embora a velocidade de reacção por essa via seja inferior [140], facto pelo qual também é considerado uma espécie oxidante mais selectiva do que o radical HO•.

2.6.3. Métodos de geração

A geração do radical anião SO₄•⁻ faz-se a partir de persulfato (S₂O₈²⁻), seja qual for o método utilizado. A estrutura do ião persulfato consiste em duas unidades tetraédricas, com centro ocupado pelo átomo de enxofre, ligadas entre si por uma ligação homopolar entre dois átomos de oxigénio cuja energia de dissociação é de 120±11 kJmol⁻¹ [100]. Esta ligação, mais fraca que a de H₂O₂, cinde homoliticamente por aquecimento [141] ou sob irradiação UV, conduzindo à formação de dois radicais aniões SO₄•⁻ [142] (equação (2.38)).



A eficiência da decomposição fotoquímica do ião persulfato é unitária, qualquer que seja o pH do meio [143, 144], pelo que se admite que a formação do radical anião SO₄•⁻ tem um rendimento quântico de 2 [145]. Dado que o persulfato possui um coeficiente de absorção muito baixo ($\epsilon(\text{S}_2\text{O}_8^{2-})_{254\text{nm}} \approx 50 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, [115]), é necessário utilizá-lo em concentrações mais elevadas relativamente a outros substratos presentes em solução de forma a que possa competir de modo eficiente com os fotões incidentes no meio aquoso.

O radical anião SO₄•⁻ pode igualmente ser gerado por radiólise pela adição de persulfato à solução aquosa que contém o soluto a estudar. Neste caso, a reacção do electrão solvatado com o persulfato transforma-o no radical SO₄•⁻ ($k = 1,2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, [115]) (equação (2.39)).



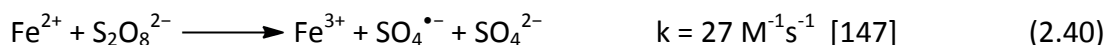
Nessas condições, convém evitar a reacção directa de qualquer das espécies primárias com o soluto. Para isso, a radiólise efectua-se em solução aquosa saturada em

árgon (para evitar a captura do electrão solvatado pelo oxigénio do ar), contendo *tert*-butanol como captor do radical hidroxilo ($k = 6,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, [146]). A reacção deste álcool terciário com o radical anião $\text{SO}_4^{\bullet-}$ é desprezável ($k = 9,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, [134]), o que reflecte a grande diferença de selectividade deste radical comparado com a do radical HO^\bullet .

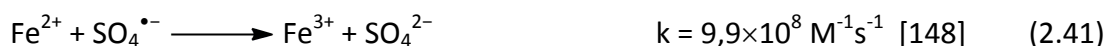
No caso de haver competição cinética entre o electrão solvatado e o radical anião $\text{SO}_4^{\bullet-}$ pelo substrato em estudo, basta usar uma concentração de $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ cerca de 10 vezes superior à do soluto para garantir que 90% do electrão solvatado se transforme no radical anião $\text{SO}_4^{\bullet-}$ antes de reagir directamente com o soluto. Nestas condições, pode-se desprezar a contribuição da reacção directa do electrão solvatado com o soluto.

O átomo de hidrogénio (outra espécie primária da radiólise), cujo rendimento radiolítico é substancialmente inferior ao do electrão solvatado, também reage com $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ para dar origem ao radical anião $\text{SO}_4^{\bullet-}$, embora mais lentamente ($k = 1,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, [115]). Da mesma forma, ao usar um excesso de $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ relativamente ao substrato, garante-se que a reacção deste com o H^\bullet é desprezável.

O radical anião $\text{SO}_4^{\bullet-}$ pode ser gerado igualmente por via química (equação (2.40), através de uma reacção análoga à de Fenton, descrita anteriormente (equação (2.28)).



No estudo da oxidação de substratos pelo radical anião $\text{SO}_4^{\bullet-}$ formado por esta via, a concentração de Fe^{2+} deve ser bastante inferior à do substrato para que a oxidação a Fe^{3+} pelo radical anião $\text{SO}_4^{\bullet-}$ formado (equação (2.41)) não compita com a oxidação do substrato.



De um modo geral, pode utilizar-se qualquer ião metálico oxidável pelo persulfato para a produção do radical anião $\text{SO}_4^{\bullet-}$ por este método. Um exemplo é a utilização de TiCl_3 e $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (equação (2.42)).



No presente trabalho utilizou-se este radical anião como oxidante na geração de radicais catiões de xantinas em misturas aquosas binárias para avaliar a sua capacidade antioxidante relativa (Capítulo 4), e para estudar o mecanismo de reacção por descarboxilação de ácidos cinâmicos (Capítulo 6).

2.7. Antioxidantes

A exposição dos organismos vivos a condições que provocam a sua lesão oxidativa levou a que tivessem desenvolvido mecanismos de defesa que limitam a produção das espécies oxidantes ou que reparam as lesões por estas provocadas. Nestes mecanismos participam espécies designadas como antioxidantes, entendendo-se como tal, segundo a definição de Halliwell e Gutteridge [1], "qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas com a do substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação desse substrato".

Considerando que os principais agentes do *stress* oxidativo são espécies radicalares, a principal acção de uma molécula antioxidante será diminuir o potencial oxidante daquelas, o que poderá acontecer por destruição do seu carácter radicalar (caso dos antioxidantes enzimáticos) ou por conversão numa outra espécie radicalar menos oxidante do ponto de visto químico e menos lesiva do ponto de vista biológico (antioxidantes não enzimáticos), quer como captora do radical oxidante primário quer como reparadora do alvo biológico oxidado. De facto, a reacção de um radical com uma espécie não radicalar dá origem a uma nova espécie radicalar, resultando o efeito antioxidante da menor reactividade desta última.

Os antioxidantes podem classificar-se em dois grandes grupos, os antioxidantes proteicos e moléculas de menor massa molecular.

2.7.1. Antioxidantes proteicos

No meio celular existem várias proteínas que exercem a sua actividade antioxidante de forma preventiva ao quelatar iões metálicos, em particular de ferro, diminuindo a sua participação catalítica na formação de radicais [1]. No entanto, as proteínas com maior efeito antioxidante são enzimas cujo modo de acção consiste na remoção catalítica das espécies reactivas de oxigénio, como é o caso das superóxido dismutases, das catalases e das peroxidases.

Os enzimas do tipo superóxido dismutase actuam na etapa inicial de defesa celular contra o *stress* oxidativo pela conversão do radical anião superóxido $O_2^{\bullet-}$ em produtos menos tóxicos, nomeadamente H_2O_2 e O_2 [40]. O peróxido de hidrogénio é eliminado sob a forma de água e de oxigénio molecular pela acção das catalases [149]. As peroxidases reduzem o peróxido de hidrogénio a água com auxílio de uma espécie doadora de electrão. O exemplo mais importante é a glutatióno peroxidase que utiliza o glutatióno como espécie doadora de electrão [150].

2.7.2. Antioxidantes de baixa massa molecular

Os antioxidantes não enzimáticos são moléculas de baixa massa molecular, maioritariamente de origem exógena, como por exemplo as vitaminas C (ácido ascórbico) e E (α -tocoferol), os carotenóides e os polifenóis, ou biossintetizados como por exemplo o ácido úrico, o ubiquinol-10 e o glutatióno (Figura 2.2). Os antioxidantes hidrossolúveis encontram-se no citosol e nos líquidos extracelulares e os lipossolúveis nas membranas celulares e associados a lipoproteínas.

O modo de actuação destes antioxidantes na protecção do organismo contra os agentes do *stress* oxidativo tem sido alvo de numerosos estudos e encontra-se largamente documentado na literatura [151-159]. Na Tabela 2.3 indicam-se os potenciais de redução de alguns pares redox de relevância biológica.

Para além da acção por efeito de captura de espécies radicalares, em particular o radical hidroxilo, ou por reparação de alvos de relevância biológica, os antioxidantes podem ter uma acção sinérgica participando em cadeias redox de acordo com o seu potencial de redução. Por exemplo, o α -tocoferol pode reparar um radical peroxilo (ROO^{\bullet}), sendo o radical α -tocoferilo (α - TO^{\bullet}) resultante reparado pelo ascorbato ($AscH^-$), havendo portanto uma transferência de carácter radicalar para espécies sucessivamente menos oxidantes (Esquema 2.2) [160]. O baixo potencial de redução do par $Asc^{\bullet-}/AscH^-$ não permite que o radical ascorbilo ($Asc^{\bullet-}$) seja capaz de oxidar alvos biológicos relevantes e é posteriormente regenerado *in vivo* a ascorbato de forma enzimática [161].

2.7.3. Métodos padrão de avaliação da capacidade antioxidante

O crescente interesse na possível acção protectora dos antioxidantes sobre processos patofisiológicos induzidos por espécies oxidantes levou a que se tivessem desenvolvido metodologias analíticas *in vitro*, simples e expeditas, para a determinação da capacidade antioxidante de compostos puros ou de matrizes complexas, tais como alimentos e extractos vegetais.

Estes métodos, muito diversos na sua natureza e modo de emprego, têm contudo em comum o objectivo de avaliarem a capacidade de um potencial antioxidante captar radicais ou outras espécies oxidantes ou monitorizar o resultado de um sistema oxidante/alvo conhecido, na ausência e na presença do candidato a antioxidante. Em caso algum estes métodos fornecem informação sobre a modificação química que o composto em estudo sofre ao ser oxidado. Deste modo, o estudo dos mecanismos químicos de oxidação do antioxidante, que constituem o modo de abordagem deste trabalho – caracterização dos intermediários envolvidos e identificação dos produtos finais – não pode ser feito utilizando os métodos padrão de avaliação da capacidade antioxidante, pelo que destes se fará apenas uma breve referência.

O teste colorimétrico DPPH (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) é um método directo que mede a capacidade de um composto captar radicais livres [169]. O radical estável DPPH[•] apresenta uma forte absorção no visível (517 nm), o que permite avaliar a capacidade antioxidante pela diminuição da absorvância registada em estado estacionário a este comprimento de onda na presença da substância a testar. A quantificação faz-se pela quantidade de substância necessária para inibir a 50% a absorvância do radical DPPH[•]. Em alternativa, a quantificação pode ser feita por espectroscopia de RPE [170] medindo a diminuição da intensidade da linha principal do espectro em função da concentração de antioxidante após reacção completa.

O método TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) [171] baseia-se na capacidade de um composto captar o radical catião ABTS^{•+}, gerado por reacção do ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico) com a ferrilmioglobina, por comparação com a do Trolox (um análogo hidrossolúvel da vitamina E). A quantificação dessa capacidade é feita pela medição da absorvância do ABTS^{•+} a 734 nm. O valor de TEAC é a razão entre as concentrações de Trolox e do antioxidante para uma absorvância equivalente. Este método constitui um exemplo de avaliação da capacidade antioxidante por transferência de electrão.

O método ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) [172] baseia-se na capacidade de um composto captar radicais peróxido produzidos por reacção de oxigénio molecular com radicais alquilo resultantes da decomposição térmica de um composto azo (AAPH, o di-cloridrato de 2,2'-azobis(2-amidino-propano)), por comparação com a do Trolox. A quantificação dessa capacidade é feita pela inibição ou atenuação do decaimento da fluorescência intrínseca da proteína beta-ficoeritrina induzida pelo radical peróxido. O valor de ORAC é a razão entre a área sob a curva de fluorescência na presença do antioxidante (subtraída do valor do ensaio em branco) e a área sob a curva de fluorescência na presença do Trolox (subtraída do valor do ensaio em branco). Este método constitui um exemplo de avaliação da capacidade antioxidante por transferência de hidrogénio.

2.8. Tipos de antioxidantes estudados

Devido à importância do efeito dos radicais oxidantes, em particular em meio biológico, várias questões se colocaram desde o início aos investigadores que se interessaram por este assunto, como a necessidade de compreender os mecanismos das reacções em que intervêm, de avaliar a sua diferente reactividade, de detectar a sua presença (com o desenvolvimento dos meios necessários para tal fim) e, finalmente, de encontrar e desenvolver moléculas (antioxidantes) capazes de proteger as células vivas do seu efeito lesivo. Este último desafio esteve na origem de uma larga área de investigação, actualmente ainda em expansão – a pesquisa de novos antioxidantes eficazes para a prevenção e reparação dos efeitos do *stress* oxidativo.

De entre os tipos de antioxidantes acima referidos, estudaram-se no âmbito da estratégia adoptada para este trabalho (Capítulo 1) duas classes de compostos: xantinas e ácidos hidroxicinâmicos. Um terceiro grupo de compostos alvo deste estudo é constituído por derivados da antipirina, compostos tradicionalmente usados em terapia como anti-inflamatórios cuja capacidade antioxidante não está ainda suficientemente avaliada.

2.8.1. Xantinas e ácidos hidroxicinâmicos

A xantina e seus derivados, são desde há muito conhecidos como antioxidantes encontrando-se na literatura referência a trabalhos respeitantes à sua avaliação como tal [173-175]. No entanto, apesar da grande informação já disponível sobre a capacidade antioxidante relativa destes compostos, quer entre si, quer comparada com a de outros

antioxidantes, não estão ainda completamente esclarecidos os mecanismos das reacções de oxidação em que estes compostos intervêm.

Neste trabalho avalia-se a capacidade antioxidante relativa de vários derivados da xantina, através do estudo do efeito do tipo de substituinte e da sua posição na estrutura purínica, e identificam-se as vias reaccionais da degradação oxidativa da teofilina, uma xantina dimetilada presente na dieta humana.

A capacidade antioxidante do ácido cafeico, como de outros polifenóis, tem sido também alvo de grande interesse de investigação [176-178]. No presente trabalho, dedica-se particular atenção ao ácido cinâmico e seus derivados mono-hidroxiados no anel benzénico (ácidos cumáricos), para avaliar o seu eventual envolvimento como precursores do próprio ácido cafeico em condições de *stress* oxidativo, identificar os respectivos produtos finais estáveis e propor mecanismos gerais de oxidação.

2.8.2. Derivados de antipirina

Os derivados da antipirina (2,3-dimetil-1-fenil-3-pirazolin-5-ona) são compostos anti-inflamatórios não esteróides (AINE) que possuem uma acção terapêutica que resulta da inibição da síntese de prostaglandinas, mediadores importantes nos processos de inflamação, dor e febre [179]. O enzima responsável por esta síntese, a prostaglandina sintetase, possui um grupo heme e dois locais activos com actividades catalíticas distintas mas interligadas: a ciclooxigenase, onde o ácido araquidónico (substrato precursor da prostaglandina) é convertido a prostaglandina G₂ (endoperóxido com grupo hidroperóxido), e a peroxidase, onde se forma a prostaglandina H₂ por redução (endoperóxido com grupo hidroxilo) [180]. Esta difunde-se e é transformada em diversas prostaglandinas por isomerases específicas [181]. O mecanismo de inibição dos AINE consiste no bloqueio da actividade enzimática da ciclooxigenase por competição com o substrato ácido araquidónico [182, 183].

A antipirina foi o primeiro derivado de pirazolona a ser utilizado no tratamento da dor e da inflamação, ainda nos finais do século XIX. Mais tarde, as suas propriedades terapêuticas foram potenciadas com a introdução de um grupo *N*⁴-dimetilamino na sua estrutura, obtendo-se a aminopirina. Dada a fraca solubilidade desta em água, foi sintetizado e comercializado em 1922 o análogo *N*⁴-metil,*N*⁴-metanossulfonato de sódio, a dipirona. No entanto, na década de 1970 estes fármacos foram retirados do mercado em

diversos países dado que a sua utilização foi associada à manifestação de efeitos secundários graves, nomeadamente a agranulocitose [184]. Mais tarde, e após vários estudos estatísticos efectuados em populações em cujos países a dipirona continua no mercado, concluiu-se que a incidência de agranulocitose e de outros efeitos secundários é marginal e que, por isso, este AINE não constitui um risco para a saúde pública quando administrado em doses terapêuticas e por curtos períodos de tempo [185, 186].

Na realidade, a dipirona é um pró-fármaco já que, após administração, é rapidamente hidrolisada a 4-(*N*-metil)-aminoantipirina, o composto farmacologicamente activo. Um estudo recente [187], associou a acção farmacológica deste com a sua capacidade de bloquear a actividade da prostaglandina sintetase por redução da forma oxidada do grupo heme (Fe^{4+} , forma activada), regenerando o enzima à sua forma desactivada (Fe^{3+}). De facto, é a forma oxidada do grupo heme, um complexo intermediário de oxoferrilo com um radical localizado na porfirina que, após transferência de electrão de um resíduo de tirosilo à porfirina oxidada [188, 189], inicia o processo de síntese da prostaglandina H₂. Esta forma de actuação, semelhante à verificada noutros inibidores de ciclooxigenase [190, 191], veio contrariar o mecanismo clássico por competição com o ácido araquidónico e levou a que se destacasse a importância do poder redutor da dipirona, isto é, da sua capacidade antioxidante.

É sabido que nos processos de inflamação existe um acréscimo de produção de ROS que estão implicadas na sua patofisiologia [192, 193], pelo que tem havido um interesse crescente na possibilidade dos efeitos terapêuticos dos AINE poderem estar associados a uma potencial actividade antioxidante. Num trabalho recente [194], demonstrou-se que a dipirona e a aminopirina são captadores muito eficazes de ROS, nomeadamente do radical hidroxilo. Contudo, é necessário identificar os vários produtos finais de oxidação dos AINE e, posteriormente, avaliar se podem eles próprios provocar ou não danos biológicos no meio fisiológico.

Tendo este objectivo em vista, neste trabalho estuda-se a reacção da aminopirina e de dois metabolitos [195], a 4-(*N*-metil)-aminoantipirina (o substrato activo da dipirona) e a 4-aminoantipirina, com o radical hidroxilo em meio neutro e identificam-se os principais produtos finais estáveis de oxidação.

Bibliografia

1. Halliwell B., Gutteridge J.M.C., *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2nd ed., New York: Oxford University Press. 1989.
2. Pani G., Galeotti T., Chiarugi P., "Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress". *Cancer and Metastasis Reviews*, 2010, **29**(2): 351-378.
3. Barja G., "Free radicals and aging". *Trends in Neurosciences*, 2004, **27**(10): 595-600.
4. Mehta J.L., Rasouli N., Sinha A.K., Molavi B., "Oxidative stress in diabetes: A mechanistic overview of its effects on atherogenesis and myocardial dysfunction". *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2006, **38**(5-6): 794-803.
5. Su B., Wang X., Nunomura A., Moreira P.I., Lee H.G., Perry G., Smith M.A., Zhu X., "Oxidative Stress Signaling in Alzheimer's Disease". *Current Alzheimer Research*, 2008, **5**(6): 525-532.
6. Pennathur S., Heinecke J.W., "Mechanisms for oxidative stress in diabetic cardiovascular disease". *Antioxidants & Redox Signaling*, 2007, **9**(7): 955-969.
7. Van Houten B., Woshner V., Santos J.H., "Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress". *DNA Repair*, 2006, **5**(2): 145-152.
8. Valko M., Morris H., Cronin M.T.D., "Metals, toxicity and oxidative stress". *Current Medicinal Chemistry*, 2005, **12**(10): 1161-1208.
9. Goetz M.E., Luch A., "Reactive species: A cell damaging rout assisting to chemical carcinogens". *Cancer Letters*, 2008, **266**(1): 73-83.
10. Poli G., Leonarduzzi G., Biasi F., Chiarotto E., "Oxidative stress and cell signalling". *Current Medicinal Chemistry*, 2004, **11**(9): 1163-1182.
11. Bowler R.P., Crapo J.D., "Oxidative stress in allergic respiratory diseases". *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2002, **110**(3): 349-356.
12. Halliwell B., "Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?". *Journal of Neurochemistry*, 2006, **97**(6): 1634-1658.
13. Nishikawa M., "Reactive oxygen species in tumor metastasis". *Cancer Letters*, 2008, **266**(1): 53-59.
14. Ryter S.W., Kim H.P., Hoetzel A., Park J.W., Nakhira K., Wang X., Choi A.M.K., "Mechanisms of cell death in oxidative stress". *Antioxidants & Redox Signaling*, 2007, **9**(1): 49-89.
15. Sies H., "Oxidative Stress - from Basic Research to Clinical-Application". *American Journal of Medicine*, 1991, **91**: S31-S38.
16. Droge W., "Free radicals in the physiological control of cell function". *Physiological Reviews*, 2002, **82**(1): 47-95.
17. Vieira A.J.S.C., "Radicais oxidantes: da Química à Biologia". *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*, 2006, **100**: 66-71.
18. Zaidi A., Fernandes D., Bean J.L., Michaelis M.L., "Effects of paraquat-induced oxidative stress on the neuronal plasma membrane Ca²⁺-ATPase". *Free Radical Biology and Medicine*, 2009, **47**(10): 1507-1514.
19. Davies M.J., "The oxidative environment and protein damage". *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 2005, **1703**(2): 93-109.

20. Hawkins C.L., Rees M.D., Davies M.J., "Superoxide radicals can act synergistically with hypochlorite to induce damage to proteins". *Febs Letters*, 2002, **510**(1-2): 41-44.
21. Hawkins C.L., Davies M.J., "Generation and propagation of radical reactions on proteins". *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 2001, **1504**(2-3): 196-219.
22. Cheng Z.Y., Li Y.Z., "What is responsible for the initiating chemistry of iron-mediated lipid peroxidation: An update". *Chemical Reviews*, 2007, **107**(3): 748-766.
23. Dizdaroglu M., Jaruga P., Birincioglu M., Rodriguez H., "Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement". *Free Radical Biology and Medicine*, 2002, **32**(11): 1102-1115.
24. Whiteman M., Jenner A., Halliwell B., "Hypochlorous acid-induced base modifications in isolated calf thymus DNA". *Chemical Research in Toxicology*, 1997, **10**(11): 1240-1246.
25. Hawkins C.L., Davies M.J., "Hypochlorite-induced damage to DNA, RNA, and polynucleotides: Formation of chloramines and nitrogen-centered radicals". *Chemical Research in Toxicology*, 2002, **15**(1): 83-92.
26. Melvin T., Botchway S.W., Parker A.W., Oneill P., "Induction of strand breaks in single-stranded polyribonucleotides and DNA by photoionization: One electron oxidized nucleobase radicals as precursors". *Journal of the American Chemical Society*, 1996, **118**(42): 10031-10036.
27. Yokoya A., Shikazono N., Fujii K., Urushibara A., Akamatsu K., Watanabe R., "DNA damage induced by the direct effect of radiation". *Radiation Physics and Chemistry*, 2008, **77**(10-12): 1280-1285.
28. Parman T., Wiley M.J., Wells P.G., "Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity". *Nature Medicine*, 1999, **5**(5): 582-585.
29. Dwyer D.J., Kohanski M.A., Collins J.J., "Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance". *Current Opinion in Microbiology*, 2009, **12**(5): 482-489.
30. Gill R., Tsung A., Billiar T., "Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors". *Free Radical Biology and Medicine*, 2010, **48**(9): 1121-1132.
31. Foote C.S., Shook F.C., Abakerli R.B., "Characterization of Singlet Oxygen". *Methods in Enzymology*, 1984, **105**: 36-47.
32. Schmidt R., "Photosensitized generation of singlet oxygen". *Photochemistry and Photobiology*, 2006, **82**(5): 1161-1177.
33. Steinbeck M.J., Khan A.U., Karnovsky M.J., "Intracellular Singlet Oxygen Generation by Phagocytosing Neutrophils in Response to Particles Coated with a Chemical Trap". *Journal of Biological Chemistry*, 1992, **267**(19): 13425-13433.
34. Adam W., Kazakov D.V., Kazakov V.P., "Singlet-oxygen chemiluminescence in peroxide reactions". *Chemical Reviews*, 2005, **105**(9): 3371-3387.
35. Babcock G.T., "How oxygen is activated and reduced in respiration". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, **96**(23): 12971-12973.
36. Turrens J.F., "Mitochondrial formation of reactive oxygen species". *Journal of Physiology - London*, 2003, **552**(2): 335-344.
37. Babior B.M., Lambeth J.D., Nauseef W., "The neutrophil NADPH oxidase". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2002, **397**(2): 342-344.
38. Bedard K., Krause K.H., "The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology". *Physiological Reviews*, 2007, **87**(1): 245-313.

39. Samai M., Sharpe M.A., Gard P.R., Chatterjee P.K., "Comparison of the effects of the superoxide dismutase mimetics EUK-134 and tempol on paraquat-induced nephrotoxicity". *Free Radical Biology and Medicine*, 2007, **43**(4): 528-534.
40. Fridovich I., "Superoxide Radical and Superoxide Dismutases". *Annual Review of Biochemistry*, 1995, **64**: 97-112.
41. Kelley E.E., Khoo N.K.H., Hundley N.J., Malik U.Z., Freeman B.A., Tarpey M.M., "Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase". *Free Radical Biology and Medicine*, 2010, **48**(4): 493-498.
42. Halliwell B., Clement M.V., Long L.H., "Hydrogen peroxide in the human body". *Febs Letters*, 2000, **486**(1): 10-13.
43. Halliwell B., Gutteridge J.M.C., "Role of Free-Radicals and Catalytic Metal-Ions in Human-Disease - an Overview". *Methods in Enzymology*, 1990, **186**: 1-85.
44. Park S., You X.J., Imlay J.A., "Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx(-) mutants of Escherichia coli". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, **102**(26): 9317-9322.
45. Rush J.D., Maskos Z., Koppenol W.H., "Reactions of Iron(II) Nucleotide Complexes with Hydrogen-Peroxide". *Febs Letters*, 1990, **261**(1): 121-123.
46. Reif D.W., "Ferritin as a Source of Iron for Oxidative Damage". *Free Radical Biology and Medicine*, 1992, **12**(5): 417-427.
47. Liochev S.I., Fridovich I., "Superoxide and iron: Partners in crime". *IUBMB Life*, 1999, **48**(2): 157-161.
48. Gutteridge J.M.C., "Iron Promoters of the Fenton Reaction and Lipid-Peroxidation Can Be Released from Hemoglobin by Peroxides". *Febs Letters*, 1986, **201**(2): 291-295.
49. Weinstein J., Bielski B.H.J., "Kinetics of the Interaction of HO₂ and O₂-Radicals with Hydrogen-Peroxide - Haber-Weiss Reaction". *Journal of the American Chemical Society*, 1979, **101**(1): 58-62.
50. Winterbourn C.C., "Comparison of Superoxide with Other Reducing Agents in the Biological Production of Hydroxyl Radicals". *Biochemical Journal*, 1979, **182**(2): 625-628.
51. Long C.A., Bielski B.H.J., "Rate of Reaction of Superoxide Radical with Chloride-Containing Species". *Journal of Physical Chemistry*, 1980, **84**(5): 555-557.
52. Folkes L.K., Candeias L.P., Wardman P., "Kinetics and Mechanisms of Hypochlorous Acid Reactions". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1995, **323**(1): 120-126.
53. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J., "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease". *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007, **39**(1): 44-84.
54. Gonzalez M.G., Oliveros E., Worner M., Braun A.M., "Vacuum-ultraviolet photolysis of aqueous reaction systems". *Journal of Photochemistry and Photobiology C - Photochemistry Reviews*, 2004, **5**(3): 225-246.
55. Baier J., Maisch T., Maier M., Engel E., Landthaler M., Baumler W., "Singlet oxygen generation by UVA light exposure of endogenous photosensitizers". *Biophysical Journal*, 2006, **91**(4): 1452-1459.
56. Pandey R., Mehrotra S., Ray R.S., Joshi P.C., Hans R.K., "Evaluation of UV-radiation induced singlet oxygen generation potential of selected drugs". *Drug and Chemical Toxicology*, 2002, **25**(2): 215-225.
57. Bergamini C.M., Gambetti S., Dondi A., Cervellati C., "Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage". *Current Pharmaceutical Design*, 2004, **10**(14): 1611-1626.

58. Pryor W.A., Das B., Church D.F., "The Ozonation of Unsaturated Fatty-Acids - Aldehydes and Hydrogen-Peroxide as Products and Possible Mediators of Ozone Toxicity". *Chemical Research in Toxicology*, 1991, **4**(3): 341-348.
59. Uppu R.M., Cueto R., Squadrito G.L., Pryor W.A., "What Does Ozone React with at the Air Lung Interface - Model Studies Using Human Red-Blood-Cell Membranes". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1995, **319**(1): 257-266.
60. Pryor W.A., "Mechanisms of Radical Formation from Reactions of Ozone with Target Molecules in the Lung". *Free Radical Biology and Medicine*, 1994, **17**(5): 451-465.
61. Wentworth P., McDunn J.E., Wentworth A.D., Takeuchi C., Nieva J., Jones T., Bautista C., Ruedi J.M., Gutierrez A., Janda K.D., Babor B.M., Eschenmoser A., Lerner R.A., "Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation". *Science*, 2002, **298**(5601): 2195-2199.
62. Pryor W.A., "Oxyradicals and Related Species - Their Formation, Lifetimes, and Reactions". *Annual Review of Physiology*, 1986, **48**: 657-667.
63. Kaur H., Halliwell B., "Detection of hydroxyl radical by aromatic hydroxylation", in *Oxygen Radicals in Biological Systems, Pt C, Methods in Enzymology*. San Diego: Academic Press Inc. 1994, **233**: 67-82.
64. do Couto P.C., Guedes R.C., Cabral B.J.C., Simoes J.A.M., "The hydration of the OH radical: Microsolvation modeling and statistical mechanics simulation". *Journal of Chemical Physics*, 2003, **119**(14): 7344-7355.
65. Ruscic B., Wagner A.F., Harding L.B., Asher R.L., Feller D., Dixon D.A., Peterson K.A., Song Y., Qian X.M., Ng C.Y., Liu J.B., Chen W.W., "On the enthalpy of formation of hydroxyl radical and gas-phase bond dissociation energies of water and hydroxyl". *Journal of Physical Chemistry A*, 2002, **106**(11): 2727-2747.
66. Czapski G., Bielski B.H.J., "Absorption-Spectra of The $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}^{\cdot-}$ Radicals in Aqueous-Solutions". *Radiation Physics and Chemistry*, 1993, **41**(3): 503-505.
67. Schwarz H.A., Dodson R.W., "Equilibrium between Hydroxyl Radicals and Thallium(II) and the Oxidation Potential of $\text{OH}(\text{aq})$ ". *Journal of Physical Chemistry*, 1984, **88**(16): 3643-3647.
68. Klaning U.K., Sehested K., Holcman J., "Standard Gibbs Energy of Formation of the Hydroxyl Radical in Aqueous-Solution - Rate Constants for the Reaction $\text{ClO}_2^- + \text{O}_3$ Reversible $\text{O}_3^- + \text{ClO}_2$ ". *Journal of Physical Chemistry*, 1985, **89**(5): 760-763.
69. Rabani J., Matheson M.S., "Pulse Radiolytic Determination of pK for Hydroxyl Ionic Dissociation in Water". *Journal of the American Chemical Society*, 1964, **86**(15): 3175-3176.
70. Poskrebyshev G.A., Neta P., Huie R.E., "Temperature dependence of the acid dissociation constant of the hydroxyl radical". *Journal of Physical Chemistry A*, 2002, **106**(47): 11488-11491.
71. Armstrong D.A., Asmus K.D., Bonifacic M., "Oxide radical anion reactivity with aliphatic amino compounds in aqueous solution: Comparison of H-atom abstraction from C-H and N-H groups by $\cdot\text{O}^-$ and $\cdot\text{OH}$ radicals". *Journal of Physical Chemistry A*, 2004, **108**(12): 2238-2246.
72. Beckman K.B., Ames B.N., "Oxidative decay of DNA". *Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**(32): 19633-19636.
73. Buxton G.V., Greenstock C.L., Helman W.P., Ross A.B., "Critical-Review of Rate Constants for Reactions of Hydrated Electrons, Hydrogen-Atoms and Hydroxyl Radicals ($\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}^-$) in Aqueous-Solution". *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 1988, **17**(2): 513-886.
74. Evans M.D., Dizdaroglu M., Cooke M.S., "Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance". *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, 2004, **567**(1): 1-61.

75. Giulivi C., Boveris A., Cadenas E., "Hydroxyl Radical Generation During Mitochondrial Electron-Transfer and the Formation of 8-Hydroxydesoxyguanosine in Mitochondrial-DNA". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1995, **316**(2): 909-916.
76. Rai P., Cole T.D., Wemmer D.E., Linn S., "Localization of Fe²⁺ at an RTGR sequence within a DNA duplex explains preferential cleavage by Fe²⁺ and H₂O₂". *Journal of Molecular Biology*, 2001, **312**(5): 1089-1101.
77. Anbar M., Meyerste.D, Neta P., "Reactivity of Aromatic Compounds toward Hydroxyl Radicals". *Journal of Physical Chemistry*, 1966, **70**(8): 2660-2662.
78. Raghavan N.V., Steenken S., "Electrophilic Reaction of the OH Radical with Phenol - Determination of the Distribution of Isomeric Dihydroxycyclohexadienyl Radicals". *Journal of the American Chemical Society*, 1980, **102**(10): 3495-3499.
79. Klein G.W., Bhatia K., Madhavan V., Schuler R.H., "Reaction of [•]OH with Benzoic-Acid - Isomer Distribution in Radical Intermediates". *Journal of Physical Chemistry*, 1975, **79**(17): 1767-1774.
80. Lundqvist M.J., Eriksson L.A., "Hydroxyl radical reactions with phenol as a model for generation of biologically reactive tyrosyl radicals". *Journal of Physical Chemistry B*, 2000, **104**(4): 848-855.
81. Solar S., Solar W., Getoff N., "Reactivity of OH with Tyrosine in Aqueous-Solution Studied by Pulse-Radiolysis". *Journal of Physical Chemistry*, 1984, **88**(10): 2091-2095.
82. Vieira A.J.S.C., Steenken S., "Pattern of OH Radical Reaction with Adenine and Its Nucleosides and Nucleotides - Characterization of 2 Types of Isomeric OH Adduct and Their Unimolecular Transformation Reactions". *Journal of the American Chemical Society*, 1990, **112**(19): 6986-6994.
83. Blanksby S.J., Ellison G.B., "Bond dissociation energies of organic molecules". *Accounts of Chemical Research*, 2003, **36**(4): 255-263.
84. Christensen H.C., Sehested K., Hart E.J., "Formation of Benzyl Radicals by Pulse-Radiolysis of Toluene in Aqueous-Solutions". *Journal of Physical Chemistry*, 1973, **77**(8): 983-987.
85. Asmus K.D., Mockel H., Henglein A., "Pulse Radiolytic Study of Site of OH Radical Attack on Aliphatic Alcohols in Aqueous-Solution". *Journal of Physical Chemistry*, 1973, **77**(10): 1218-1221.
86. Gilbert B.C., Holmes R.G.G., Laue H.A.H., Norman R.O.C., "Electron-Spin Resonance Studies .50. Reactions of Alkoxy Radicals Generated from Alkyl Hydroperoxides and Titanium(III) Ion in Aqueous-Solution". *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2*, 1976(9): 1047-1052.
87. Bonifacic M., Stefanic I., Hug G.L., Armstrong D.A., Klaus-Dieter A., "Glycine decarboxylation: The free radical mechanism". *Journal of the American Chemical Society*, 1998, **120**(38): 9930-9940.
88. Rao P.S., Hayon E., "Oxidation of Aromatic-Amines and Diamines by OH Radicals - Formation and Ionization-Constants of Amine Cation Radicals in Water". *Journal of Physical Chemistry*, 1975, **79**(11): 1063-1066.
89. Steenken S., Vieira A.J.S.C., "Water-assisted intramolecular electron transfer from the ring to the side chain in N,N,N',N'-tetraalkyl-para-phenylenediamine radicals - The reverse of side chain deprotonation of radical cations". *Angewandte Chemie-International Edition*, 2001, **40**(3): 571-573.
90. Vieira A.J.S.C., Steenken S., "Pattern of OH Radical Reaction with N⁶,N⁶,9-Trimethyladenine - Dehydroxylation and Ring-Opening of Isomeric OH Adducts". *Journal of Physical Chemistry*, 1991, **95**(23): 9340-9346.
91. Henglein A., *Einführung in die Strahlenchemie*. Weinheim: Verlag Chemie GmbH. 1969.
92. Allen A.O., *The Radiation Chemistry of Water and Aqueous Solutions*: D. Van Nostrand Co. Inc. 1961.

93. Ferradini C., *Biologie de l'Action des Rayonnements Ionisants*. Paris: Masson. 1983.
94. Ore A., "Interaction of Ionizing Radiation with Matter", in *Effects of Ionizing Radiation on DNA*. Springer Verlag. 1978.
95. Freeman G.R., "Absorption of Energy from Ionizing Radiation", in *The Study of Fast Processes and Transient Species by Electron Pulse Radiolysis*. Holland: NATO ASI 1981, D. R. Ridel pub. Co. 1982.
96. Buxton G.V., "Radiation Chemistry of the Liquid State: (1) Water and Homogeneous Aqueous Solutions", in *Radiation Chemistry: Principles and Applications*, Farhataziz N. and Rodgers M.A.J., Editors. Weinheim: VCH. 1987. p. 321-349.
97. Schulte-Frohlinde D., Eiben K., "Solvatisierte Elektronen in Eingefrorenen Lösungen". *Zeitschrift Fur Naturforschung Part a - Astrophysik Physik Und Physikalische Chemie*, 1962, **A 17**(5): 445-446.
98. Von Sonntag C., *The chemical basis of radiation biology*. London: Taylor & Francis. 1987.
99. Bielski B.H.J., Richter H.W., "Study of Superoxide Radical Chemistry by Stopped-Flow Radiolysis and Radiation-Induced Oxygen-Consumption". *Journal of the American Chemical Society*, 1977, **99**(9): 3019-3023.
100. Brusa M.A., Churio M.S., Grela M.A., Bertolotti S.G., Previtali C.M., "Reaction volume and reaction enthalpy upon aqueous peroxodisulfate dissociation: $S_2O_8^{2-} \rightarrow 2SO_4^{\bullet-}$ ". *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2000, **2**(10): 2383-2387.
101. Yu X.Y., Barker J.R., "Hydrogen peroxide photolysis in acidic aqueous solutions containing chloride ions. II. Quantum yield of HO^{\bullet} (aq) radicals". *Journal of Physical Chemistry A*, 2003, **107**(9): 1325-1332.
102. Crowell R.A., Lian R., Sauer M.C., Oulianov D.A., Shkrob I.A., "Geminate recombination of hydroxyl radicals generated in 200 nm photodissociation of aqueous hydrogen peroxide". *Chemical Physics Letters*, 2004, **383**(5-6): 481-485.
103. Schwarz H.A., "Determination of Some Rate Constants for Radical Processes in Radiation Chemistry of Water". *Journal of Physical Chemistry*, 1962, **66**(2): 255-262.
104. Legrini O., Oliveros E., Braun A.M., "Photochemical Processes for Water-Treatment". *Chemical Reviews*, 1993, **93**(2): 671-698.
105. Vieira A.J.S.C., Telo J.P., Dias R.M.B., "Generation of hydroxyl radical by photolysis of mercaptopyridine N-oxides: Application to redox chemistry of purines", in *Oxidants and Antioxidants, Pt B, Methods in Enzymology*. San Diego: Academic Press Inc. 1999, **300**: 194-201.
106. Vieira A.J.S.C., Telo J.P., Dias R.M.B., "Reaction of purines with hydroxyl radical generated by photolysis of mercaptopyridine-N-oxides". *Journal De Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*, 1997, **94**(2): 318-325.
107. Kessirabia M., Gardesalbert M., Julien R., Ferradini C., "Effect of pH on the System $I^-/I_3^-/H_2O_2$ - Application to Iodine Hydrolysis". *Journal De Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*, 1995, **92**(5): 1104-1123.
108. Fenton H.J.H., "Oxidation of tartaric acid in the presence of iron". *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 1894, **65**: 899-910.
109. Rigg T., Taylor W., Weiss J., "The Rate Constant of the Reaction between Hydrogen Peroxide and Ferrous Ions". *Journal of Chemical Physics*, 1954, **22**(4): 575-577.
110. Lloyd R.V., Hanna P.M., Mason R.P., "The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction". *Free Radical Biology and Medicine*, 1997, **22**(5): 885-888.

111. Walling C., Amarnath K., "Oxidation of Mandelic-Acid by Fenton Reagent". *Journal of the American Chemical Society*, 1982, **104**(5): 1185-1189.
112. Bray W.C., Gorin M.H., "Ferryl ion, a compound of tetravalent iron". *Journal of the American Chemical Society*, 1932, **54**: 2124-2125.
113. Wink D.A., Nims R.W., Saavedra J.E., Utermahlen W.E., Ford P.C., "The Fenton Oxidation Mechanism - Reactivities of Biologically Relevant Substrates with 2 Oxidizing Intermediates Differ from Those Predicted for the Hydroxyl Radical". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, **91**(14): 6604-6608.
114. Welch K.D., Davis T.Z., Aust S.D., "Iron autoxidation and free radical generation: Effects of buffers, ligands, and chelators". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2002, **397**(2): 360-369.
115. Von Sonntag C., *Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair*. Heidelberg: Springer-Verlag. 2006.
116. Jiang J., Bank J.F., Scholes C.P., "Subsecond Time-Resolved Spin-Trapping Followed by Stopped-Flow EPR of Fenton Reaction-Products". *Journal of the American Chemical Society*, 1993, **115**(11): 4742-4746.
117. Buettner G.R., Jurkiewicz B.A., "Catalytic metals, ascorbate and free radicals: Combinations to avoid". *Radiation Research*, 1996, **145**(5): 532-541.
118. Lati J., Meyerstein D., "Oxidation of 1st-Row Bivalent Transition-Metal Complexes Containing Ethylenediaminetetraacetate and Nitritotriacetate Ligands by Free-Radicals - Pulse-Radiolysis Study". *Journal of the Chemical Society - Dalton Transactions*, 1978(9): 1105-1118.
119. Tabatabaei A.R., Abbott F.S., "LC/MS analysis of hydroxylation products of salicylate as an indicator of in vivo oxidative stress". *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, **26**(7-8): 1054-1058.
120. Fang X.W., Mark G., vonSonntag C., "OH radical formation by ultrasound in aqueous solutions .1. The chemistry underlying the terephthalate dosimeter". *Ultrasonics Sonochemistry*, 1996, **3**(1): 57-63.
121. Louit G., Hanedanian M., Taran F., Coffigny H., Renault J.P., Pin S., "Determination of hydroxyl rate constants by a high-throughput fluorimetric assay: towards a unified reactivity scale for antioxidants". *Analyst*, 2009, **134**(2): 250-255.
122. Steenken S., "Purine-Bases, Nucleosides, and Nucleotides - Aqueous-Solution Redox Chemistry and Transformation Reactions of Their Radical Cations and e⁻ and OH Adducts". *Chemical Reviews*, 1989, **89**(3): 503-520.
123. Ito T., Kuno S., Uchida T., Fujita S., Nishimoto S., "Properties and Reactivity of the Adenosine Radical Generated by Radiation-Induced Oxidation in Aqueous Solution". *Journal of Physical Chemistry B*, 2009, **113**(1): 389-394.
124. Lomoth R., Naumov S., Brede O., "Transients of the oxidation of pyrimidines with SO₄^{•-}: Structure and reactivity of the resulting radicals". *Journal of Physical Chemistry A*, 1999, **103**(33): 6571-6579.
125. Aravindakumar C.T., Schuchmann M.N., Rao B.S.M., von Sonntag J., von Sonntag C., "The reactions of cytidine and 2'-deoxycytidine with SO₄^{•-} revisited. Pulse radiolysis and product studies". *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2003, **1**(2): 401-408.
126. Rashid R., Mark F., Schuchmann H.P., von Sonntag C., "SO₄^{•-}-Induced Oxidation of 1,3,6-Trimethyluracil and 1,3,5-Trimethyluracil (1,3-Dimethylthymine) by Potassium Peroxodisulfate in Aqueous-Solution - an Interesting Contrast". *International Journal of Radiation Biology*, 1991, **59**(5): 1081-1100.
127. Candeias L.P., Steenken S., "Structure and Acid-Base Properties of One-Electron-Oxidized Deoxyguanosine, Guanosine, and 1-Methylguanosine". *Journal of the American Chemical Society*, 1989, **111**(3): 1094-1099.

128. Wolf P., Jones G.D.D., Candeias L.P., Oneill P., "Induction of Strand Breaks in Polyribonucleotides and DNA by the Sulfate Radical-Anion - Role of Electron Loss Centers as Precursors of Strand Breakage". *International Journal of Radiation Biology*, 1993, **64**(1): 7-18.
129. Hildenbrand K., "Spin-Trapping Studies of the Reaction of the Sulfate Radical-Anion with *N*-1-Substituted Pyrimidine-Bases - Comparison with Continuous-Flow Electron-Paramagnetic-Resonance Experiments". *Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions 2*, 1995(12): 2153-2162.
130. Nicolaescu A.R., Wiest O., Kamat P.V., "Radical-induced oxidative transformation of quinoline". *Journal of Physical Chemistry A*, 2003, **107**(3): 427-433.
131. Manoj P., Prasanthkumar K.P., Manoj V.M., Aravind U.K., Manojkumar T.K., Aravindakumar C.T., "Oxidation of substituted triazines by sulfate radical anion ($\text{SO}_4^{\bullet-}$) in aqueous medium: a laser flash photolysis and steady state radiolysis study". *Journal of Physical Organic Chemistry*, 2007, **20**(2): 122-129.
132. Hori H., Yamamoto A., Koike K., Kutsuna S., Osaka I., Arakawa R., "Persulfate-induced photochemical decomposition of a fluorotelomer unsaturated carboxylic acid in water". *Water Research*, 2007, **41**(13): 2962-2968.
133. Stanbury D.M., "Reduction Potentials Involving inorganic Free Radicals in Aqueous Solution". *Advances in Inorganic Chemistry*, 1989, **33**: 69-138.
134. Hayon E., Treinin A., Wilf J., "Electronic-Spectra, Photochemistry, and Autoxidation Mechanism of Sulfite-Bisulfite-Pyrosulfite Systems - SO_2^- , SO_3^- , SO_4^- , and SO_5^- Radicals". *Journal of the American Chemical Society*, 1972, **94**(1): 47-57.
135. Neta P., Madhavan V., Zemel H., Fessenden R.W., "Rate Constants and Mechanism of Reaction of $\text{SO}_4^{\bullet-}$ with Aromatic-Compounds". *Journal of the American Chemical Society*, 1977, **99**(1): 163-164.
136. Chawla O.P., Fessenden R.W., "Electron-Spin Resonance and Pulse-Radiolysis Studies of Some Reactions of $\text{SO}_4^{\bullet-}$ ". *Journal of Physical Chemistry*, 1975, **79**(24): 2693-2700.
137. Merga G., Aravindakumar C.T., Rao B.S.M., Mohan H., Mittal J.P., "Pulse-Radiolysis Study of the Reactions of $\text{SO}_4^{\bullet-}$ with Some Substituted Benzenes in Aqueous-Solution". *Journal of the Chemical Society - Faraday Transactions*, 1994, **90**(4): 597-604.
138. Norman R.O.C., Storey P.M., West P.R., "Electron Spin Resonance Studies .25. Reactions of Sulphate Radical Anion with Organic Compounds". *Journal of the Chemical Society B - Physical Organic*, 1970(6): 1087-1095.
139. Gilbert B.C., Smith J.R.L., Taylor P., Ward S., Whitwood A.C., "The interplay of electronic, steric and stereoelectronic effects in hydrogen-atom abstraction reactions of $\text{SO}_4^{\bullet-}$, revealed by EPR spectroscopy". *Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions 2*, 1999(8): 1631-1637.
140. Huie R.E., Clifton C.L., Kafafi S.A., "Rate Constants for Hydrogen Abstraction Reactions of the Sulfate Radical, $\text{SO}_4^{\bullet-}$ - Experimental and Theoretical Results for Cyclic Ethers". *Journal of Physical Chemistry*, 1991, **95**(23): 9336-9340.
141. Stasko A., Brezova V., Liptakova M., Savel J., "Thermally initiated radical reactions of $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$: EPR spin trapping investigations". *Magnetic Resonance in Chemistry*, 2000, **38**(11): 957-962.
142. Tsao M.S., Wilmarth W.K., "The Aqueous Chemistry of Inorganic Free Radicals .1. The Mechanism of the Photolytic Decomposition of Aqueous Persulfate Ion and Evidence Regarding the Sulfatehydroxyl Radical Interconversion Equilibrium". *Journal of Physical Chemistry*, 1959, **63**(3): 346-353.
143. Crist R.H., "The quantum efficiency of the photochemical decomposition of potassium persulfate". *Journal of the American Chemical Society*, 1932, **54**: 3939-3942.
144. Heidt L.J., "The photolysis of persulfate". *Journal of Chemical Physics*, 1942, **10**(5): 297-302.

145. Yu X.Y., Bao Z.C., Barker J.R., "Free radical reactions involving $\text{Cl}^{\bullet-}$, Cl_2^- , and $\text{SO}_4^{\bullet-}$ in the 248 nm photolysis of aqueous solutions containing $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ and Cl^- ". *Journal of Physical Chemistry A*, 2004, **108**(2): 295-308.
146. Alam M.S., Rao B.S.M., Janata E., "•OH reactions with aliphatic alcohols: evaluation of kinetics by direct optical absorption measurement. A pulse radiolysis study". *Radiation Physics and Chemistry*, 2003, **67**(6): 723-728.
147. Woods R., Kolthoff I.M., Meehan E.J., "Arsenic(IV) as an Intermediate in Induced Oxidation of Arsenic(III) by Iron(II) - Persulfate Reaction and Photoreduction of Iron(III).1. Absence of Oxygen". *Journal of the American Chemical Society*, 1963, **85**(16): 2385-2390.
148. Heckel E., Henglein A., Beck G., "Pulsradiolytische Untersuchung Des Radikalanions $\text{SO}_4^{\bullet-}$ ". *Berichte Der Bunsen - Gesellschaft Fur Physikalische Chemie*, 1966, **70**(2): 149-154.
149. Wheeler C.R., Salzman J.A., Elsayed N.M., Omaye S.T., Korte D.W., "Automated Assays for Superoxide-Dismutase, Catalase, Glutathione-Peroxidase, and Glutathione-Reductase Activity". *Analytical Biochemistry*, 1990, **184**(2): 193-199.
150. Flohe L., Gunzler W.A., Schock H.H., "Glutathione Peroxidase - Selenoenzyme". *Febs Letters*, 1973, **32**(1): 132-134.
151. Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M., "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, **90**(17): 7915-7922.
152. Bors W., Heller W., Michel C., Saran M., "Flavonoids as Antioxidants - Determination of Radical-Scavenging Efficiencies". *Methods in Enzymology*, 1990, **186**: 343-355.
153. Halliwell B., "Vitamin C: Antioxidant or pro-oxidant in vivo?". *Free Radical Research*, 1996, **25**(5): 439-454.
154. Halliwell B., "Antioxidants in human health and disease". *Annual Review of Nutrition*, 1996, **16**: 33-50.
155. Rice-Evans C., "Flavonoid antioxidants". *Current Medicinal Chemistry*, 2001, **8**(7): 797-807.
156. Ames B.N., Cathcart R., Schwiers E., Hochstein P., "Uric-acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant-caused and radical-caused aging and cancer - A hypothesis". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - Biological Sciences*, 1981, **78**(11): 6858-6862.
157. Frei B., Kim M.C., Ames B.N., "Ubiquinol-10 Is an Effective Lipid-Soluble Antioxidant at Physiological Concentrations". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, **87**(12): 4879-4883.
158. Meister A., "Glutathione Ascorbic-Acid Antioxidant System in Animals". *Journal of Biological Chemistry*, 1994, **269**(13): 9397-9400.
159. Denisov E.T., Afanas'ev I.B., *Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology*. Boca Raton, FL: CRC Press. 2005.
160. Laranjinha J., Cadenas E., "Redox cycles of caffeic acid, α -tocopherol, and ascorbate: Implications for protection of low-density lipoproteins against oxidation". *IUBMB Life*, 1999, **48**(1): 57-65.
161. May J.M., Cobb C.E., Mendiratta S., Hill K.E., Burk R.F., "Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase". *Journal of Biological Chemistry*, 1998, **273**(36): 23039-23045.
162. Koppenol W.H., "Oxyradical Reactions - from Bond-Dissociation Energies to Reduction Potentials". *Febs Letters*, 1990, **264**(2): 165-167.

163. Fontecave M., Pierre J.L., "Oxygen Activation and Toxicity - Principles for an Efficient Antioxidant Therapy". *Bulletin De La Societe Chimique De France*, 1991(4): 505-520.
164. Madej E., Wardman P., "The oxidizing power of the glutathione thiy radical as measured by its electrode potential at physiological pH". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007, **462**(1): 94-102.
165. Simic M.G., Jovanovic S.V., "Antioxidation Mechanisms of Uric-Acid". *Journal of the American Chemical Society*, 1989, **111**(15): 5778-5782.
166. Pazos M., Andersen M.L., Medina I., Skibsted L.H., "Efficiency of natural phenolic compounds regenerating α -tocopherol from α -tocopheroxyl radical". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, **55**(9): 3661-3666.
167. Buettner G.R., Jurkiewicz B.A., "Ascorbate Free-Radical as a Marker of Oxidative Stress - an EPR Study". *Free Radical Biology and Medicine*, 1993, **14**(1): 49-55.
168. Zhu Z.Y., Gunner M.R., "Energetics of quinone-dependent electron and proton transfers in Rhodobacter sphaeroides photosynthetic reaction centers". *Biochemistry*, 2005, **44**(1): 82-96.
169. Brandwilliams W., Cuvelier M.E., Berset C., "Use of a Free-Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity". *Food Science and Technology-Lebensmittel - Wissenschaft & Technologie*, 1995, **28**(1): 25-30.
170. Dalal N.S., Kennedy D.E., McDowell C.A., "Electron-Paramagnetic Resonance (EPR) and Electron-Nuclear Double-Resonance (ENDOR) of Hyperfine Interactions in Solutions of α, α' -Diphenyl- β -picryl Hydrazyl (DPPH)". *Journal of Chemical Physics*, 1973, **59**(6): 3403-3410.
171. Miller N.J., RiceEvans C., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A., "A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and Its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates". *Clinical Science*, 1993, **84**(4): 407-412.
172. Cao G.H., Alessio H.M., Cutler R.G., "Oxygen-Radical Absorbency Capacity Assay for Antioxidants". *Free Radical Biology and Medicine*, 1993, **14**(3): 303-311.
173. Shi X., Dalal N.S., Jain A.C., "Antioxidant Behavior of Caffeine - Efficient Scavenging of Hydroxyl Radicals". *Food and Chemical Toxicology*, 1991, **29**(1): 1-6.
174. Stadler R.H., Fay L.B., "Antioxidative Reactions of Caffeine - Formation of 8-Oxocaffeine (1,3,7-Trimethyluric Acid) in Coffee Subjected to Oxidative Stress". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, **43**(5): 1332-1338.
175. Glantzounis G.K., Tsimoyiannis E.C., Kappas A.M., Galaris D.A., "Uric acid and oxidative stress". *Current Pharmaceutical Design*, 2005, **11**(32): 4145-4151.
176. Kono Y., Kobayashi K., Tagawa S., Adachi K., Ueda A., Sawa Y., Shibata H., "Antioxidant activity of polyphenolics in diets - Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen". *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1997, **1335**(3): 335-342.
177. Higdon J.V., Frei B., "Tea catechins and polyphenols: Health effects, metabolism, and antioxidant functions". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2003, **43**(1): 89-143.
178. Privat C., Telo J.P., Bernardes-Genisson V., Vieira A., Souchard J.P., Nepveu F., "Antioxidant properties of *trans*- ϵ -viniferin as compared to stilbene derivatives in aqueous and nonaqueous media". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, **50**(5): 1213-1217.
179. Vanegas H., Schaible H.G., "Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord (vol 64, pg 327, 2001)". *Progress in Neurobiology*, 2001, **65**(6): 609-609.

180. Tsai A.L., Wu G., Palmer G., Bambai B., Koehn J.A., Marshall P.J., Kulmacz R.J., "Rapid kinetics of tyrosyl radical formation and heme redox state changes in prostaglandin H synthase-1 and-2". *Journal of Biological Chemistry*, 1999, **274**(31): 21695-21700.
181. Blobaum A.L., Marnett L.J., "Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition". *Journal of Medicinal Chemistry*, 2007, **50**(7): 1425-1441.
182. Marnett L.J., "Cyclooxygenase mechanisms". *Current Opinion in Chemical Biology*, 2000, **4**(5): 545-552.
183. Smith W.L., DeWitt D.L., Garavito R.M., "Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology". *Annual Review of Biochemistry*, 2000, **69**: 145-182.
184. Gursoy A., Demirayak S., Capan G., Erol K., Vural K., "Synthesis and preliminary evaluation of new 5-pyrazolinone derivatives as analgesic agents". *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2000, **35**(3): 359-364.
185. Hamerschlak N., Maluf E., Cavalcanti A.B., Avezum A., Eluf-Neto J., Falcao R.P., Lorand-Metze I.G.H., Goldenberg D., Santana C.L., Rodrigues D.D.W., Passos L.N.D., Coelho E.O.D., Pintao M.C.T., de Souza H.M., Borbolla J.R., Pasquini R., "Incidence and risk factors for agranulocytosis in Latin American countries - the Latin study". *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2008, **64**(9): 921-929.
186. Ibanez L., Vidal X., Ballarin E., Laporte J.R., "Agranulocytosis associated with dipyron (metamizol)". *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2005, **60**(11): 821-829.
187. Pierre S.C., Schmidt R., Brenneis C., Michaelis M., Geisslinger G., Scholich K., "Inhibition of cyclooxygenases by dipyron". *British Journal of Pharmacology*, 2007, **151**(4): 494-503.
188. Svistunenko D.A., "Reaction of haem containing proteins and enzymes with hydroperoxides: The radical view". *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 2005, **1707**(1): 127-155.
189. Tsai A.L., Wei C.H., Baek H.K., Kulmacz R.J., VanWart H.E., "Comparison of peroxidase reaction mechanisms of prostaglandin H synthase-1 containing heme and mangano protoporphyrin IX". *Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**(14): 8885-8894.
190. Lucas R., Warner T.D., Vojnovic I., Mitchell J.A., "Cellular mechanisms of acetaminophen: role of cyclooxygenase". *Faseb Journal*, 2005, **19**(2): 635-637.
191. Ouellet M., Percival M.D., "Mechanism of acetaminophen inhibition of cyclooxygenase isoforms". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2001, **387**(2): 273-280.
192. Vapaatalo H., "Free-Radicals and Antiinflammatory Drugs". *Medical Biology*, 1986, **64**(1): 1-7.
193. Halliwell B., Houlst J.R., Blake D.R., "Oxidants, Inflammation, and Anti-Inflammatory Drugs". *Faseb Journal*, 1988, **2**(13): 2867-2873.
194. Costa D., Marques A.P., Reis R.L., Lima J., Fernandes E., "Inhibition of Human Neutrophil Oxidative Burst by Pyrazolone Derivatives". *Free Radical Biology and Medicine*, 2006, **40**(4): 632-640.
195. Agundez J.A.G., Martinez C., Benitez J., "Metabolism of aminopyrine and derivatives in man - *in vivo* study of monomorphic and polymorphic methabolic pathways". *Xenobiotica*, 1995, **25**(4): 417-427.

3. Parte Experimental

3.1. Reagentes

A maior parte dos compostos utilizados neste trabalho (excepto os sintetizados, ver 3.2) encontram-se disponíveis no mercado em elevado grau de pureza, pelo que foram utilizados sem posterior purificação.

Tabela 3.1 – Reagentes utilizados

Reagente	Pureza	Marca
<i>Xantinas</i>		
Xantina	99%	Sigma
1-Metilxantina		Sigma
3-Metilxantina		Sigma
7-Metilxantina		Fluka
9-Metilxantina	> 98%	Fluka
Xantosina	> 99%	Sigma
Teofilina (1,3-dimetilxantina)	> 99%	Sigma
Paraxantina (1,7-dimetilxantina)	98%	Sigma
1,9-Dimetilxantina		Fluka
Teobromina (3,7-dimetilxantina)	> 99%	Sigma
3,9-Dimetilxantina		Fluka
<i>Antipirinas</i>		
Antipirina		Sigma
4-(<i>N,N</i> -dimetil)-aminoantipirina		Sigma
4-(<i>N,N</i> -di(trideuterometil))-aminoantipirina		(sintetizada)
4-(<i>N</i> -metil)-aminoantipirina		(sintetizada)
4-aminoantipirina	98%	Aldrich
<i>Ácido cinâmico e derivados</i>		
Ácido cinâmico	> 99%	Fluka
Ácido <i>o</i> -cumárico (ácido 2-hidroxicinâmico)	> 97%	Fluka
Ácido <i>m</i> -cumárico (ácido 3-hidroxicinâmico)	> 98%	Fluka
Ácido <i>p</i> -cumárico (ácido 4-hidroxicinâmico)	> 98%	Fluka
Ácido cafeico (ácido 3,4-di-hidroxicinâmico)	> 98%	Fluka
Ácido 2,4-di-hidroxicinâmico	97%	Aldrich
Ácido 3-fenil-láctico	> 97%	Fluka

Tabela 3.1 – Reagentes utilizados (continuação)

<i>Outros padrões</i>		
Fenilacetaldéido	> 90%	Aldrich
Benzaldéido	> 99%	Fluka
<i>Geradores de radicais</i>		
Persulfato de potássio	+99%	Aldrich
Peróxido de hidrogénio	30% (p/v)	Panreac
<i>N</i> -óxido de 4-mercaptopiridina		(sintetizado)
<i>Outros reagentes (eluente)</i>		
Metanol (HPLC gradiente)	99,9%	Panreac
Acetonitrilo (HPLC gradiente)	99,9%	Panreac
Fosfato diácido de potássio	+99%	Aldrich
Fosfato dibásico de sódio	+99%	Aldrich
Ácido fórmico	98%	Panreac
Acetato de amónio	98%	Sigma
<i>Sistema de Fenton</i>		
Na ₂ EDTA (di-hidrato)	99%	Riedel-de-Haën
Sulfato de Ferro (II) (hepta-hidrato)	99,5%	Pronalys
Cloreto de Titânio (III) (solução em 20-30% HCl)	> 10%	Aldrich
Ácido ascórbico	>99%	Fluka
<i>Síntese de N-óxido de 4-mercaptopiridina</i>		
<i>N</i> -óxido de 4-nitropiridina	97%	Aldrich
Tiourea	>99%	Fluka
Cloreto de acetilo	98%	Panreac
Pentacloreto de fósforo		
<i>N,N</i> -Dimetilanilina		
Etanol	99,5%	Panreac
<i>Síntese de 4-(N-metil)-aminoantipirina</i>		
Anidrido ftálico	>98%	Merck
Sulfato dimetílico	>99%	Merck
Iodeto de metilo	99.5%	Sigma
Iodeto de metilo – d ₃	99.5%	Aldrich
<i>Agentes de derivatização para GC-MS</i>		
<i>N</i> -Metil- <i>N</i> -(trimetilsilil)-trifluoroacetamida		Fluka

3.2. Sínteses

3.2.1. *N*-óxido de 4-mercaptopiridina

Preparou-se o *N*-óxido de 4-cloropiridina (rendimento 66%, ponto de fusão 164-166°C com decomposição) por reacção de *N*-óxido de 4-nitropiridina com cloreto de acetilo previamente seco [1]. De seguida, fez-se reagir o composto obtido com tiourea em etanol seco [2]. Ao sal de isotuironio resultante adicionou-se uma solução aquosa de Na₂CO₃ e Na₂S, e, após hidrólise ácida, obteve-se o *N*-óxido de 4-mercaptopiridina. Recristalizou-se o composto de uma mistura etanol/água (rendimento global 22%, ponto de fusão 144-146 °C com decomposição).

3.2.2. 4-(*N*-metil)-aminoantipirina

Adaptou-se uma metodologia previamente publicada [3] para a síntese da 4-(*N*-metil)-aminoantipirina, que envolve a formação inicial de 4-ftalimidoantipirina, seguida de semi-hidrólise com hidróxido de sódio e subsequente metilação do sal de sódio da 4-(*N*-ftalil)-aminoantipirina com sulfato dimetílico. Após hidrólise ácida da 4-(*N*-metil-*N*-ftalil)-aminoantipirina, obteve-se a 4-(*N*-metil)-aminoantipirina sob a forma de um óleo amarelo com um rendimento global de 4%. Caracterizou-se o produto por espectrometria de massa e RMN de ¹H e ¹³C. A atribuição de todos os sinais baseou-se nas correlações observadas nos espectros de HMQC e HMBC (ver Apêndice A).

IV: $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (NaCl)/cm⁻¹ 1651 (C=O).

¹H RMN: δ (CDCl₃) 7.38-7.32 (4 H, m, Aromático), 7.15 (1 H, t, J 6.9, 4'-H), 2.77 (3 H, s, *N*(1)-CH₃), 2.73 (3 H, s, *N*⁴-CH₃), 2.16 (3 H, s, C(5)-CH₃);

¹³C RMN: δ (CDCl₃) 162.7 (C3), 140.2 (C5), 135.7 (C1'), 129.5 (C3'+C5'), 124.4 (C4'), 123.4 (C2'+C6'), 38.1 (*N*(1)-CH₃), 35.1 (*N*⁴-CH₃), 11.3 (C(5)-CH₃).

GC-MS: *m/z* (EI) 217 (M⁺, 7%), 202 (M - CH₃, 0,5), 98 (M - C₆H₅NCO, 4), 83 (M - C₆H₅NCO- CH₃, 28), 77 (C₆H₅, 7), 56 (CH₃CN CH₃, 100).

Dado o fraco rendimento em 4-(*N*-metil)-aminoantipirina através da técnica acima descrita, preparou-se também este composto por metilação da 4-aminoantipirina com iodeto de metilo em tetra-hidrofurano seco. Controlou-se a reacção por cromatografia em camada fina e interrompeu-se quando a quantidade de produto dimetilado começou a

exceder a do pretendido. Após concentração da mistura das três antipirinas, isolou-se a 4-(*N*-metil)-aminoantipirina por HPLC semi-preparativa em fase reversa (ver 3.5.2). Embora esta reacção e respectivo tratamento sejam mais simples do que o procedimento anterior, tem a desvantagem de ser necessário despende mais tempo para isolar o produto final.

Sintetizou-se o análogo da 4-(*N,N*-dimetil)-aminoantipirina deuterado nos grupos metilo em N^4 – 4-(*N,N*-di(trideuterometil))-aminoantipirina – através da técnica acima descrita com iodeto de metilo deuterado.

3.3. Preparação de soluções

As soluções aquosas dos compostos a estudar foram preparadas com água ultra-pura (resistividade 18 MΩ cm) obtida com um sistema Millipore Milli-Q 50.

A tamponização das soluções em meio neutro foi feita por adição de uma mistura equimolar de KH_2PO_4 e de Na_2HPO_4 , tipicamente 5 mM cada. Sempre que necessário, fez-se o ajuste do valor de pH pretendido com soluções de NaOH ou HClO_4 .

De um modo geral, as soluções foram preparadas imediatamente antes da sua utilização nas respectivas experiências. Nos casos em que houve necessidade de conservá-las por períodos longos (superiores a 24 horas), foram guardadas protegidas da luz e a 4°C, e testou-se a sua composição antes de nova utilização.

Sempre que necessário desarejaram-se as soluções, para remover o oxigénio atmosférico, fazendo borbulhar previamente e durante a utilização uma corrente de azoto ou de árgon. As soluções a submeter a radiólise gama foram desarejadas com árgon (reacção com o radical anião sulfato) ou desarejadas e saturadas com N_2O (reacção com o radical hidroxilo).

3.4. Geração de radicais

3.4.1. Fotólise UV

A geração de radicais por via fotolítica foi efectuada por exposição das soluções contendo os respectivos precursores a radiação UV emitida por uma lâmpada de mercúrio de alta pressão Hanau de 150 W. O radical HO^\bullet é obtido por fotólise quer de H_2O_2 em soluções com pH abaixo de 8, quer de *N*-óxido de 4-mercaptopiridina. Este último utilizou-se em soluções muito básicas (pH superior a 12) sempre que se pretendeu obter o radical anião

$O^{\bullet-}$, a base conjugada do radical HO^{\bullet} . O radical anião $SO_4^{\bullet-}$ é produzido por fotólise de persulfato de potássio seja qual for o pH do meio.

As amostras colocaram-se numa célula de quartzo de 1 cm de percurso óptico e 3 mL de volume. A extensão da oxidação radicalar dos compostos em estudo foi analisada variando a distância da célula ao centro da lâmpada (Figura 3.1) através de um suporte regulável e o tempo de exposição à radiação UV.

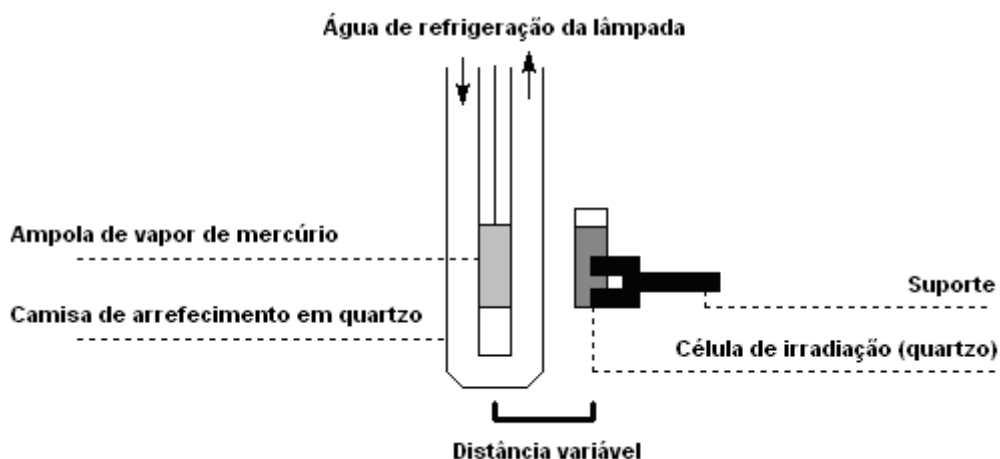


Figura 3.1 – Montagem para fotólise UV de soluções aquosas. A distância mínima permitida ao centro da lâmpada é de 2,5 cm.

Nas experiências em que se pretendeu um meio isento de oxigénio, desarejaram-se as amostras com árgon directamente na célula de quartzo durante 5 minutos imediatamente antes da irradiação. Utilizou-se um procedimento análogo para a saturação de soluções com oxigénio, tendo-se mantido a corrente de gás durante a irradiação.

As irradiações efectuadas para isolamento e caracterização dos produtos de reacção foram conduzidas num reactor cilíndrico de 800 mL no qual é colocada no centro a mesma lâmpada UV acima descrita. A mistura reaccional é continuamente agitada durante o tempo de fotólise de modo a garantir a sua homogeneidade.

3.4.2. Reacção de Fenton

O estudo da oxidação radicalar de substratos com elevada fotodegradação levou a que se tivesse optado por gerar os radicais oxidantes por via química através do sistema de Fenton. Adicionaram-se à solução aquosa contendo o substrato, por esta ordem, pequenas quantidades de soluções concentradas do agente precursor do radical oxidante, do ião

metálico (complexado ou não) e de ácido ascórbico (apenas para a reacção com radical hidroxilo a pH 7), de forma a que a variação do volume inicial fosse desprezável.

Utilizou-se H_2O_2 e $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ como agentes precursores do radical hidroxilo e do radical anião sulfato, respectivamente. Nas reacções a pH 7, utilizou-se uma solução aquosa concentrada (0,1 M) de ião Fe^{2+} complexado com EDTA, previamente preparada por adição estequiométrica de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{SO}_4$ a uma solução alcalina de EDTA dissódico. Nas reacções efectuadas em meio ácido utilizou-se simplesmente o ião Fe^{2+} na forma de sulfato. Nalguns casos, na reacção do substrato com o radical anião sulfato utilizou-se o ião Ti^{3+} como redutor de persulfato.

O tempo de reacção das misturas reaccionais controlou-se pelo instante da injeção da amostra no sistema cromatográfico, uma vez que a concentração de metanol presente no eluente é suficientemente elevada para captar os radicais HO^\bullet e $\text{SO}_4^{\bullet-}$ mais rapidamente do que qualquer soluto da mistura reaccional.

3.4.3. Irradiação gama

As amostras foram irradiadas numa fonte de cobalto 60 instalada na Unidade de Tecnologias de Radiação do Instituto Tecnológico Nuclear. Esta unidade industrial está preparada para a irradiação de produtos para fins tão diversos como o alimentar, médico, laboratorial, conservação e restauro, que, depois de devidamente acondicionados em embalagens padrão, são conduzidos até ao centro da câmara onde se encontra a fonte radioactiva. No caso das amostras em estudo, estas colocaram-se simplesmente a uma distância da fonte previamente definida cujo valor de débito de dose é conhecido. No entanto, e uma vez que a fonte vai perdendo actividade ao longo do tempo, utilizaram-se dosímetros do tipo Perspex (Harwell Gammachrome YR[®]) para calcular o valor do débito de dose nas posições onde as amostras foram irradiadas. Estes dosímetros são materiais poliméricos (polimetilmetacrilato) transparentes que escurecem quando expostos à radiação. A variação da densidade óptica, medida directamente num espectrofotómetro, é função da dose de radiação absorvida. Em todas as irradiações efectuadas, o débito de dose foi de 45 Gymin^{-1} .

As amostras a irradiar prepararam-se por dissolução do substrato (10 mM e 2 mM para os derivados da antipirina e do ácido cinâmico, respectivamente) em 3 mL de água MilliQ. O pH do meio foi acertado com tampão fosfato 5 mM (pH 7) ou com KH_2PO_4 5 mM

(pH 2, ajuste com ácido perclórico). Para a reacção com o radical HO[•], as amostras saturaram-se previamente em N₂O durante cerca de 15 minutos. No caso da reacção com o radical anião SO₄^{•-}, adicionou-se 40,5 mg persulfato de potássio (50 mM) e 28 µL de *tert*-butanol destilado (100 mM), e saturou-se com árgon durante cerca de 15 minutos.

As amostras foram irradiadas durante 60 min, o que equivale a uma dose absorvida de 2,7 kGy. Dado que se conhece o rendimento radiolítico global do radical HO[•] em soluções aquosas saturadas em N₂O (ver Capítulo 2, $G(\text{HO}^{\bullet}) = 5,6 (100 \text{ eV})^{-1}$) consegue-se estimar a quantidade de radicais HO[•] formados durante o tempo de irradiação em cada amostra. Para um volume de 3 mL, formam-se cerca de 4,70 µmol de radicais HO[•], o que, caso tivessem sido gerados no instante inicial, corresponderia a uma concentração total de 1,57 mM.

3.5. Sistemas cromatográficos

3.5.1. Cromatografia líquida de alta eficiência analítica

A análise das misturas reaccionais por HPLC fez-se por detecção óptica com matriz de fotodíodos, nalguns casos acoplada à espectroscopia de massa. Os solventes utilizados na eluição das amostras foram previamente destilados e filtrados. Nos sistemas desprovidos de desgaseificador, o eluente foi previamente desarejado com hélio.

A concentração de cada um dos solutos determinou-se por integração da área dos respectivos picos observados nos cromatogramas obtidos por detecção óptica, depois de se ter verificado uma relação de linearidade dentro das gamas de concentração utilizadas (tipicamente 0 - 1 mM).

3.5.1.1. Sistema Shimadzu

Utilizou-se este sistema na análise das misturas reaccionais da xantina e seus derivados metilados (Capítulo 4). As soluções aquosas contendo os dois substratos (0,5 mM cada), K₂S₂O₈ 20 mM e tampão fosfato 5 mM foram previamente desarejadas com árgon. As amostras, colocadas em células de quartzo a 6 cm de distância ao centro da lâmpada de UV, foram irradiadas entre 0 e 20 minutos.

A análise quantitativa da evolução dos substratos destas misturas em função do tempo de irradiação fez-se por HPLC recorrendo a um sistema composto por uma bomba para eluentes Shimadzu LC-10AS, um injector Reodhyne 7125 com um volume de injeção

de 20 μL , uma coluna de fase reversa de octadecilsilano Merck Purospher® STAR RP18e (comprimento 25 cm e diâmetro 4 mm) e um detector óptico de matriz de fotodíodos Shimadzu SPD-M10A. A aquisição foi feita na gama entre 200 e 360 nm.

A eluição das amostras fez-se em modo isocrático. A composição do eluente e o caudal utilizado foram ajustados consoante o par de xantinas de cada mistura reaccional, de forma a otimizar a sua separação e, conseqüentemente, obter maior precisão na análise quantitativa. Tipicamente, utilizaram-se soluções aquosas contendo 0-20% (v/v) de metanol ou 0-10% (v/v) de acetonitrilo, eluídas entre 0,6 e 1,2 mLmin^{-1} . Cada eluente foi tamponizado a pH abaixo de 4 (com KH_2PO_4) de modo a garantir a eluição dos substratos na sua forma não dissociada.

No caso particular da análise dos produtos de desmetilação da teofilina (ver 4.7), utilizou-se um eluente composto por uma solução aquosa de KH_2PO_4 5 mM (pH 4) com 20% de metanol a 0,8 mLmin^{-1} .

3.5.1.2. Sistema Thermo Finnigan

A detecção e identificação dos produtos das misturas reaccionais de derivados de 4-aminoantipirina foram efectuadas por HPLC de fase reversa com detecção óptica entre 200 e 600 nm (matriz de fotodíodos) acoplada à espectrometria de massa (Capítulo 5). As misturas reaccionais foram preparadas em simultâneo e analisadas sequencialmente, pelo que os tempos de reacção são diferentes. No entanto, essa diferença, para as condições experimentais utilizadas, tem uma interferência muito reduzida nos respectivos perfis cromatográficos em termos qualitativos e quantitativos.

O sistema cromatográfico consiste no modelo Thermo Finnigan Surveyor composto por uma bomba, um injector automático, uma unidade de desgaseificação de eluente e um detector de fotodíodos. As amostras (volume de injeção 20 μL) foram eluídas em modo isocrático a 1 mLmin^{-1} numa coluna de fase reversa RP18 (LiChrospher®, 250-4 mm, 5 μm , Merck) com uma solução aquosa de metanol a 20% (v/v) tamponizada com acetato de amónio 50 mM (pH 7).

A detecção mássica foi efectuada com um espectrómetro de massa Thermo Finnigan LCQ Deca XP com analisador do tipo armadilha de iões e com fonte de ionização por *electrospray* em modo positivo (ESI+). Fez-se a aquisição na gama espectral 50-1000 Da. Os dados foram registados e tratados com o *software* Xcalibur (versão 1.3).

3.5.1.3. Sistema Waters

Este sistema HPLC é composto por uma bomba gradiente quaternária para eluentes Waters 600, um sistema de degaseificação por vácuo, um amostrador automático 717 com volume de injeção variável até 200 μL e um detector UV-Vis de matriz de fotodíodos Waters 996. Utilizou-se uma coluna de fase reversa octadecilsilano Merck Purospher® STAR RP18e (comprimento 250 mm e diâmetro 4 mm, diâmetro das partículas de enchimento 5 μm). A aquisição foi feita na gama entre 200 e 400 nm.

Para uma melhor caracterização de algumas amostras, utilizou-se este cromatógrafo acoplado a um espectrómetro de massa VG Platform (Micromass, UK Ltd) com um analisador do tipo quadrupolo e fonte de ionização por *electrospray*. Tipicamente, trabalhou-se em modo de ionização positivo, com uma voltagem de cone variável entre 20 e 50 V, uma tensão aplicada no capilar de 3,5 kV, a temperatura da fonte entre 100 e 140°C e fez-se a aquisição na gama de m/z 50-500 Da. Utilizou-se o azoto como gás de nebulização com um caudal de 10 Lh^{-1} .

Tipicamente, nas eluições feitas em meio ácido (pH 3) utilizou-se ácido fórmico 0,1 % enquanto que em meio neutro se utilizou acetato de amónio 50 mM, uma vez que estes tampões são compatíveis com a análise por espectrometria de massa.

A automatização e controlo do sistema HPLC-MS e o tratamento de dados fizeram-se a partir do *software* MassLynx™.

3.5.2. Cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa

O sistema Shimadzu acima descrito utilizou-se igualmente para isolar compostos obtidos por síntese (4-(*N*-metil)-aminoantipirina, Capítulo 5) ou produtos finais estáveis de misturas reaccionais para posterior identificação e caracterização.

Utilizou-se uma coluna semi-preparativa de fase reversa de octadecilsilano Merck Purospher® STAR RP18e (comprimento 250 mm e diâmetro 10 mm) de características idênticas à utilizada para a cromatografia analítica, um injetor Reodhyne 7125 com um volume de injeção de 500 μL e um caudal de eluição entre 2,5 mLmin^{-1} e 3 mLmin^{-1} , conforme a composição do eluente e produtos a separar.

Após identificação do respectivo pico de absorção, cada produto foi recolhido à saída do detector de matriz de fotodíodos Shimadzu SPD-M10A. As amostras recolhidas evaporaram-se à secura e os respectivos produtos analisados e caracterizados. No caso da

análise por GC das fracções secas, não se removeu previamente o tampão do eluente utilizado na separação por HPLC semi-preparativa. No entanto, fez-se essa remoção (por extracção líquido-líquido) nas amostras para identificação por RMN.

3.5.3. Cromatografia gasosa com detecção mássica

3.5.3.1. Preparação das amostras

Para garantir a integridade da coluna de GC e um aumento da volatilidade dos compostos a analisar, as amostras contendo padrões ou produtos de reacção com átomos de hidrogénio lábeis foram evaporadas e previamente derivatizadas com a introdução de grupos trimetilsililo por adição de 50 μL de *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) com aquecimento a cerca de 50 a 70°C durante 30 a 60 min.

3.5.3.2. Sistema Agilent

A análise qualitativa de padrões e de produtos de reacção de xantinas e ácidos cinâmicos previamente derivatizados efectuou-se com um cromatógrafo gasoso Agilent 6850 acoplado a um espectrómetro de massa Agilent 5975C VL MSD. A separação realizou-se com auxílio de uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (5% fenilmetilsiloxano, modelo HP 19091S-433E, comprimento 30 m, diâmetro interno 0,25 mm com espessura de filme 0,25 μm , Agilent Technologies Inc.). Utilizaram-se as seguintes condições experimentais: caudal de gás de arrastamento (hélio) 1 mLmin^{-1} , temperatura do injector 250°C, temperatura do detector 280°C, modo *splitless*, volume da injeção 1,0 μL , pressão do gás de arrastamento 10,47 psi, caudal de purga 20 mLmin^{-1} , velocidade média 37 cm s^{-1} . Os espectros de massa foram obtidos por ionização por impacto electrónico (EI) com uma energia de fonte iónica de 70 eV, adquiridos com recurso ao *software* MSD ChemStation (Agilent) e comparados com a base de dados NIST05.

Na análise dos produtos de oxidação da teofilina (ver 4.7) programou-se o forno de GC com uma temperatura inicial de 100°C durante 3 min, seguido de uma rampa de 6°C min^{-1} até aos 250°C e uma isotérmica a esta temperatura durante 3 min.

3.5.3.3. Sistema Carlo Erba

A separação e detecção de derivados da aminopirina previamente derivatizados foi efectuada com um cromatógrafo gasoso Carlo Erba Vega Series 2 acoplado a um espectrómetro de massa Carlo Erba QMD1000. Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida DB-5MS (5% fenil-95% dimetilpolisiloxano, comprimento 30 m, diâmetro interno 0,32 mm com espessura de filme 0,25 μm , Agilent – J&W Scientific). Utilizaram-se as seguintes condições experimentais: caudal de gás de arrastamento (hélio) 1,5 mLmin^{-1} , temperatura da fonte iónica 150°C, temperatura da linha de transferência 220°C, volume da injeção 1,0 μL , pressão do gás de arrastamento 12,33 psi. Os espectros de massa foram obtidos por ionização por impacto electrónico (EI) com uma energia de fonte iónica de 70 eV e adquiridos com recurso ao *software* MassLab™ (Micromass).

A 4-(*N*-metil)-aminoantipirina caracterizou-se sem derivatização prévia programando o forno com uma temperatura inicial de 200°C durante 3 min, seguido de uma rampa de 3°C min^{-1} até aos 250°C. Fez-se a aquisição na gama de m/z entre 50 e 350 Da.

As soluções aquosas de ácido cinâmico e seus derivados irradiadas na fonte de ^{60}Co analisaram-se, após evaporação do solvente e derivatização, com o forno de GC programado da seguinte forma: na reacção com o radical hidroxilo utilizou-se uma isotérmica inicial de 60°C durante 3 min, seguido de uma primeira rampa de 10°C min^{-1} até aos 250°C e outra de 20°C min^{-1} até aos 310°C e uma isotérmica a esta temperatura durante 13 min; na reacção com o radical anião sulfato utilizou-se uma isotérmica inicial de 40°C durante 3 min, seguido de uma primeira rampa de 15°C min^{-1} até aos 250°C e outra de 20°C min^{-1} até aos 310°C e uma isotérmica a esta temperatura durante 10 min. Em ambos os casos fez-se a aquisição na gama de m/z entre 50 e 450 Da.

3.6. Espectrometria de massa por injeção directa

As amostras analisadas directamente por espectrometria de massa foram dissolvidas em metanol e conduzidas ao espectrómetro de massa VG Platform (Micromass, UK Ltd) com um analisador do tipo quadrupolo através de uma bomba de infusão (Harvard Apparatus) com um débito de 0,6 mLmin^{-1} . Utilizou-se uma fonte de ionização por *electrospray* em modo negativo (ESI-). Manteve-se a temperatura do capilar entre 100 e 120°C e aplicou-se uma voltagem ao cone e ao capilar de 140 V e 3,5 kV, respectivamente.

Utilizou-se azoto como gás de nebulização com um caudal de 10 Lh⁻¹. Fez-se a aquisição na gama de 150 a 300 Da.

Os produtos de *orto* e *meta* hidroxilação da 4-(*N,N*-dimetil)-aminoantipirina foram analisados por injeção directa num espectrómetro de massa com analisador TOF (Micromass, UK Ltd) e sonda de temperatura. Utilizou-se o modo de ionização por impacto electrónico (EI).

3.7. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C foram obtidos num espectrómetro Bruker ARX 400, a operar a 400 e 100,62 MHz respectivamente. Os desvios químicos (δ) em relação ao tetrametilsilano estão expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

3.8. Espectroscopia de Infravermelho

O espectro de infravermelho da 4-(*N*-metil)-aminoantipirina foi registado num espectrómetro de infravermelho com transformada de Fourier Perkin Elmer 683 FT-IR.

3.9. Voltametria cíclica

No estudo da capacidade antioxidante relativa da xantina e derivados (Capítulo 4), realizaram-se medições do potencial de redução por voltametria cíclica para cada composto individualmente.

Prepararam-se soluções aquosas para cada derivado de xantina numa concentração de 1 mM, às quais se adicionou 0,1 M de KCl como electrólito suporte e 20 mM de tampão fosfato. As amostras foram colocadas numa célula de vidro na qual foram mergulhados um eléctrodo saturado de calomelanos (eléctrodo de referência), um eléctrodo de carbono vítreo (eléctrodo de trabalho) e um fio de platina (contra-eléctrodo). Antes de cada medição, as amostras foram previamente desarejadas com um fluxo contínuo de árgon durante 30 minutos.

A determinação do potencial de redução foi realizada à temperatura ambiente e com auxílio de um potenciostato Autolab. Nesta técnica aplica-se um potencial que varia entre dois valores extremos na forma $E_1 \rightarrow E_2 \rightarrow E_1$ ($E_1 < E_2$) com uma determinada velocidade de varrimento, neste caso 40 mVs⁻¹. No primeiro varrimento ($E_1 \rightarrow E_2$) observa-

se a oxidação do substrato à superfície do eléctrodo de trabalho pelo aumento da corrente (pico anódico). No entanto, no varrimento catódico ($E_2 \rightarrow E_1$) não se observa nenhum pico para os compostos em estudo. Isto significa que o processo de oxidação não é reversível. Além disso, o substrato oxidado no primeiro varrimento fica adsorvido na superfície do eléctrodo de carbono vítreo, pelo que a geometria (área disponível) é alterada de uma medição para outra. Assim, foi necessário renovar a superfície do eléctrodo entre cada medição (limpeza abrasiva com alumina) para que os resultados fossem reprodutíveis.

3.10. Espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica

No estudo da capacidade antioxidante relativa da xantina e derivados (Capítulo 4), caracterizaram-se alguns radicais destes compostos por reacção com o radical anião $SO_4^{\bullet-}$, através da técnica de espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica (RPE).

As soluções aquosas dos compostos estudados, preparadas por dissolução em água MilliQ do derivado da xantina (2 mM), persulfato de potássio (25 mM) e tampão fosfato, foram colocadas num recipiente que permite a passagem contínua de uma corrente de árgon através de uma placa de vidro sinterizado. Desta forma, garante-se a ausência de oxigénio no seio da solução aquosa.

A solução desarejada passa em fluxo contínuo numa célula de quartzo plana colocada na cavidade do espectrómetro. O radical anião $SO_4^{\bullet-}$ é produzido *in situ* por fotólise do persulfato de potássio com auxílio de uma lâmpada UV de Hg-Xe de 1000 W focada para o centro da cavidade. Assim, e mantendo constante o fluxo da solução a analisar, o ataque do radical anião $SO_4^{\bullet-}$ ao substrato e conseqüente formação do respectivo radical que se pretende caracterizar é constante ao longo da experiência, isto é, trata-se de uma fotólise UV estacionária.

Entre o recipiente que alimenta a cavidade e o espectrómetro, a solução passa por uma bomba peristáltica que permite regular o respectivo caudal. Este parâmetro é particularmente importante pois permite compensar os diferentes tempos de vida dos radicais. Por exemplo, para um radical com um tempo de vida demasiado curto para se conseguir um bom sinal de aquisição, é possível melhorar o resultado com um aumento do caudal.

No estudo da reacção de derivados da antipirina com o radical hidroxilo gerado por via química (Capítulo 5) não se utilizou a técnica de fluxo contínuo. Preparou-se cada mistura

reaccional por adição sucessiva dos reagentes do sistema de Fenton e preencheu-se de imediato a célula de quartzo plana que se colocou na cavidade do espectrómetro. Como se discute nesse capítulo, e em particular para um dos derivados da antipirina, o tempo de vida do radical catião formado é suficientemente longo para se obter um espectro de RPE.

Em ambos os estudos, os espectros foram obtidos com um espectrómetro de banda X (frequência de microondas da ordem de 10 GHz) Brüker, com os seguintes componentes: aquisição de sinal ER023M, gerador de campo ER082, ponte de microondas ER041MR e controlo por computador ESP3220, com *software* ESP300E, com uma modulação de amplitude de 0,1 G, constante de tempo de 82 ms e um varrimento de tempo total de 22 minutos. Nalguns casos aplicou-se um *smooth* do espectro obtido (disponível no espectrómetro Brüker).

3.11. Cálculos teóricos

Efectuaram-se cálculos de DFT (Density Functional Theory) com o pacote de *software* GAUSSIAN 03 [4] para determinar a estabilidade relativa dos diversos tipos de tautómeros da xantina e seus derivados metilados envolvidos nos equilíbrios de reparação radicalar em meio aquoso. Utilizou-se o funcional híbrido sem restrição de spin (UB3LYP) com a base 6-31+g(2d,p) e recorreu-se ao modelo de polarização contínua para descrever o efeito do solvente. Usou-se a ausência de frequências imaginárias como critério para assegurar que as estruturas optimizadas representam um mínimo na superfície de energia potencial.

Efectuaram-se cálculos semelhantes com a base 6-31+g(2d,p) do pacote de *software* GAUSSIAN 98 [5] para a determinação das constantes de acoplamento hiperfino dos radicais aniões de xantinas. As densidades de spin foram calculadas pela análise da população de Mulliken.

No estudo da reacção de desmetilação da teofilina, todas as espécies foram pré-optimizadas através de mecânica molecular com campo de força Dreiding [6], implementada nos *softwares* Marvin e Calculator Plugins [7]. Efectuaram-se os cálculos utilizando o método paramétrico 6 (PM6) [8], tal como implementado em MOPAC2009 [9], dentro do formalismo do método de Hartree-Fock restrito e recorrendo ao método COSMO (Conductor-like Screening Model) para uma aproximação ao efeito de solvente (água). Em todos os casos, a geometria das espécies considerou-se optimizada para gradientes abaixo de 0,01.

Bibliografia

1. Ochiai E., "Recent Japanese Work on the Chemistry of Pyridine 1-Oxide and Related Compounds". *Journal of Organic Chemistry*, 1953, **18**(5): 534-551.
2. Barton D.H.R., Crich D., Kretzschmar G., "The Invention of New Radical Chain-Reactions .9. Further Radical Chemistry of Thiohydroxamic Esters - Formation of Carbon Carbon Bonds". *Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions 1*, 1986(1): 39-53.
3. Stein B., Wegan B., "Derivatives of 4-amino-antipyrine". *USPO 2,506,654*, 1950.
4. Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Montgomery Jr. J.A., Vreven T., Kudin K.N., Burant J.C., Millam J.M., Iyengar S.S., Tomasi J., Barone V., Mennucci B., Cossi M., Scalmani G., Rega N., Petersson G.A., Nakatsuji H., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Klene M., Li X., Knox J.E., Hratchian H.P., Cross J.B., Bakken V., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R.E., Yazyev O., Austin A.J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J.W., Ayala P.Y., Morokuma K., Voth G.A., Salvador P., Dannenberg J.J., Zakrzewski V.G., Dapprich S., Daniels A.D., Strain M.C., Farkas O., Malick D.K., Rabuck A.D., Raghavachari K., Foresman J.B., Ortiz J.V., Cui Q., Baboul A.G., Clifford S., Cioslowski J., Stefanov B.B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Martin R.L., Fox D.J., Keith T., Al-Laham M.A., Peng C.Y., Nanayakkara A., Challacombe M., Gill P.M.W., Johnson B., Chen W., Wong M.W., Gonzalez C., Pople J.A., *Gaussian 03, Revision E.01*. Wallingford CT: Gaussian, Inc. 2004.
5. Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Zakrzewski V.G., Montgomery Jr. J.A., Stratmann R.E., Burant J.C., Dapprich S., Millam J.M., Daniels A.D., Kudin K.N., Strain M.C., Farkas O., Tomasi J., Barone V., Cossi M., Cammi R., Mennucci B., Pomelli C., Adamo C., Clifford S., Ochterski J.W., Petersson G.A., Ayala P.Y., Cui Q., Morokuma K., Malick D.K., Rabuck A.D., Raghavachari K., Foresman J.B., Cioslowski J., Ortiz J.V., Baboul A.G., Stefanov B.B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Gomperts R., Martin R.L., Fox D.J., Keith T., Al-Laham M.A., Peng C.Y., Nanayakkara A., Gonzalez C., Challacombe M., Gill P.M.W., Johnson B., Chen W., Wong M.W., Andres J.L., Head-Gordon M., Replogle E.S., Pople J.A., *Gaussian 98, Revision A.7*. Pittsburgh PA: Gaussian, Inc. 1998.
6. Mayo S.L., Olafson B.D., Goddard W.A., "Dreiding - a Generic Force-Field for Molecular Simulations". *Journal of Physical Chemistry*, 1990, **94**(26): 8897-8909.
7. Marvin, *Marvin version 5.00 and Calculator Plugins for Marvin 5.00*. Budapest, Hungary: ChemAxon. 2008.
8. Stewart J.J.P., "Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements". *Journal of Molecular Modeling*, 2007, **13**(12): 1173-1213.
9. Stewart J.J.P., *MOPAC2009. Stewart Computational Chemistry*. Colorado Springs, CO. 2008.

4. Estrutura e propriedades redox dos radicais derivados da oxidação de xantinas

4.1. Introdução

A xantina e seus derivados são metabolizados *in vivo* por diversas vias sendo a etapa final desse processo a formação dos respectivos ácidos úricos [1, 2]. Estes são conhecidos pela sua elevada capacidade antioxidante, protegendo as células e as moléculas biológicas do *stress* oxidativo [3-7]. No entanto, é sabido que as próprias xantinas possuem um efeito antioxidante significativo e, por conseguinte, são capazes de proteger alvos biológicos de danos provocados por espécies reactivas de oxigénio [8-12].

Neste capítulo estuda-se o efeito antioxidante da xantina, do seu ribósido, e de vários derivados metilados (Tabela 4.1) em solução aquosa. A capacidade de uma xantina reparar a forma oxidada de outra regenerando a forma original desta, em condições de equilíbrio, permite estabelecer uma escala qualitativa de capacidade antioxidante dos compostos estudados. Para tal fizeram-se reagir misturas binárias de xantinas com o radical anião sulfato ($\text{SO}_4^{\bullet-}$) e seguiu-se a concentração de ambos os compostos por HPLC em função do tempo de reacção.

Discute-se de que forma o pH do meio e os grupos substituintes da xantina influenciam o posicionamento de cada composto nessa escala, isto é, o seu potencial de redução. Esta grandeza foi quantificada individualmente para cada xantina por voltametria cíclica, de modo a confirmar a ordem estabelecida.

Efectuaram-se cálculos de DFT para avaliar a estabilidade relativa dos tautómeros dos radicais dos compostos e compararam-se os resultados obtidos com os dados experimentais.

Obtiveram-se espectros de RPE de radicais aniões de alguns dos derivados da xantina em meio básico ($\text{pH} > 9$), e fez-se a atribuição das constantes de acoplamento hiperfino.

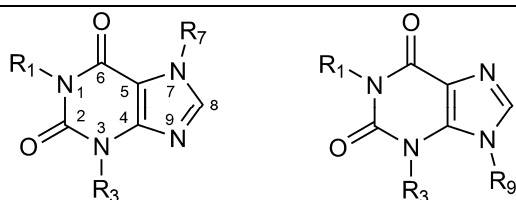
Por ser de maior relevância biológica, estudou-se ainda a reacção de oxidação de uma xantina usual na dieta humana (teofilina) com o radical hidroxilo (HO^\bullet) em meio fisiológico. Para além da esperada formação do respectivo ácido úrico [13], verificou-se a ocorrência de uma reacção de desmetilação, até agora não descrita na literatura.

4.2. Caracterização das xantinas

4.2.1. Propriedades ácido-base e tautomerismo

A xantina (3,7-di-hidropurina-2,6-diona) e seus derivados são compostos purínicos cuja estrutura genérica se apresenta na Tabela 4.1. Todos os compostos estudados possuem pelo menos um átomo de hidrogénio ligado a átomos de azoto, pelo que têm pelo menos uma posição possível de desprotonação. Na mesma Tabela apresentam-se igualmente os respectivos valores de pK_a .

Tabela 4.1 – Estrutura da xantina, sistema de numeração e derivados. Valores de pK_a para a formação do monoanião e respectiva posição de desprotonação. ^a [14, 15], ^b [16], ^c [17]; relativamente a 3,9-DiMeX, outros autores sugerem $pK_a = 8,6$ [18] ou $pK_a = 9,5$ [19].



Composto	Abreviatura	pK_a	R ₁	R ₃	R ₇	R ₉
Xantina	Xan	7,74 ^a (N3), 20°C	H	H	H	–
1-Metilxantina	1-MeX	7,70 ^a (N3), 25°C	CH ₃	H	H	–
3-Metilxantina	3-MeX	8,10 ^a (N7), 25°C	H	CH ₃	H	–
7-Metilxantina	7-MeX	8,30 ^a (N3), 25°C	H	H	CH ₃	–
9-Metilxantina	9-MeX	6,25 ^a (N3), 25°C	H	H	–	CH ₃
Xantosina	Xao	5,67 ^b (N3), 20°C	H	H	–	Ribosilo
Teofilina	1,3-DiMeX	8,60 ^a (N7), 18°C	CH ₃	CH ₃	H	–
Paraxantina	1,7-DiMeX	8,50 ^a (N3), 18°C	CH ₃	H	CH ₃	–
1,9-Dimetilxantina	1,9-DiMeX	6,30 ^a (N3), 18°C	CH ₃	H	–	CH ₃
Teobromina	3,7-DiMeX	9,90 ^a (N1), 18°C	H	CH ₃	CH ₃	–
3,9-Dimetilxantina	3,9-DiMeX	10,5 ^c (N1), 25°C	H	CH ₃	–	CH ₃

Se se considerarem todos os equilíbrios tautoméricos devidos à possibilidade de ligação de um átomo de hidrogénio a diferentes átomos de azoto (forma lactama) ou oxigénio (forma lactima), existem 14 tautómeros possíveis para a xantina (Figura 4.1). As formas lactima estão destabilizadas em cerca de 40 kJmol⁻¹ relativamente às formas lactama [20]. Assim, apenas os tautómeros Xan(1H3H7H) e Xan(1H3H9H), as formas di-lactama **1** e **2**

da Figura 4.1, são considerados em solução aquosa, sendo o primeiro $2,5 \text{ kJmol}^{-1}$ mais estável [21].

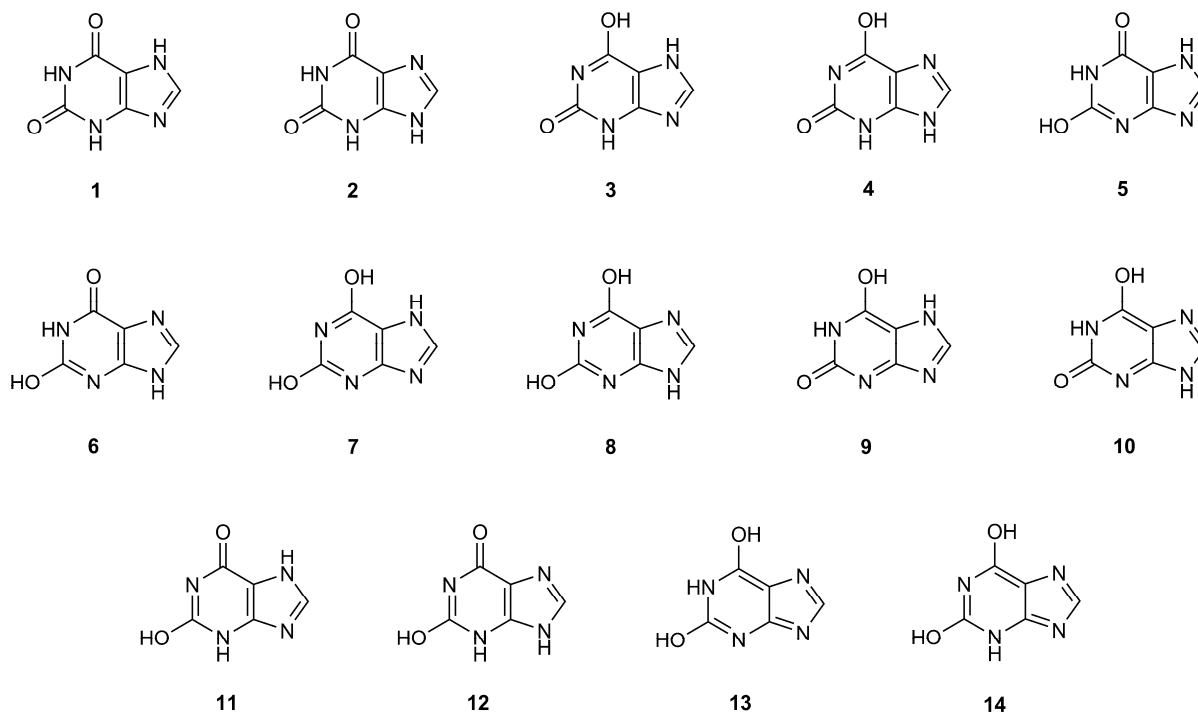


Figura 4.1 – Tautômeros possíveis para a xantina.

Para além da xantina, apenas a 1-MeX, a 3-MeX e a 1,3-DiMeX podem apresentar este tipo de tautomerismo. Enquanto que no caso da 1-MeX, a diferença de energias entre os tautômeros $N(7)H$ e $N(9)H$ é muito semelhante à da Xan, a presença de um grupo metilo em $N(3)$ nos outros dois compostos parece ser determinante para que os respectivos tautômeros $N(9)H$ sejam desprezáveis.

Estudos feitos por 1H RMN [22] também confirmaram a maior contribuição do tautômero $N(7)H$ da Xan. Os desvios químicos dos prótons $N(1)H$, $N(3)H$ e $C(8)H$ da Xan são muito semelhantes aos da 7-MeX, mas diferentes dos da 9-MeX. Por outro lado, no caso da 3-MeX, o desvio químico do próton $C(8)H$ é semelhante ao da Xan mas muito diferente do da 9-MeX.

Em meio fisiológico, apenas algumas xantinas estão totalmente (Xao) ou parcialmente desprotonadas (Xan, 1-MeX, 9-MeX, 1,9-DiMeX) (Tabela 4.1). No caso da Xan, a desprotonação só pode ocorrer de $N(3)$ ou de $N(7)$. A acidez intrínseca do próton em $N(1)$ é a mais baixa [23], de tal forma que é indiferente a existência de um grupo metilo nessa posição. Por esse motivo, o valor de pK_a da 1-MeX é praticamente idêntico ao da Xan.

Estudos feitos por ^1H RMN em estado sólido [24] e em fase aquosa [25] indicam que o anião mais estável da Xan corresponde ao tautómero $N(9)\text{H}$ que se forma por desprotonação de $N(3)$. Esta conclusão foi confirmada por cálculos DFT [20]: as espécies $\text{Xan}(1\text{H}9\text{H})^-$ e $\text{Xan}(1\text{H}7\text{H})^-$, correspondentes aos aniões formados por desprotonação de $N(3)$, existem em solução aquosa numa percentagem de 78 e 10%, respectivamente, ao passo que o anião $\text{Xan}(1\text{H}3\text{H})^-$, formado por desprotonação de $N(7)$, existe numa percentagem de 12%.

4.2.2. Espectros electrónicos

Os espectros UV das xantinas em solução aquosa apresentam, de um modo geral, uma banda de absorção a cerca de 270 nm. Nos compostos com substituintes em $N(9)$ (com grupo metilo ou ribosilo), observa-se uma banda adicional para comprimentos de onda a cerca de 240 nm [26]. Na Figura 4.2, apresentam-se os espectros obtidos nas condições de eluição descritas anteriormente (ver 3.5.1.1) a pH 3, ou seja, trata-se, em todos os casos, dos compostos neutros.

Analisando os comprimentos de onda máximos de absorção dos compostos em solução aquosa é possível retirar algumas conclusões. Em primeiro lugar, ao comparar as xantinas cuja única diferença estrutural é a substituição do átomo de hidrogénio pelo grupo metilo em $N(1)$ verifica-se que não existe variação no máximo de absorção. Isto significa que não há tautomerização significativa em $N(1)$.

Por outro lado, a substituição do grupo metilo por H em $N(3)$ envolve um desvio hipsocrómico de 4 nm (para os pares 3-MeX/Xan, 1,3-DiMeX/1-MeX e 3,7-DiMeX/7-MeX) e 6 nm (para os pares 9-MeX/3,9-DiMeX e Xao/3,9-DiMeX), o que sugere a hipótese de haver enolização do grupo carbonilo de C(2) ou C(6) (tautomerismo lactama-lactima; tautómeros **3** e **5** da Figura 4.1) [17].

Por último, se se atender ao facto de que o $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção do grupo de xantinas substituídas em $N(9)$ (9-MeX, 1,9-DiMeX e Xao) e do grupo de xantinas substituídas em $N(7)$ (7-MeX e 1,7-DiMeX) é de 265 e 271 nm respectivamente, pode concluir-se que o $\lambda_{\text{máx}}$ de 269 nm para a Xan e a 1-MeX resulta do facto destes dois compostos existirem sob a forma tautomérica $N(7)\text{H}$, mas com uma contribuição apreciável do tautómero $N(9)\text{H}$.

Os espectros das espécies aniónicas têm deslocamentos do $\lambda_{\text{máx}}$ diferentes consoante a posição do grupo metilo na estrutura purínica [26]. No caso da 3,7-DiMeX e 3,9-DiMeX, a variação de $\lambda_{\text{máx}}$ correspondente à desprotonação de $N(1)$ é muito pequena

(1-2 nm). Para os compostos que podem desprotonar de $N(3)$ (1,7-DiMeX, 7-MeX, 1,9-DiMeX, 9-MeX, Xao), $\Delta\lambda_{\text{máx}}$ é muito elevado (13-19 nm), enquanto que os que desprotonam de $N(7)$ (3-MeX e 1,3-DiMeX) é pequeno (3 nm). Assim, a variação intermédia de 9 nm que se verifica para a Xan e 1-MeX é indicativa de que a desprotonação ocorre quer de $N(3)$ como de $N(7)$ para estes dois compostos.

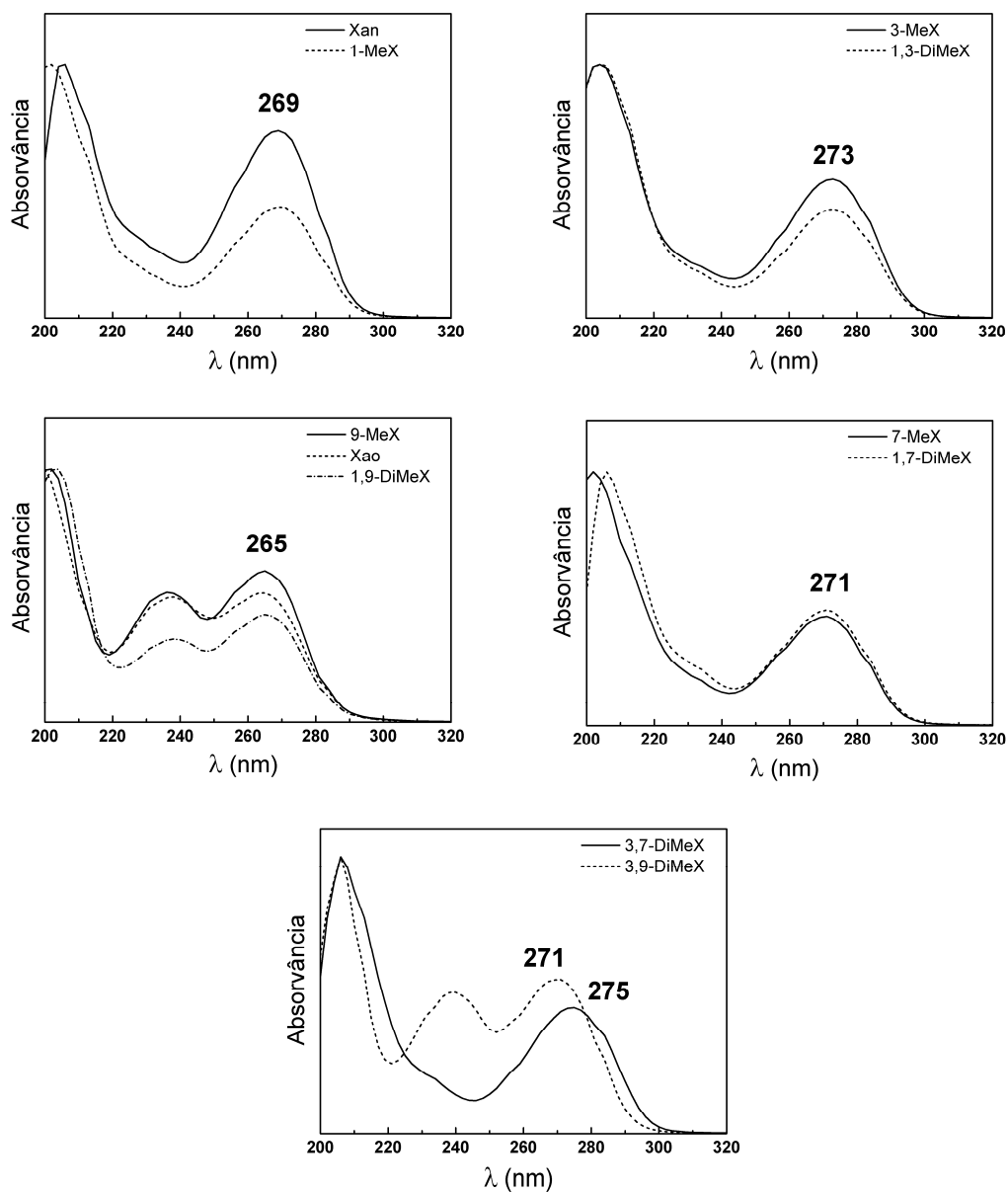


Figura 4.2 – Espectros UV da xantina e seus derivados metilados, em solução aquosa a pH 3, obtidos por HPLC com detector de fotodiodos.

4.3. Estudo da capacidade antioxidante relativa de xantinas

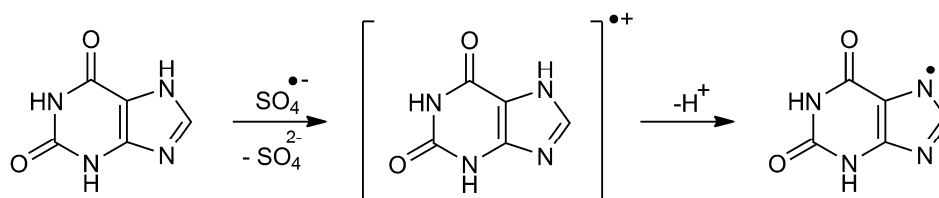
A avaliação da capacidade antioxidante relativa do grupo de xantinas em estudo efectuou-se por irradiação UV de diversas misturas binárias equimolares destes compostos em solução aquosa com persulfato de potássio. Nesta secção discutem-se primeiro os resultados obtidos para as misturas irradiadas a pH 3, ou seja, num meio em que todos os substratos estão na sua forma não dissociada. Em cada uma dessas misturas, o radical anião sulfato ($\text{SO}_4^{\bullet-}$) gerado oxida as duas xantinas diferentes (adiante designadas como X_1 e X_2) por transferência de electrão dando origem a radicais catiões que, excepto para o caso de xantinas trimetiladas, em que ocorre hidrólise com formação do respectivo ácido úrico [27], desprotonam imediatamente conduzindo aos respectivos radicais neutros X_1^\bullet e X_2^\bullet .

A perda de um electrão aumenta drasticamente a acidez de um composto insaturado. Como exemplo, na oxidação monoelectrónica do fenol ($\text{pK}_a = 10$) observa-se um aumento de acidez de 12 ordens de grandeza devido à diminuição da densidade electrónica do sistema π do radical catião do fenol ($\text{pK}_a = -2$) [28].

Nos compostos purínicos com pelo menos um protão ácido na sua estrutura, o valor de pK_a dos respectivos radicais catiões também diminui substancialmente. Por exemplo, o pK_a da 2'-desoxiguanosina em solução aquosa e à temperatura ambiente é de 9,6 enquanto que o valor do respectivo radical catião é de 3,9 [29]. No entanto, no caso da 2'-desoxiadenosina ($\text{pK}_a > 13,75$), a acidez aumenta em mais de 13 ordens de grandeza pois o respectivo radical catião, centrado na base adenina, possui um valor de pK_a inferior a 1 [30]. Estudos mais recentes com recurso a cálculos teóricos confirmam igualmente esta diminuição de acidez [31, 32].

Os valores de pK_a das xantinas aqui estudadas situam-se entre cerca de 6 e 11, pelo que, por analogia, é razoável considerar que a acidez dos respectivos radicais catiões é também substancialmente mais elevada e que, conseqüentemente, estes desprotonam ao valor de pH a que as misturas foram irradiadas. Além disso, a desprotonação, por ocorrer a velocidades próximas do limite de difusão [33], será mais rápida do que qualquer outra reacção possível do radical catião.

No Esquema 4.1 exemplifica-se o processo de oxidação monoelectrónica para o caso da xantina.



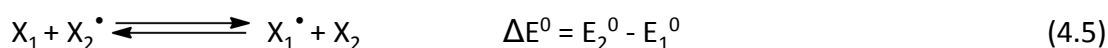
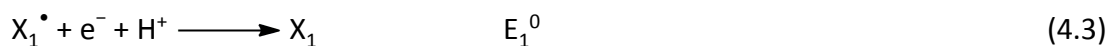
Esquema 4.1 – Oxidação monoelectrónica da xantina, com formação do respectivo radical catião seguido de desprotonação de N(7) (um dos possíveis tautómeros formados; ver 4.4)

Dado que todas as xantinas em estudo reagem com o radical anião $\text{SO}_4^{\bullet-}$ com constantes de velocidade muito semelhantes (a ordem de grandeza é de $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, obtidas por radiólise pulsada; [Vieira A.J.S.C. e Steenken S., resultados não publicados]), na gama de $3\text{-}5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, [34] admite-se que, em cada mistura, ambos os substratos sejam oxidados à mesma velocidade (equações (4.1) e (4.2)).



O controlo de pH das misturas reaccionais fez-se por adição de uma mistura de fosfatos. Assim, para além das duas xantinas presentes, o radical anião sulfato pode reagir não só com o solvente ($10^3 - 10^4 \text{ s}^{-1}$ [35]) mas também com o tampão utilizado ($k(\text{HPO}_4^{2-}) = 1,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k(\text{H}_2\text{PO}_4^-) < 7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [36]) que se encontra em largo excesso relativamente aos substratos. No entanto, estas reacções são substancialmente mais lentas quando comparadas com a oxidação das xantinas, pelo que não são consideradas.

Durante a exposição da mistura à luz UV, estão presentes no meio as duas xantinas (em concentrações próximas das iniciais) e os respectivos radicais neutros que, como se referiu, se formam a velocidades semelhantes. Caso os potenciais de redução dos pares X_i^{\bullet}/X_i sejam muito próximos, ambas as xantinas tenderão a ser degradadas nos respectivos produtos finais estáveis de oxidação até não haver mais substrato oxidável no seio da amostra irradiada. No entanto, se esses potenciais forem diferentes, os radicais X_1^{\bullet} e X_2^{\bullet} reagem com os substratos que lhe deram origem de acordo com o equilíbrio (4.5).



No caso do radical X_2^\bullet ser mais oxidante que o radical X_1^\bullet ($E_2^0 > E_1^0$), a reacção directa do equilíbrio (4.5) é termodinamicamente favorável ($\Delta E^0 > 0$) e a xantina X_2 é reparada. Nos instantes iniciais da irradiação UV, estarão presentes no meio aquoso a xantina reparada (X_2) numa concentração muito próxima da inicial, a xantina reparadora (X_1) numa concentração inferior à inicial, e o produto (ou produtos) de oxidação de X_1 . A extensão dessa reparação será tanto mais pronunciada quanto maior for a diferença entre os potenciais de redução E_1^0 e E_2^0 . Por outro lado, a partir do momento em que a concentração de X_1 não for suficiente para reparar X_2 , observar-se-á um decaimento desta última resultante da degradação de X_2^\bullet em produtos estáveis de oxidação.

É importante referir que o equilíbrio apresentado é válido sobretudo enquanto os produtos de oxidação não interferirem no sistema, pois eles próprios podem ser oxidados pelo radical anião $SO_4^{\bullet-}$ e dar origem a outros radicais que competem com as xantinas, dependendo do respectivo potencial de redução. Por outras palavras, o equilíbrio aplica-se sobretudo para tempos de irradiação curtos.

As quantidades relativas das duas xantinas presentes na solução aquosa após um determinado período de irradiação UV representam uma medida da posição do equilíbrio (4.5), desde que a degradação de ambos os radicais X_1^\bullet e X_2^\bullet se dê a velocidades semelhantes e, idealmente, mais baixas do que as das reacções de abstracção de hidrogénio representadas nesse equilíbrio. Deste modo, irradiou-se previamente cada uma das xantinas com persulfato de potássio e verificou-se que a sua degradação com o radical anião $SO_4^{\bullet-}$ ao longo do tempo é semelhante, o que garante a validade do equilíbrio (4.5).

Verificou-se igualmente que a concentração de cada xantina sofre uma diminuição inferior a 0,1% do seu valor inicial ao fim do tempo máximo de irradiação UV utilizado, pelo que a degradação fotoquímica destes compostos se considerou desprezável.

Na Figura 4.3 apresenta-se, como exemplo, um conjunto de cromatogramas de HPLC com detecção óptica (ver 3.5.1.1) correspondentes a vários tempos de irradiação UV de uma solução de 7-MeX e 9-MeX a pH3. De forma a facilitar a visualização da evolução da concentração das xantinas irradiadas em cada mistura, os resultados obtidos serão apresentados tal como na Figura 4.4. A concentração de cada substrato determinou-se por integração da área dos picos respectivos, dada a relação linear entre estas duas grandezas para a gama de concentrações utilizadas.

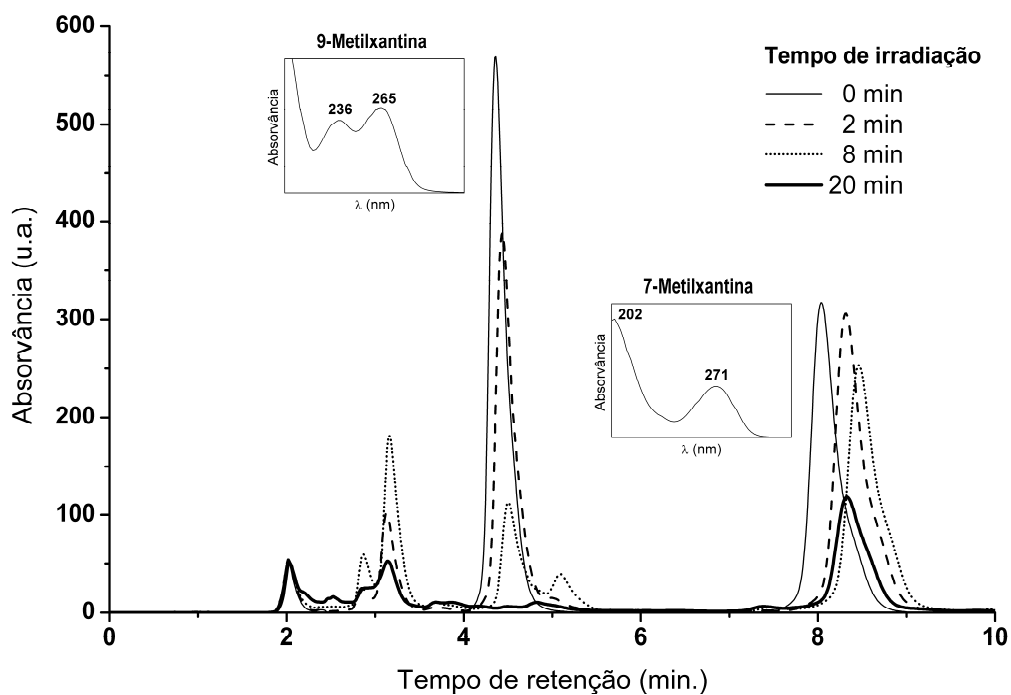


Figura 4.3 – Cromatogramas de HPLC (sistema Shimadzu) a 265 nm obtidos após vários tempos de irradiação UV de uma solução aquosa de 7-MeX e 9-MeX 0,5 mM cada com $K_2S_2O_8$ 20 mM a pH3.

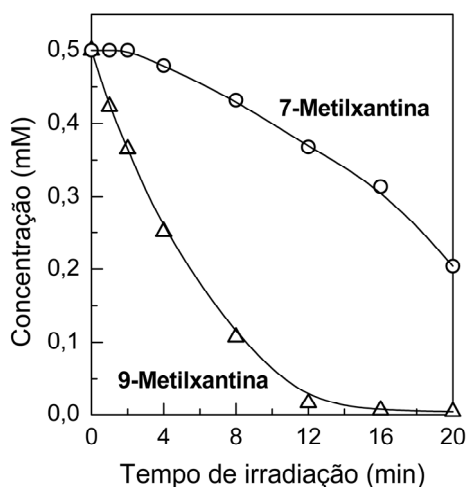
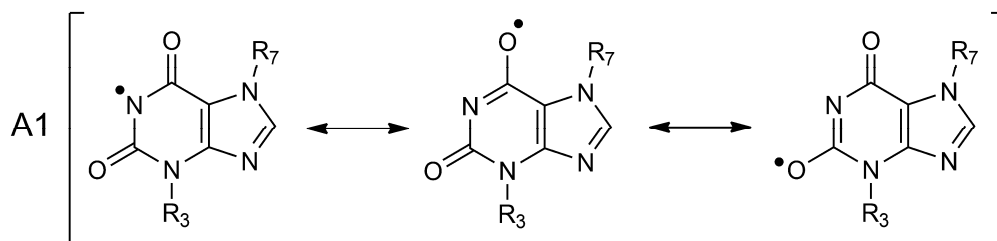


Figura 4.4 – Representação gráfica da evolução das concentrações de 7-MeX e de 9-MeX 0,5 mM cada, numa solução aquosa a pH 3 com $K_2S_2O_8$ 20mM e sujeita a diferentes tempos de irradiação UV.

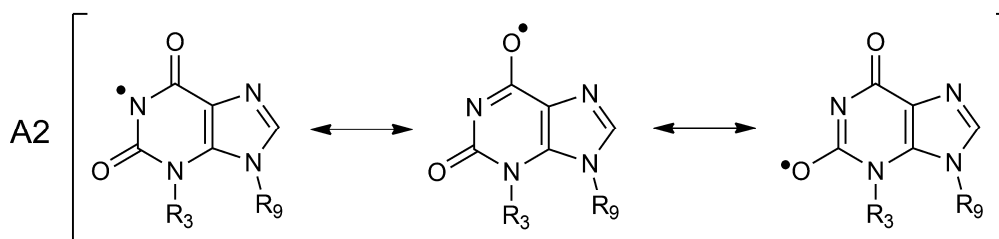
4.3.1. Tautómeros dos radicais formados

A desprotonação dos radicais catiões das xantinas formados por oxidação com $SO_4^{\bullet-}$ pode ocorrer em três posições distintas, de onde resultam radicais neutros com

estabilidades diferentes. Nos Esquemas 4.2 a 4.4 apresentam-se todos os radicais neutros possíveis para os compostos em estudo, divididos por três tipos diferentes (**A**, **B** e **C**).

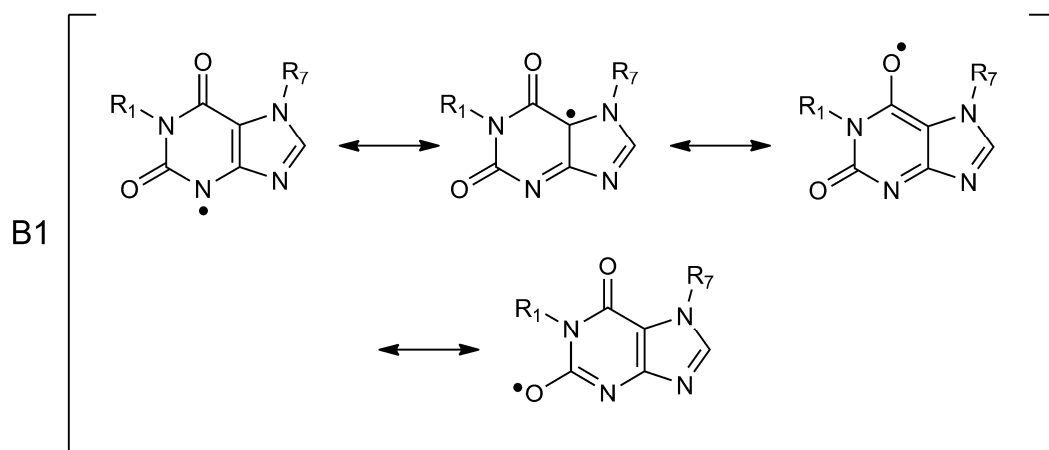


R ₃	R ₇	Radical neutro tipo A1
H	H	Xan(3H7H) [•]
CH ₃	H	3-MeX(7H) [•]
H	CH ₃	7-MeX(3H) [•]
CH ₃	CH ₃	3,7-DiMeX [•]

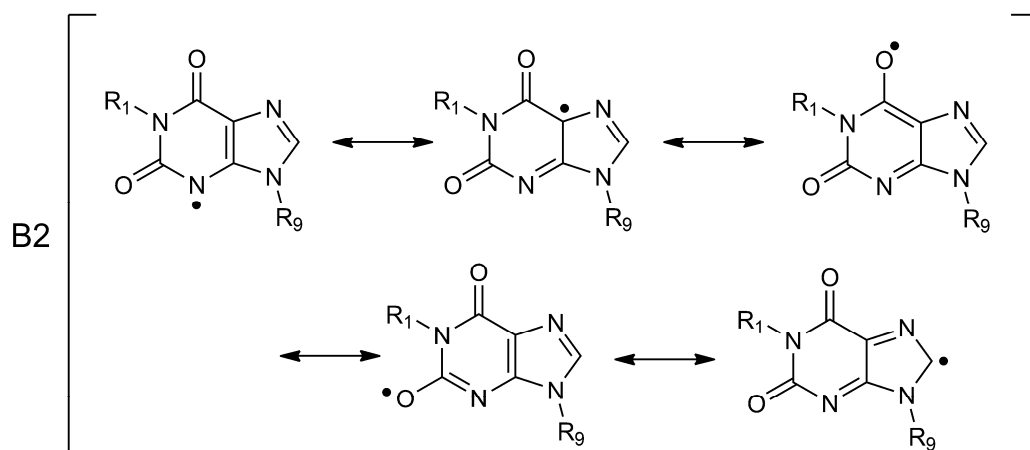


R ₃	R ₉	Radical neutro tipo A2
H	H	Xan(3H9H) [•]
CH ₃	H	3-MeX(9H) [•]
H	CH ₃	9-MeX(3H) [•]
H	Ribosilo	Xao(3H) [•]
CH ₃	CH ₃	3,9-DiMeX [•]

Esquema 4.2 – Estruturas de ressonância dos radicais neutros de tipo **A1** e **A2** que resultam da desprotonação em *N*(1) de radicais catiões de xantinas que apresentem tautomerismo ou grupos substituintes em *N*(7) e *N*(9), respectivamente.

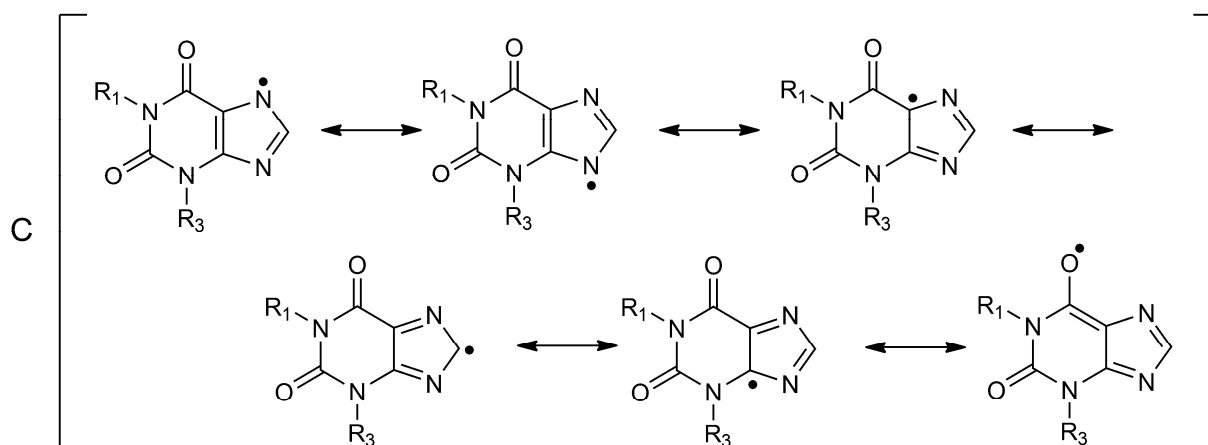


R ₁	R ₇	Radical neutro tipo B1
H	H	Xan(1H7H) [•]
CH ₃	H	1-MeX(7H) [•]
H	CH ₃	7-MeX(1H) [•]
CH ₃	CH ₃	1,7-DiMeX [•]



R ₁	R ₉	Radical neutro tipo B2
H	H	Xan(1H9H) [•]
CH ₃	H	1-MeX(9H) [•]
H	CH ₃	9-MeX(1H) [•]
H	Ribosilo	Xao(1H) [•]
CH ₃	CH ₃	1,9-DiMeX [•]

Esquema 4.3 – Estruturas de ressonância dos radicais neutros de tipo **B1** e **B2** que resultam da desprotonação em *N*(3) de radicais catiões de xantinas que apresentem tautomerismo ou grupos substituintes em *N*(7) e *N*(9), respectivamente.



R ₁	R ₃	Radical neutro tipo C
H	H	Xan(1H3H) [•]
CH ₃	H	1-MeX(3H) [•]
H	CH ₃	3-MeX(1H) [•]
CH ₃	CH ₃	1,3-DiMeX [•]

Esquema 4.4 – Estruturas de ressonância dos radicais neutros de tipo **C** que resultam da desprotonação em *N*(7) ou *N*(9) dos radicais catiões de xantinas que formam tautómeros *N*(7) e *N*(9).

Numa primeira análise aos três tipos de radicais neutros possíveis, facilmente se conclui que os de tipo **A** serão os mais oxidantes dado que possuem uma densidade de *spin* centrada em três heteroátomos. Será pois de esperar, à partida, que as xantinas que só possam desprotonar de *N*(1) sejam reparadas por todas as outras, de acordo com o equilíbrio (4.5) acima referido.

Relativamente aos radicais de tipo **B**, os isómeros com substituintes em *N*(9) possuem um contributor de ressonância a mais em que o electrão desemparelhado está centrado em C(8), o que os torna menos oxidantes (radicais do tipo **B2**).

Os radicais de tipo **C** são os que têm o electrão desemparelhado mais deslocalizado. Contudo, apenas os dois contributores de ressonância que possuem o electrão centrado nos átomos de azoto, são de facto mais importantes visto que mantêm a aromaticidade no anel de imidazole.

Na secção seguinte, tentar-se-á interpretar os resultados experimentais com base no tipo de radicais neutros que cada xantina pode formar após reacção com o radical anião SO₄^{•-}.

4.3.2. Efeito do grupo metilo na posição N(1)

As xantinas das misturas binárias apresentadas na Figura 4.5 têm como única diferença estrutural a presença ou ausência de um grupo metilo na posição N(1). Em todos os casos verifica-se que o composto metilado em N(1) exerce um ligeiro efeito reparador sobre o composto análogo desmetilado nessa posição. Interpretando este resultado segundo o equilíbrio (4.5) isto significa que o radical neutro do composto metilado em N(1) é ligeiramente mais redutor, devido ao efeito indutivo electrodoador exercido pelo grupo metilo.

Note-se, no entanto, que os radicais catiões dos compostos que são reparados não desprotonam de N(1). Se assim fosse, formar-se-iam radicais neutros de tipo **A** que, por serem muito mais oxidantes, aumentariam de forma apreciável o grau de reparação. Deste modo, o tipo de radicais neutros formados em cada uma das misturas tem uma estrutura muito semelhante, e o grupo metilo em N(1) provoca apenas um ligeiro aumento da capacidade antioxidante do composto.

No caso da mistura de 9-MeX e 1,9-DiMeX, os potenciais de redução dos respectivos radicais neutros deverão ser praticamente idênticos, uma vez que, para tempos de irradiação curtos, não se verifica qualquer reparação de uma xantina sobre a outra. A partir dos 6 minutos de irradiação, há uma inversão nas curvas de decaimento, parecendo que a 1,9-DiMeX passa a ser reparada pela 9-MeX. Este efeito pode ser resultado da presença de produtos de oxidação dos substratos iniciais no meio irradiado e da sua interferência no equilíbrio acima proposto. Este resultado reforça, uma vez mais, a importância da observação do comportamento das xantinas para tempos de irradiação curtos, onde o sistema se aproxima mais das condições ideais.

4.3.3. Efeito da posição do grupo metilo nos derivados monometilados

Estudou-se a influência da posição do grupo metilo na actividade antioxidante das xantinas monometiladas. Na Figura 4.6 apresentam-se os resultados da reacção de misturas binárias destes derivados com o radical anião $\text{SO}_4^{\bullet-}$.

Das quatro xantinas estudadas, a 9-MeX é a que consegue reparar todas as outras, e esse efeito é mais intenso na mistura composta por 9-MeX e 7-MeX. De acordo com este resultado (ver também Figura 4.4), o radical neutro da 9-MeX será mais estável (e menos oxidante) que o análogo da 7-MeX. Partindo do pressuposto que os radicais catiões

respectivos não desprotonam de $N(1)$, os radicais neutros formados serão $9\text{-MeX}(1\text{H})^\bullet$ e $7\text{-MeX}(1\text{H})^\bullet$, isto é, do tipo **B2** e **B1**. Como se referiu, a diferença entre eles está na existência de um contributor de ressonância com o electrão desemparelhado centrado em $C(8)$, o que torna o radical $9\text{-MeX}(1\text{H})^\bullet$ mais redutor.

A 3-MeX e a 7-MeX têm um comportamento muito semelhante, ou seja, ambas são degradadas pelo radical $\text{SO}_4^{\bullet-}$ sem que haja reparação de uma à custa da outra. Desprezando, uma vez mais, a desprotonação em $N(1)$, conclui-se que os dois tipos de radicais neutros formados, respectivamente **C** e **B1**, possuem um potencial de redução muito semelhante.

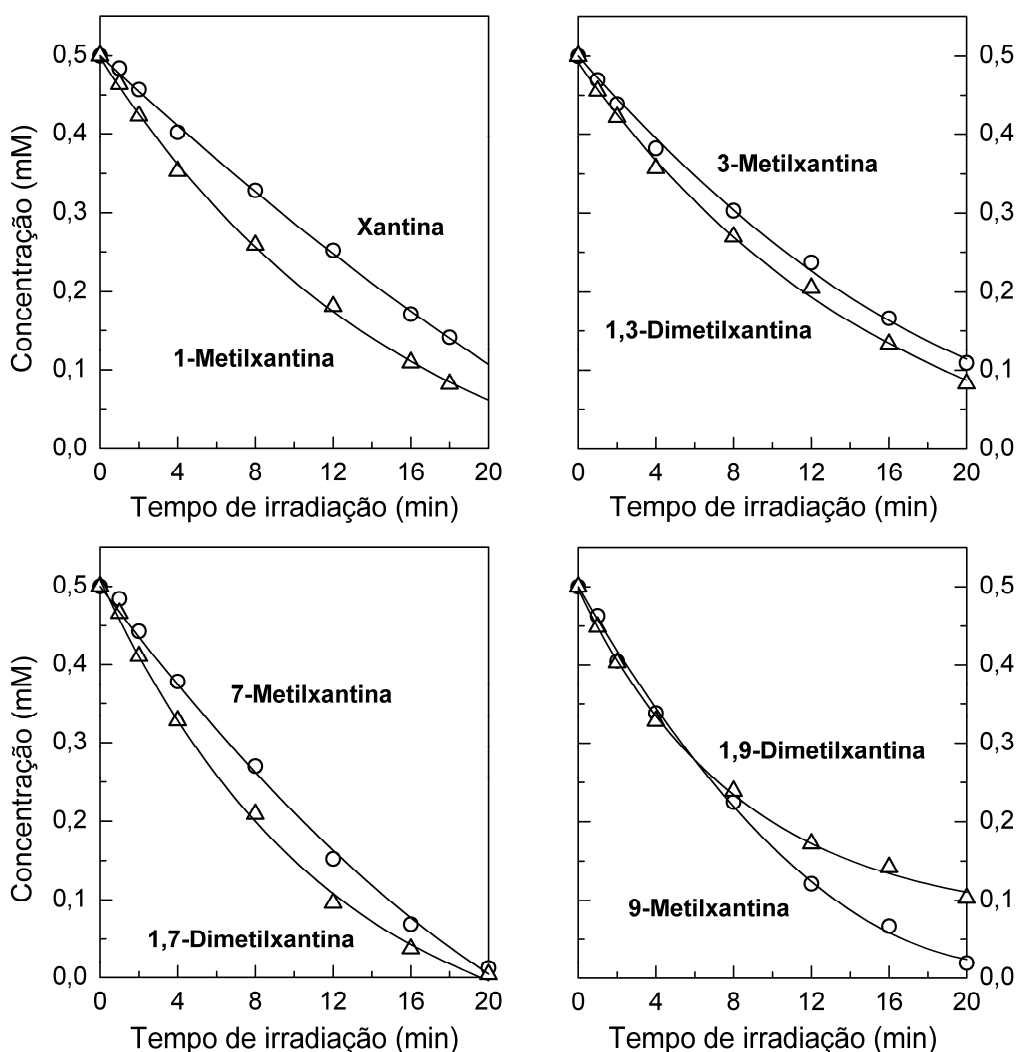


Figura 4.5 – Fotólise de misturas binárias de xantinas 0,5 mM cada e $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 20 mM a pH 3. Efeito do grupo metilo em $N(1)$.

O radical catião da 1-MeX pode desprotonar de $N(3)$ ou $N(7)$, dando origem a radicais de tipo **B1** ou **C**. Assim, seria de esperar que, na mistura com a 7-MeX , não houvesse

nenhum efeito de reparação, tal como não havia na mistura 7-MeX com 3-MeX. No entanto, verifica-se que o radical neutro da 1-MeX é de facto mais redutor que o da 7-MeX pois esta xantina é reparada. O mesmo resultado verificar-se-ia na mistura 1-MeX com 3-MeX. Este comportamento só é explicável se se admitir que o radical neutro pode ter uma contribuição apreciável do tautómero 1-MeX(9H)^{*}.

Desta forma, a ordem de capacidade antioxidante é a seguinte: 9-MeX > 1-MeX > 7-MeX ≈ 3-MeX. Verificou-se, na secção anterior, a mesma ordem de reparação (1,9-DiMeX > Xan > 1,7-DiMeX ≈ 1,3-DiMeX), o que está perfeitamente de acordo com o fraco efeito que a metilação em *N*(1) exerce no aumento do efeito reparador.

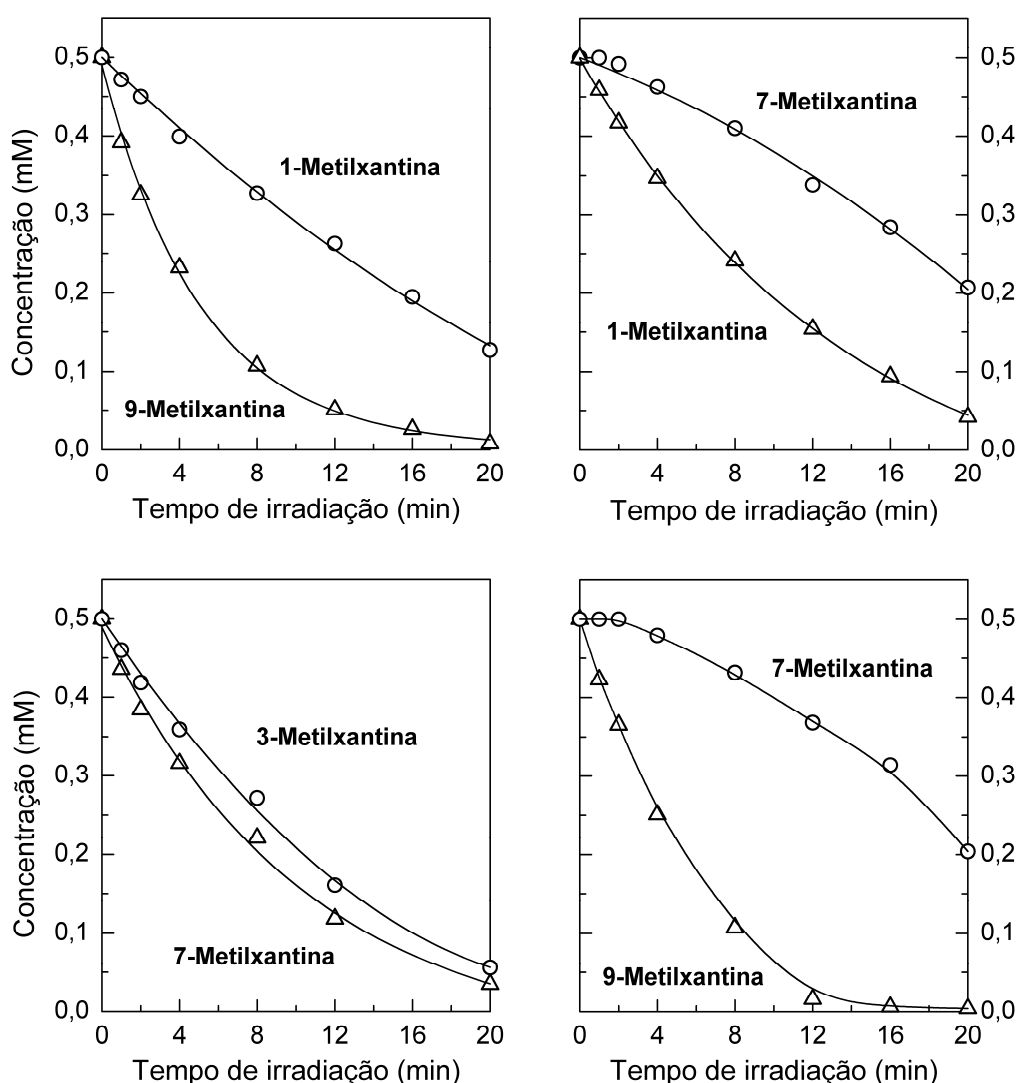


Figura 4.6 – Fotólise de misturas binárias de xantinas 0,5 mM cada e $K_2S_2O_8$ 20 mM a pH 3. Efeito da posição do grupo metilo nos derivados monometilados.

4.3.4. Efeito indutivo do substituinte em $N(9)$

Na mistura binária 9-MeX com Xao da Figura 4.7 ilustra-se o resultado de dois grupos substituintes em $N(9)$ com efeito indutivo oposto. A 9-MeX repara a oxidação da Xao apesar de ambos os radicais $9\text{-MeX}(1\text{H})^\bullet$ e $\text{Xao}(1\text{H})^\bullet$ possuírem estruturas semelhantes (radicais de tipo **B2**). O efeito electrodoador do grupo metilo na 9-MeX diminui o carácter oxidante do respectivo radical neutro, enquanto que o efeito electrotractor do grupo ribosilo na Xao aumenta esse mesmo carácter em $\text{Xao}(1\text{H})^\bullet$. Segundo este raciocínio, seria de esperar que Xan possuísse um comportamento intermédio, isto é, que fosse reparada pela 9-MeX, mas que reparasse a Xao. No entanto, e atendendo ao resultado da mistura 9-MeX com Xan (Figura 4.7), verifica-se que a primeira exerce um efeito reparador superior relativamente à Xan do que à Xao. Logo, a Xan é a mais oxidante destas três. Este resultado deve-se ao facto do radical neutro da Xan consistir num equilíbrio entre os tautómeros $\text{Xan}(1\text{H}9\text{H})^\bullet$ (radical de tipo **B2**) e $\text{Xan}(1\text{H}3\text{H})^\bullet$ (radical de tipo **C**, mais oxidante que o de tipo **B2**), tal como no caso da 1-MeX discutido anteriormente.

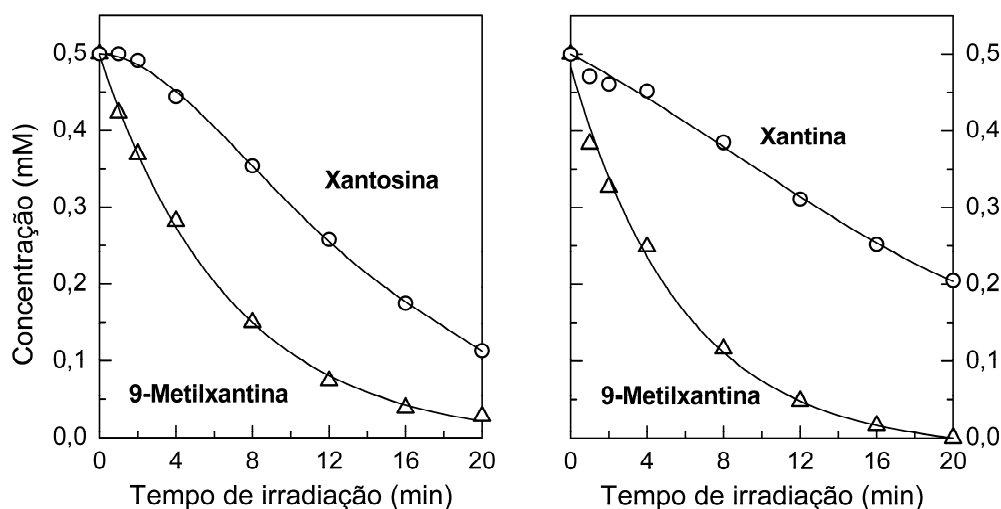


Figura 4.7 – Fotólise de misturas binárias de xantinas 0,5 mM cada e $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 20 mM a pH 3. Efeito indutivo do substituinte em $N(9)$.

4.3.5. Teobromina e 3,9-dimetilxantina

A teobromina (3,7-DiMeX) e a 3,9-dimetilxantina possuem um comportamento muito semelhante, como se verifica na respectiva mistura binária apresentada na Figura 4.8. Os radicais catiões destas duas xantinas só podem desprotonar de $N(1)$, dado origem aos radicais neutros 3,7-DiMeX $^\bullet$ e 3,9-DiMeX $^\bullet$. Tal como se explicou anteriormente, estes

radicais, de tipo **A**, são os mais oxidantes por terem a densidade de *spin* centrada exclusivamente em três heteroátomos. Na outra mistura apresentada na Figura 4.8, verifica-se que a teofilina (1,3-DiMeX) consegue reparar com alguma eficácia a 3,9-DiMeX, e, por isso, possui um carácter antioxidante superior. Numa experiência semelhante [9] provou-se igualmente o efeito antioxidante que a teofilina exerce sobre a teobromina, devido ao respectivo radical neutro desprotonado de *N*(7).

Assim, e segundo o conjunto de resultados apresentados anteriormente, conclui-se que as duas xantinas estudadas nesta secção são reparadas por todas as outras, ou seja, terão os valores de potencial de redução mais elevados.

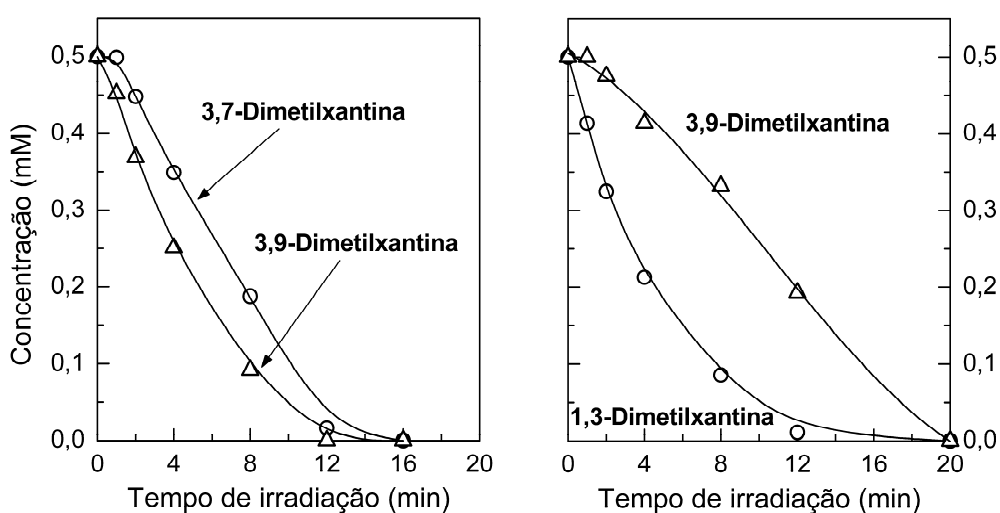


Figura 4.8 – Fotólise de misturas binárias de xantinas 0,5 mM cada e $K_2S_2O_8$ 20 mM a pH 3. Teobromina e 3,9-dimetilxantina.

4.3.6. Efeito do pH

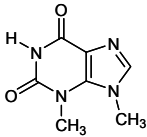
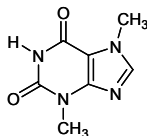
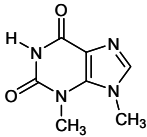
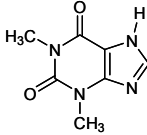
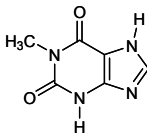
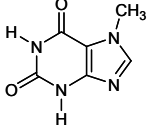
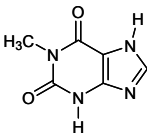
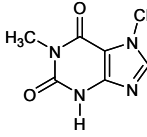
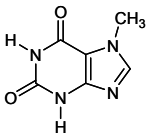
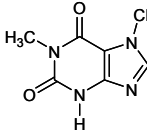
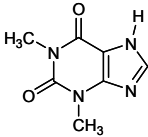
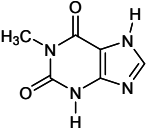
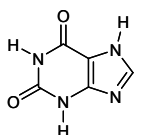
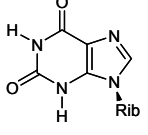
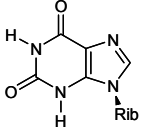
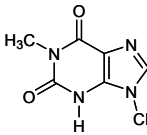
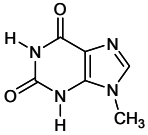
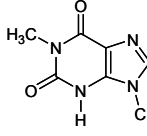
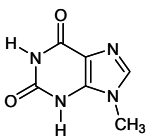
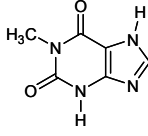
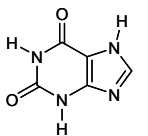
O efeito reparador mútuo das xantinas é alterado conforme o pH das misturas binárias irradiadas. A escolha de um meio ácido para um primeiro conjunto de irradiações teve duas razões. A primeira prende-se com os valores de pK_a dos compostos em estudo (ver Tabela 4.1) de modo a garantir que não estejam desprotonados em solução aquosa. A outra teve como base o pressuposto de que um meio a pH 3 seria suficientemente ácido para que os próprios radicais neutros da xantina e derivados monossustituídos formados após oxidação pelo radical anião $SO_4^{\bullet-}$ não desprotonassem, como se explica mais abaixo. Desta forma, considerou-se que nas irradiações em meio ácido apenas estão envolvidas espécies neutras no equilíbrio (4.5).

Demonstrou-se por RPE [8] que o radical neutro da xantina (Xan^\bullet) possui um valor de pK_a de 5,0 (obtido a 280 K). Desta forma, é de prever que a introdução de um grupo metilo na estrutura purínica diminua ligeiramente a acidez do radical neutro, pelo que os valores de pK_a dos radicais neutros das metilxantinas deverão ser superiores a 4,7 (valor acima referido corrigido para 298 K, temperatura de referência das irradiações realizadas).

Como já foi referido anteriormente (ver 4.2.1), o protão de $N(1)$ é o menos ácido de todos, pelo que a formação de $\text{Xan}^{\bullet-}$ dar-se-á por desprotonação de $N(3)$ ou $N(7)$ do respectivo radical neutro. O mesmo se passa no caso de $1\text{-MeX}^{\bullet-}$, sendo expectável que o valor de pK_a de 1-MeX^\bullet seja apenas ligeiramente superior ao de Xan^\bullet . No entanto, nos casos dos radicais 3-MeX^\bullet , 7-MeX^\bullet e 9-MeX^\bullet , a desprotonação só pode dar-se de $N(1)$. Por conseguinte, os respectivos valores de pK_a deverão ser superiores aos de 1-MeX^\bullet . A espécie $3\text{-MeX}^{\bullet-}$ é um radical anião com carácter do tipo **C** (ver Esquema 4.4), em que a carga negativa está deslocalizada por toda a estrutura purínica excepto em $N(3)$. O mesmo já não acontece com $7\text{-MeX}^{\bullet-}$ e $9\text{-MeX}^{\bullet-}$, pois são radicais aniões com carácter do tipo **B1** e **B2**, respectivamente, onde a deslocalização da carga negativa é menor. Sendo assim, é de esperar que a ordem crescente de valores de pK_a dos radicais neutros das metilxantinas siga a ordem Xan^\bullet ($\text{pK}_a = 4,70$ a 298 K) $\leq 1\text{-MeX}^\bullet < 3\text{-MeX}^\bullet < 9\text{-MeX}^\bullet \leq 7\text{-MeX}^\bullet$.

No caso do radical Xao^\bullet , que também só pode desprotonar de $N(1)$, a presença do grupo ribosilo exerce um efeito indutivo de estabilização na sua base conjugada, ao contrário do grupo metilo de $9\text{-MeX}^{\bullet-}$. A diferença dos valores de pK_a dos substratos 9-MeX e Xao é de 0,68 (valores a 25°C, a partir da Tabela 5.1), resultante dos efeitos indutivos opostos dos grupos substituintes em $N(9)$. Se se assumir uma diferença semelhante para os valores de pK_a dos respectivos radicais neutros, é de esperar que a pH 3 também não haja desprotonação de Xao^\bullet .

Os resultados apresentados nesta secção dizem respeito a uma série de fotólises UV de várias misturas binárias a pH 7, de forma a avaliar a capacidade antioxidante relativa das xantinas em meio fisiológico. No Esquema 4.5 faz-se a comparação dessa capacidade para os dois meios estudados (pH 3 e pH 7). Apresentam-se igualmente os valores do potencial de redução para cada composto obtidos por voltametria cíclica (ver 4.5).

Potencial de redução	pH 3		pH 7	
		 1,436	 1,449	 1,382
	 1,242	 1,236	 0,980	 0,985
	 1,190	 1,249	 0,945	 0,982
	 1,089	 1,094	 0,923	
	 1,062		 n.d.	 0,855
	 1,020	 1,024	 0,805	 0,822

Esquema 4.5 – Capacidade antioxidante relativa da xantina e seus derivados a pH 3 e pH 7, determinada por irradiação de misturas binárias de xantinas com persulfato de potássio. Para cada composto apresenta-se igualmente o valor do potencial de redução (E_p , V vs ESC) obtido por voltametria cíclica.

Os resultados obtidos a pH 3 e a pH 7 permitiram agrupar os compostos em cinco conjuntos que se distinguem por haver uma diferença de capacidade antioxidante apreciável de uns para os outros. Comparando esses resultados, verifica-se que a diferença mais significativa está nos compostos substituídos em *N*(9) (9-MeX, 1,9-DiMeX e Xao), cujo potencial de redução a pH 7 é deslocado para valores mais elevados (acima dos de 1-MeX e de Xan). Consequentemente, a 1-MeX passa a ser a xantina com maior capacidade antioxidante em meio fisiológico.

Dado que a pH 7 algumas xantinas existem em solução aquosa sob forma das respectivas bases conjugadas, esta alteração na ordem de capacidade antioxidante relativa poder-se-ia justificar pela diferença de reactividade entre o radical anião $\text{SO}_4^{\bullet-}$ e uma espécie neutra ou aniónica. Contudo, as respectivas velocidades de reacção são aproximadamente iguais. Por exemplo, a constante de velocidade do radical anião $\text{SO}_4^{\bullet-}$ com a 9-MeX varia apenas entre $1,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (pH 3,5) e $1,2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (pH 11,0) [valores obtidos por radiólise pulsada; Vieira A.J.S.C. e Steenken S., resultados não publicados].

Assim, a diferença de resultados a pH 7 prende-se exclusivamente com a existência de substratos e de radicais na forma aniónica (em diferentes proporções, consoante a sua natureza e respectivos valores de pK_a) nos equilíbrios, que irão afectar de forma diferente a capacidade de reparação de uma xantina sobre a outra. No entanto, a interpretação dos resultados em meio fisiológico apresentados nesta secção fez-se sobretudo a partir da avaliação do maior ou menor carácter oxidante dos radicais aniões que participam no equilíbrio (4.5) (à excepção do caso das dimetilxantinas). Este pressuposto não é necessariamente correcto, sobretudo para os radicais neutros das xantinas monometiladas com valores de pK_a mais elevados, que, por isso, terão um peso importante no equilíbrio.

Seguido o mesmo raciocínio adoptado na interpretação dos resultados anteriores, a pH 7 a deslocalização da densidade de *spin* pela estrutura purínica nos radicais aniões é maior do que nos radicais neutros. Consequentemente, aqueles não serão exclusivamente de um só tipo (Esquemas 4.2 a 4.4) como se verifica na Figura 4.9.

Tendo em conta a ordem crescente do carácter oxidante $\mathbf{B2} < \mathbf{B1} \approx \mathbf{C} < \mathbf{A1}$ já discutida anteriormente, facilmente se conclui que, dos quatro radicais aniões apresentados na Figura 4.9, $1\text{-MeX}^{\bullet-}$ será o menos oxidante e, portanto, a 1-MeX será a xantina mais reparadora a pH 7.

Na mistura binária de 1-MeX e Xan a pH 7 (Figura 4.10), a ordem de reparação não é alterada. Os radicais aniões são do mesmo tipo e o efeito indutivo electrodoador do grupo

metilo em $N(1)$ é que confere à 1-MeX uma capacidade antioxidante ligeiramente superior, tal como acontece a pH 3. De facto, dado que a extensão da desprotonação é praticamente a mesma para os dois substratos (cerca de 20% de base conjugada), a única diferença acaba por ser a substituição em $N(1)$. Estes dois compostos constituem o conjunto com menor potencial de redução a pH 7 (ver Esquema 4.5).

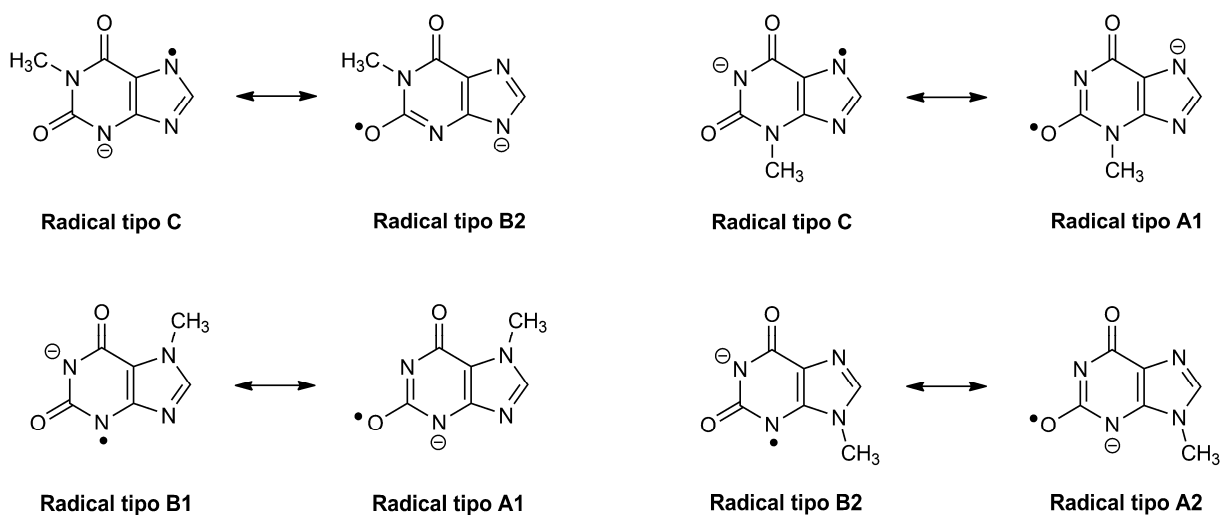


Figura 4.9 – Contributores de ressonância dos radicais aniões das xantinas monometiladas que melhor ilustram a que tipo de radical correspondem. Os radicais aniões da xantina e da xantosina, $Xan(1H)^{\bullet-}$ e $Xao^{\bullet-}$, são do mesmo tipo de $1-MeX^{\bullet-}$ e $9-MeX^{\bullet-}$ respectivamente, pelo que foram omitidos.

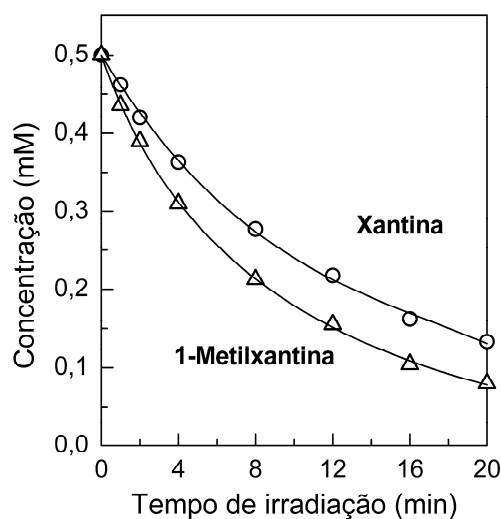


Figura 4.10 – Fotólise UV da mistura binária de 1-MeX e Xan 0,5 mM cada com $K_2S_2O_8$ 20 mM a pH 7.

No grupo seguinte do Esquema 4.5, o facto da 9-MeX perder parte da sua capacidade reparadora a pH 7 deve-se a algum carácter de radical tipo **A1** de $9-MeX^{\bullet-}$, que o

torna mais oxidante do que 1-MeX^{•-} (e Xan^{•-}). Assim, a 1-MeX e a Xan reparam quer a 9-MeX quer a Xao (Figura 4.11).

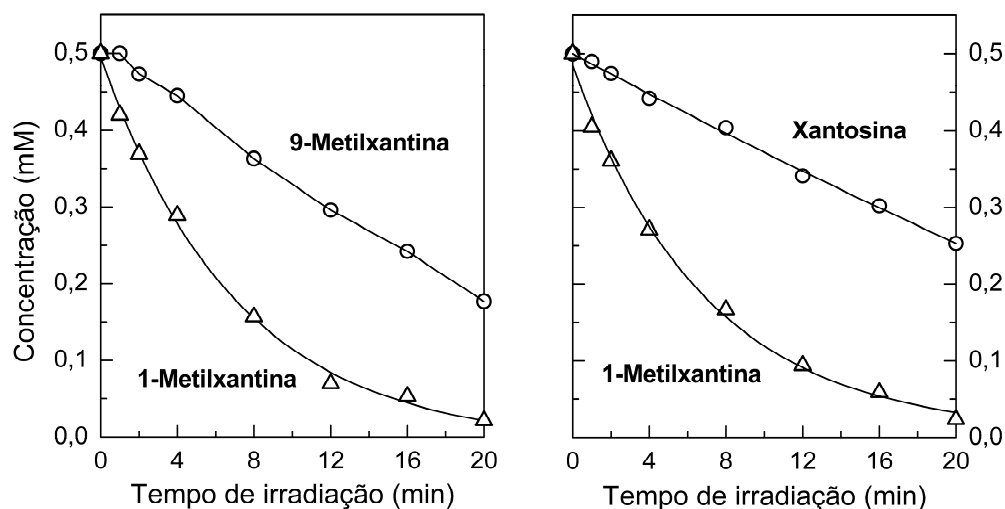


Figura 4.11 – Fotólise UV de misturas binárias de xantinas 0,5 mM cada com $K_2S_2O_8$ 20 mM a pH 7. Efeito reparador da 1-MeX sobre xantinas *N*(9)-substituídas.

Dentro do grupo das três xantinas substituídas em *N*(9), a ordem crescente de potencial de redução a pH 7 (1,9-DiMeX < 9-MeX < Xao) mantém-se mas o efeito de reparação entre cada par destas xantinas é ligeiramente mais pronunciado do que a pH 3, tal como se verifica pela análise da Figura 4.12, por comparação com o conjunto de resultados apresentados anteriormente em meio ácido.

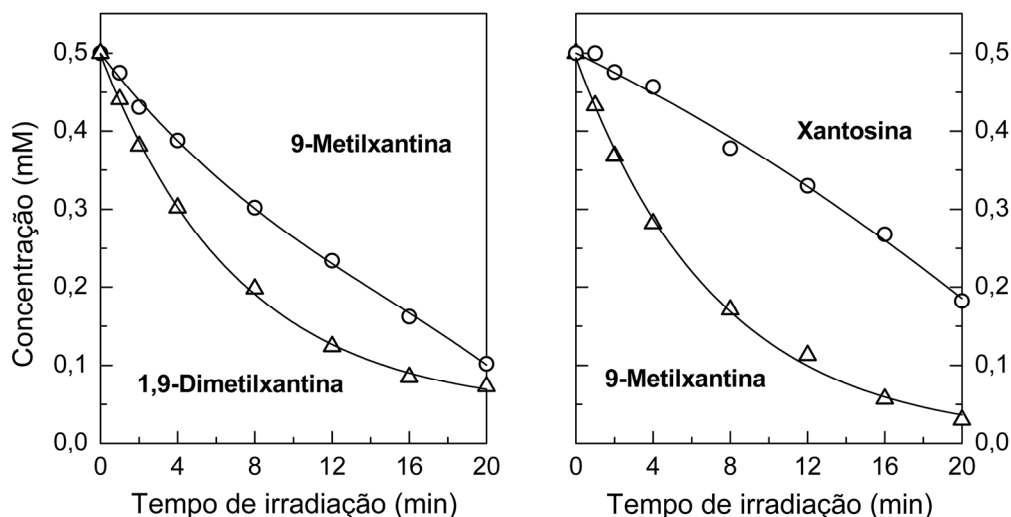
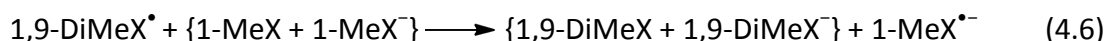


Figura 4.12 – Fotólise UV de misturas binárias de xantinas 0,5 mM cada com $K_2S_2O_8$ 20 mM a pH 7. Ordem de capacidade antioxidante das xantinas *N*(9)-substituídas.

Este resultado deve-se ao facto dos radicais aniões 9-MeX^{•-} e Xao^{•-} serem do tipo **B2** com uma contribuição do tipo **A2** (a pH 3, os respectivos radicais neutros são apenas de tipo **B2**), o que os torna, comparativamente a 1,9-DiMeX[•] (mantém-se sempre do tipo **B2**), mais oxidantes a pH 7. No caso da mistura Xao e 9-MeX, o efeito indutivo discutido anteriormente (ver 4.3.4) continua a ser mais importante e a determinar a ordem dos potenciais de redução. Devido ao efeito reparador significativo que a 1,9-DiMeX e a 9-MeX exercem sobre a Xao, agruparam-se as duas primeiras num conjunto distinto da última.

Dos resultados apresentados até aqui nesta secção, também se conclui que a 1-MeX exerce algum efeito reparador sobre a 1,9-DiMeX. A interpretação desse resultado, verificado experimentalmente (ver Figura 4.13), é mais complexa do que a dos casos discutidos anteriormente. De facto, comparando os dois radicais envolvidos 1,9-DiMeX[•] (tipo **B2**) e 1-MeX^{•-} (tipos **B2** e **C**), verifica-se que o primeiro é menos oxidante, pelo que seria de esperar um efeito de reparação inverso. A equação (4.6) representa o sentido do deslocamento do equilíbrio. A pH 7, a 1-MeX (espécie reparadora) e a 1,9-DiMeX estão cerca de 20 e 80% sob as respectivas formas desprotonadas, respectivamente. Deste modo, e atendendo à repulsão pelo efeito de Coulomb, a reparação de um radical neutro (1,9-DiMeX[•]) por uma espécie parcialmente desprotonada é mais favorável.



Nalguns casos, como por exemplo na mistura binária 9-MeX e 1,9-DiMeX acima referida, a reacção de reparação envolve precisamente duas espécies parcialmente desprotonadas, o que contraria, em certa medida, a explicação dada acima. No entanto, é razoável admitir que o efeito de repulsão de Coulomb só prevalece nos casos em que o carácter oxidante dos radicais (neutros ou aniões) envolvidos é muito semelhante, tal como para os radicais 1,9-DiMeX[•] e 1-MeX^{•-}.

Por outro lado, enquanto que a pH 3 o tipo de mecanismo envolvido na reparação de uma xantina sobre a outra é idêntico em todos os casos aqui analisados, a pH 7 não é claro se há preferência pela abstracção de hidrogénio ou pela transferência de electrão seguida de desprotonação. Estes dois mecanismos são formalmente equivalentes mas difíceis de distinguir pois originam os mesmos produtos [37]. A velocidade da reacção por transferência de átomo de hidrogénio de uma dada espécie está directamente relacionada

com a energia de ligação desse átomo, enquanto que a reacção por transferência de electrão depende do potencial de ionização da espécie. Assim, é natural que este mecanismo seja fortemente dependente do solvente devido à estabilização das espécies carregadas formadas após a transferência de electrão [38]. Embora não se discuta aqui em que medida é que a possível competição entre estes dois mecanismos afecta o sentido da reparação de uma xantina à custa de outra nas misturas irradiadas a pH 7, é razoável admitir que possa ser, pelo menos nalguns casos, um factor importante para determinar o sentido em que o equilíbrio se desloca.

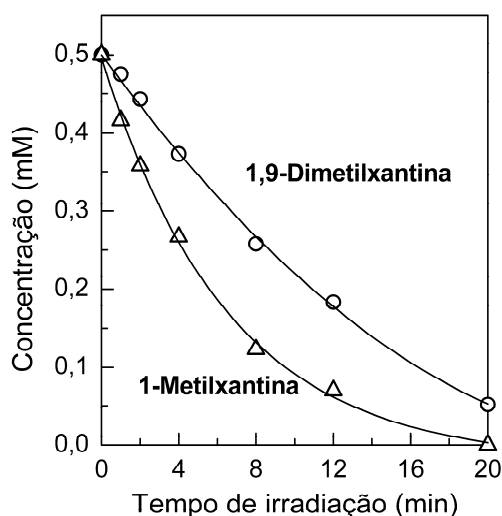


Figura 4.13 – Fotólise UV da mistura binária de 1-MeX e 1,9-DiMeX 0,5 mM cada com $K_2S_2O_8$ 20 mM a pH 7.

O conjunto seguinte é composto pela 3-MeX, 7-MeX, 1,3-DiMeX e 1,7DiMeX, e, tal como a pH 3, não existe nenhum efeito reparador de umas sobre as outras (ver Figura 4.14), sobretudo para as três primeiras xantinas.

Este resultado justifica-se pelo facto dos radicais aniões dos dois compostos monometilados, $3\text{-MeX}^{\bullet-}$ e $7\text{-MeX}^{\bullet-}$, terem um carácter de radical do tipo **A1** que os torna suficientemente mais oxidantes para serem reparados aos compostos de origem por todas as outras xantinas dos conjuntos com menor potencial de redução. Por outro lado, seria de esperar que a 1,3-DiMeX e a 1,7DiMeX conseguissem ter algum efeito reparador sobre os compostos análogos monometilados, uma vez que os radicais neutros $1,3\text{-DiMeX}^{\bullet}$ e $1,7\text{-DiMeX}^{\bullet}$ (de tipo **C** e **B1**, respectivamente) não têm uma contribuição de radical de tipo **A1**. Verifica-se que esse efeito existe de facto para a 1,7-DiMeX (embora muito ténue), mas é inexistente para a 1,3-DiMeX.

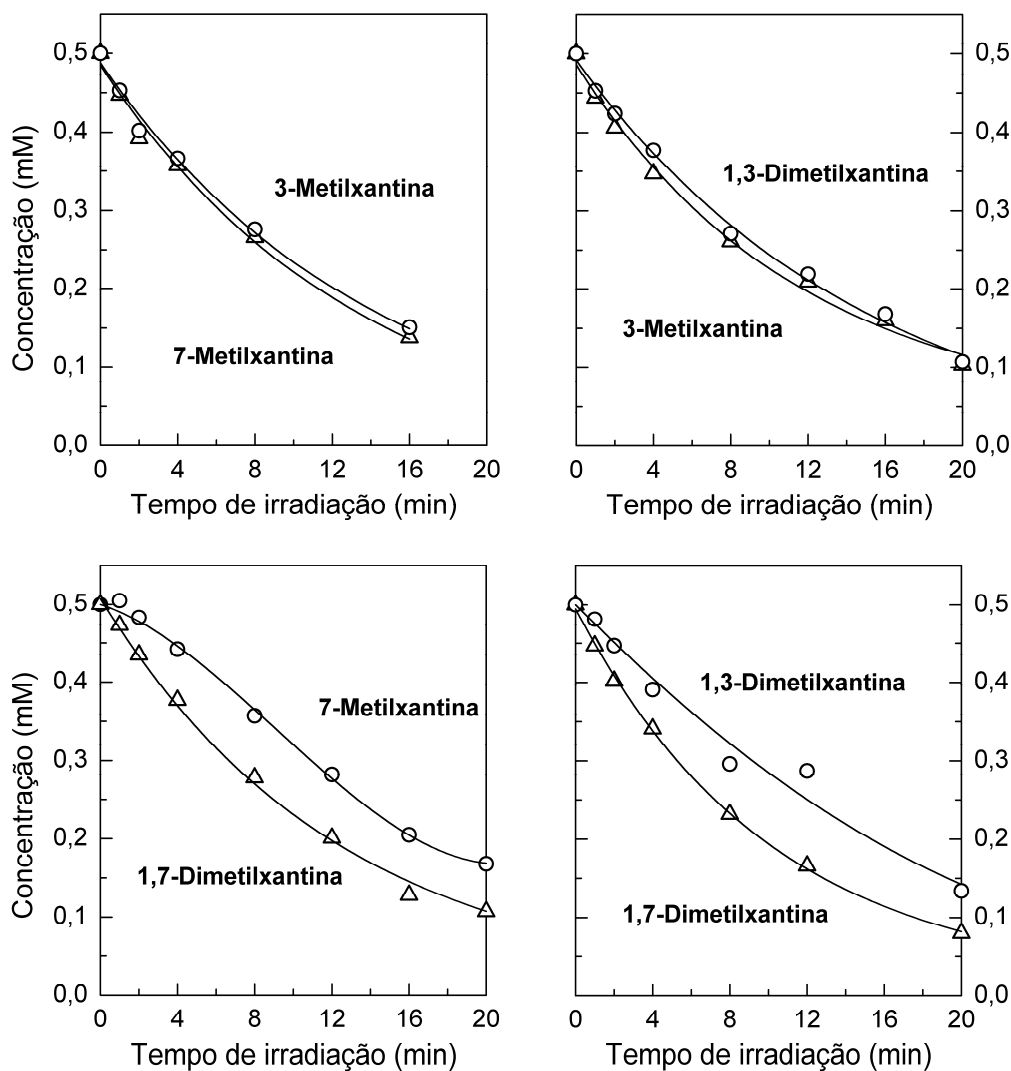


Figura 4.14 – Fotólise UV de misturas binárias de xantinas 0,5 mM cada com $K_2S_2O_8$ 20 mM a pH 7. Comparação entre xantinas N(3) e N(7)-substituídas.

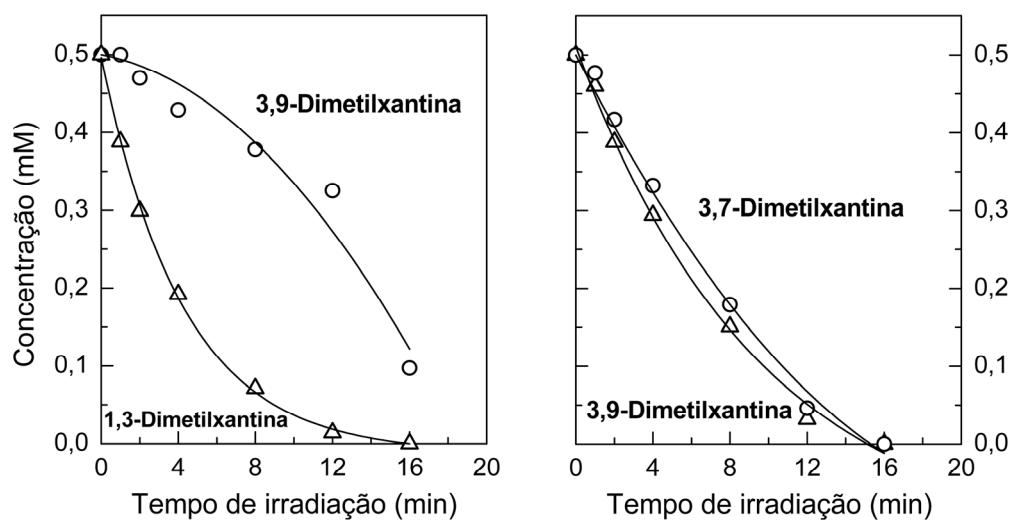


Figura 4.15 – Fotólise de misturas binárias de xantinas 0,5 mM cada e $K_2S_2O_8$ 20 mM a pH 7. Teobromina e 3,9-dimetilxantina.

Finalmente, e como seria de esperar, a 3,9-DiMeX e a 3,7-DiMeX continuam a ser as xantinas com menor capacidade antioxidante a pH 7. Na Figura 4.15 verifica-se que, para além destas não terem qualquer efeito reparador de uma sobre a outra, são reparadas pela 1,3-DiMeX e, segundo os resultados apresentados acima, por todas as outras xantinas estudadas.

4.4. Métodos computacionais

Utilizaram-se métodos computacionais para determinar a ordem de capacidade antioxidante relativa das xantinas em estudo. Para tal, calcularam-se as energias das espécies envolvidas nos equilíbrios de reparação de xantinas em meio ácido e meio neutro, e compararam-se os resultados obtidos com os dados experimentais.

Deste modo, realizaram-se cálculos de DFT utilizando o funcional híbrido sem restrição de *spin* (UB3LYP) com a base 6-31+G(2d,p) e o modelo de polarização contínua para descrever o efeito do solvente. Do conjunto de compostos estudados, apenas não se efectuaram cálculos para a Xao.

4.4.1. Equilíbrios em meio ácido

Como foi referido atrás, não há desprotonação das espécies envolvidas nos equilíbrios de reparação de xantinas a pH 3. Assim, apenas se calcularam as energias das espécies neutras (radicalares ou não) para avaliar para que sentido estaria deslocado o equilíbrio de reparação para cada mistura binária em meio ácido.

Há casos em que a estrutura de uma determinada espécie não é ambígua, tal como a de um radical neutro de uma dimetilxantina, cuja formação resulta da dissociação do único protão ácido do radical catião precursor. No entanto, noutros casos, há que contar com a possível existência de diversos tautómeros em equilíbrio para cada espécie (radicalar ou não) em solução aquosa. A energia destas espécies calculou-se como sendo a soma ponderada das energias de cada um dos seus tautómeros, cuja população é determinada pela distribuição de Boltzmann (equação 4.7),

$$\frac{N_i}{N_1} = e^{-\Delta E/RT} \quad \Delta E = E_i - E_1 \text{ (kJmol}^{-1}\text{)} \quad (4.7)$$

em que N_i corresponde à fracção do tautómero de energia E_i , R é a constante dos gases perfeitos e T a temperatura absoluta. Para cada espécie, tomou-se $E_1 = 0 \text{ kJmol}^{-1}$ como referência para o tautómero mais estável, pelo que a fracção de cada tautómero é calculada directamente pela expressão (4.8).

$$N_i = \frac{e^{-E_i/RT}}{\sum e^{-E_i/RT}} \quad (4.8)$$

Calcularam-se as energias dos vários tautómeros de cada espécie pelo método DFT acima referido. Na Tabela 4.2 apresentam-se as energias relativas e respectivas fracções dos tautómeros de cada espécie envolvida nos equilíbrios de xantinas a pH 3.

Provou-se que os radicais neutros das xantinas monometiladas 3-MeX, 7-MeX e 9-MeX existem apenas sob a forma de tautómeros $N(1)H$, uma vez que os que resultam da desprotonação em $N(1)$ são menos estáveis em cerca de 44 a 74 kJmol^{-1} . Embora não se apresentem cálculos semelhantes para a Xao, admite-se que o mesmo seja válido para este composto. No caso dos radicais neutros da Xan e da 1-MeX, os tautómeros $N(9)H$, de tipo **B2**, são largamente predominantes, o que está de acordo com o que foi discutido anteriormente. Relativamente aos substratos não radicalares, verifica-se a existência de uma pequena fracção dos respectivos tautómeros $N(9)$.

Como foi referido atrás, calculou-se a energia de cada espécie (substratos e radicais neutros) envolvida nos equilíbrios apresentados na secção 4.3 a partir da soma ponderada de cada tautómero. Na Tabela 4.3 apresentam-se os valores das energias livres de Gibbs calculados pela expressão (4.9) e correspondentes a cada reacção de reparação da xantina X_2 à custa da xantina X_1 , ou seja, à reacção directa do equilíbrio (4.5). Estas variações de energia resultam essencialmente de variações de entalpia uma vez que se admite que a contribuição da entropia é desprezável [21]. Deste modo, quando refere genericamente uma variação de energia está a considerar-se uma variação de entalpia.

$$\Delta G_{\text{reacção, aq}}^0 = \left\{ \Delta G_{\text{aq}}^0(X_1^\bullet) + \Delta G_{\text{aq}}^0(X_2) \right\}_{\text{prod}} - \left\{ \Delta G_{\text{aq}}^0(X_2^\bullet) + \Delta G_{\text{aq}}^0(X_1) \right\}_{\text{reag}} \quad (4.9)$$

Tabela 4.2 – Energias relativas e respectivas fracções dos tautómeros de cada espécie envolvida nos equilíbrios de xantinas a pH 3 e à temperatura ambiente (298 K).

Espécie neutra	Tautómero	Energia (kJmol ⁻¹)	Fracção (%)
Xan	Xan(1H3H7H)	0,00	98,9
	Xan(1H3H9H)	11,07	1,1
Xan [•]	Xan(1H3H) [•]	12,77	0,6
	Xan(1H7H) [•]	9,82	1,8
	Xan(1H9H) [•]	0,00	97,6
	Xan(3H7H) [•]	60,91	0,0
	Xan(3H9H) [•]	69,75	0,0
1-MeX	1-MeX(3H7H)	0,00	99,2
	1-MeX(3H9H)	11,83	0,8
1-MeX [•]	1-MeX(3H) [•]	12,46	0,6
	1-MeX(7H) [•]	8,81	2,8
	1-MeX(9H) [•]	0,00	96,6
3-MeX	3-MeX(1H7H)	0,00	99,4
	3-MeX(1H9H)	12,76	0,6
3-MeX [•]	3-MeX(1H) [•]	0,00	100,0
	3-MeX(7H) [•]	44,42	0,0
	3-MeX(9H) [•]	58,13	0,0
7-MeX [•]	7-MeX(1H) [•]	0,00	100,0
	7-MeX(3H) [•]	51,37	0,0
9-MeX [•]	9-MeX(1H) [•]	0,00	100,0
	9-MeX(3H) [•]	74,35	0,0
1,3-DiMeX	1,3-DiMeX(7H)	0,00	99,7
	1,3-DiMeX(9H)	14,20	0,3

Os valores apresentados na Tabela 4.3 são perfeitamente compatíveis com os resultados experimentais das misturas binárias irradiadas a pH 3. As reacções do primeiro conjunto possuem um valor de ΔG^0 muito baixo mas negativo, o que mostra que as xantinas com um grupo metilo em N(1) exercem um efeito reparador muito ligeiro sobre as xantinas análogas sem o grupo substituinte nessa posição, tal como se verificou na secção 4.3.2. No

segundo conjunto de resultados, os valores de ΔG^0 superiores a cerca de -15 kJmol^{-1} (em valor absoluto) confirmam a elevada capacidade antioxidante da 9-MeX sobre as outras xantinas monometiladas verificada na secção 4.3.3, enquanto que a 1-MeX consegue reparar com alguma eficácia a 3-MeX e a 7-MeX ($\Delta G \approx -8 \text{ kJmol}^{-1}$). O valor de ΔG^0 praticamente nulo obtido na reacção de reparação da 3-MeX pela 7-MeX (ou vice-versa) comprova que a capacidade antioxidante destas xantinas é idêntica. Tal como nas irradiações da mistura binária apresentada na secção 4.3.4, os cálculos teóricos confirmam a reparação da Xao pela 9-MeX ($\Delta G^0 = -17,44 \text{ kJmol}^{-1}$), fruto da influência do efeito indutivo do grupo substituinte em N(9). Finalmente, a elevada capacidade reparadora da 1,3-DiMeX sobre a 3,7-DiMeX e a 3,9-DiMeX ($\Delta G^0 \approx -43 \text{ kJmol}^{-1}$) coloca estas duas xantinas no grupo com menor poder antioxidante, tal como verificado experimentalmente e discutido na secção 4.3.5.

Tabela 4.3 – Energias livres de Gibbs das reacções de reparação da xantina X_2 à custa da xantina X_1 correspondentes às misturas binárias irradiadas a pH 3.

X_1	X_2^\bullet	\longrightarrow	X_1^\bullet	X_2	$\Delta G^0_{\text{reacção,aq}} (\text{kJmol}^{-1})$
<i>Efeito do grupo metilo na posição N(1)</i>					
1-MeX	Xan $^\bullet$	\longrightarrow	1-MeX $^\bullet$	Xan	-1,19
1,3-DiMeX	3-MeX $^\bullet$	\longrightarrow	1,3-DiMeX $^\bullet$	3-MeX	-1,45
1,7-DiMeX	7-MeX $^\bullet$	\longrightarrow	1,7-DiMeX $^\bullet$	7-MeX	-3,03
1,9-DiMeX	9-MeX $^\bullet$	\longrightarrow	1,9-DiMeX $^\bullet$	9-MeX	-1,77
<i>Efeito da posição do grupo metilo nos derivados monometilados</i>					
9-MeX	1-MeX $^\bullet$	\longrightarrow	9-MeX $^\bullet$	1-MeX	-16,25
1-MeX	7-MeX $^\bullet$	\longrightarrow	1-MeX $^\bullet$	7-MeX	-7,69
7-MeX	3-MeX $^\bullet$	\longrightarrow	7-MeX $^\bullet$	3-MeX	0,03
9-MeX	7-MeX $^\bullet$	\longrightarrow	9-MeX $^\bullet$	7-MeX	-23,94
<i>Efeito indutivo do substituinte em N(9)</i>					
9-MeX	Xao $^\bullet$	\longrightarrow	9-MeX $^\bullet$	Xao	-17,44
<i>Teobromina e 3,9-dimetilxantina</i>					
3,9-DiMeX	3,7-DiMeX $^\bullet$	\longrightarrow	3,9-DiMeX $^\bullet$	3,7-DiMeX	-0,88
1,3-DiMeX	3,9-DiMeX $^\bullet$	\longrightarrow	1,3-DiMeX $^\bullet$	3,9-DiMeX	-42,71

4.4.2. Cálculo dos valores de pK_a de radicais neutros

O cálculo das energias das espécies envolvidas nos equilíbrios de reparação de uma xantina sobre outra em meio fisiológico implica saber a extensão da sua desprotonação dado que a esse valor de pH pode haver a participação das respectivas formas aniónicas. Os valores de pK_a dos substratos são conhecidos (ver Tabela 4.1) e demonstrou-se [8] que o radical neutro da xantina possui um valor de pK_a de 5,0 (obtido a 280 K). No entanto, e tanto quanto se sabe, não existe na literatura qualquer referência a valores de pK_a para os radicais neutros das xantinas monometiladas. Nesta secção utilizou-se uma metodologia simples para estimar esses valores a partir das energias das espécies envolvidas em cada equilíbrio ácido-base.

O valor absoluto de pK_a de um ácido HA pode calcular-se directamente a partir da respectiva energia livre de desprotonação em solução aquosa [39-41] (equação 4.10).

$$pK_a = \frac{\Delta G_{\text{desprot, aq}}^0}{2,303RT} \quad (4.10)$$

O método mais comum para o cálculo da energia livre de desprotonação de um ácido em solução aquosa consiste na aplicação de ciclos termodinâmicos que combinam os valores de energia livre de Gibbs em fase gasosa de cada espécie envolvida no equilíbrio ácido-base com as respectivas energias livres de solvatação ($\Delta G_{\text{aq}}^0 = \Delta G_{\text{g}}^0 + \Delta G_{\text{solv}}^0$). Na Figura 4.16 representa-se o ciclo termodinâmico mais simples e mais utilizado para esse propósito [42].

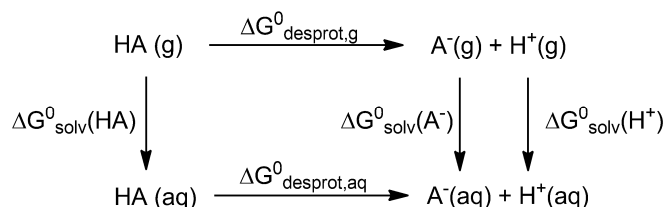


Figura 4.16 – Ciclo termodinâmico para o cálculo do valor da energia livre de Gibbs de desprotonação de um ácido HA em solução aquosa.

Assim, calcula-se a energia de desprotonação de cada substrato a partir dos valores das energias das espécies HA, A^- e H^+ em solução aquosa obtidas através dos cálculos DFT referidos anteriormente (equação 4.11). Dos diversos estudos existentes na literatura para a

estimativa da energia livre do próton em solução aquosa [43], considerou-se um dos que possui um menor erro associado [44], cujo valor é $\Delta G_{\text{aq}}^0(\text{H}^+) = -1104,5 \text{ kJmol}^{-1}$.

$$\Delta G_{\text{desprot, aq}}^0 = \Delta G_{\text{aq}}^0(\text{A}^-) + \Delta G_{\text{aq}}^0(\text{H}^+) - \Delta G_{\text{aq}}^0(\text{HA}) \quad (4.11)$$

Tal como anteriormente (ver 4.4.1), determinou-se a população dos tautómeros de cada espécie desprotonada (Tabela 4.4) para o cálculo das respectivas energias. Como esperado, os tautómeros que resultam da desprotonação de *N*(1) são muito menos estáveis e a sua contribuição para as energias dos respectivos aniões é desprezável. Obtiveram-se resultados muito semelhantes para o caso do ácido úrico e derivados metilados [4].

Testou-se primeiro este método de cálculo de valores de pK_a para as xantinas em estudo (excepto a Xao), cujos resultados se apresentam na Tabela 4.5. Por aplicação das equações (4.10) e (4.11) obtiveram-se valores de $\text{pK}_{a, \text{calc}}$ com um desvio elevado mas aproximadamente constante relativamente aos valores experimentais. Este desvio sistemático pode ter origem no método de cálculo DFT ou no facto de se ter optado por utilizar um valor estimado de $\Delta G_{\text{aq}}^0(\text{H}^+)$ obtido por um método diferente. Corrigiram-se os resultados obtidos para cada xantina ($\text{pK}_{a, \text{calc}}(X_i)$) tomando como referência o valor de pK_a da Xan segundo a expressão (4.12).

$$\text{pK}_{a, \text{corr}}(X_i) = \text{pK}_{a, \text{corr}}(\text{Xan}) \frac{\text{pK}_{a, \text{calc}}(X_i)}{\text{pK}_{a, \text{calc}}(\text{Xan})}, \quad \text{pK}_{a, \text{corr}}(\text{Xan}) \equiv \text{pK}_{a, \text{exp}}(\text{Xan}) \quad (4.12)$$

Após esta correcção, verifica-se que a diferença entre os valores de pK_a experimentais e calculados ($\text{pK}_{a, \text{corr}}(X_i)$) é inferior a 0,35 para a todas as xantinas à excepção das *N*(9) substituídas, onde o desvio é um pouco maior (Tabela 4.5). Dado que os resultados desta metodologia são satisfatórios, fez-se o mesmo para calcular os valores de pK_a dos radicais neutros das xantinas monometiladas (Tabela 4.6).

Aplicaram-se as expressões (4.10) e (4.11) para as espécies envolvidas nos equilíbrios ácido-base dos radicais neutros, e corrigiram-se os valores obtidos de pK_a ($\text{pK}_{a, \text{calc}}$) de forma análoga tendo como referência $\text{pK}_{a, \text{exp}}(\text{Xan}^\bullet) = 4,70$ (25°C) [8].

Dos resultados da Tabela 4.6, verifica-se que, à excepção do radical 9-MeX[•], os valores de pK_a dos radicais neutros seguem exactamente a mesma ordem prevista e discutida anteriormente na secção 4.3.6.

Tabela 4.4 – Energias relativas e respectivas fracções dos tautómeros das espécies aniónicas envolvidas nos equilíbrios de xantinas a pH 7 e à temperatura ambiente (298 K).

Espécie aniónica	Tautómero	Energia (kJmol ⁻¹)	Fracção (%)
Xan ⁻	Xan(1H3H) ⁻	0,00	63,8
	Xan(1H7H) ⁻	7,85	2,7
	Xan(1H9H) ⁻	1,60	33,5
	Xan(3H7H) ⁻	22,78	0,0
	Xan(3H9H) ⁻	36,71	0,0
Xan ^{•-}	Xan(1H) ^{•-}	0,00	100,0
	Xan(3H) ^{•-}	37,87	0,0
	Xan(7H) ^{•-}	51,12	0,0
	Xan(9H) ^{•-}	48,36	0,0
1-MeX ⁻	1-MeX(3H) ⁻	0,00	73,2
	1-MeX(7H) ⁻	7,87	3,0
	1-MeX(9H) ⁻	2,79	23,8
3-MeX ⁻	3-MeX(1H) ⁻	0,00	100,0
	3-MeX(7H) ⁻	23,79	0,0
	3-MeX(9H) ⁻	39,07	0,0
7-MeX ⁻	7-MeX(1H) ⁻	0,00	100,0
	7-MeX(3H) ⁻	16,34	0,0
9-MeX ⁻	9-MeX(1H) ⁻	0,00	100,0
	9-MeX(3H) ⁻	37,18	0,0

Tabela 4.5 – Valores de pK_a (25°C) da xantina e seus derivados metilados determinados a partir das energias de cada espécie do equilíbrio ácido-base obtidas por cálculos DFT ($pK_{a,calc}$). Comparação entre valores calculados após correção ($pK_{a,corr}$) e valores experimentais ($\Delta pK_a = pK_{a,corr} - pK_{a,exp}$).

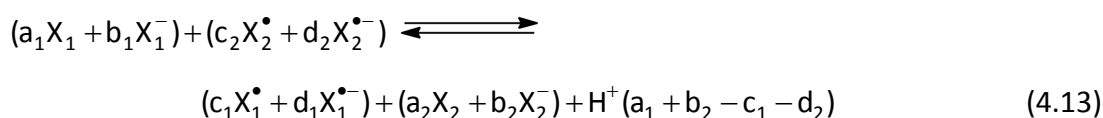
Composto	$\Delta G^0_{desprot}$ (kJmol ⁻¹)	$pK_{a,calc}$	$pK_{a,corr}$	$pK_{a,exp}$ (25°C)	ΔpK_a
Xan	127,27	22,29	7,61	7,61	---
1-MeX	133,61	23,40	7,99	7,70	0,29
3-MeX	130,36	22,84	7,79	8,10	-0,31
7-MeX	138,82	24,32	8,30	8,30	0,00
9-MeX	117,42	20,57	7,02	6,25	0,77
13-DiMeX	136,69	23,94	8,17	8,40	-0,23
17-DiMeX	144,42	25,30	8,64	8,30	0,34
19-DiMeX	123,49	21,63	7,38	6,15	1,23
37-DiMeX	159,83	28,00	9,56	9,67	-0,11
39-DiMeX	159,35	27,91	9,53	9,50	0,03

Tabela 4.6 – Valores de pK_a (25°C) dos radicais da xantina e seus derivados monometilados determinados a partir das energias de cada espécie do equilíbrio ácido-base obtidas por cálculos DFT ($pK_{a,calc}$) e respectiva correção ($pK_{a,corr}$) tendo como referência $pK_{a,exp}(Xan^\bullet) = 4,70$.

Radical	$\Delta G^0_{desprot}$ (kJmol ⁻¹)	$pK_{a,calc}$	$pK_{a,corr}$
Xan [•]	94,35	16,53	4,70
1-MeX [•]	99,40	17,41	4,95
3-MeX [•]	124,46	21,80	6,20
7-MeX [•]	142,08	24,89	7,08
9-MeX [•]	146,86	25,72	7,31

4.4.3. Equilíbrios em meio fisiológico (pH 7)

Nas misturas binárias irradiadas a pH 7 há que considerar a possível participação de espécies aniónicas nos equilíbrios de reparação de uma xantina (X_2) à custa de outra (X_1), pelo que a sua forma genérica é dada agora pela equação (4.13).



Os coeficientes de cada espécie do equilíbrio dizem respeito às fracções das formas neutra e desprotonada dos substratos (a_i e b_i) e dos respectivos radicais neutros (c_i e d_i), pelo que cada um dos quatro primeiros termos representa uma concentração total (ou energia, para efeitos de cálculos DFT) (equações (4.14) e (4.15)).

$$\overline{X}_i = a_iX_i + b_iX_i^- \quad a_i + b_i = 1 \quad (4.14)$$

$$\overline{X}_i^\bullet = c_iX_i^\bullet + d_iX_i^{\bullet-} \quad c_i + d_i = 1 \quad (4.15)$$

A energia livre de Gibbs correspondente à reacção directa do equilíbrio (4.13) é dada pela expressão (4.16), onde $\delta = a_1 + b_2 - c_1 - d_2$.

$$\Delta G_{\text{reacção, aq}}^0 = \left\{ \Delta G_{\text{aq}}^0(\overline{X}_1^\bullet) + \Delta G_{\text{aq}}^0(\overline{X}_2) + \delta \Delta G_{\text{aq}}^0(H^+) \right\}_{\text{prod}} - \left\{ \Delta G_{\text{aq}}^0(\overline{X}_2^\bullet) + \Delta G_{\text{aq}}^0(\overline{X}_1) \right\}_{\text{reag}} \quad (4.16)$$

Tabela 4.7 – Fracções das espécies envolvidas nos equilíbrios de reparação de xantinas em meio fisiológico e a 25°C. Os valores de c_i e d_i das xantinas monometiladas foram obtidos a partir dos respectivos pK_a estimados por cálculos DFT.

Composto	$a_i (X_i)$	$b_i (X_i^-)$	$c_i (X_i^\bullet)$	$d_i (X_i^{\bullet-})$
Xan	0,803	0,197	0,005	0,995
1-MeX	0,834	0,166	0,009	0,991
3-MeX	0,926	0,074	0,136	0,864
7-MeX	0,952	0,048	0,543	0,457
9-MeX	0,151	0,849	0,673	0,327
1,3-DiMeX	0,962	0,038	1,000	---
1,7-DiMeX	0,952	0,048	1,000	---
1,9-DiMeX	0,124	0,876	1,000	---
3,7-DiMeX	0,998	0,002	1,000	---
3,9-DiMeX	1,000	0,000	1,000	---

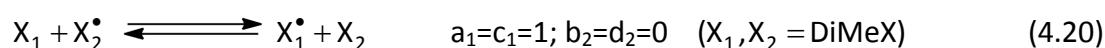
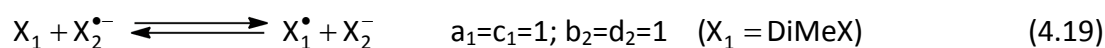
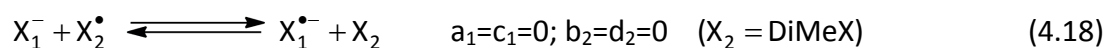
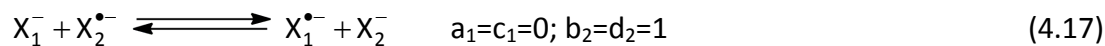
Na Tabela 4.7 apresentam-se os coeficientes a_i , b_i , c_i e d_i de cada espécie, obtidos a partir dos valores de pK_a experimentais (Tabela 4.5) e estimados (Tabela 4.6). Como é evidente, no caso das dimetilxantinas não pode haver desprotonação dos respectivos radicais neutros pelo que $c_i = 1$.

Como anteriormente, e sempre que aplicável, as energias das espécies envolvidas no equilíbrio (4.13) calcularam-se como sendo a média ponderada das energias dos respectivos tautómeros (Tabela 4.2 e Tabela 4.4).

Na Tabela 4.8 (Caso I) apresentam-se os resultados das energias livres de Gibbs obtidos através da aplicação da reacção directa do equilíbrio (4.13) com os respectivos coeficientes da Tabela 4.7, ou seja, admite-se a participação de todas as espécies (neutras e aniónicas) no equilíbrio. Como se pode verificar, na maioria dos equilíbrios os valores de ΔG^0 obtidos não traduzem os resultados experimentais. Uma das razões tem a ver com o próprio valor de $\Delta G^0_{aq}(H^+)$, cujas estimativas na literatura variam em cerca de 20 kJmol^{-1} [45]. Este desvio em relação ao valor escolhido é suficientemente elevado para, por exemplo, baixar o valor de pK_a calculado ($pK_{a,corr}$, Tabela 4.6) do radical neutro da 9-MeX em 0,5 unidades. Além disso, o termo $\delta\Delta G^0_{aq}(H^+)$ é da mesma ordem de grandeza que $\Sigma\Delta G^0_{aq}(X_i)_{prod} - \Sigma\Delta G^0_{aq}(X_i)_{reag}$, pelo que um desvio de $\Delta G^0_{aq}(H^+)$ tal como referido acima pode alterar o valor de $\Delta G^0_{reacção,aq}$ até cerca de 50 kJmol^{-1} (em valor absoluto). Outra razão que pode justificar as discrepâncias entre os resultados experimentais e teóricos (Caso I) é o facto de se ter considerado a participação de H^+ quer no cálculo dos pK_a dos radicais neutros como no equilíbrio (4.13), em vez do par H_2O/H_3O^+ . Finalmente, o mecanismo reaccional entre a espécie reparadora e a espécie radicalar reparada pode ser distinto consoante estas estejam na forma neutra e/ou aniónica, ou seja, pode tratar-se de uma reparação por abstracção de um átomo de hidrogénio ou apenas por transferência directa de electrão. Ao calcular $\Delta G^0_{reacção,aq}$ segundo a expressão (4.16) não se está a fazer a distinção entre esses mecanismos.

Na Tabela 4.8 (Caso II) apresentam-se igualmente valores $\Delta G^0_{reacção,aq}$ obtidos através da aplicação da reacção directa do equilíbrio (4.13), mas admitindo apenas o mecanismo de reparação por abstracção de um átomo de hidrogénio. Além disso, considerou-se ainda que a espécie reparadora (reduzora) é aniónica, excepto para o caso das dimetilxantinas em que tem que ser neutra, caso contrário a reacção ocorreria por transferência de electrão. Em qualquer destas situações, os coeficientes das espécies participantes no equilíbrio da reacção de reparação são unitários, ou seja, admite-se que à

medida que a reacção decorre, os respectivos equilíbrios ácido-base dos reagentes se deslocam no sentido da formação das espécies participantes na reacção de reparação. Assim, $\delta=0$ e, portanto, deixa de haver a contribuição do termo $\delta\Delta G^0_{\text{aq}}(\text{H}^+)$ no cálculo da energia da reacção de reparação (equações (4.17) a (4.20)).



Os valores obtidos no Caso II reproduzem, de uma forma geral, os resultados experimentais a pH 7, sobretudo para as misturas onde houve um efeito reparador mais evidente.

Verifica-se claramente que a 1-MeX é a xantina mais reparadora de todas. A energia de reparação desta sobre a Xan é de apenas $-2,48 \text{ kJmol}^{-1}$, fruto do efeito do grupo metilo em $N(1)$ já discutido, enquanto que a energia de reparação sobre a xantina mais oxidante (3,7-DiMeX) é de $-84,01 \text{ kJmol}^{-1}$. Verifica-se igualmente a clara diferença de capacidade antioxidante entre o grupo formado pela 1-MeX e Xan e as xantinas $N(9)$ substituídas. Nestas, a 1,9-DiMeX exerce um efeito reparador considerável sobre a 9-MeX, como aliás se previu dado o carácter mais oxidante de $9\text{-MeX}^{\bullet-}$ relativamente a $1,9\text{-DiMeX}^{\bullet}$, para além do efeito do grupo metilo em $N(1)$. Entre a 9-MeX e a 7-MeX, o resultado indica uma fraca reparação desta sobre a primeira. No entanto, e tal como para os resultados do grupo composto pelas xantinas 3-MeX, 7-MeX, 1,3-DiMeX e 1,7-DiMeX, os valores de $\Delta G^0_{\text{reacção, aq}}$ calculados para as condições implícitas neste Caso II não são suficientemente elevados (em termos absolutos) para retirar conclusões inequívocas sobre a reparação (ou a sua inexistência) de uma xantina sobre a outra. Finalmente, as xantinas 3,7-DiMeX e 3,9-DiMeX continuam a formar o conjunto de menor capacidade antioxidante, tal como previsto na secção 4.3.6.

Apesar dos resultados do Caso II traduzirem com mais fidelidade o que se verificou experimentalmente a pH 7, é possível que haja alguma participação de espécies que não foram consideradas nas expressões (4.17) a (4.20). Seria necessário conhecer, para cada caso, as constantes de velocidade entre a espécie reparadora e a espécie radicalar reparada

(neutras e aniónicas). Por outro lado, as energias obtidas para os equilíbrios a pH 3 (secção 4.4.1) são mais realistas, uma vez que não há dúvidas quanto às espécies participantes e, por isso, o mecanismo reaccional é igual em todos os casos.

Tabela 4.8 – Energias livres de Gibbs das reacções de reparação da xantina X_2 à custa da xantina X_1 correspondentes às misturas binárias irradiadas a pH 7, a partir dos Casos I e II.

$\overline{X_1} + \overline{X_2} \rightarrow \overline{X_1} + \overline{X_2} + \delta H^+$		$\Delta G^0_{\text{reacção,aq}} \text{ (kJmol}^{-1}\text{)}$	
X_1	X_2	Caso I	Caso II
1-MeX	Xan	6,30	-2,48
1-MeX	1,9-DiMeX	202,52	-16,20
1-MeX	9-MeX	144,18	-47,40
1,9-DiMeX	9-MeX	-58,27	-31,20
1,9-DiMeX	7-MeX	-192,14	-28,97
9-MeX	7-MeX	-133,87	2,24
1,7-DiMeX	7-MeX	-68,21	-6,29
1,7-DiMeX	1,3-DiMeX	-3,18	-1,55
7-MeX	3-MeX	-39,59	9,19
1,3-DiMeX	3-MeX	-104,63	4,44
1,3-DiMeX	3,9-DiMeX	-47,47	-42,72
3,9-DiMeX	3,7-DiMeX	-1,04	-0,88
1-MeX	3,7-DiMeX	26,84	-84,01

4.5. Determinação dos potenciais de redução por voltametria cíclica

Os resultados obtidos por irradiação UV de misturas binárias de xantinas com persulfato de potássio permitiram ordená-las segundo uma escala relativa de capacidade antioxidante. Nesta secção, determinou-se o potencial de redução de cada xantina por voltametria cíclica de forma a estabelecer um paralelo entre esta propriedade intrínseca e o respectivo efeito reparador. Na Figura 4.17 apresenta-se um exemplo típico de uma curva de corrente-potencial obtida para estes compostos.

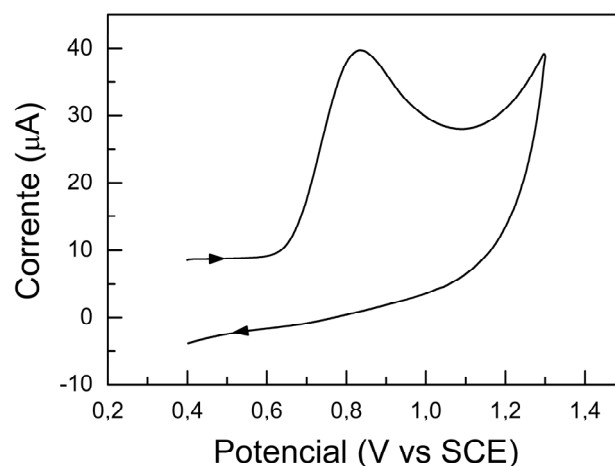


Figura 4.17 – Voltamograma cíclico de uma solução aquosa de Xan 1 mM a pH 7 obtido com uma velocidade de varrimento de 40 mVs^{-1} .

O varrimento no sentido do aumento do potencial aplicado apresenta um pico de oxidação (pico anódico), enquanto que no varrimento inverso não se observa nenhum pico de redução. Isto significa que todas as oxidações à superfície do eléctrodo são irreversíveis. A decomposição bimolecular dos radicais das xantinas por dismutação dá-se mais rapidamente que o varrimento de potencial aplicado. Os valores de potencial dos picos de oxidação para cada composto apresentam-se no Esquema 4.5.

Os valores de potencial de redução que se encontram na literatura para algumas das xantinas [18, 46] seguem a mesma ordem obtida neste conjunto de experiências (por exemplo, 0,683 V para a Xan, 0,936 V para a 1,3-DiMeX e 1,246 V para a 3,7-DiMeX a pH 7).

A ordem crescente dos valores de potencial de redução obtidos por voltametria cíclica é bastante concordante com os resultados obtidos por fotólise, apesar destes últimos corresponderem a reacções reversíveis em equilíbrio. Os cinco conjuntos de xantinas considerados para ambos os valores de pH possuem, de uma forma geral, uma diferença de valores de potenciais de redução apreciáveis ($E_p > 30 \text{ mV}$ aproximadamente). Por outro lado, as diferenças de potencial de redução dentro de cada conjunto são muito ténues, excepção feita para a 1,7-DiMeX. No entanto, e sobretudo a pH 7, também se verifica algum efeito reparador desta xantina sobre todas as outras do seu conjunto nas respectivas misturas binárias irradiadas (ver Figura 4.14).

4.6. Espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica

A espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica (RPE) é uma técnica fundamental para o estudo e caracterização de radicais instáveis derivados de xantinas substituídas em solução aquosa [4, 8, 27].

Obtiveram-se espectros de RPE por fotólise *in situ* de soluções aquosas de 1-MeX ou de 3-MeX contendo persulfato de potássio, a valores de pH entre 9 e 13 (Figura 4.18), que foram atribuídos aos respectivos radicais aniões (Figura 4.19). Não foi possível interpretar os espectros de RPE obtidos com a 7-MeX e 9-MeX por serem demasiado fracos e complexos. Não se detectou nenhum espectro para qualquer dos compostos estudados a valores mais baixos de pH. Nessas condições, as espécies radicalares são neutras e é de esperar que decaiam mais rapidamente por reacções bimoleculares, pelo que os respectivos tempos de vida são muito mais curtos.

Os cálculos DFT são consistentes com as constantes de acoplamento hiperfino de radicais de pirimidinas e purinas e a estabilidade relativa dos respectivos tautómeros [4, 47, 48]. Assim, efectuaram-se cálculos teóricos para a atribuição das constantes de acoplamento hiperfino de espectros de RPE obtidos a valores elevados de pH. As constantes calculadas estão de acordo com as obtidas experimentalmente (Figura 4.19).

A oxidação da Xao, o nucleósido natural da xantina, a pH 10, deu origem a um espectro que foi atribuído ao respectivo radical anião (Figura 4.18). O espectro foi interpretado como tendo constantes de acoplamento para os quatro átomos de N e H(6) purínicos, e o átomo H(2') do grupo ribosilo (Figura 4.19). A estrutura do radical anião Xao^{•-} em fase gasosa obtida por cálculos DFT apresenta uma ligação de hidrogénio intramolecular entre N(3) purínico e o grupo hidroxilo em C(5'). Dado que o N(3) possui uma densidade de *spin* considerável, como se verifica pelo valor da constante de acoplamento experimental de 4,5 G (o valor calculado é de 5,1 G), a ligação de hidrogénio induz uma pequena densidade de *spin* nos átomos de hidrogénio do grupo OH e de C(5'), com constantes calculadas de -0,3 G e de 0,2 G, respectivamente. Além disso, na estrutura optimizada, o átomo H(2') está praticamente no mesmo plano da purina, e, conseqüentemente, perpendicular aos orbitais π conjugados. Esta conformação produz uma pequena constante de acoplamento calculada de apenas 0,2 G.

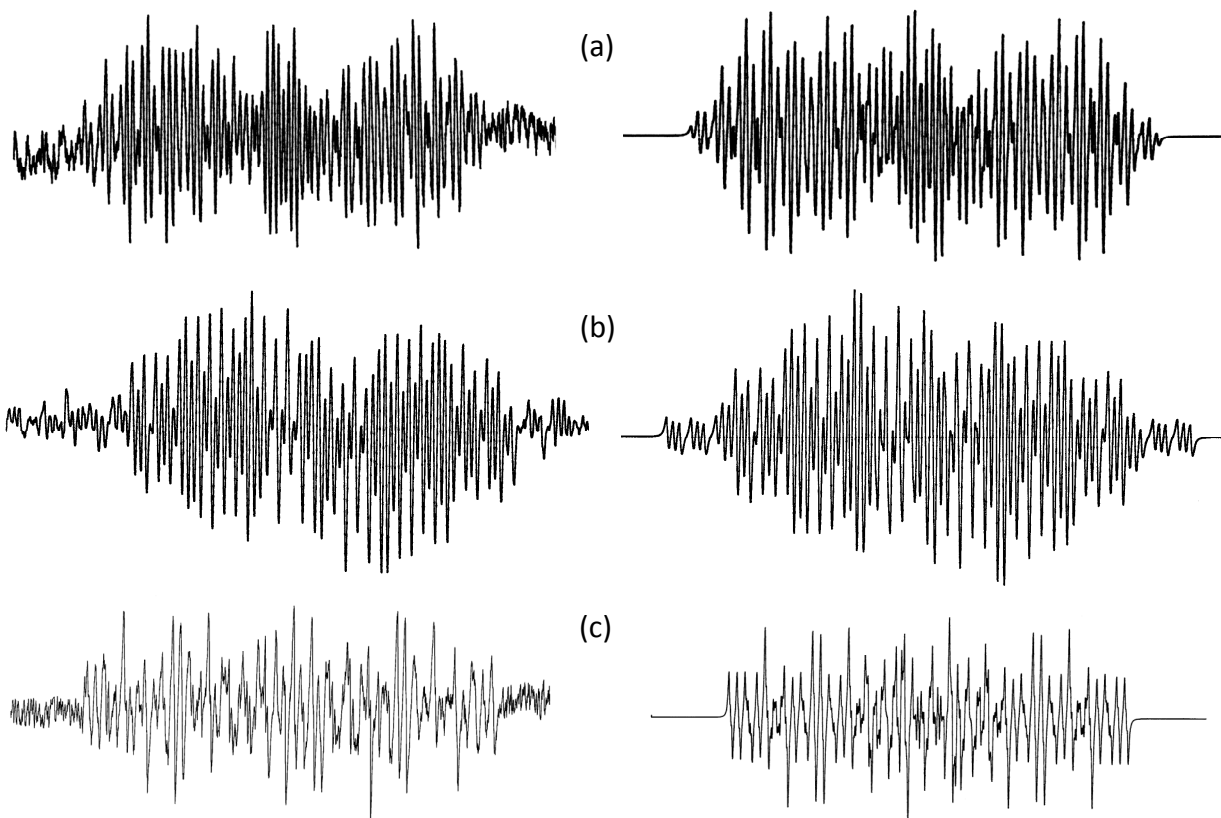


Figura 4.18 – Espectros de RPE experimentais (lado esquerdo) e respectivas simulações (lado direito) dos radicais aniões (a) 1-MeX^{•-}, (b) 3-MeX^{•-} e (c) Xao^{•-}.

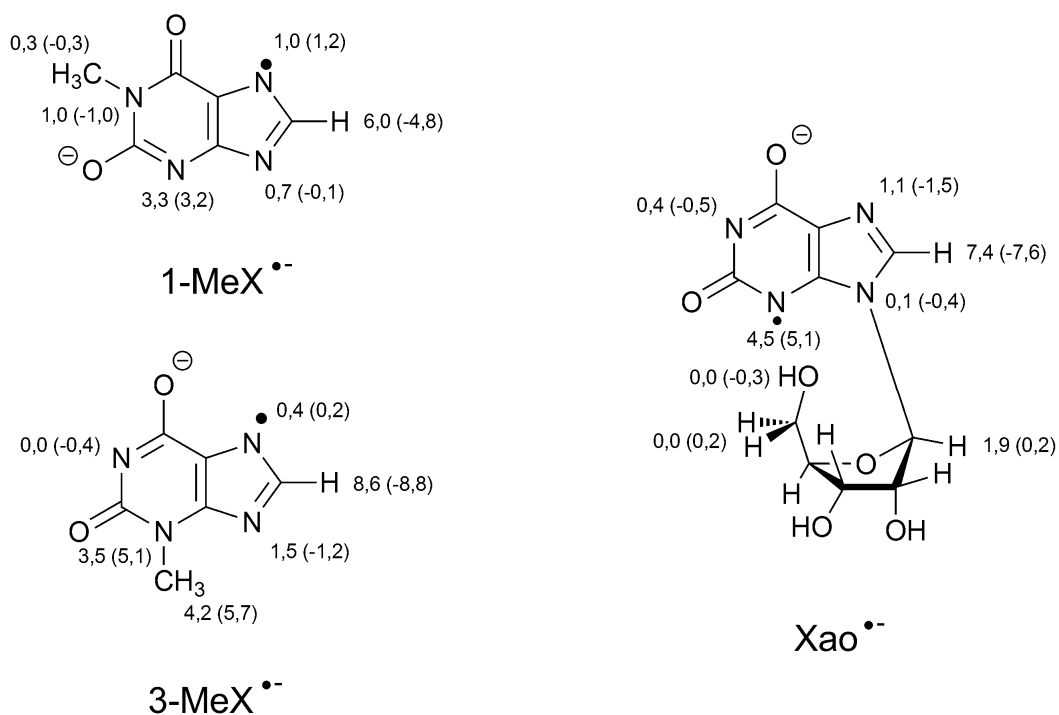


Figura 4.19 – Constantes de acoplamento hiperfino experimentais (e calculadas) dos radicais aniões dos derivados da xantina, obtidas por espectroscopia de RPE (valores em Gauss).

Em solução aquosa, a ligação de hidrogénio do solvente provoca a disrupção da ligação intramolecular O(5')H-N(3). Deste modo, não se detectam constantes de acoplamento para o grupo C(5')H₂OH, e o valor experimental da constante de acoplamento de H(2') é consideravelmente superior ao calculado, o que indica que o radical deve estar numa conformação em que o átomo de hidrogénio está numa posição mais perto da perpendicularidade relativamente à estrutura purínica.

4.7. Desmetilação da teofilina a 1-metilxantina

Como se mostra no Esquema 4.5, nenhuma das xantinas naturais usualmente presentes na dieta humana (teofilina, teobromina e cafeína) é potencialmente um bom antioxidante. Contudo, durante o seu metabolismo, se a teofilina (a mais antioxidante das três) sofrer desmetilação de N(3) dará origem à 1-MeX, a mais antioxidante das xantinas aqui estudadas a pH fisiológico.

4.7.1. Oxidação da teofilina pelo radical hidroxilo

Com o objectivo de avaliar a possibilidade do mecanismo de desmetilação, efectuou-se a reacção da teofilina com o radical HO[•] gerado por fotólise UV de peróxido de hidrogénio, tal como descrito na Parte Experimental (ver 3.4.1).

Detectaram-se produtos de reacção após tempos de reacção curtos. A Figura 4.20 mostra um cromatograma obtido após irradiação UV de uma solução aquosa contendo teofilina e H₂O₂. Para além do reagente inicial não transformado (pico principal; tempo de retenção de aproximadamente 15 min), detectaram-se dois produtos maioritários, o ácido úrico da teofilina (ácido 1,3-dimetilúrico) e a 1-MeX. Para tempos de irradiação mais longos, a concentração destes produtos diminui pois também reagem com o radical HO[•].

O ácido 1,3-dimetilúrico é um produto esperado, uma vez que é conhecido que as xantinas e seus derivados são oxidados pelo radical hidroxilo aos respectivos ácidos úricos, por adição do HO[•] à posição C(8) seguida de oxidação do radical redutor resultante [49]. Contudo, a 1-MeX é um produto novo, que normalmente não é referido como produto de oxidação da teofilina. A formação deste composto e de uma quantidade mais pequena de 3-MeX foi confirmada por comparação dos tempos de retenção e dos espectros de UV respectivos com os de amostras padrão, bem como por espectrometria de massa.

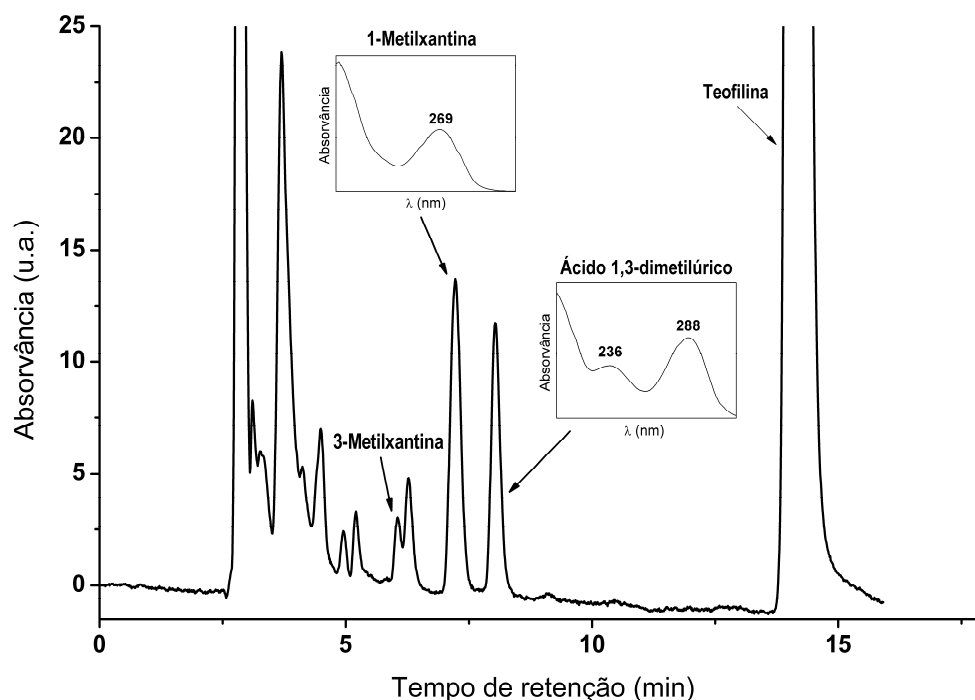


Figura 4.20 – Cromatograma HPLC (sistema Shimadzu) após 4 min de irradiação UV de uma solução aquosa de teofilina 1 mM, H₂O₂ 20 mM e tampão fosfatos 5 mM (reação com o radical HO[•], pH 7).

Repetiu-se a mesma reação da teofilina com o radical HO[•] a pH 7 em larga escala para identificação e caracterização dos produtos de desmetilação, tal como descrito na Parte Experimental (ver 3.4.1). Controlou-se a formação dos produtos de oxidação da teofilina por HPLC e, após se obter um rendimento máximo dos produtos de desmetilação (atingido ao fim de 18 min de irradiação UV), concentrou-se a amostra, extraiu-se com acetato de etilo, evaporou-se o solvente e derivatizou-se o resíduo seco com MSTFA. O cromatograma de GC-MS da amostra derivatizada mostrou dois picos com tempos de retenção de 10,7 min e 11,4 min idênticos aos obtidos com os padrões (derivatizados da mesma forma) de 3-MeX e 1-MeX, respectivamente. Os espectros de massa (compatíveis com os dos padrões derivatizados) apresentam um pico correspondente ao íon molecular com $m/z = 310$ e um pico base a $m/z = 295$ correspondente a um fragmento obtido por perda de um grupo metilo (Figura 4.21). Ambos os espectros apresentam um pico muito intenso com $m/z = 73$ que corresponde ao íon trimetilsililo proveniente da derivatização com MSTFA. Estes resultados mostram que os dois novos produtos, formados por oxidação da teofilina pelo radical HO[•], possuem duas posições de derivatização, o que demonstra a perda de um grupo metilo da teofilina.

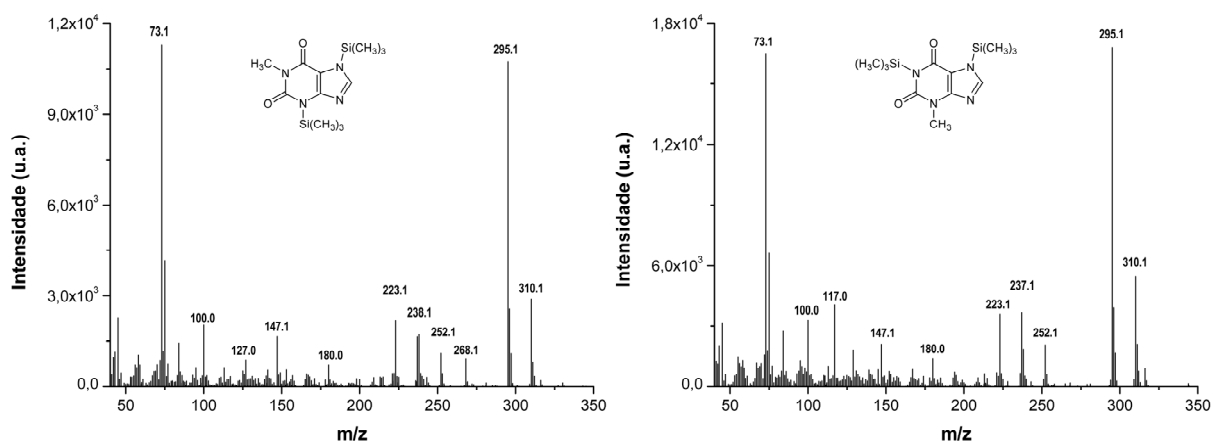


Figura 4.21 – Espectros de massa (sistema Agilent) dos produtos de desmetilação derivatizados obtidos após reacção de teofilina como radical HO^\bullet (condições descritas na Figura 4.20)

No cromatograma de GC-MS da mistura reaccional derivatizada identificaram-se ainda outros picos, alguns dos quais atribuídos a oxidações radiculares sucessivas de xantinas por comparação com a base de dados de espectros, tal como por exemplo o ácido dimetilparabânico, a dimetilureia e a dimetilalantoína.

O possível mecanismo reaccional para a formação de 1-MeX é proposto e discutido mais abaixo. É sabido que o radical HO^\bullet reage com compostos heterocíclicos aromáticos principalmente por adição a uma ligação dupla, e, em menor extensão, por abstracção de um átomo de hidrogénio [33, 50]. Enquanto que a formação do ácido úrico resulta da adição habitual de HO^\bullet à ligação dupla em C(8), a formação do produto de desmetilação (1-MeX) implica a perda de um átomo de carbono, consistente com o segundo mecanismo acima referido (ver Esquema 4.6). Detectou-se igualmente o outro produto de desmetilação, a 3-MeX, mas em muito menor quantidade (ver Figura 4.20).

Estes produtos de desmetilação foram sempre observados em concentrações baixas (comparadas com a da teofilina) mesmo para tempos de irradiação longos, o que sugere que eles próprios são consumidos pelo radical oxidante. Este comportamento foi confirmado com mais detalhe na reacção com o radical anião $\text{O}^{\bullet-}$ (ver 4.7.2). Assim, os produtos resultantes de nova oxidação de 1-MeX e 3-MeX (xantina e ácidos 1-metil e 3-metilúricos) formar-se-ão com rendimentos abaixo dos limites de detecção dos sistemas de análise utilizados (HPLC e GC-MS).

Em condições fisiológicas (pH 7), a reacção de desmetilação da teofilina a 1-MeX é importante já que ambos os compostos desempenham um papel relevante como antioxidantes na protecção de alvos biológicos contra o *stress* oxidativo. Por exemplo, no

caso da adenina, ambos os compostos exercem um efeito importante na protecção desta base contra a sua oxidação pelo radical HO^\bullet , tal como se mostra na Figura 4.22.

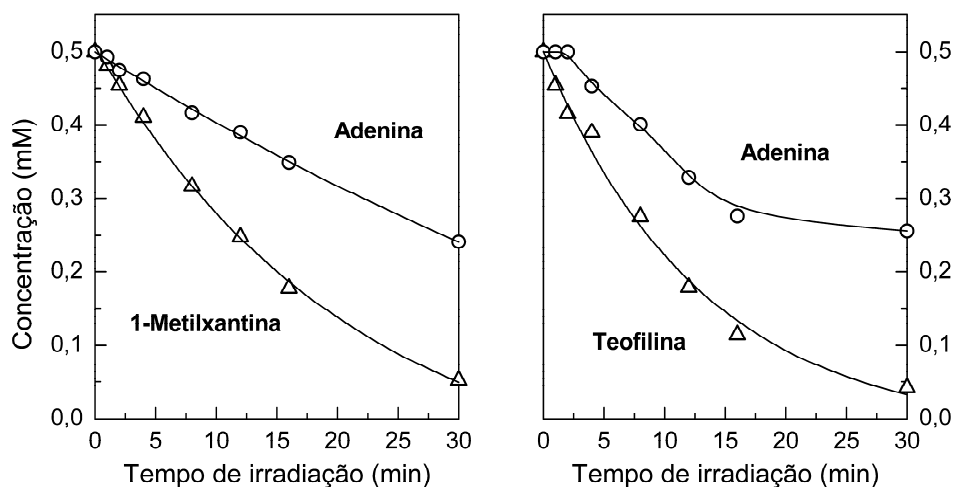


Figura 4.22 – Dependência da concentração em função do tempo de irradiação seguida por HPLC (sistema Shimadzu) na fotólise UV de misturas binárias de substratos 0,5 mM cada (adenina e antioxidante), H_2O_2 20 mM e tampão de fosfatos 5 mM (pH 7).

Demonstrou-se anteriormente (ver 4.3.6) que a 1-MeX é um antioxidante mais forte que a teofilina. Deste modo, os resultados aqui apresentados sugerem que a conversão parcial de teofilina a 1-MeX pode ter um efeito sinérgico, em que a reacção de desmetilação desempenha um papel importante como primeiro passo de uma cascata antioxidante.

4.7.2. Oxidação da teofilina em meio fortemente básico (radical anião $\text{O}^{\bullet-}$)

Para confirmar o mecanismo reaccional por abstracção de um átomo de hidrogénio, fez-se reagir a teofilina em meio fortemente básico, em que os produtos formados resultam da oxidação pela base conjugada do radical hidroxilo ($\text{O}^{\bullet-}$), conhecido por ser um melhor abstrator de hidrogénio do que o radical HO^\bullet [51].

A Figura 4.23 mostra um cromatograma obtido após irradiação UV de uma solução aquosa contendo teofilina e *N*-óxido de 4-mercaptopiridina, um bom precursor do radical HO^\bullet que se pode fotolisar a valores elevados de pH, permitindo a obtenção de produtos resultantes da oxidação pelo radical anião $\text{O}^{\bullet-}$ [52]. Os picos do cromatograma com tempo de retenção inferior ao da 3-MeX correspondem a compostos dissulfureto conhecidos por serem produtos de degradação do *N*-óxido de 4-mercaptopiridina [52].

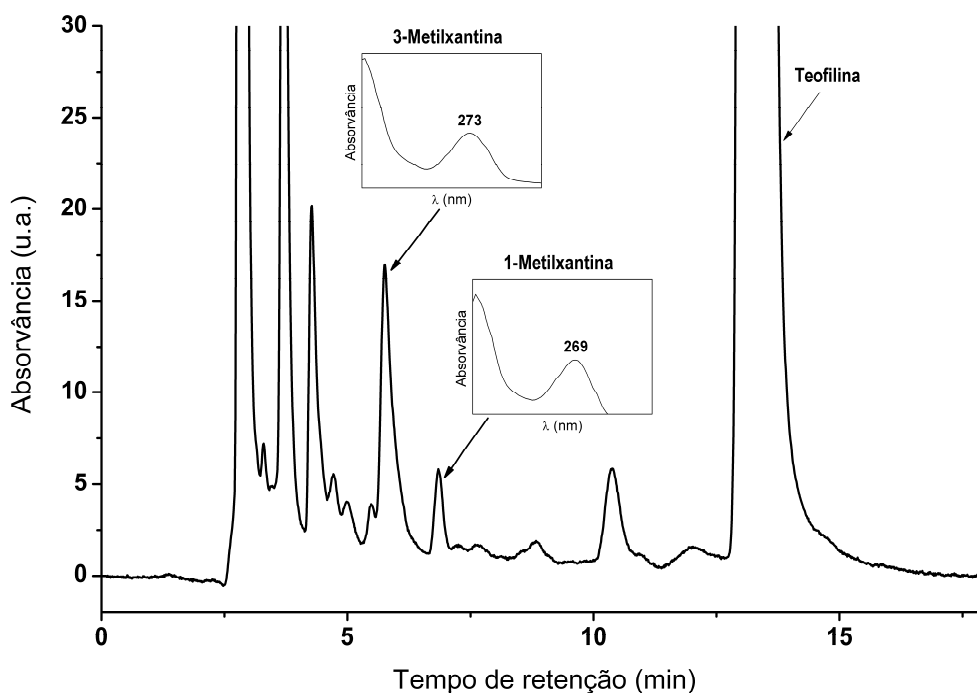


Figura 4.23 – Cromatograma HPLC (sistema Shimadzu) após 25 min de irradiação UV de uma solução aquosa de teofilina 2 mM, *N*-óxido de 4-mercaptopiridina 0,5 mM e tampão fosfatos 5 mM (reacção com o radical anião $O^{\bullet-}$, pH \approx 13)

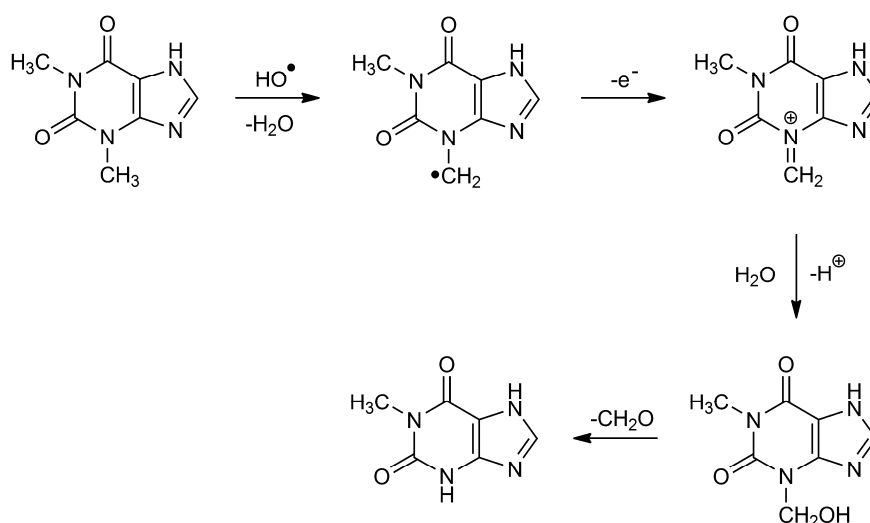
Os tempos de reacção apresentados nas Figura 4.21 e Figura 4.23 correspondem aos rendimentos máximos obtidos para os produtos de desmetilação. No caso da reacção com o radical anião $O^{\bullet-}$, o maior tempo de reacção (25 min) reflecte a sua menor reactividade com um dado substrato comparada com a do radical HO^{\bullet} [53].

A pH aproximadamente 13 (em que radical anião $O^{\bullet-}$ é a espécie radicalar predominante; $pK_a(HO^{\bullet}) = 11,9$ [54]) não se detectou a presença do ácido 1,3-dimetilúrico no meio reaccional, tal como esperado, mas a formação de 1-MeX foi notória. Este resultado é compatível com a capacidade do radical anião $O^{\bullet-}$ para reagir por abstracção de hidrogénio. Para além deste produto, observou-se a formação, em maior quantidade, do outro produto de desmetilação (3-MeX). Este resultado permite concluir que na oxidação pelo radical anião $O^{\bullet-}$ ocorre apenas reacção de desmetilação, quer de *N*(3) quer de *N*(1), conduzindo à formação de 1-MeX e 3-MeX, respectivamente.

Outro resultado interessante é que a desmetilação de *N*(1) a pH 13 se observou em maior extensão para todos os tempos de irradiação UV (0 a 25 min), conduzindo a uma maior predominância de 3-MeX em solução relativamente a 1-MeX. Isto pode significar uma maior reactividade desta última para com o radical anião $O^{\bullet-}$. Para confirmar esta hipótese, gerou-se o radical anião $O^{\bullet-}$ em soluções 1 mM de 1-MeX e 3-MeX e quantificou-se a

diminuição das suas concentrações para tempos de irradiação curtos. Representado o \ln da concentração do substrato em função do tempo de irradiação, determinaram-se as constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem de $9,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ e $1,6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ para a 3-MeX e a 1-MeX, respectivamente, o que mostra que a 1-MeX é consumida mais rapidamente do que a 3-MeX após a sua formação nas condições reaccionais.

No Esquema 4.6 propõe-se o possível mecanismo reaccional para a reacção de desmetilação da teofilina (exemplificado para a desmetilação de *N*(3) com formação da 1-MeX).



Esquema 4.6 – Mecanismo reaccional de desmetilação da teofilina a 1-metilxantina.

Esta via reaccional, que conduz à perda de um grupo metilo ligado a um átomo de azoto, parece ser comum, tal como indicam estudos de oxidação radicalar da cafeína [55] ou de metabolismo enzimático de xantinas [56] e degradação oxidativa de aminopirinas [57-59].

4.7.3. Efeito do oxigénio molecular

Os resultados acima descritos foram obtidos em soluções aquosas preparadas em condições atmosféricas normais (saturadas em ar). De modo a elucidar o possível efeito do oxigénio molecular, efectuaram-se os mesmos ensaios (reacção com os radicais HO^\bullet e $\text{O}^{\bullet-}$) em soluções desarejadas com árgon, mantendo todos os outros parâmetros constantes. Obtiveram-se, para ambos os casos, resultados semelhantes.

No caso da reacção com o radical HO^\bullet , o rendimento de 1-MeX formada após 4 min de irradiação de uma solução contendo H_2O_2 foi o mesmo com ou sem oxigénio, apesar da

quantidade de ácido 1,3-dimetilúrico ter sido maior na presença de oxigénio. Este resultado é expectável de acordo com o que tem sido observado com vários sistemas purínicos (por exemplo, adenina [60, 61], guanosina [62, 63] e xantinas [49]). De facto, nestes casos, verificou-se que a formação de um produto de hidroxilação em C(8), tal como no caso do ácido úrico, é favorecida na presença de oxigénio molecular (ou outro oxidante externo), devido à necessária oxidação do radical precursor, o aducto C(8)-OH.

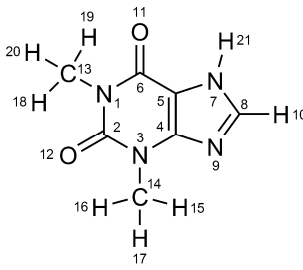
No caso da reacção com o radical anião $O^{\bullet-}$, observou-se também a formação de 1-MeX e 3-MeX na ausência de oxigénio, sem diferenças significativas dos resultados obtidos em soluções arejadas. Estes resultados mostram que o oxigénio molecular não tem um efeito significativo na reacção de desmetilação, o que sugere que o oxigénio molecular não é responsável pelo segundo passo de oxidação proposto no Esquema 4.6.

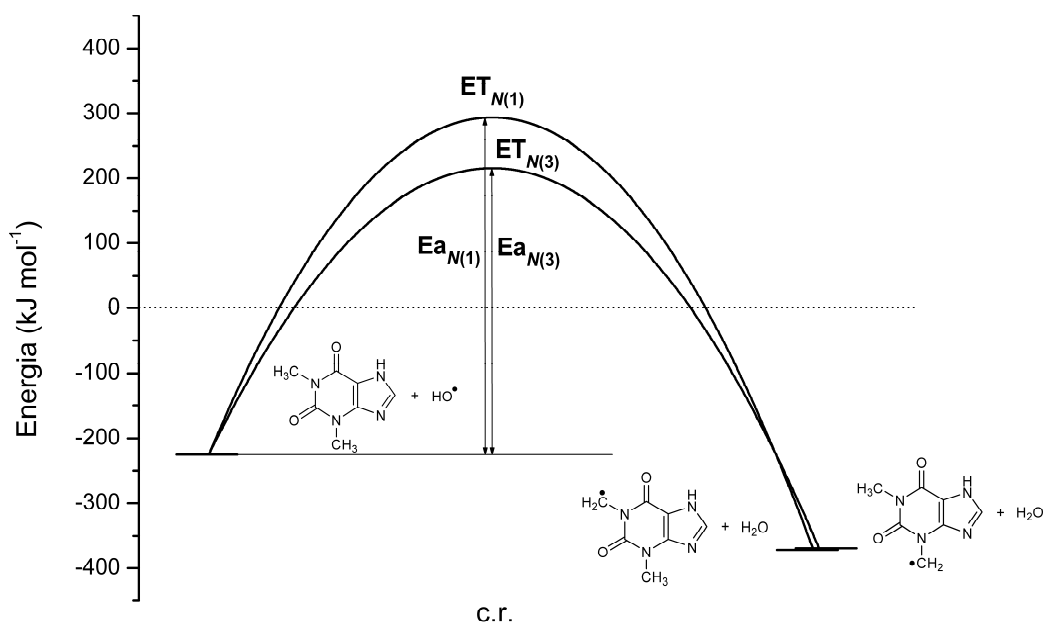
4.7.4. Cálculos teóricos

Efectuaram-se cálculos teóricos com o modelo PM6 para confirmar a posição preferencial de desmetilação da teofilina pelo radical HO^{\bullet} . Considerou-se apenas o tautómero $N(7)H$, uma vez que, segundo este método, é $6,13 \text{ kJmol}^{-1}$ mais estável do que $N(9)H$ em solução aquosa, correspondendo a mais de 92% no equilíbrio. Na Tabela 4.9 apresentam-se as cargas parciais dos átomos envolvidos em ambas as reacções de desmetilação, calculadas a partir da superfície de potencial electrostático da teofilina. De acordo com estes valores, as cargas globais dos grupos $N(1)-CH_3$ e $N(3)-CH_3$ são $-0,1184$ e $-0,1645$ (unidade electrostática – esu) respectivamente, o que mostra que a abstracção do átomo de hidrogénio de $N(3)-CH_3$ é mais favorável. Esta previsão está de acordo com os resultados experimentais obtidos a pH 7 acima referidos.

Usou-se o mesmo modelo para calcular as energias de activação (E_a) para as duas reacções de desmetilação. Como se vê na Figura 4.24, a energia do estado de transição da reacção de desmetilação a partir de $N(1)$ ($ET_{N(1)}$) é superior em 78 kJmol^{-1} à do $ET_{N(3)}$. Uma vez que a variação de entropia é muito semelhante para as duas reacções, as variações de energia reflectem essencialmente variações de entalpia. Os perfis reaccionais da Figura 4.24 sugerem que a desmetilação é controlada cineticamente.

Tabela 4.9 – Cargas parciais calculadas para o tautómero mais estável da teofilina (*N*(7)H).

	Posição	Átomo	Carga parcial (esu)
	2	<i>N</i> (1)	-0,7296
	4	<i>N</i> (3)	-1,2106
	13	C(1)	-0,7897
	14	C(3)	0,2638
	15	H(3)	0,0300
	16	H(3)	-0,0229
	17	H(3)	0,1172
	18	H(1)	0,2781
	19	H(1)	0,3921
	20	H(1)	0,2572

Figura 4.24 – Perfis reaccionais para a abstracção de hidrogénio da teofilina a partir dos grupos metilo em *N*(1) e *N*(3), por reacção com o radical HO•.

4.8. Conclusões

Os resultados apresentados mostram que as xantinas mais oxidantes são aquelas cujos radicais catiões formados por oxidação monoeléctrica apenas podem desprotonar de *N*(1) (teobromina e 3,9-dimetilxantina).

Na ausência de espécies aniónicas em solução (meio ácido), a presença de um grupo substituinte em *N*(9) (9-metilxantina, 1,9-dimetilxantina e xantosina) ou a forte

contribuição do tautómero $N(9)H$ (1-metilxantina e xantina) aumentam a capacidade antioxidante destes compostos. Em meio fisiológico, onde a contribuição de espécies aniónicas é relevante, a 1-metilxantina revelou possuir o melhor efeito de reparação sobre todas as outras xantinas.

Nenhuma das xantinas presentes na dieta humana (teobromina, teofilina e cafeína) satisfaz os requisitos acima referidos necessários para serem candidatas a um bom antioxidante. No entanto, a oxidação da teofilina pelo radical HO^{\bullet} em meio fisiológico conduz à formação de produtos de desmetilação, em particular a 1-metilxantina, para além da esperada formação de ácido 1,3-dimetilúrico. Além disso, a própria 1-metilxantina formada pode reagir também com o radical oxidante desmetilando a xantina.

Dado que a 1-metilxantina possui um carácter mais antioxidante que o seu precursor (assim como a xantina), a reacção de desmetilação pode desempenhar um papel biológico importante como primeiro passo de uma cascata antioxidante.

Bibliografia

1. Magkos F., Kavouras S.A., "Caffeine use in sports, pharmacokinetics in man, and cellular mechanisms of action". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2005, **45**(7-8): 535-562.
2. Higdon J.V., Frei B., "Coffee and health: A review of recent human research". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2006, **46**(2): 101-123.
3. Bhat V.B., Madyastha K.M., "Antioxidant and radical scavenging properties of 8-oxo derivatives of xanthine drugs pentoxifylline and lisofylline". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, **288**(5): 1212-1217.
4. Telo J.P., "Radicals derived from uric acid and its methyl derivatives in aqueous solution: an EPR spectroscopy and theoretical study". *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2003, **1**(3): 588-592.
5. Nishida Y., "Inhibition of Lipid-Peroxidation by Methylated Analogs of Uric-Acid". *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1991, **43**(12): 885-887.
6. Haberman F., Tang S.C., Arumugam T.V., Hyun D.H., Yu Q.S., Cutler R.G., Guo Z., Holloway H.W., Greig N.H., Mattson M.P., "Soluble neuroprotective antioxidant uric acid analogs ameliorate ischemic brain injury in mice". *Neuromolecular Medicine*, 2007, **9**(4): 315-323.
7. Gomez-Ruiz J.A., Leake D.S., Ames J.M., "In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, **55**(17): 6962-6969.
8. Langman S.R., Shohoji M., Telo J.P., Vieira A.J.S.C., Novais H.M., "EPR spectroscopic study of the radical oxidation of hydroxypurines in aqueous solution: Acid-base properties of the derived radicals". *Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions 2*, 1996(7): 1461-1465.
9. Vieira A.J.S.C., Telo J.P., Pereira H.F., Patrocinio P.F., Dias R.M.B., "Antioxidant effect of naturally occurring xanthines on the oxidative damage of DNA bases". *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*, 1999, **96**(1): 116-123.
10. Devasagayam T.P.A., Kamat J.P., Mohan H., Kesavan P.C., "Caffeine as an antioxidant: Inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species". *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1996, **1282**(1): 63-70.
11. Stadler R.H., Fay L.B., "Antioxidative Reactions of Caffeine - Formation of 8-Oxocaffeine (1,3,7-Trimethyluric Acid) in Coffee Subjected to Oxidative Stress". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, **43**(5): 1332-1338.
12. Shi X., Dalal N.S., Jain A.C., "Antioxidant Behavior of Caffeine - Efficient Scavenging of Hydroxyl Radicals". *Food and Chemical Toxicology*, 1991, **29**(1): 1-6.
13. Stadler R.H., Richoz J., Turesky R.J., Welti D.H., Fay L.B., "Oxidation of caffeine and related methylxanthines in ascorbate and polyphenol-driven Fenton-type oxidations". *Free Radical Research*, 1996, **24**(3): 225-240.
14. Ogston A.G., "The constitution of the purine nucleosides. Part III. Potentiometric determination of the dissociation constants of methylated xanthines". *Journal of the Chemical Society*, 1935: 1376-1379.
15. Katritzky R., *Physical Methods in the Heterocyclic Chemistry*. New York: Academic Press. 1963.
16. Roy K.B., Miles H.T., "Tautomerism and Ionization of Xanthosine". *Nucleosides & Nucleotides*, 1983, **2**(3): 231-242.
17. Lichtenberg D., Bergmann F., Neiman Z., "Tautomeric Forms and Ionisation Processes in Xanthine and Its N-Methyl Derivatives". *Journal of the Chemical Society C - Organic*, 1971(9): 1676-1682.

18. Goyal R.N., Srivastava A.K., Bansal V., "Oxidation of 3,9-Dimethyl-9H-purine-2,6(1H,3H)-dione at Stationary Pyrolytic-Graphite Electrode". *Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions 2*, 1994(7): 1709-1715.
19. Massoud S.S., Corfu N.A., Griesser R., Sigel H., "Acid-base properties of xanthosine 5'-monophosphate (XMP) and of some related nucleobase derivatives in aqueous solution: Micro acidity constant evaluations of the (N1)H versus the (N3)H deprotonation ambiguity". *Chemistry - A European Journal*, 2004, **10**(20): 5129-5137.
20. Rogstad K.N., Jang Y.H., Sowers L.C., Goddard W.A., "First principles calculations of the pK_a values and tautomers of isoguanine and xanthine". *Chemical Research in Toxicology*, 2003, **16**(11): 1455-1462.
21. Civcir P.U., "AM1 and PM3 study of tautomerism of xanthine in the gas and aqueous phases". *Journal of Molecular Structure - Theochem*, 2001, **545**(1-3): 7-15.
22. Platonov M.O., Samijlenko S.P., Sudakov O.O., Kondratyuk I.V., Hovorun D.M., "To what extent can methyl derivatives be regarded as stabilized tautomers of xanthine?". *Spectrochimica Acta Part A - Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2005, **62**(1-3): 112-114.
23. Faraggi M., Broitman F., Trent J.B., Klapper M.H., "One-electron oxidation reactions of some purine and pyrimidine bases in aqueous solutions. Electrochemical and pulse radiolysis studies". *Journal of Physical Chemistry*, 1996, **100**(35): 14751-14761.
24. Mizuno H., Fujiwara T., Tomita K.I., "Crystal and Molecular Structure of Sodium Salt of Xanthine". *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 1969, **42**(11): 3099-3105.
25. Pfeleiderer W., Nubel G., "Purine, .2. Zur Struktur Des Xanthins Und Seiner N-Methyl-Derivate". *Annalen Der Chemie - Justus Liebig*, 1961, **647**(1): 155-160.
26. Cavalieri L.F., Fox J.J., Stone A., Chang N., "On the Nature of Xanthine and Substituted Xanthines in Solution". *Journal of the American Chemical Society*, 1954, **76**(4): 1119-1122.
27. Telo J.P., Vieira A.J.S.C., "Mechanism of free radical oxidation of caffeine in aqueous solution". *Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions 2*, 1997(9): 1755-1757.
28. Dixon W.T., Murphy D., "Determination of Acidity Constants of Some Phenol Radical Cations by Means of Electron-Spin Resonance". *Journal of the Chemical Society - Faraday Transactions 2*, 1976, **72**: 1221-1230.
29. Candeias L.P., Steenken S., "Structure and Acid-Base Properties of One-Electron-Oxidized Deoxyguanosine, Guanosine, and 1-Methylguanosine". *Journal of the American Chemical Society*, 1989, **111**(3): 1094-1099.
30. Steenken S., "Purine-Bases, Nucleosides, and Nucleotides - Aqueous-Solution Redox Chemistry and Transformation Reactions of Their Radical Cations and E⁻ and OH Adducts". *Chemical Reviews*, 1989, **89**(3): 503-520.
31. Baik M.H., Silverman J.S., Yang I.V., Ropp P.A., Szalai V.A., Yang W.T., Thorp H.H., "Using density functional theory to design DNA base analogues with low oxidation potentials". *Journal of Physical Chemistry B*, 2001, **105**(27): 6437-6444.
32. Chen X.H., Syrstad E.A., Nguyen M.T., Gerbaux P., Turek F., "Distonic isomers and tautomers of the adenine cation radical in the gas phase and aqueous solution". *Journal of Physical Chemistry A*, 2004, **108**(42): 9283-9293.
33. Von Sonntag C., *Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair*. Heidelberg: Springer-Verlag. 2006.

34. Vinchurkar M.S., Rao B.S.M., Mohan H., Mittal J.P., "Kinetics, spectral and redox behaviour of OH adducts of methylxanthines: a radiation chemical study". *Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions 2*, 1999(3): 609-617.
35. Pennington D.E., Haim A., "Stoichiometry and Mechanism of Chromium(II)-Peroxydisulfate Reaction". *Journal of the American Chemical Society*, 1968, **90**(14): 3700-3704.
36. Maruthamuthu P., Neta P., "Phosphate Radicals - Spectra, Acid-Base Equilibria, and Reactions with Inorganic Compounds". *Journal of Physical Chemistry*, 1978, **82**(6): 710-713.
37. Huang D.J., Ou B.X., Prior R.L., "The chemistry behind antioxidant capacity assays". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, **53**(6): 1841-1856.
38. Wright J.S., Johnson E.R., DiLabio G.A., "Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants". *Journal of the American Chemical Society*, 2001, **123**(6): 1173-1183.
39. Topol I.A., Tawa G.J., Burt S.K., Rashin A.A., "Calculation of absolute and relative acidities of substituted imidazoles in aqueous solvent". *Journal of Physical Chemistry A*, 1997, **101**(51): 10075-10081.
40. Liptak M.D., Shields G.C., "Accurate pK_a calculations for carboxylic acids using Complete Basis Set and Gaussian-n models combined with CPCM continuum solvation methods". *Journal of the American Chemical Society*, 2001, **123**(30): 7314-7319.
41. Jang Y.H., Goddard W.A., Noyes K.T., Sowers L.C., Hwang S., Chung D.S., " pK_a values of guanine in water: Density functional theory calculations combined with Poisson-Boltzmann continuum-solvation model". *Journal of Physical Chemistry B*, 2003, **107**(1): 344-357.
42. Sadlej-Sosnowska N., "Calculation of acidic dissociation constants in water: solvation free energy terms. Their accuracy and impact". *Theoretical Chemistry Accounts*, 2007, **118**(2): 281-293.
43. Schmidt am Busch M., Knapp E.W., "Accurate pK_a determination for a heterogeneous group of organic molecules". *Chemphyschem*, 2004, **5**(10): 1513-1522.
44. Tissandier M.D., Cowen K.A., Feng W.Y., Gundlach E., Cohen M.H., Earhart A.D., Coe J.V., Tuttle T.R., "The proton's absolute aqueous enthalpy and Gibbs free energy of solvation from cluster-ion solvation data". *Journal of Physical Chemistry A*, 1998, **102**(40): 7787-7794.
45. Ho J.M., Coote M.L., "A universal approach for continuum solvent pK_a calculations: are we there yet?". *Theoretical Chemistry Accounts*, 2010, **125**(1-2): 3-21.
46. Spataru N., Sarada B.V., Tryk D.A., Fujishima A., "Anodic voltammetry of xanthine, theophylline, theobromine and caffeine at conductive diamond electrodes and its analytical application". *Electroanalysis*, 2002, **14**(11): 721-728.
47. Reynisson J., Steenken S., "DFT studies on the pairing abilities of the one-electron reduced or oxidized adenine-thymine base pair". *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2002, **4**(21): 5353-5358.
48. Naumov S., Hildenbrand K., von Sonntag C., "Tautomers of the N-centered radical generated by reaction of $SO_4^{\bullet-}$ with N1-substituted cytosines in aqueous solution. Calculation of isotropic hyperfine coupling constants by a density functional method". *Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions 2*, 2001(9): 1648-1653.
49. Vieira A.J.S.C., Steenken S., "Radical oxidation of xanthines: A reaction pathway to uric acid?". *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*, 1996, **93**(1): 235-243.
50. Ferradini C., *Biologie de l'Action des Rayonnements Ionisants*. Paris: Masson. 1983.

51. Scholes M.L., Schuchmann M.N., Vonsonntag C., "Enhancement of Radiation-Induced Base Release from Nucleosides in Alkaline-Solution - Essential Role of the $O^{\bullet -}$ Radical". *International Journal of Radiation Biology*, 1992, **61**(4): 443-449.
52. Vieira A.J.S.C., Telo J.P., Dias R.M.B., "Generation of hydroxyl radical by photolysis of mercaptopyridine *N*-oxides: Application to redox chemistry of purines", in *Oxidants and Antioxidants, Pt B. Methods in Enzymology*. San Diego: Academic Press Inc. 1999, **300**: 194-201.
53. Armstrong D.A., Asmus K.D., Bonifacic M., "Oxide radical anion reactivity with aliphatic amino compounds in aqueous solution: Comparison of H-atom abstraction from C-H and N-H groups by $^{\bullet}O^-$ and $^{\bullet}OH$ radicals". *Journal of Physical Chemistry A*, 2004, **108**(12): 2238-2246.
54. Rabani J., Matheson M.S., "Pulse Radiolytic Determination of pK for Hydroxyl Ionic Dissociation in Water". *Journal of the American Chemical Society*, 1964, **86**(15): 3175-3176.
55. Dalmazio I., Santos L.S., Lopes R.P., Eberlin M.N., Augusti R., "Advanced oxidation of caffeine in water: On-line and real-time monitoring by electrospray ionization mass spectrometry". *Environmental Science & Technology*, 2005, **39**(16): 5982-5988.
56. Kanazawa H., Atsumi R., Matsushima Y., Kizu J., "Determination of theophylline and its metabolites in biological samples by liquid chromatography-mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*, 2000, **870**(1-2): 87-96.
57. Griffin B.W., Ting P.L., "Mechanism of *N*-Demethylation of Aminopyrine by Hydrogen-Peroxide Catalyzed by Horseradish-Peroxidase, Metmyoglobin, and Protohemin". *Biochemistry*, 1978, **17**(11): 2206-2211.
58. Lasker J.M., Sivarajah K., Mason R.P., Kalyanaraman B., Aboudonia M.B., Eling T.E., "A Free-Radical Mechanism of Prostaglandin Synthase-Dependent Aminopyrine Demethylation". *Journal of Biological Chemistry*, 1981, **256**(15): 7764-7767.
59. Pérez-Gilabert M., SanchezFerrer A., García-Carmona F., "Oxidation of aminopyrine by the hydroperoxidase activity of lipoxygenase: A new proposed mechanism of *N*-demethylation". *Free Radical Biology and Medicine*, 1997, **23**(4): 548-555.
60. Vieira A.J.S.C., Steenken S., "Pattern of OH Radical Reaction with Adenine and Its Nucleosides and Nucleotides - Characterization of 2 Types of Isomeric OH Adduct and Their Unimolecular Transformation Reactions". *Journal of the American Chemical Society*, 1990, **112**(19): 6986-6994.
61. Dias R.M.B., Vieira A.J.S.C., "Substituent effect on superoxide elimination from peroxy radicals of adenine and methylated derivatives". *Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry*, 1998, **117**(3): 217-222.
62. Candeias L.P., Steenken S., "Reaction of HO^{\bullet} with guanine derivatives in aqueous solution: Formation of two different redox-active OH-Adduct radicals and their unimolecular transformation reactions. Properties of $G(-H)^{\bullet}$ ". *Chemistry - A European Journal*, 2000, **6**(3): 475-484.
63. Vieira A.J.S.C., Candeias L.P., Steenken S., "Hydroxyl Radical-Induced Damage to the Purine-Bases of DNA - In vitro Studies". *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*, 1993, **90**(4): 881-897.

5. Degradação radicalar de derivados da antipirina

5.1. Introdução

A antipirina e os seus 4-aminoderivados (Figura 5.1) são pirazolonas *N*-fenilsubstituídas habitualmente incluídas no grupo dos fármacos anti-inflamatórios não esteróides (AINE).

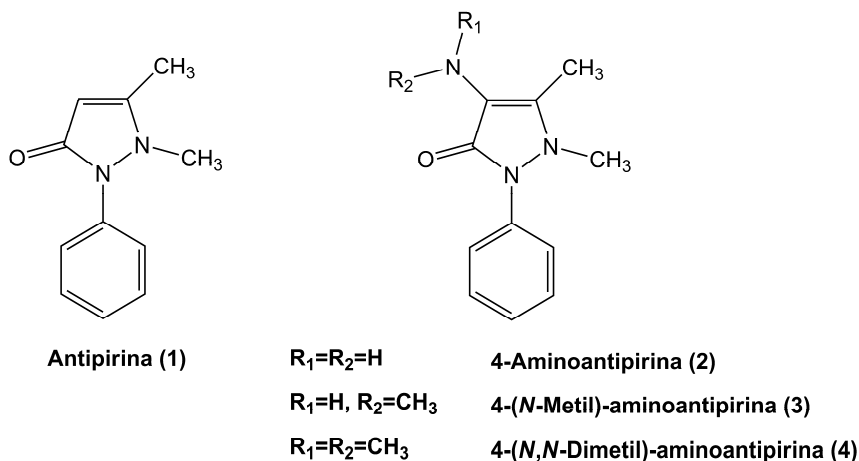


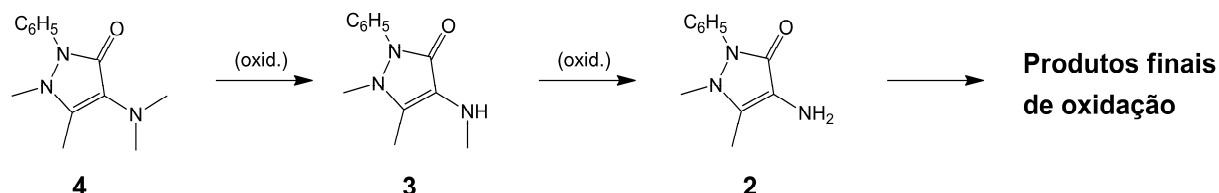
Figura 5.1 – Estrutura da antipirina e seus derivados 4-aminosubstituídos.

Os derivados de pirazolona antipirina (**1**) e 4-(*N,N*-dimetil)-aminoantipirina (aminopirina; **4**) têm sido usados como fármacos analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios desde finais do século XIX [1]. Estes compostos são inibidores potentes de isoenzimas da ciclooxigenase e da síntese de tromboxano de plaquetas e de prostanóides [1]. A actividade biológica destes compostos tem sido também atribuída à sua actividade captora de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS), bem como à inibição da explosão oxidativa pelos neutrófilos. De facto, a aminopirina e a dipirona (forma hidrolisada da 4-(*N*-metil)-aminoantipirina) demonstraram ser captadores altamente eficazes das ROS radical hidroxilo (HO^\bullet) [1], ácido hipocloroso (HOCl) [1-3], radical peroxilo (ROO^\bullet) [1] e oxigénio singleto (1O_2) [4] e das RNS óxido nítrico ($^\bullet NO$) e peroxinitrito ($ONOO^-$) [5], bem como impedir eficazmente a explosão oxidativa pelos neutrófilos induzida por forbol-12-miristato-13-acetato [1]. Estas duas pirazolonas foram ineficazes na captura de H_2O_2 e do radical anião $O_2^{\bullet -}$ [1]. Por outro lado, a antipirina mostrou ter uma eficiência residual ou inexistente na captura das ROS e RNS acima mencionadas [1, 4, 5].

Apesar dos seus benefícios terapêuticos reconhecidos, a utilização de pirazolonas tem estado associada a potenciais efeitos adversos caracterizados como leucopenia, mais frequentemente de neutrófilos, originando neutropenia no sangue (agranulocitose) [6]. É de

salientar que foi já referida a oxidação da aminopirina por HOCl gerado por neutrófilos, levando à formação de um radical catião azul ao qual tem sido atribuída a toxicidade da medula óssea potencialmente fatal que conduz à agranulocitose [2, 3]. A partir dos estudos até agora efectuados, tem sido proposto que a oxidação por HOCl da aminopirina a um radical catião, envolve uma *N*-cloração seguida pela perda de um radical cloro [3]. Um outro mecanismo possível é a formação de um dicatão pela perda de ião cloreto da *N*-cloroaminopirina [6]. Tendo em conta a elevada reactividade da aminopirina com outras ROS para além do HOCl, bem como com RNS, pode admitir-se que intermediários reactivos potencialmente lesivos possam também resultar da acção de captura da aminopirina. Contudo, os mecanismos reaccionais de pirazonas com outras ROS e RNS continuam por esclarecer. Além disso, a eficácia relativa das várias pirazonas no que respeita às suas reacções com ROS e RNS é também, até agora, desconhecida.

O objectivo do trabalho apresentado neste capítulo é avaliar a hipótese de que a maior actividade antioxidante de **4** comparada com a de **1** pode ser atribuída à capacidade do primeiro sofrer oxidação seguida por desmetilação na reacção com radicais livres, dando origem à 4-(*N*-metil)-aminoantipirina (**3**), que por sua vez desmetila a 4-aminoantipirina (**2**) (Esquema 5.1).



Esquema 5.1 – Desmetilação oxidativa da 4-(*N,N*-dimetil)-aminoantipirina.

Com este objectivo, estudaram-se as reacções da 4-aminoantipirina e seus derivados metilados com o radical HO[•], como modelo da capacidade antioxidante contra espécies reactivas de oxigénio (ROS), através da análise dos produtos reaccionais. Neste contexto, sintetizou-se a 4-(*N*-metil)-aminoantipirina (**3**) utilizada como padrão (ver 3.2.2), uma vez que não se encontra disponível comercialmente.

Dada a elevada fotossensibilidade desta família de compostos, o radical HO[•] não pode ser gerado fotoliticamente, quer a partir de H₂O₂ quer a partir de *N*-óxido de 4-mercaptopiridina. Por esta razão, optou-se por gerá-lo em solução aquosa através da

reação de Fenton ou por via radiolítica (irradiação gama de soluções aquosas saturadas em N_2O numa fonte de ^{60}Co).

5.2. Oxidação dos derivados da aminoantipirina pelo radical hidroxilo

As reações de 4-(*N,N*-dimetil)-aminoantipirina (**4**), 4-(*N*-metil)-aminoantipirina (**3**) e 4-aminoantipirina (**2**) com o radical HO^\bullet efectuaram-se em solução aquosa a diferentes valores de pH.

Apesar da elevada fotodegradação destes compostos sob radiação UV, testou-se a reação de **4** com o radical HO^\bullet produzido por fotólise de *N*-óxido de 4-mercaptopiridina (4-SPyNO) para tempos curtos de irradiação. Mantendo constantes a distância à lâmpada de UV e o tempo de irradiação, a produção de radicais HO^\bullet com este composto é cerca de 90 vezes superior quando comparada com a fotólise de H_2O_2 , pelo que a sua utilização constitui uma grande vantagem na irradiação de soluções com substratos fotodegradáveis. Assim, irradiou-se uma solução tamponizada a pH 7 do composto **4** 1 mM com 4-SPyNO 0,1 mM durante 1 minuto e a 2,5 cm da lâmpada de UV (distância mínima permitida). Nesta experiência utilizou-se 4-SPyNO numa concentração 10 vezes inferior à de **4** de forma a minimizar a probabilidade da reação directa do radical HO^\bullet com o seu próprio precursor. No entanto, mesmo nestas condições, não foi possível observar nenhum produto de reação de **4** com o radical HO^\bullet . Apenas foram detectados os respectivos produtos de fotodegradação de **4** e de 4-SPyNO. Face à impossibilidade de estudar a reação dos derivados da aminoantipirina com o radical HO^\bullet por métodos fotolíticos, recorreu-se à reação de Fenton. Trata-se de um processo químico que, embora evite o problema das reações fotoquímicas dos substratos, tem o inconveniente de ser mais bastante mais complexo, quer nas várias reações envolvidas como nas variáveis experimentais a controlar.

As misturas reaccionais analisaram-se por HPLC-MS com detecção UV-Vis (matriz de fotodíodos). Nalguns casos, isolaram-se produtos de reação por HPLC semi-preparativa, o que permitiu a sua caracterização por espectrometria de massa e espectroscopia de RMN. Na Figura 5.2 apresentam-se os cromatogramas de HPLC das misturas reaccionais dos compostos **4**, **3** e **2** a pH 7.

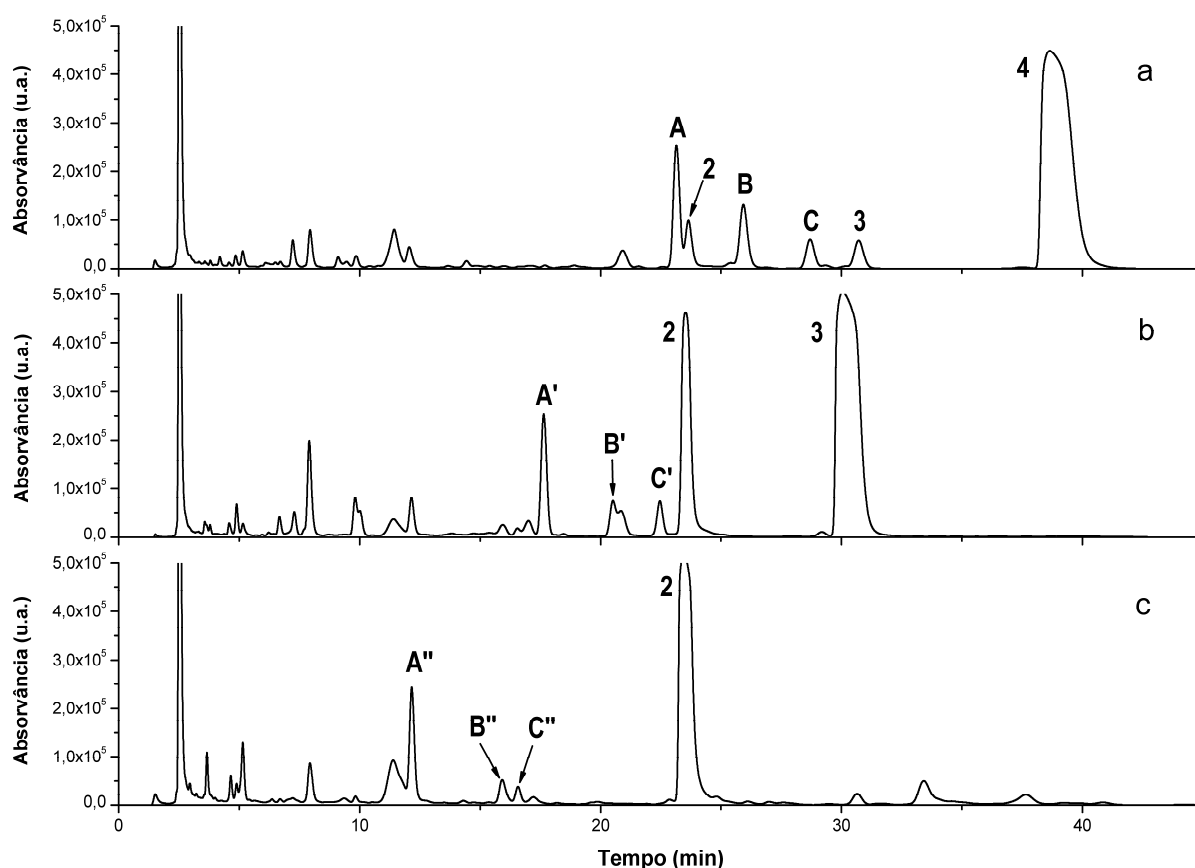


Figura 5.2 – Cromatogramas HPLC (sistema Thermo Finnigan) com detecção óptica das misturas reacionais de **4** (a), **3** (b) e **2** (c) com o radical HO[•] a pH 7; condições experimentais: substrato 10 mM, H₂O₂ 10 mM, Fe^{II}EDTA 2 mM, ácido ascórbico 1 mM (tampão fostatos 5 mM); tempos de reação 12h, 9h e 6h respectivamente.

No caso da oxidação do composto **4** (Figura 5.2a), observou-se que a alteração do valor de pH de 1 para 7 na mistura reacional não alterou significativamente o perfil cromatográfico (Figura 5.3). A diferença mais notória é que a pH 1 (solução aquosa 0,1 N em HCl) os produtos **2** e **3** se formaram após um tempo de reação mais longo do que a pH 7. Este resultado pode explicar-se com base no grau de protonação da molécula: a pH 1, o grupo amino exocíclico encontra-se protonado ($pK_a = 5,0$) [7], o que dificultará a ocorrência de oxidação nesta parte da molécula.

Os compostos **2** e **3** foram identificados como 4-aminoantipirina e 4-(*N*-metil)-aminoantipirina, respectivamente, com base nos espectros de UV, indistinguíveis dos obtidos com os respectivos padrões, bem como pelos tempos de retenção idênticos aos dos padrões, comercialmente disponíveis ou sintetizados, registados nas mesmas condições. Devido à má resolução cromatográfica do pico correspondente ao composto **2** e à instabilidade do composto **3**, não foi possível isolar estes compostos para posterior

identificação por ^1H RMN e MS. Contudo, foi possível confirmar as suas estruturas por HPLC-MS (Figura 5.4).

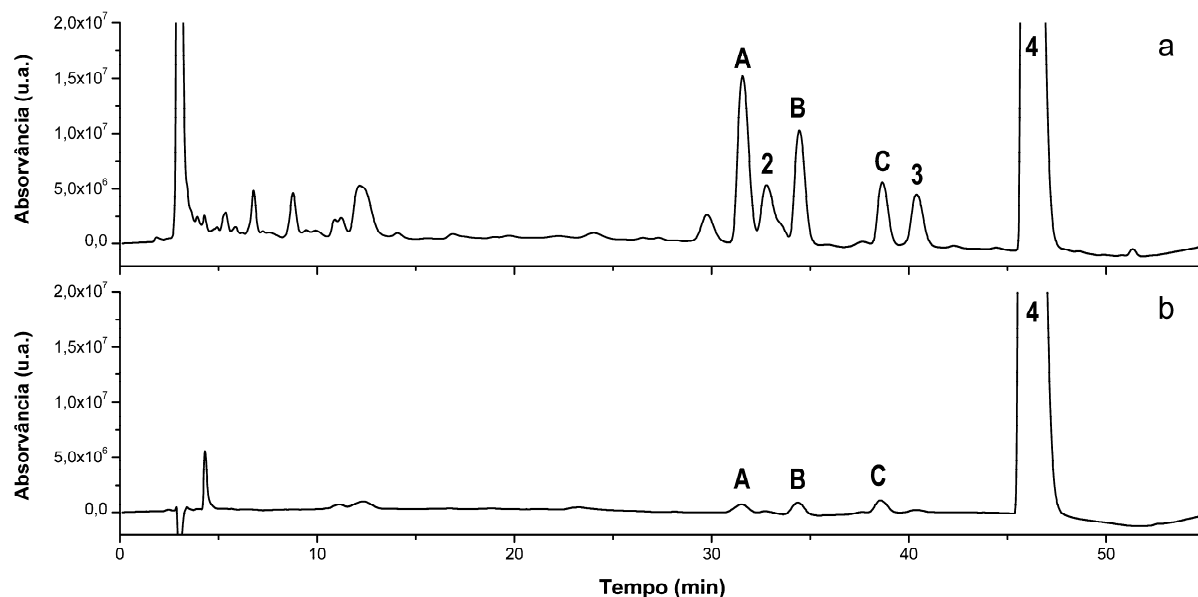


Figura 5.3 – Cromatogramas HPLC (sistema Waters) com detecção óptica das misturas reaccionais de **4** com o radical HO^\bullet , condições experimentais: (a) substrato 10 mM, H_2O_2 10 mM, $\text{Fe}^{\text{II}}\text{EDTA}$ 2 mM, ácido ascórbico 1 mM, pH 7 (tampão fosfatos 5 mM), tempo de reacção 4h30, (b) substrato 10 mM, H_2O_2 10 mM, FeSO_4 2 mM, pH 1 (meio HCl 0,1 M), tempo de reacção 7h30.

5.2.1. Caracterização dos produtos mono-hidroxilados da aminoantipirina

Como se pode observar na Figura 5.2a, para além dos produtos de desmetilação formam-se três outros produtos principais na reacção de **4** com o radical HO^\bullet (**A**, **B** e **C**). Os seus espectros de massa (Figura 5.4) apresentam o mesmo ião molecular compatível com a existência de mais um grupo hidroxilo. A separação desta mistura reaccional por HPLC semi-preparativa permitiu o isolamento destes produtos e a sua análise posterior por métodos espectrométricos (Tabela 5.1). Os compostos **B** e **C** apresentam um ião molecular a $m/z = 247$ no espectro de TOF-MS(EI) e o composto **A** um ião pseudo-molecular a $m/z = 246$ quando analisado por MS(ESI-) (ver espectros, Apêndice B). Estes resultados são inteiramente compatíveis com a formação de derivados que resultam da inserção por substituição de um grupo hidroxilo no anel benzénico na molécula de **4**.

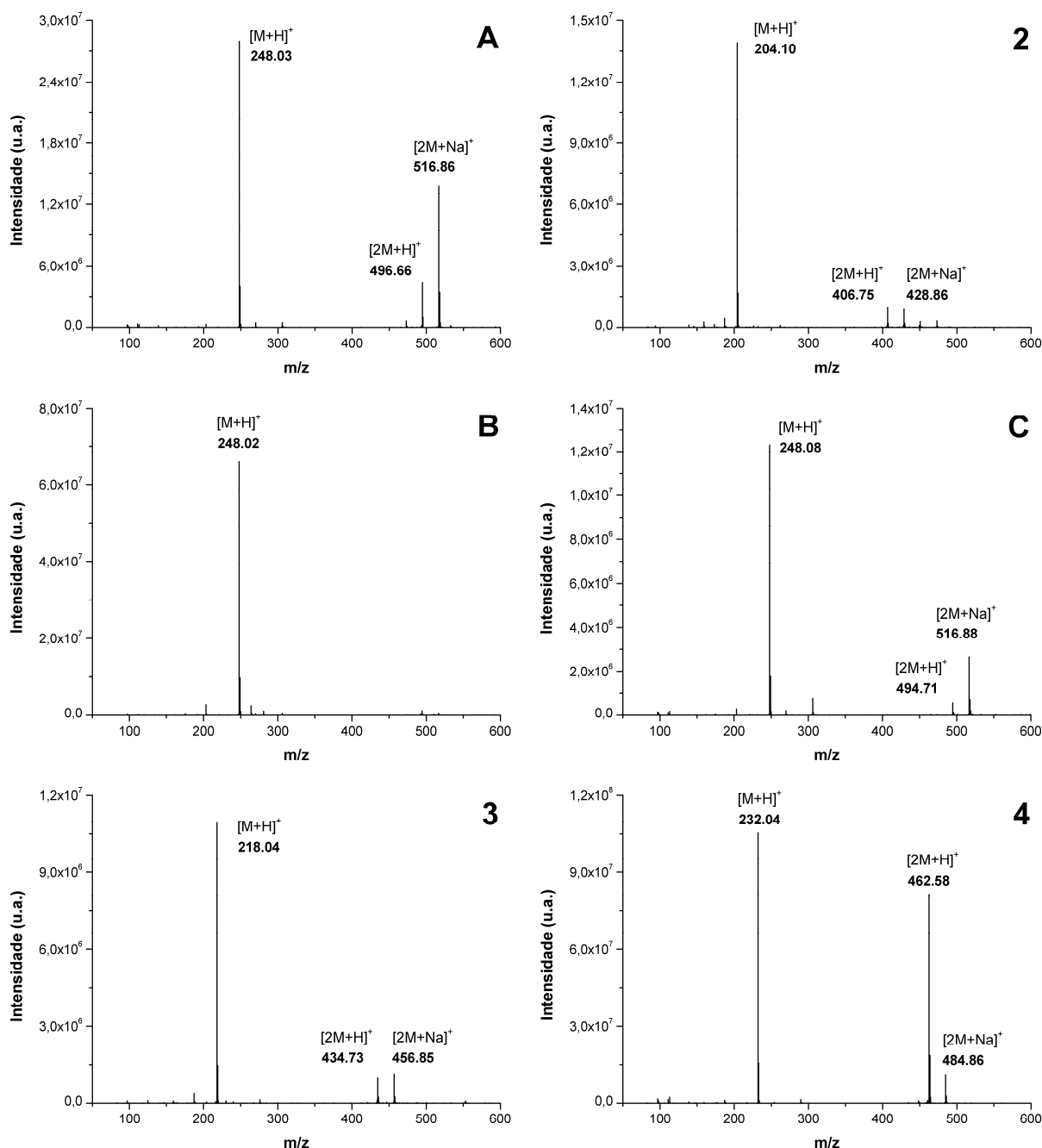


Figura 5.4 – Espectros de massa (ESI+) dos produtos de desmetilação (**2**, **3**) e de hidroxilação (**A**, **B**, **C**) obtidos na reação de **4** com o radical hidroxilo a pH 7 (perfil de HPLC da Figura 5.2a).

A posição de hidroxilação foi estabelecida com base nos espectros de ^1H RMN, nos quais os três compostos apresentam perfis espectroscópicos muito semelhantes na região correspondente aos prótons alifáticos, mas sinais muito distintos na região dos prótons aromáticos. Os espectros de ^1H RMN destes três produtos (Figura 5.5 e Tabela 5.1) apresentam três singletos (de 3,5 a 2,0 ppm) compatíveis com a presença de doze prótons dos quatro grupos metilo, indicando que não ocorreu qualquer modificação nesta parte da molécula.

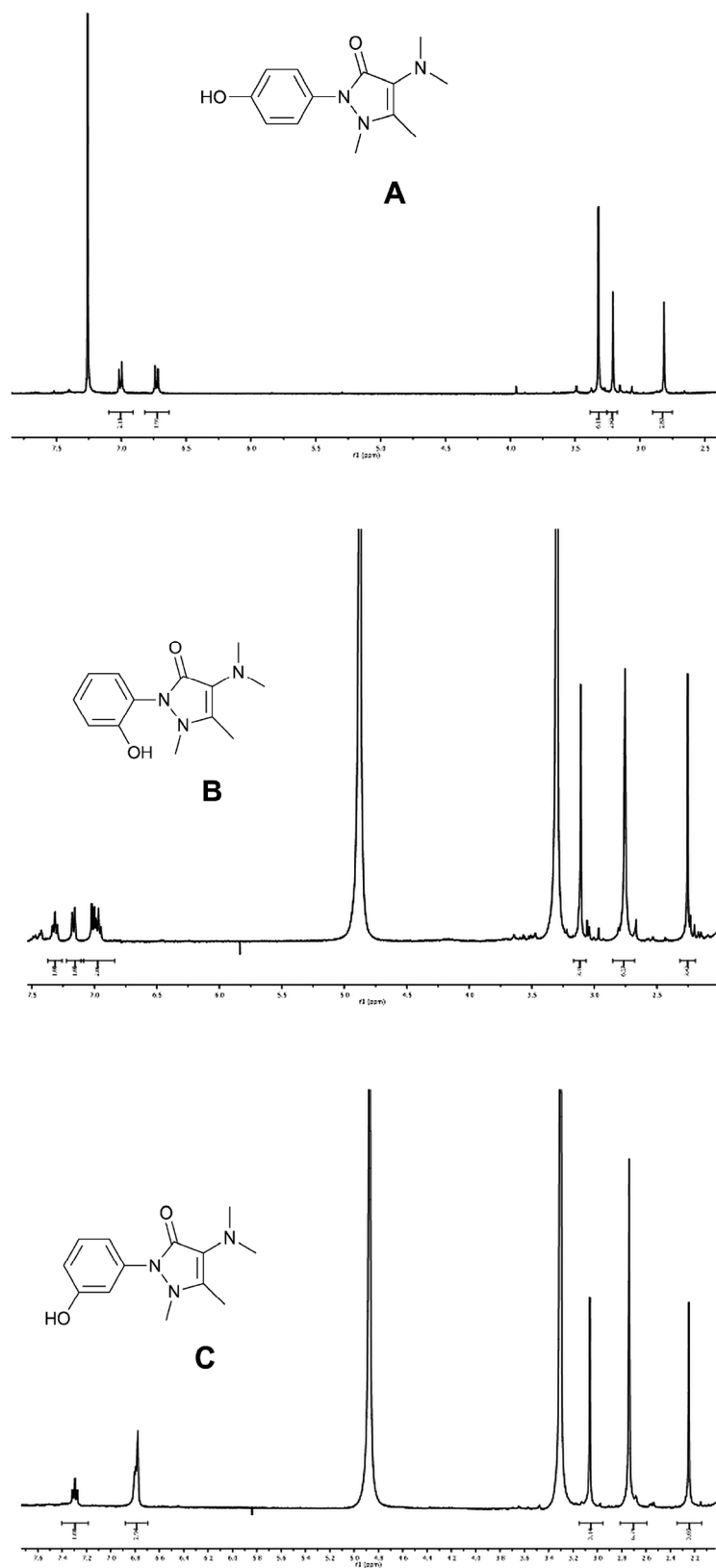


Figura 5.5 – Espectros de ^1H RMN dos produtos de hidroxilação (A, B, C) obtidos na reacção de 4 com o radical hidroxilo a pH 7 (perfil de HPLC da Figura 5.2a).

Tabela 5.1 – Identificação espectroscópica dos produtos de hidroxilação da 4-(*N,N*-dimetil)-aminoantipirina.

Composto	¹ H RMN			MS	
	Solvente	δ _H (ppm)	Atribuição	Modo	m/z
A	CDCl ₃	6,93 6,65 3,26 3,14 2,75	2H, d, <i>J</i> 8,6 Hz, Aromático 2H, d, <i>J</i> 8,6 Hz, Aromático 6H, s, N ⁴ -(CH ₃) ₂ 3H, s, 1-CH ₃ 3H, s, 5-CH ₃	ESI-	246 (M - H ⁺) 278 (M - H ⁺ + CH ₃ OH)
B	CD ₃ OD	7,31 7,17 7,02-6,95 3,11 2,75 2,25	1H, t, <i>J</i> 7,1 Hz, 4'-H 1H, d, <i>J</i> 7,7 Hz, 6'-H 2H, m, 3'-H e 5'-H 3H, s, 1-CH ₃ 6H, s, N ⁴ -(CH ₃) ₂ 3H, s, 5-CH ₃	TOF-MS (EI)	247,130 (M ⁺) 191,081 (M-CH ₃ CNCH ₃) 56,048 (100, H ₃ CNCH ₃)
C	CD ₃ OD	7,29 6,80-6,78 3,06 2,74 2,25	1H, t, <i>J</i> 8,4 Hz, 4'-H 3H, m, Aromático 3H, s, 1-CH ₃ 6H, s, N ⁴ -(CH ₃) ₂ 3H, s, 5-CH ₃	TOF-MS (EI)	247,129 (M ⁺) 56,048 (100, H ₃ CNCH ₃)

Deste modo, as estruturas destes três produtos foram discriminadas com base no padrão de sinais de ¹H RMN dos prótons aromáticos. O produto **A** apresenta no seu espectro de ¹H RMN dois dubletos (a 6,93 e 6,65 ppm), integrando cada um deles para dois prótons, o que evidencia uma substituição *para* na parte aromática do composto **4**. O espectro de ¹H RMN do produto **B** apresenta um tripleto a 7,32 ppm (4'-H), um dubleto a 7,17 ppm (6'-H) e um multipletto a 7,02-6,94 ppm (integrando para dois prótons), que se simplificou num singleto e num dubleto irradiando selectivamente o tripleto a 7,32 ppm. Em conjunto, estes resultados evidenciam a ocorrência de uma substituição na posição *orto* do anel aromático. Assim, o composto **C**, que apresenta apenas dois sinais de ¹H RMN a campo baixo, a 7,29 ppm (tripleto) e a 6,80-6,78 ppm (um multipletto correspondente a três prótons), resulta da hidroxilação na posição *meta*.

Os resultados atrás discutidos são análogos aos obtidos quando se produz o radical hidroxilo por radiólise da água, quer no que respeita à ocorrência de desmetilação quer à formação de produtos de hidroxilação (na Figura 5.6 apresenta-se o caso do composto **4**

como exemplo). A formação de derivados fenólicos foi também observada quando se submeteram soluções aquosas de antipirina a irradiação com ^{60}Co [8].

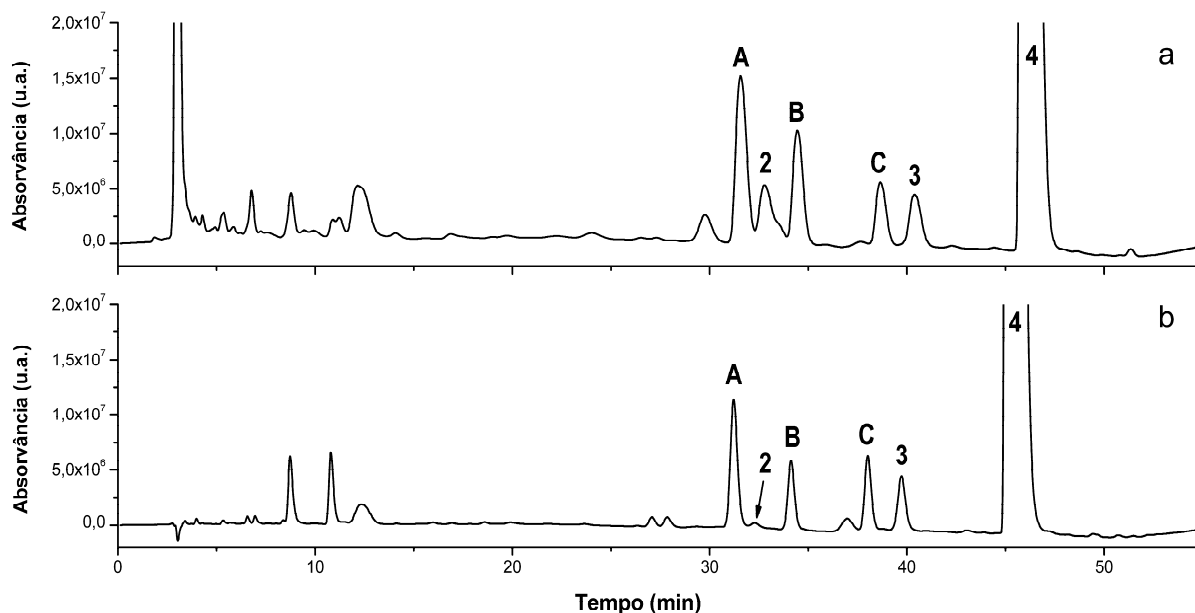


Figura 5.6 – Cromatogramas HPLC (sistema Waters) com detecção óptica das misturas reaccionais de **4** com o radical HO^\bullet , condições experimentais: (a) substrato 10 mM, H_2O_2 10 mM, $\text{Fe}^{\text{II}}\text{EDTA}$ 2 mM, ácido ascórbico 1 mM, pH 7 (tampão fostatos 5 mM), tempo de reacção 4h30, (b) substrato 10 mM, pH 7 (tampão fostatos 5 mM), solução saturada em N_2O irradiada numa fonte de ^{60}Co (dose 2,7 kGy).

Em resumo, estes resultados indicam que a reacção mais favorável entre **4** e o radical HO^\bullet é a hidroxilação no anel aromático. É também evidente que **4** sofre desmetilação para dar **3**, que é posteriormente desmetilado originando **2**. O facto de **2** ser detectado por HPLC/UV-Vis (com matriz de fotodíodos, Figura 5.2b) e por MS (Figura 5.4), quando se faz reagir **3** com o radical HO^\bullet , comprova o processo de desmetilação sucessiva. A reacção de hidroxilação no anel aromático também ocorre nos compostos **2** e **3** (produtos **A''**, **B''**, **C''** e **A'**, **B'**, **C'**, respectivamente, Figura 5.2), como se discute a seguir.

Uma outra possibilidade de reacção com o radical HO^\bullet é a adição à ligação dupla do anel heterocíclico, conduzindo a um produto de oxidação com um aumento de massa de 18 unidades relativamente ao substrato inicial. Embora não tenha sido detectado qualquer produto de mono-hidroxilação deste tipo (o que reforça a hidroxilação preferencial no anel aromático), há evidência de que possa ocorrer após hidroxilação no anel aromático, como se demonstra pela detecção de produtos de di-hidroxilação discutidos a seguir.

5.2.2. Outros produtos de hidroxilação

Apesar de se terem isolado e caracterizado apenas os produtos principais de hidroxilação do composto **4**, esta via reaccional é comum aos próprios produtos de desmetilação **2** e **3**. Assim, é possível a partir do reagente inicial a ocorrência cumulativa de reacções de desmetilação e hidroxilação. Nos cromatogramas da Figura 5.2, alguns picos podem ser atribuídos à hidroxilação dos respectivos produtos de desmetilação. Na Figura 5.7 apresentam-se os cromatogramas das misturas reaccionais com detecção específica de massa ($[M+H]^+$) correspondente aos produtos de hidroxilação no anel benzénico dos substratos **2** ($m/z = 220$, Figura 5.7a) e **3** ($m/z = 234$, Figura 5.7c).

Como se pode observar, após a reacção de **4** com o radical HO^\bullet , detecta-se a formação de **A'**, **B'** e **C'**, o que demonstra a ocorrência cumulativa de hidroxilação no anel aromático e de desmetilação (Figura 5.7e) e a formação de **A''**, **B''** e **C''**, correspondente à ocorrência de hidroxilação no anel aromático e de dupla desmetilação (Figura 5.7d). De modo análogo, da reacção do substrato **3** com o radical HO^\bullet também se formam os produtos **A''**, **B''** e **C''**, resultantes de desmetilação e hidroxilação (Figura 5.7b).

Enquanto que os produtos de hidroxilação de **4** (compostos **A**, **B**, **C**) foram identificados e caracterizados (ver 5.2.1), tal não aconteceu para os produtos análogos de **2** e **3**, pelo que a sua ordem nos cromatogramas é arbitrária. No entanto, é claro que em cada caso se formam os três isómeros. A identificação destes produtos, à excepção da posição de hidroxilação, foi feita com base nos respectivos espectros de massa (Figura 5.8).

Além disso, é também possível a ocorrência de poli-hidroxilação. Na Figura 5.9 apresenta-se a identificação de alguns produtos de di-hidroxilação das antipirinas estudadas. Esta identificação foi feita com base num aumento de massa de 34 unidades em relação ao substrato de partida, compatível com uma hidroxilação no anel aromático e outra por adição à ligação dupla do anel heterocíclico. Este resultado é comum aos três compostos estudados. Para além da proposta decorrente das estruturas apresentadas na Figura 5.9, existe uma outra possibilidade de aumento de 34 unidades de massa que é uma hidroxilação por adição à ligação dupla do anel heterocíclico e uma hidroxilação num grupo metilo. Esta última reacção deverá envolver a abstracção pelo radical hidroxilo de um átomo de hidrogénio de um grupo metilo.

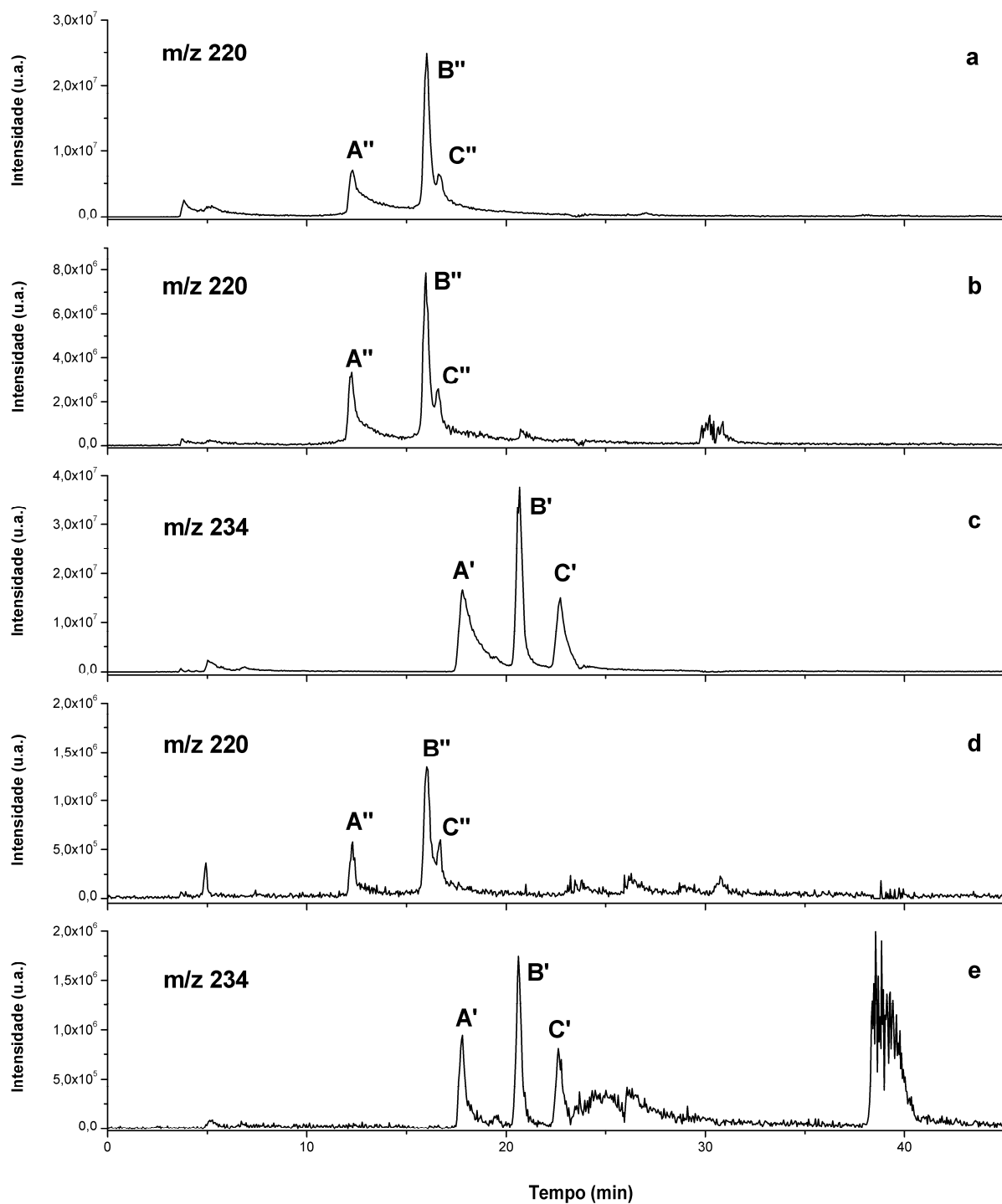


Figura 5.7 – Cromatogramas HPLC (sistema Thermo Finnigan) com a detecção mássica indicada das misturas reaccionais de **2** (a), **3** (b, c) e **4** (d, e) com o radical HO[•] a pH 7; condições experimentais: substrato 10 mM, H₂O₂ 10 mM, Fe^{II}EDTA 2 mM, ácido ascórbico 1 mM (tampão fostatos 5 mM).

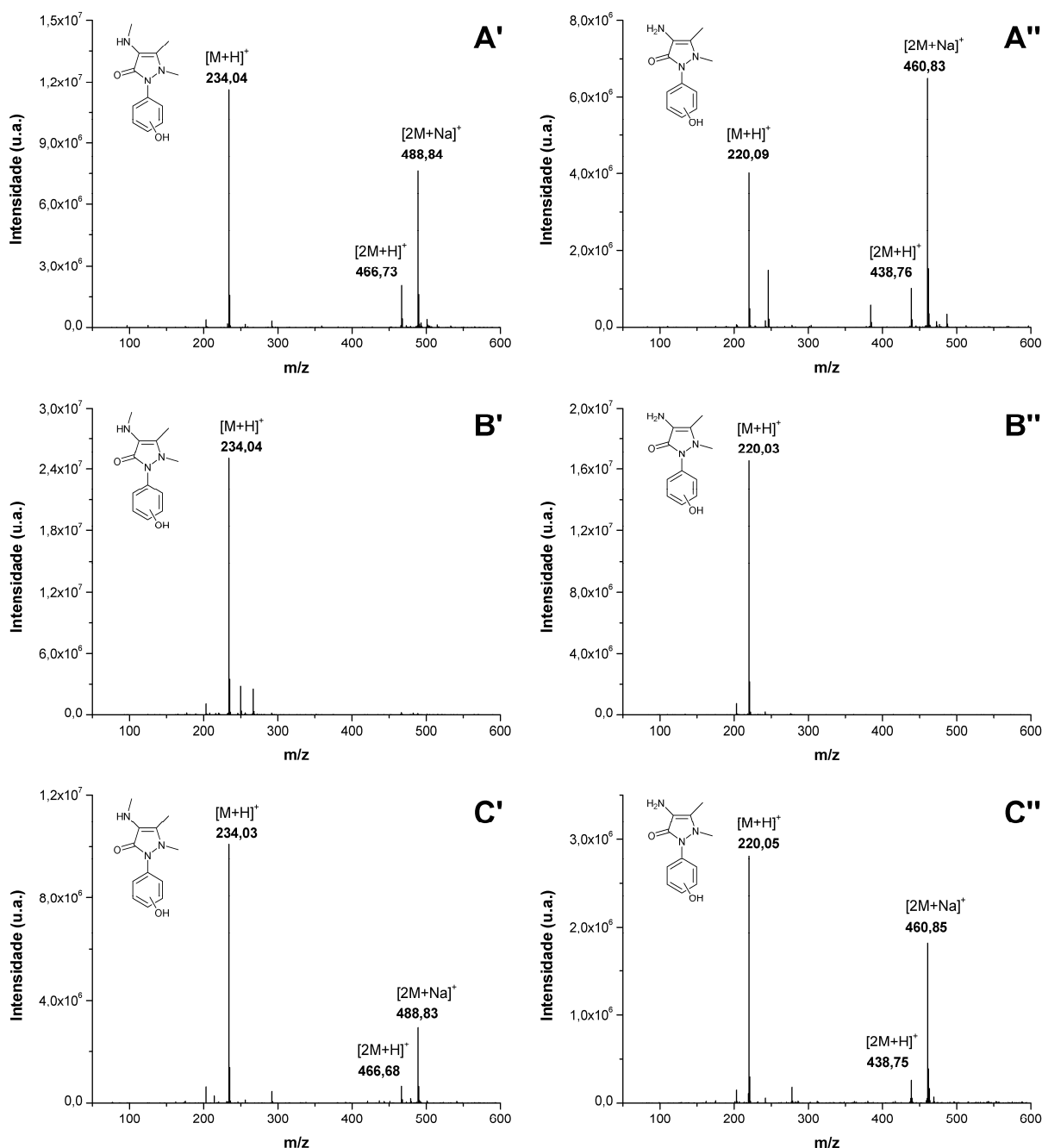


Figura 5.8 – Espectros de massa (ESI+) dos produtos de mono-hidroxilação no anel aromático de **3** (A', B', C') e de **2** (A'', B'', C'').

Uma outra situação de di-hidroxilação leva à ocorrência de produtos com um aumento de 32 unidades de massa em relação ao composto de partida. Na Figura 5.10 ilustra-se este tipo de resultado para o caso do composto **4**. Como sugerido na estrutura inserida nesta Figura, a di-hidroxilação pode ocorrer no anel aromático. No entanto, o aumento de 32 unidades de massa é também compatível com uma hidroxilação no anel benzênico e outra num grupo metilo, à semelhança do aumento de 34 unidades de massa discutido acima.

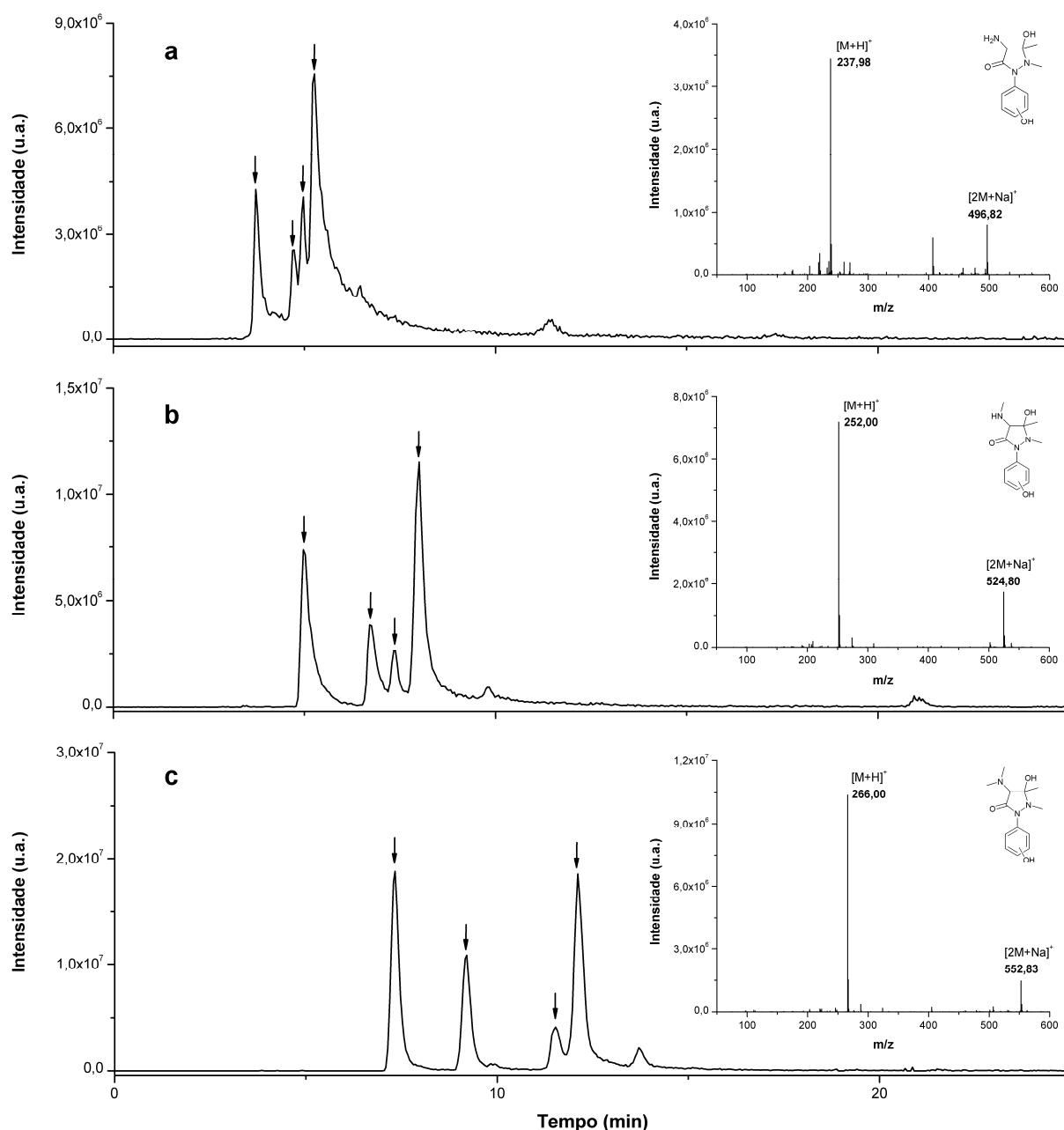


Figura 5.9 – Cromatogramas HPLC (sistema Thermo Finnigan) com detecção mássica das misturas reaccionais de **2** (a, canal $m/z = 238$), **3** (b, canal $m/z = 252$) e **4** (c, canal $m/z = 266$) com o radical HO^\bullet a pH 7; condições experimentais: substrato 10 mM, H_2O_2 10 mM, $\text{Fe}^{\text{II}}\text{EDTA}$ 2 mM, ácido ascórbico 1 mM (tampão fostatos 5 mM). Os espectros de massa (ESI+) e respectivas estruturas de produtos de di-hidroxilação inseridos correspondem aos picos assinalados (\downarrow).

Os dois tipos de reacção acima referidos – desmetilação e hidroxilação – podem ocorrer cumulativamente como já discutido. Também no caso de alguns produtos de di-hidroxilação foi possível identificar a sua formação a partir de substratos iniciais diferentes, o que implica a ocorrência cumulativa de pelo menos uma reacção de desmetilação. De um modo geral, pode pois concluir-se que estes dois tipos de reacção ocorrem independentemente. Como é evidente, o rendimento final dos produtos será tanto menor

quanto maior o número destas reacções sucessivas necessárias para a sua formação, o que em muitos casos torna praticamente impossível a sua detecção.

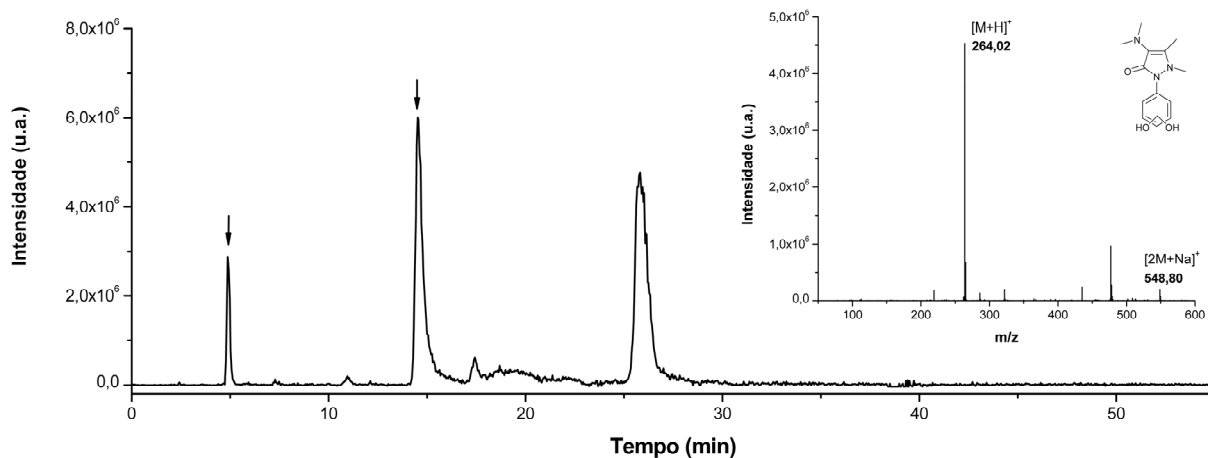


Figura 5.10 – Cromatogramas HPLC (sistema Thermo Finnigan) com detecção mássica da mistura reaccional de **4** (canal $m/z = 264$) com o radical HO^\bullet a pH 7; condições experimentais: substrato 10 mM, H_2O_2 10 mM, $\text{Fe}^{\text{II}}\text{EDTA}$ 2 mM, ácido ascórbico 1 mM (tampão fostatos 5 mM). O espectro de massa (ESI+) e respectiva estrutura do produto de di-hidroxilação inseridos correspondem aos picos assinalados (\downarrow).

5.2.3. Produtos de hidroxilação com abertura do anel heterocíclico

Nas reacções dos compostos **3** e **2** com o radical HO^\bullet identificou-se igualmente um produto com aumento de massa de 32 unidades (ver Figura 5.11). No entanto, ao contrário da reacção com o composto **4**, este produto tem um tempo de retenção semelhante aos produtos de mono-hidroxilação no anel benzénico (**A'**, **B'**, **C'** e **A''**, **B''**, **C''**, respectivamente), pelo que não deve possuir dois grupos hidroxilo nesse anel.

No Esquema 5.2 propõe-se um mecanismo de abertura do anel heterocíclico que conduz à formação de um composto 1,2-dicarbonílico. Num estudo recente com degradação de compostos análogos através de processos de oxidação avançados [9] identificou-se o mesmo tipo de produto final estável.

Além disso, o produto derivado do composto **3** observou-se também quando se oxidou o composto **4** com o radical HO^\bullet (ver Figura 5.11c). Este resultado vem reforçar a ocorrência de reacções de oxidação cumulativas neste sistema. Neste caso particular, o composto **4** desmetila de N^4 em primeiro lugar, uma vez que o mecanismo de abertura de anel heterocíclico necessita da participação de um átomo de hidrogénio ligado ao átomo de azoto do grupo 4-amino.

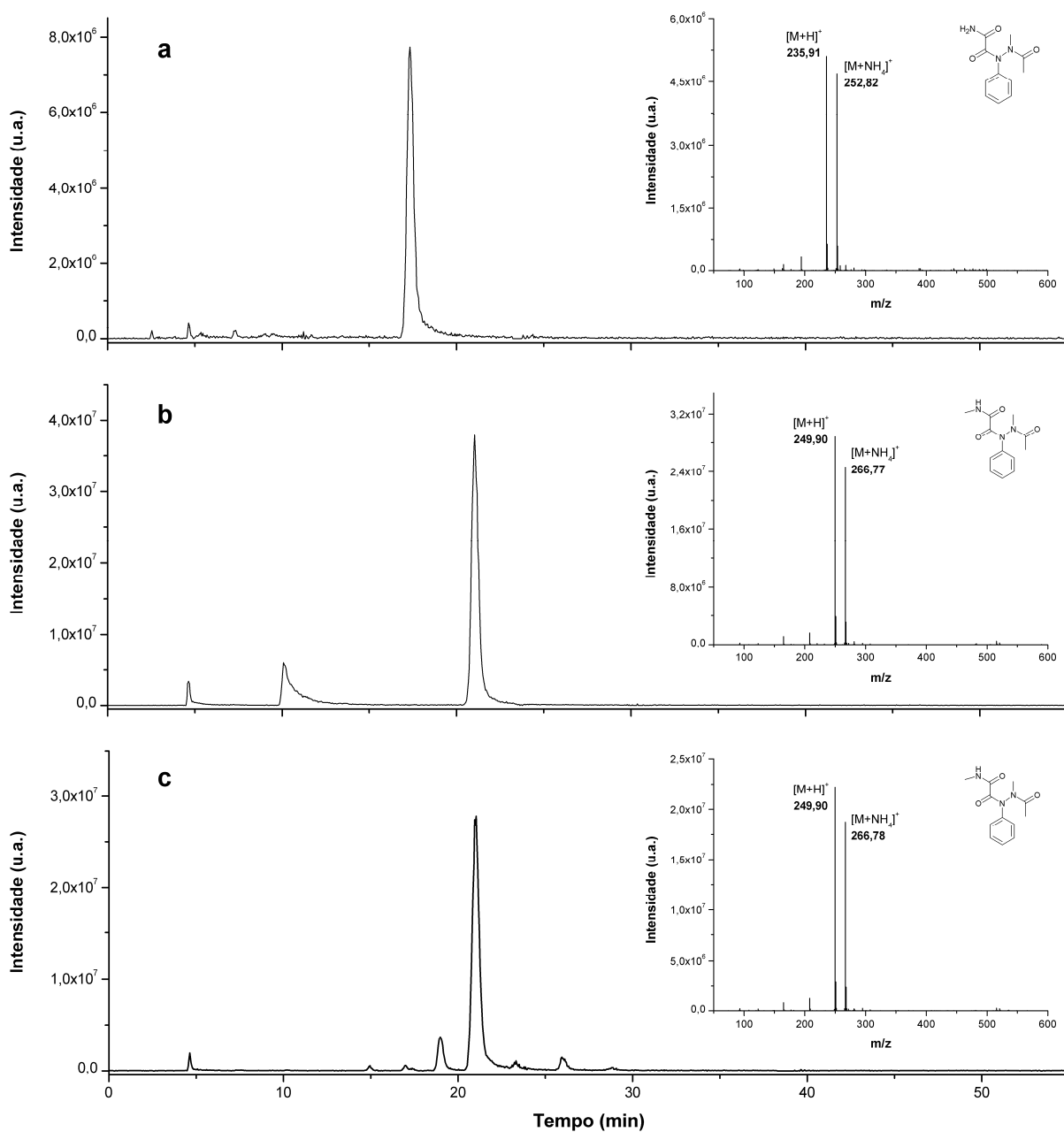
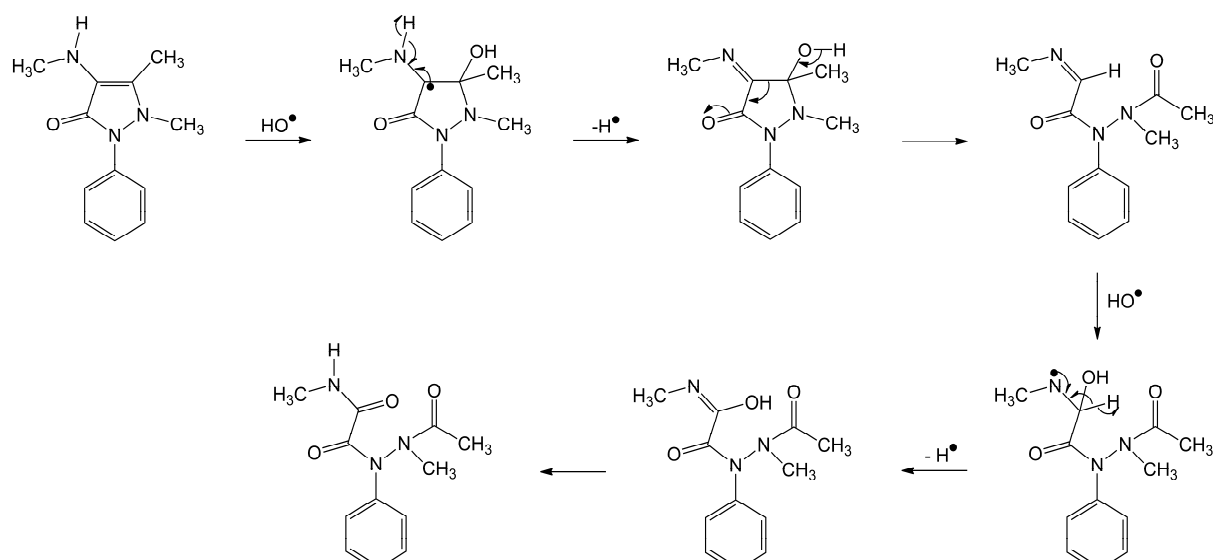


Figura 5.11 – Cromatogramas HPLC (sistema Thermo Finnigan) com detecção mássica das misturas reaccionais de **2** (a, canal $m/z = 236$), **3** (b, canal $m/z = 250$) e **4** (c, canal $m/z = 250$) com o radical HO^\bullet a pH 7; condições experimentais: substrato 10 mM, H_2O_2 10 mM, $Fe^{II}EDTA$ 2 mM, ácido ascórbico 1 mM (tampão fostatos 5 mM). Os espectros de massa (ESI+) e respectivas estruturas de produtos de di-hidroxilação com abertura do anel heterocíclico inseridos correspondem aos picos maioritários.



Esquema 5.2 – Mecanismo reaccional para a dupla adição de radical HO• com abertura do anel heterocíclico de **3**. O mecanismo é idêntico para o composto **2**.

5.2.4. Oxidação da antipirina pelo radical hidroxilo

Estudou-se igualmente a reacção da antipirina (**1**) com o radical HO•, por ser o composto com a estrutura base dos substratos até aqui referidos. Identificaram-se quatro produtos com aumento de massa de 16 unidades, correspondentes a uma hidroxilação no anel benzénico ou na ligação dupla do anel heterocíclico (ver Figura 5.12). Em termos de tempo de reacção, a formação de produtos de oxidação do composto **1** pelo radical hidroxilo foi muito mais lenta que os seus 4-amino derivados, o que está de acordo com a maior actividade antioxidante destes [1].

O mecanismo proposto no Esquema 5.3 só é possível para a antipirina (não substituída em C(4)). De facto, não se observou a formação de um produto análogo a partir dos substratos 4-aminosubstituídos (**2**, **3** e **4**).

Identificaram-se igualmente dois produtos (**P**) comuns às misturas reaccionais dos derivados da antipirina com o radical hidroxilo, por comparação de tempos de retenção e espectros de UV. Isto significa que, nesses compostos, para além das várias reacções de hidroxilação e desmetilação atrás discutidas, também ocorre a saída do grupo 4-amino. No entanto, não foi possível identificar com clareza o ião pseudo-molecular desses produtos por espectrometria de massa.

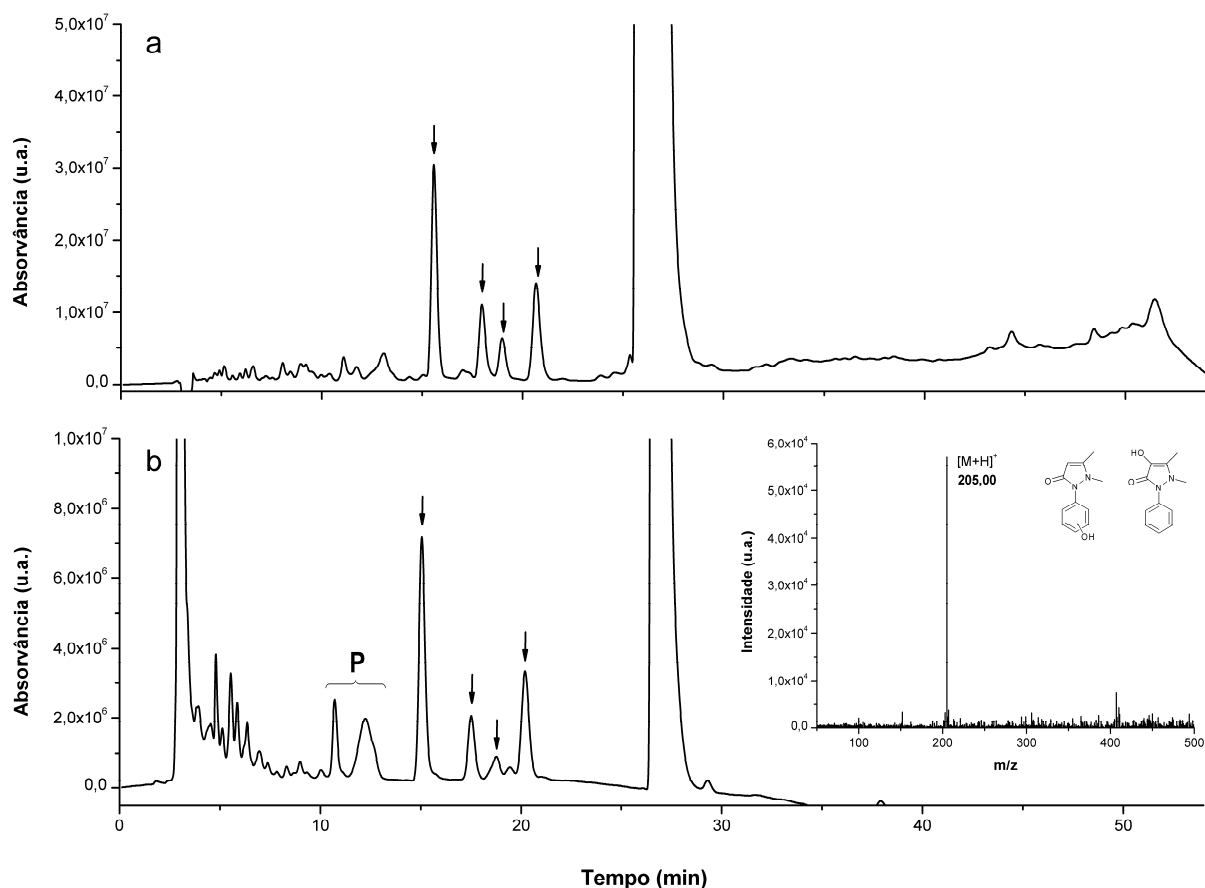
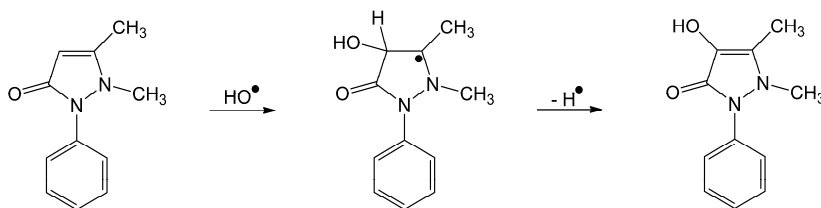


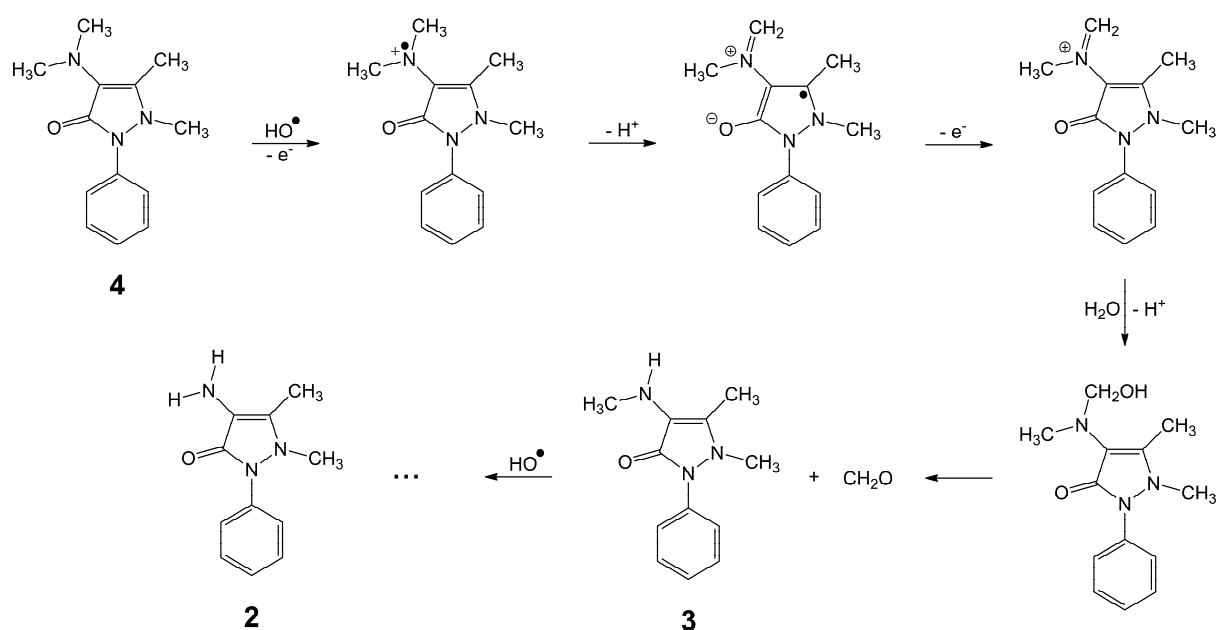
Figura 5.12 – Cromatogramas HPLC (sistema Waters) com detecção óptica das misturas reaccionais de **1** com o radical HO^\bullet , condições experimentais: (a) substrato 10 mM, pH 7 (tampão fostatos 5 mM), solução saturada em N_2O irradiada numa fonte de ^{60}Co (dose 2,7 kGy) (b) substrato 10 mM, H_2O_2 10 mM, $\text{Fe}^{\text{II}}\text{EDTA}$ 2 mM, ácido ascórbico 1 mM, pH 7 (tampão fostatos 5 mM), tempo de reacção 2h. O espectro de massa (ESI+) e respectivas estruturas possíveis dos produtos de hidroxilação inseridos correspondem aos picos assinalados (\downarrow). Os produtos **P** foram igualmente detectados nas reacções de **2**, **3** e **4** com o radical HO^\bullet .



Esquema 5.3 – Mecanismo reaccional para a adição de radical HO^\bullet na ligação dupla do anel heterocíclico de **1**.

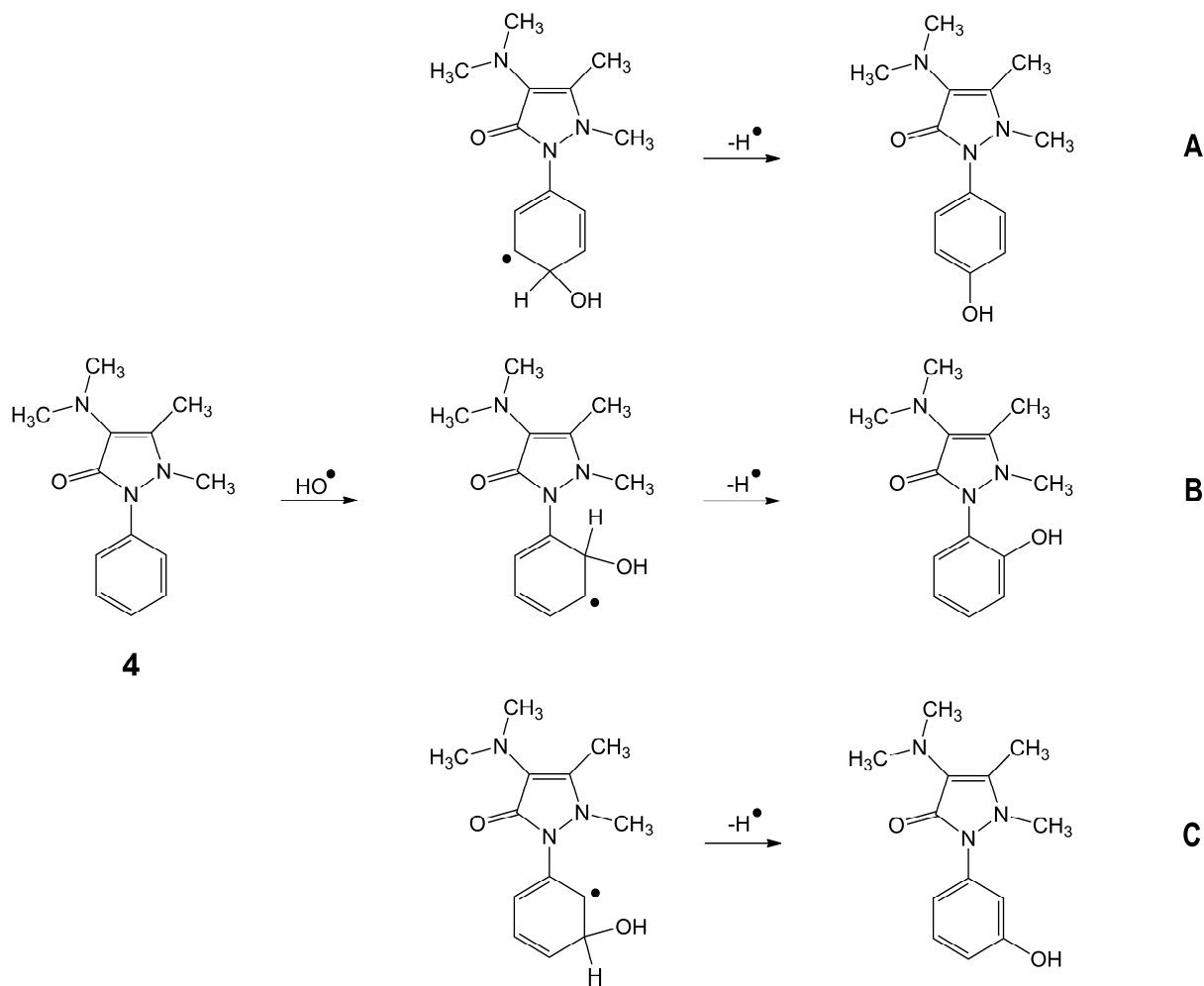
5.2.5. Mecanismos de hidroxilação e de desmetilação

Um mecanismo possível para a formação dos produtos desmetilados é a oxidação monoelétrica dos compostos iniciais, levando à formação dos respectivos radicais catiões (Esquema 5.4). A desmetilação deste tipo de intermediários, com formação de um radical aminometilo seguida por posterior oxidação, leva à formação do derivado desmetilado com perda de formaldeído, um processo já observado para este tipo de compostos em condições de oxidação enzimática, na presença de peróxido de hidrogénio [10-12].



Esquema 5.4 – Mecanismo reaccional para a desmetilação sucessiva de 4.

A hidroxilação no anel benzénico (Esquema 5.5) é um mecanismo conhecido que envolve a adição do radical hidroxilo com formação de um radical di-hidroxiciclohexadienilo, que após oxidação conduz à obtenção de produtos fenólicos [13, 14]. Esta reacção ocorre de modo análogo em anéis aromáticos heterocíclicos, nomeadamente de compostos de relevância biológica [15-18].



Esquema 5.5 – Mecanismo reaccional de adição de radical HO^\bullet ao anel benzénico de **4** com formação dos respectivos derivados hidroxilados.

5.2.6. Espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica

A oxidação monoelectrónica do substrato inicial proposta no mecanismo acima descrito foi confirmada por espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica (RPE).

Obteve-se um espectro de RPE por reacção do composto **4** com o radical hidroxilo (sistema de Fenton) em solução aquosa, que se apresenta na Figura 5.13. A espécie detectada é atribuída ao radical catião centrado no átomo de azoto do grupo 4-dimetilamino [10, 11, 19]. Este espectro é idêntico ao que se obtém quando se efectua a reacção com outras espécies oxidantes ($\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$, $\text{SO}_4^{\bullet-}$, I_2). O tempo de vida deste radical catião (vários minutos) é suficientemente longo para que possa ser detectado introduzindo uma alíquota da mistura reaccional numa célula de quartzo plana colocada no centro da cavidade do espectrómetro.

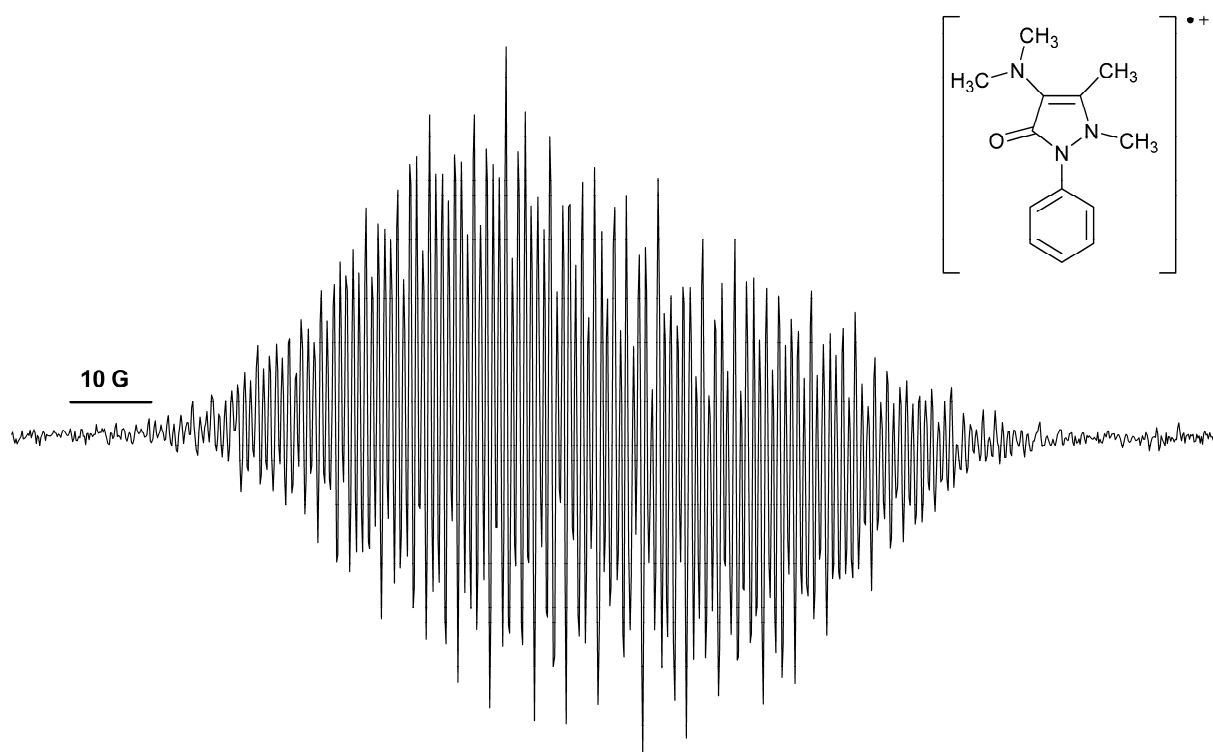


Figura 5.13 – Espectro de RPE do radical catião da 4-(*N,N*-dimetil)-aminoantipirina, obtido por reacção de Fenton (4 30mM, H₂O₂ 30 mM, FeSO₄ 0,5 mM, pH 1)

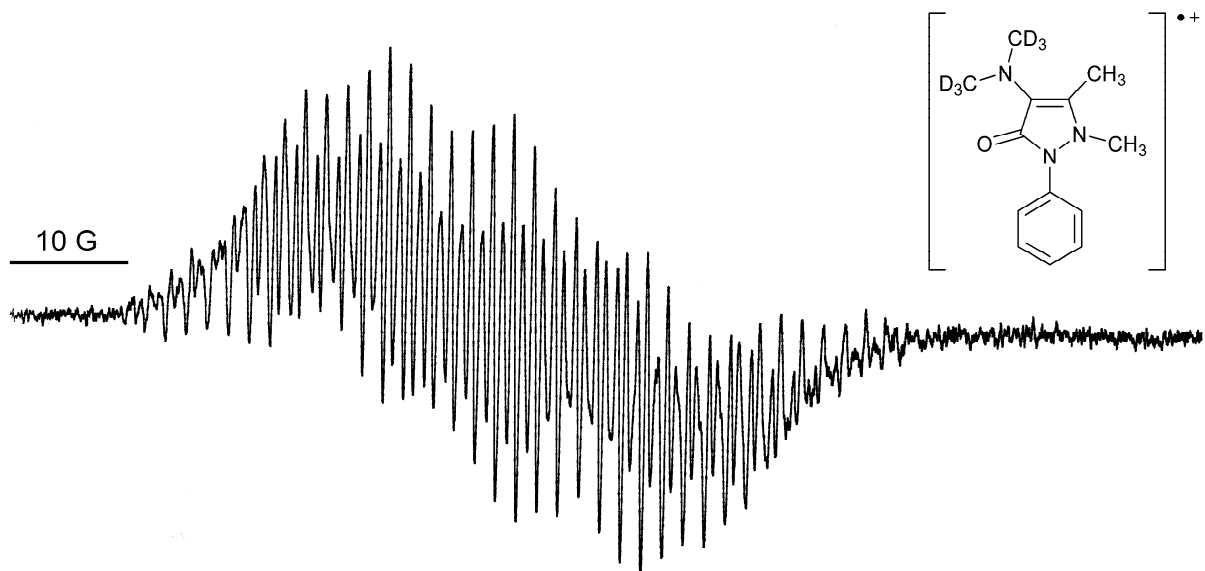


Figura 5.14 – Espectro de RPE do radical catião da 4-(*N,N*-di(trideuterometil))-aminoantipirina, obtido por reacção de Fenton (substrato deuterado 30mM, H₂O₂ 30 mM, FeSO₄ 0,5 mM, pH 1).

No entanto, dada a sua complexidade, não foi possível fazer a atribuição das constantes de acoplamento hiperfino. Com o objectivo de interpretar o espectro, sintetizou-se o análogo do composto **4** selectivamente deuterado nos grupos metilo do grupo 4-amino de forma a obter um espectro simplificado (Figura 5.14).

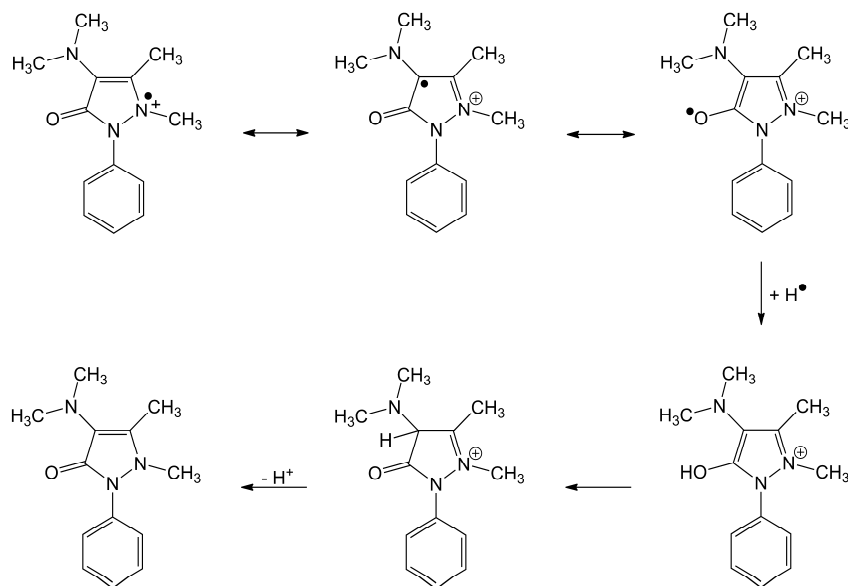
A substituição de átomos de hidrogénio ($I = 1/2$, $g_H = 5,5857$) por deutério ($I = 1$, $g_D = 0,8574$) resulta em constantes de acoplamento que são cerca de 85% inferiores. Embora o número de riscas teóricas aumente (os dubletos de H são substituídos por tripletos de D), o espectro pode simplificar-se se as constantes de acoplamento forem indetectáveis por serem inferiores à largura de risca.

Mesmo assim, não foi possível fazer a atribuição das constantes de acoplamento para o espectro do radical catião da Figura 5.14, uma vez que a espécie possui ainda três átomos de azoto não equivalentes, dois grupos metilo e os hidrogénios benzénicos. Apesar do espectro ser substancialmente mais pequeno, em resultado da simplificação esperada, a sua estrutura hiperfina é demasiado complexa para ser possível fazer uma atribuição inequívoca de todas as constantes de acoplamento.

Tentou-se igualmente obter um espectro de RPE dos radicais catiões dos compostos **3** e **2**, nas mesmas condições acima descritas para o composto **4**. No entanto, nestes casos o tempo de vida das espécies radicalares é substancialmente mais curto, uma vez que a pH 7 desprotonam do grupo 4-amino dando origem a radicais neutros. Assim, não foi possível a detecção de radicais com a técnica utilizada para este tipo de compostos.

A complexidade do espectro de RPE do composto **4** pode ser atribuída à coexistência de dois radicais catiões no meio reaccional. De facto, e apesar de até agora se ter referido apenas a formação do radical catião centrado em N^4 (ver Esquema 5.4), também é possível a formação de um outro radical catião, centrado em $N(1)$, como se apresenta no Esquema 5.6. O contributor de ressonância mais relevante deste radical é aquele que possui o electrão desemparelhado no átomo de oxigénio pois torna o anel heterocíclico aromático. Este trata-se de um radical oxidante que rapidamente conduz à formação do substrato inicial, pelo que não ocorre desmetilação por esta via. Aliás, para além do produto **3**, não foi detectado nenhum outro produto de desmetilação na reacção do composto **4** com o radical hidroxilo. No caso do composto **3**, apesar de ser teoricamente possível a desmetilação de $N(1)$, também não foi detectado nenhum outro produto para além de **2**.

Os radicais catiões de **4** centrados em N^4 e $N(1)$ são espécies distintas que possuem constantes de acoplamento diferentes, o que pode justificar a complexidade do espectro de RPE obtido.



Esquema 5.6 – Estrutura do radical catião de **4** centrado em $N(1)$ e mecanismo reaccional para a sua redução com regeneração ao composto inicial.

5.3. Oxidação pelo radical anião sulfato

Como se referiu acima, a formação do radical catião de **4** também ocorre por oxidação com o radical anião $SO_4^{\bullet-}$, pelo que houve interesse em verificar se os produtos finais de oxidação seriam idênticos aos obtidos na reacção com o radical HO^{\bullet} .

Dos produtos identificados na Figura 5.15, verifica-se que ocorre desmetilação de N^4 com formação dos produtos **2** e **3**, o que pressupõe a formação de um radical catião como proposto no Esquema 5.4. O facto de não se observar a formação de produtos de hidroxilação no anel benzénico mostra que a oxidação monoelectrónica pelo radical anião $SO_4^{\bullet-}$ não ocorre nesta parte da molécula.

Para além dos produtos de desmetilação, identificou-se um novo produto com um aumento de 16 unidades de massa, mas que não pode corresponder a nenhuma hidroxilação no anel benzénico. O ião pseudo-molecular do respectivo espectro de massa (ver Figura 5.15) é compatível com a estrutura do produto formado segundo o mecanismo apresentado no Esquema 5.7.

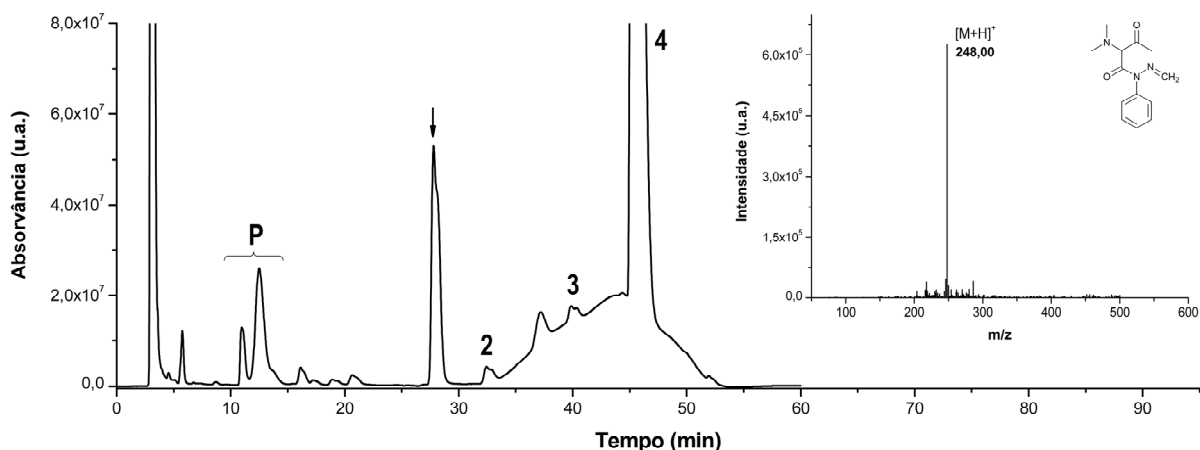
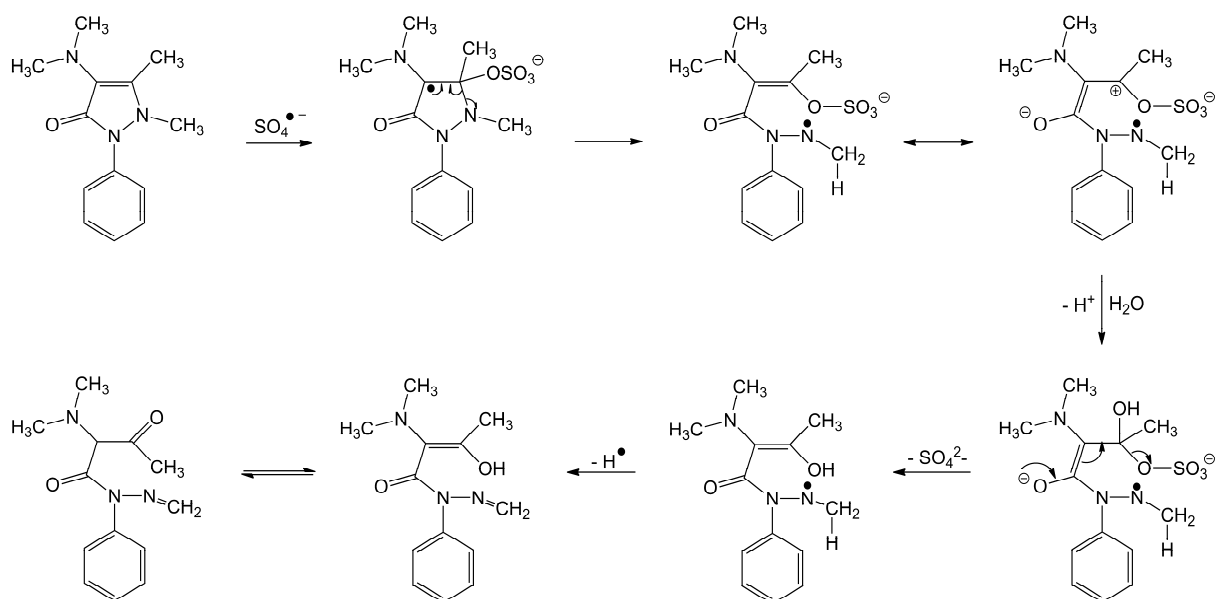


Figura 5.15 – Cromatograma HPLC (sistema Waters) com detecção óptica da mistura reaccional de **4** com o radical anião $\text{SO}_4^{\bullet-}$. Condições experimentais: substrato 10 mM, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 50 mM, $\text{Fe}^{\text{II}}\text{EDTA}$ 2 mM, ácido ascórbico 1 mM, pH 7 (tampão fostatos 5 mM), tempo de reacção 5 min. O espectro de massa (ESI+) e respectiva estrutura possível do produto de oxidação inseridos correspondem ao pico assinalado (\downarrow). Os produtos **P** foram igualmente detectados nas reacções de **1**, **2**, **3** e **4** com o radical HO^{\bullet} .



Esquema 5.7 – Mecanismo reaccional para a formação do novo produto identificado por reacção de **4** com o radical anião $\text{SO}_4^{\bullet-}$.

No caso da reacção do composto **1** com o radical anião $\text{SO}_4^{\bullet-}$, observou-se apenas a formação do produto de adição na ligação dupla do anel heterocíclico proposto no Esquema 5.8. Apesar de ter um tempo de retenção idêntico a um dos produtos de hidroxilação (ver Figura 5.16), possui espectros de UV e de massa distintos. O aumento de 96 unidades de

massa é compatível com a introdução de um grupo sulfato. A adição em C(4) parece ser mais favorável dado o menor impedimento estereoquímico. No caso do composto **4**, a posição de adição mais favorável é C(5), pela mesma razão (Esquema 5.7). O factor estereoquímico é particularmente relevante no caso de uma reacção que envolve uma espécie volumosa com o radical anião $\text{SO}_4^{\bullet-}$.

A formação do produto final do Esquema 5.8 envolve a oxidação do radical aducto de sulfato pelo oxigénio molecular com eliminação de radical superóxido, uma situação comum em oxidações radicalares em solução aquosa arejada [20].

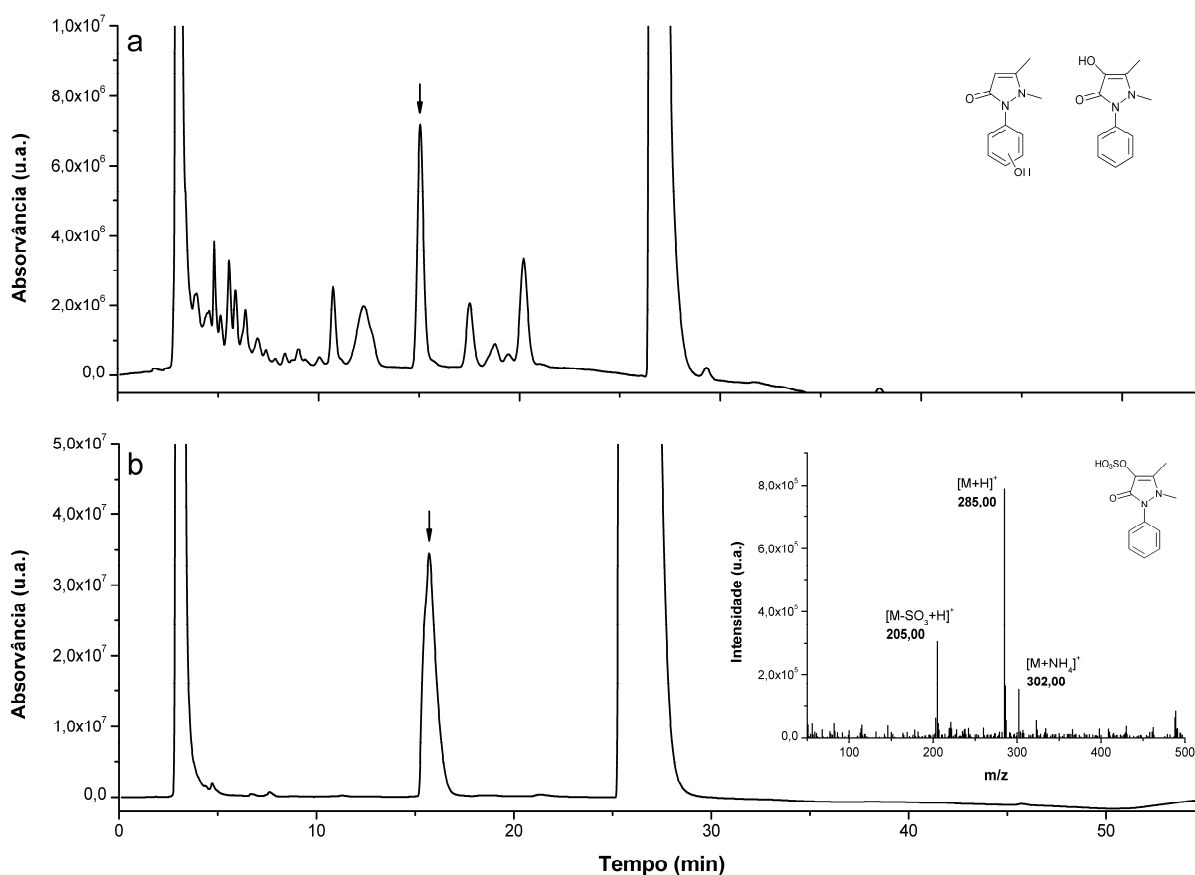
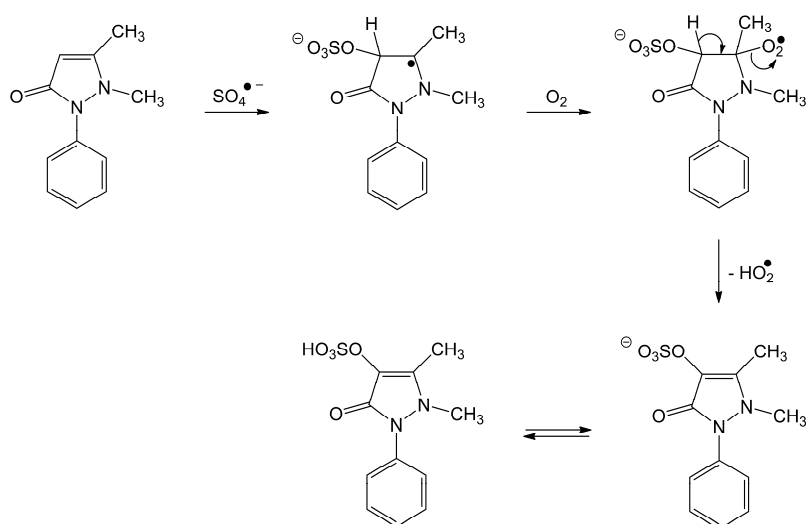


Figura 5.16 – Cromatogramas HPLC (sistema Waters) com detecção óptica das misturas reaccionais de **1** com os radicais HO^\bullet e $\text{SO}_4^{\bullet-}$. Condições experimentais: (a) substrato 10 mM, H_2O_2 10 mM, $\text{Fe}^{\text{II}}\text{EDTA}$ 2 mM, ácido ascórbico 1 mM, pH 7 (tampão fostatos 5 mM), tempo de reacção 2h (b) substrato 10 mM, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 50 mM, $\text{Fe}^{\text{II}}\text{EDTA}$ 2 mM, ácido ascórbico 1 mM, pH 7 (tampão fostatos 5 mM), tempo de reacção 2h. O espectro de massa (ESI+) e respectiva estrutura possível do produto de adição de sulfato inseridos correspondem ao pico assinalado (\downarrow).



Esquema 5.8 – Mecanismo reaccional para a formação do aducto sulfato do composto 1.

5.4. Conclusões

Os resultados obtidos permitem concluir que uma das vias possíveis para a reacção entre a 4-(N,N-dimetil)-aminoantipirina (**4**) e o radical HO^{\bullet} é a hidroxilação no anel aromático. Esta reacção, comum aos compostos **2**, **3** e **4**, tem sido observada em sistemas aromáticos iso- e hetero-cíclicos, nomeadamente em compostos de relevância biológica [16-18]. Há também evidência de que o composto **4** sofre uma nova reacção – uma desmetilação – que leva à formação de 4-(N-metil)-aminoantipirina (**3**), que sofre nova desmetilação a 4-aminoantipirina (**2**). Esta reacção ocorre também quando se utiliza como oxidante o radical anião $\text{SO}_4^{\bullet-}$.

A importância patofisiológica dos produtos reaccionais formados e seus possíveis intermediários reactivos não foi até agora discutida e avaliada, embora estes resultados possam trazer uma mais valia à informação sobre a eventual reactividade *in vivo* das pirazolonas estudadas com o radical HO^{\bullet} . Assim, na ocorrência de processos inflamatórios relacionados com *stress* oxidativo, em que esteja envolvido o radical HO^{\bullet} , a terapia com AINE do tipo pirazolona envolverá a hidroxilação do anel aromático bem como reacções de desmetilação. Estes metabolitos devem ser considerados, quer pela sua eventual toxicidade, quer pela sua contribuição para o efeito terapêutico. As reacções de desmetilação poderão provavelmente desempenhar um efeito biológico relevante, comparado com o da reacção de hidroxilação, uma vez que a sua ocorrência sequencial poderá configurar uma cascata antioxidante em que os compostos **4**, **3** e **2** se comportam, cada um deles, como antioxidantes.

Bibliografia

1. Costa D., Marques A.P., Reis R.L., Lima J., Fernandes E., "Inhibition of Human Neutrophil Oxidative Burst by Pyrazolone Derivatives". *Free Radical Biology and Medicine*, 2006, **40**(4): 632-640.
2. Kalyanaraman B., Sohnle P.G., "Generation of Free-Radical Intermediates from Foreign Compounds by Neutrophil-Derived Oxidants". *Journal of Clinical Investigation*, 1985, **75**(5): 1618-1622.
3. Sayo H., Saito M., "The Mechanism of Myeloperoxidase-Catalyzed Oxidation of Aminopyrine". *Xenobiotica*, 1990, **20**(9): 957-965.
4. Costa D., Gomes A., Lima J., Fernandes E., "Singlet oxygen scavenging activity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs". *Redox Report*, 2008, **13**(4): 153-160.
5. Costa D., Vieira A., Fernandes E., "Dipyron and aminopyrine are effective scavengers of reactive nitrogen species". *Redox Report*, 2006, **11**(3): 136-142.
6. Uetrecht J.P., Ma H.M., Macknight E., McClelland R., "Oxidation of Aminopyrine by Hypochlorite to a Reactive Dication - Possible Implications for Aminopyrine-Induced Agranulocytosis". *Chemical Research in Toxicology*, 1995, **8**(2): 226-233.
7. Takahashi K., Sakano H., Rytting J.H., Numata N., Kuroda S., Mizuno N., "Influence of pH on the permeability of *p*-toluidine and aminopyrine through shed snake skin as a model membrane". *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2001, **27**(2): 159-164.
8. Coolen S.A.J., Everaerts F.M., Huf F.A., "Characterization of ⁶⁰Co γ -radiation induced radical products of antipyrine by means of high-performance liquid chromatography, mass spectrometry, capillary zone electrophoresis, micellar electrokinetic capillary chromatography and nuclear magnetic resonance spectrometry". *Journal of Chromatography A*, 1997, **788**(1-2): 95-103.
9. Pérez-Estrada L.A., Malato S., Aguera A., Fernandez-Alba A.R., "Degradation of dipyron and its main intermediates by solar AOPs Identification of intermediate products and toxicity assessment". *Catalysis Today*, 2007, **129**(1-2): 207-214.
10. Griffin B.W., Ting P.L., "Mechanism of *N*-Demethylation of Aminopyrine by Hydrogen-Peroxide Catalyzed by Horseradish-Peroxidase, Metmyoglobin, and Protohemin". *Biochemistry*, 1978, **17**(11): 2206-2211.
11. Lasker J.M., Sivarajah K., Mason R.P., Kalyanaraman B., Aboudonia M.B., Eling T.E., "A Free-Radical Mechanism of Prostaglandin Synthase-Dependent Aminopyrine Demethylation". *Journal of Biological Chemistry*, 1981, **256**(15): 7764-7767.
12. Pérez-Gilabert M., SanchezFerrer A., García-Carmona F., "Oxidation of aminopyrine by the hydroperoxidase activity of lipoxygenase: A new proposed mechanism of *N*-demethylation". *Free Radical Biology and Medicine*, 1997, **23**(4): 548-555.
13. Raghavan N.V., Steenken S., "Electrophilic Reaction of the OH Radical with Phenol - Determination of the Distribution of Isomeric Dihydroxycyclohexadienyl Radicals". *Journal of the American Chemical Society*, 1980, **102**(10): 3495-3499.
14. Albarran G., Schuler R.H., "Hydroxyl radical as a probe of the charge distribution in aromatics: Phenol". *Journal of Physical Chemistry A*, 2007, **111**(13): 2507-2510.
15. Steenken S., "Purine-Bases, Nucleosides, and Nucleotides - Aqueous-Solution Redox Chemistry and Transformation Reactions of Their Radical Cations and E⁻ and OH Adducts". *Chemical Reviews*, 1989, **89**(3): 503-520.

16. Candeias L.P., Steenken S., "Reaction of HO[•] with guanine derivatives in aqueous solution: Formation of two different redox-active OH-adduct radicals and their unimolecular transformation reactions. Properties of G(-H)[•]". *Chemistry - A European Journal*, 2000, **6**(3): 475-484.
17. Vieira A.J.S.C., Steenken S., "Pattern of OH Radical Reaction with Adenine and Its Nucleosides and Nucleotides - Characterization of Two Types of Isomeric OH Adduct and Their Unimolecular Transformation Reactions". *Journal of the American Chemical Society*, 1990, **112**(19): 6986-6994.
18. Vieira A.J.S.C., Steenken S., "Radical oxidation of xanthines: A reaction pathway to uric acid?". *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*, 1996, **93**(1): 235-243.
19. Griffin B.W., "Free-Radical Intermediate in N-Demethylation of Aminopyrine by Horseradish Peroxidase Hydrogen Peroxide". *Febs Letters*, 1977, **74**(1): 139-143.
20. Dias R.M.B., Vieira A.J.S.C., "Substituent effect on superoxide elimination from peroxy radicals of adenine and methylated derivatives". *Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry*, 1998, **117**(3): 217-222.

6. Reacção de derivados do ácido cinâmico com radicais oxidantes

6.1. Introdução

Os derivados hidroxilados do ácido cinâmico são compostos conhecidos pelas suas propriedades antioxidantes que podem prevenir ou retardar processos oxidativos *in vitro* e/ou *in vivo*, em particular doenças cardíacas coronárias, cancro e inflamação [1]. A actividade antioxidante dos ácidos hidroxicinâmicos tem sido relacionada com a sua capacidade doadora de electrão ou de hidrogénio, e respectiva estabilização do radical fenoxilo resultante [2]. Essa actividade é potenciada para compostos com uma estrutura catecólica, como no caso do ácido cafeico (ácido 3,4-di-hidroxicinâmico) [3-5]. O papel da cadeia etilénica na actividade captora de radicais tem levantado alguma controvérsia. Alguns estudos atribuem-lhe importância pelo facto de contribuir para a estabilização do radical fenoxilo [6, 7], enquanto que outros não a relacionam com a eficácia antioxidante [8-10].

Embora existam muitos resultados de estudos da actividade antioxidante destes compostos, em particular no que respeita ao teste da sua capacidade captora de radicais por métodos tradicionalmente utilizados para este fim (ver 2.7.3) [11-15], não estão ainda completamente esclarecidos os mecanismos reaccionais de oxidação radicalar dos próprios antioxidantes, em particular a caracterização dos radicais transientes e a identificação dos produtos finais estáveis.

Neste trabalho, estudaram-se algumas reacções de ácido cinâmico e derivados hidroxilados (Figura 6.1) com radicais oxidantes com o objectivo de propor os respectivos mecanismos com base na identificação da estrutura dos produtos finais.

Complementou-se este estudo com a avaliação do efeito protector relativo de três destes compostos em relação à degradação oxidativa de um composto de relevância biológica.

O ácido cinâmico e seus derivados (adiante designados genericamente por ácidos cinâmicos) são compostos com uma estrutura de vinilbenzeno de configuração *E*. Contudo, sob a acção de luz ou em meio ácido, existem em equilíbrio quantidades detectáveis dos respectivos isómeros *Z*. Desta forma, optou-se por gerar os radicais oxidantes por via química através da reacção de Fenton e por via radiolítica.

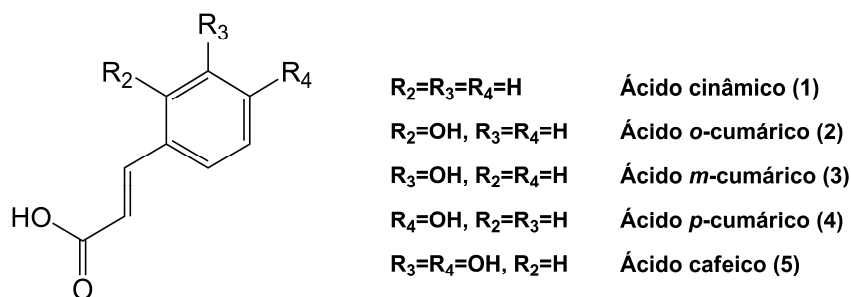


Figura 6.1 – Estrutura do ácido cinâmico e seus derivados.

6.2. Oxidação pelo radical hidroxilo

As reacções de ácidos cinâmicos com o radical hidroxilo efectuaram-se por radiólise de soluções aquosas saturadas em N_2O , como descrito no Capítulo 3. Na Figura 6.2 apresentam-se os cromatogramas HPLC das soluções aquosas a pH 7 irradiadas numa fonte de ^{60}Co . A este valor de pH os substratos encontram-se completamente desprotonados (pK_a entre 4 e 5 [16]).

Utilizando como substrato o ácido cinâmico (composto **1**, Figura 6.2a), observa-se a formação dos produtos **2**, **3** e **4** identificados como ácidos *orto*-, *meta*- e *para*-cumáricos, respectivamente. Esta identificação baseou-se na comparação dos tempos de retenção e espectros de UV de padrões. A formação de **2** e **4** com um rendimento superior ao de **3** reflecte o efeito *orto/para* director da cadeia vinílica exocíclica em relação a uma reacção com uma espécie electrofílica como o radical hidroxilo.

De modo análogo, verificou-se a ocorrência de hidroxilação quando se usaram como substratos os ácidos cumáricos, com formação de compostos di-hidroxilados no anel benzénico. No caso do composto **2**, identificou-se a formação do ácido 2,4-dihidroxicinâmico (composto **6**), e de um outro produto (composto **7**) cujo tempo de retenção e espectro de UV são compatíveis com uma estrutura di-hidroxilada no anel benzénico, não tendo contudo sido possível identificar a posição de hidroxilação pela inexistência de padrão. A reacção do composto **3** conduziu à formação de ácido cafeico (composto **5**) e do produto **7**. Este produto, tendo-se formado a partir quer do ácido *orto*- quer do ácido *meta*-cumárico, será necessariamente o ácido 2,3- ou 2,5-dihidroxicinâmico. Finalmente, por reacção do composto **4** com o radical hidroxilo obteve-se também o ácido cafeico e o composto **6**. No Esquema 6.1 propõe-se um mecanismo para estas reacções de hidroxilação.

Para uma melhor caracterização dos produtos formados na reacção dos ácidos cinâmicos com o radical hidroxilo, fizeram-se análises por GC-MS das mesmas soluções

irradiadas após evaporação do solvente e derivatização com MSTFA, tal como descrito na Parte Experimental (ver 3.5.3.1). Nas Figuras 6.3 a 6.7 apresentam-se os cromatogramas GC obtidos após derivatização de soluções irradiadas de ácido cinâmico (**1**) e derivados (**2-5**).

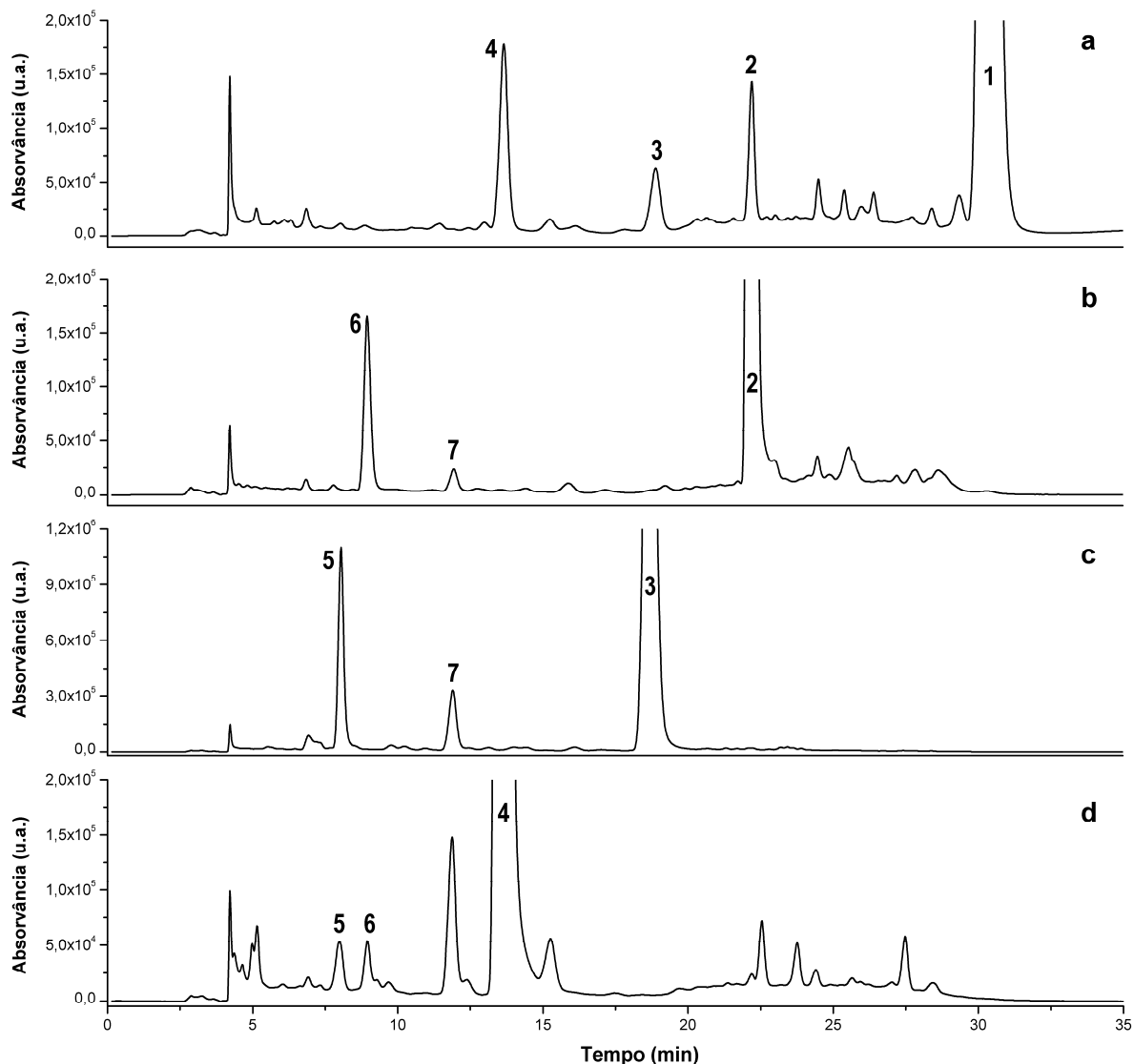
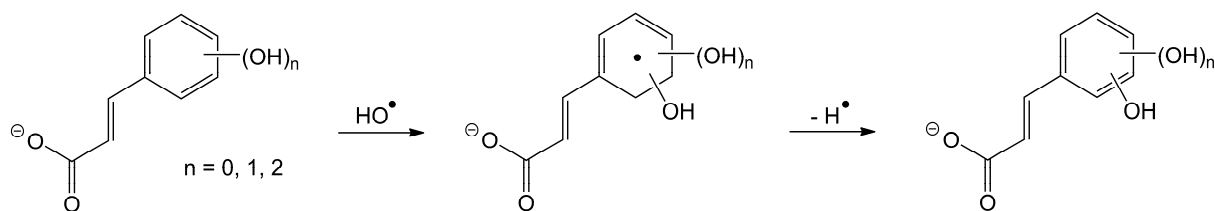


Figura 6.2 – Cromatogramas HPLC (sistema Waters) com detecção óptica de soluções aquosas de **1**(a), **2**(b), **3**(c) e **4**(d) (2 mM, pH 7) saturadas em N_2O e irradiadas numa fonte de ^{60}Co (dose 2,7 kGy).



Esquema 6.1 – Mecanismo de hidroxilação no anel benzénico de ácidos cinâmicos.

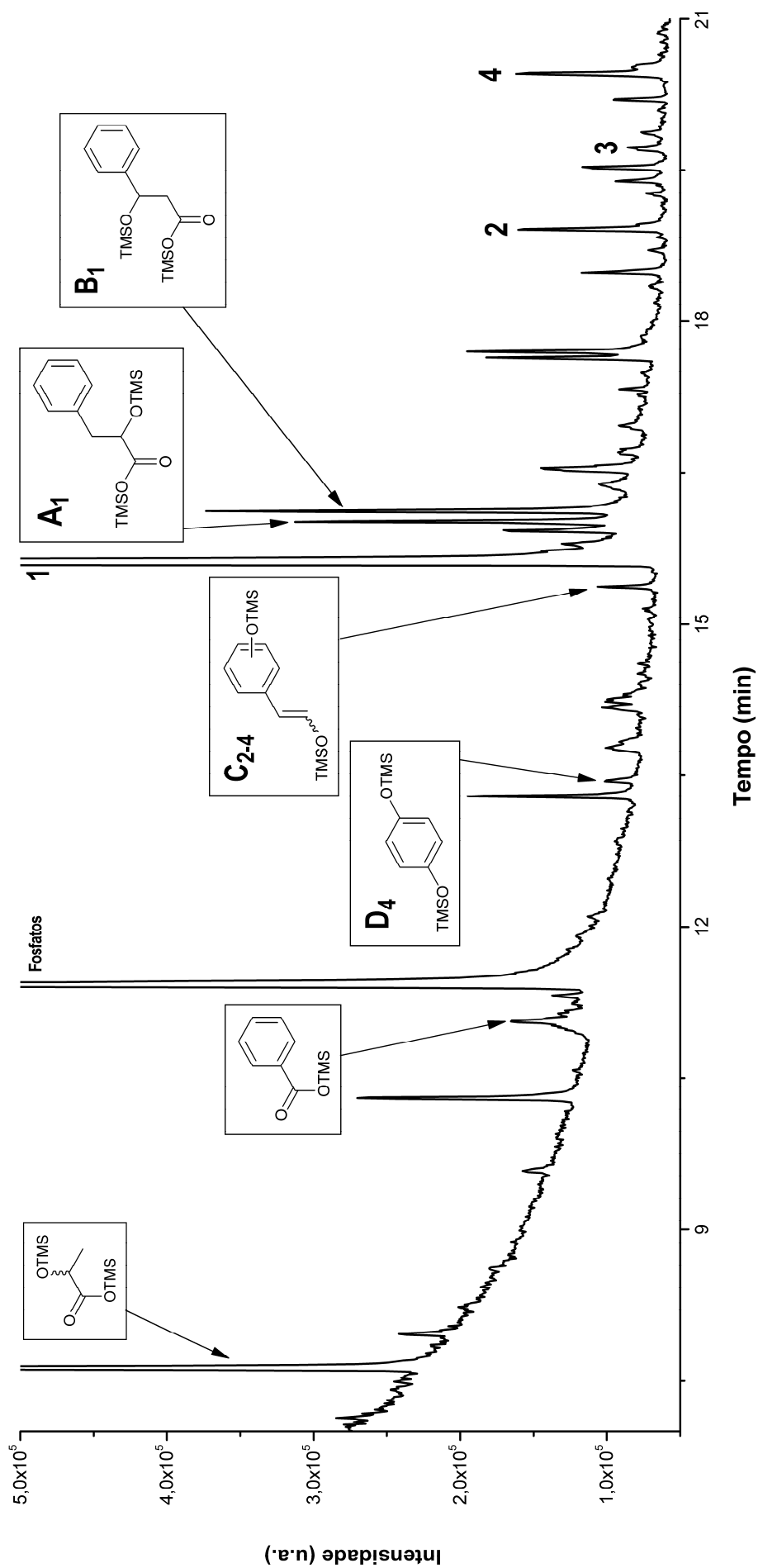
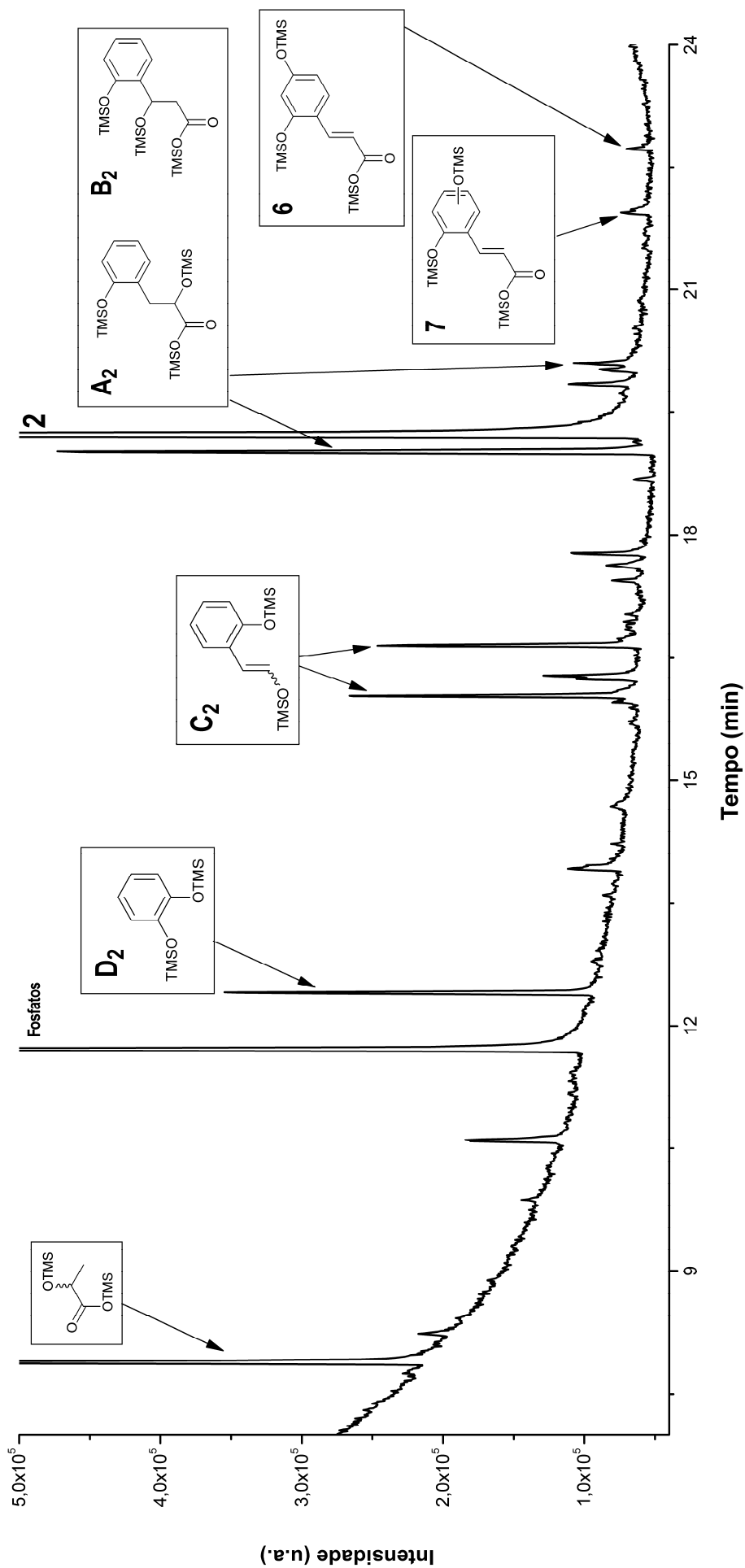


Figura 6.3 – Cromatograma GC-MS (sistema Carlo Erba) de uma amostra derivatizada da mistura reacional de **1** com o radical HO[•] (gerado por radiólise).

Figura 6.4 – Cromatograma GC-MS (sistema Carlo Erba) de uma amostra derivatizada da mistura reaccional de **2** com o radical HO[•] (gerado por radiólise).

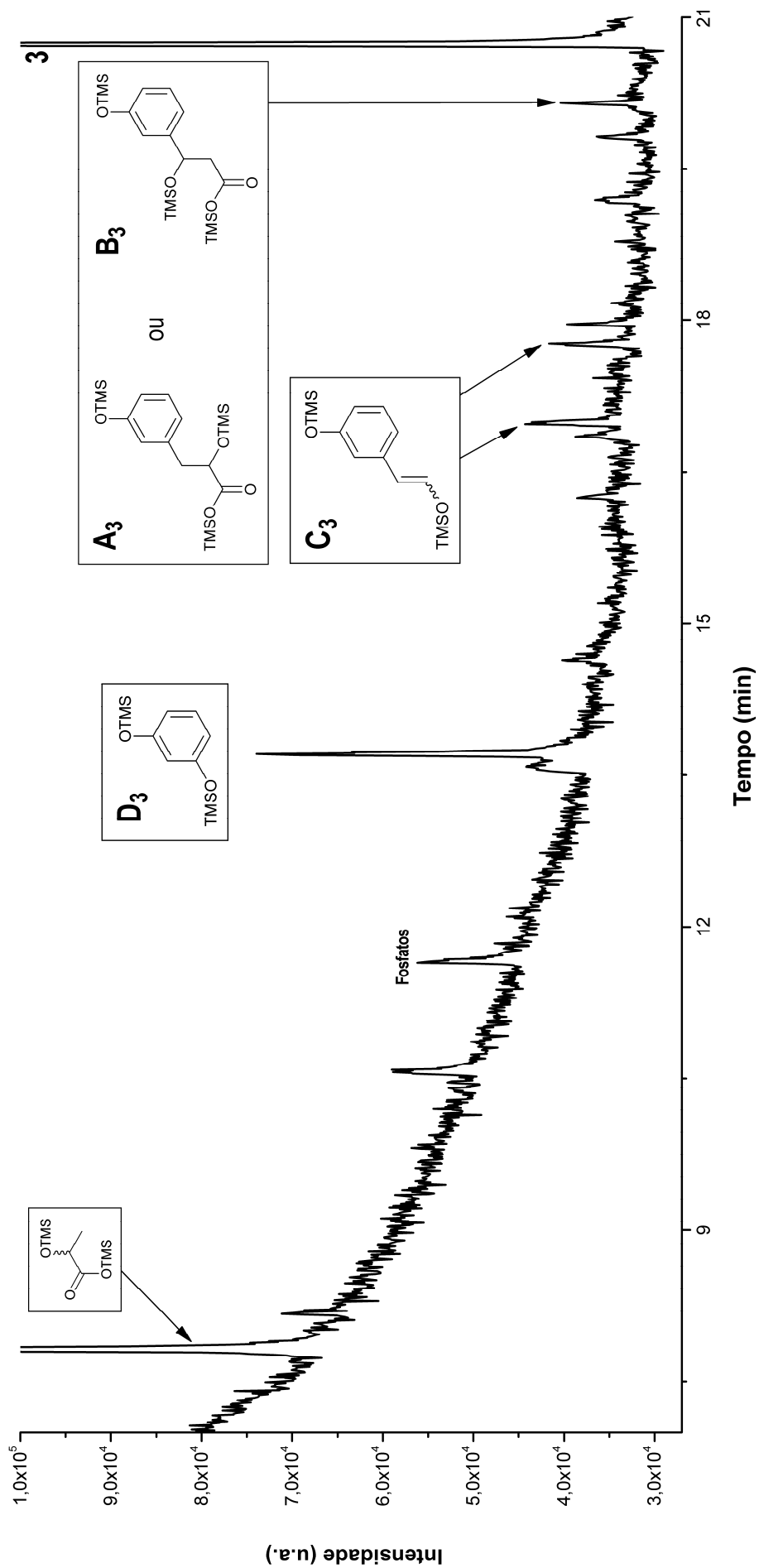


Figura 6.5 – Cromatograma GC-MS (sistema Carlo Erba) de uma amostra derivatizada da mistura reaccional de **3** com o radical HO[•] (gerado por radiólise).

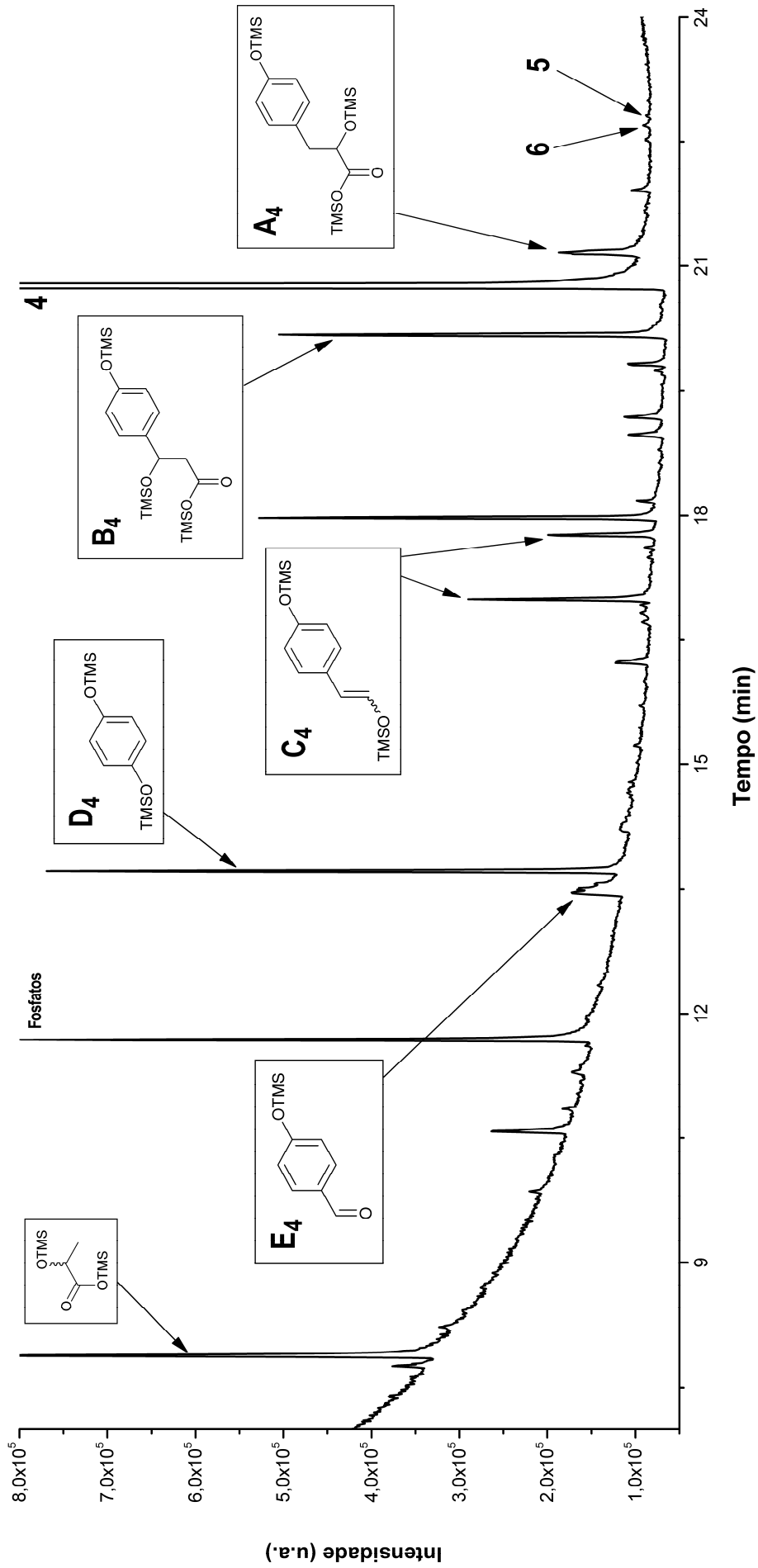


Figura 6.6 – Cromatograma GC-MS (sistema Carlo Erba) de uma amostra derivatizada da mistura reaccional de **4** com o radical HO \cdot (gerado por radiólise).

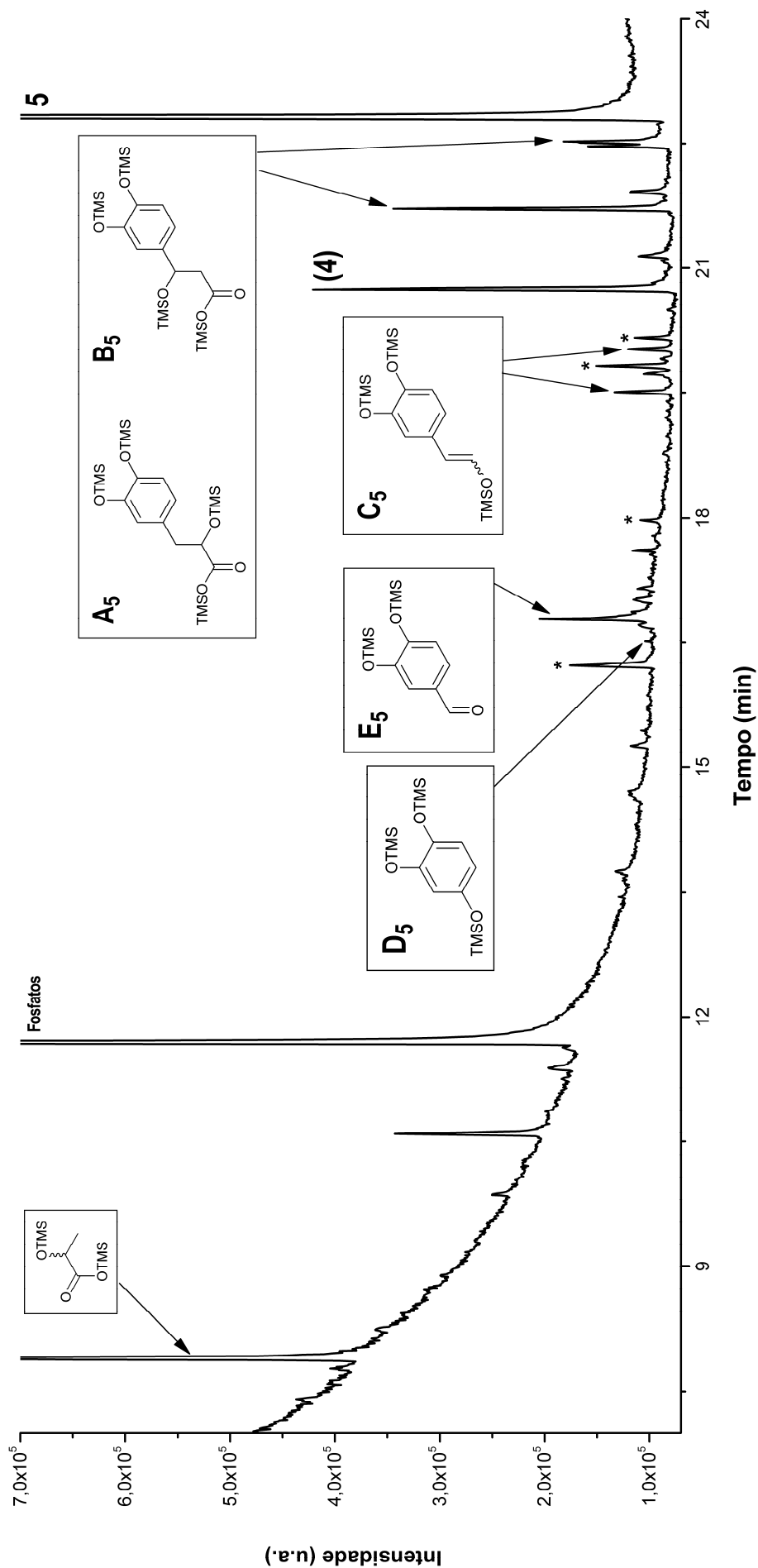
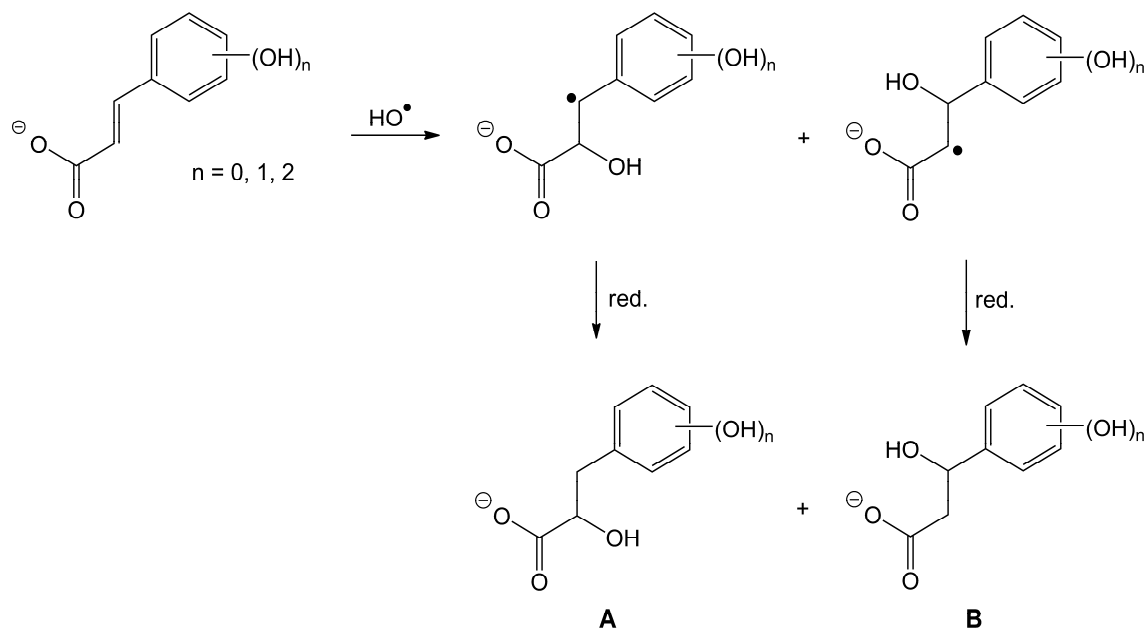


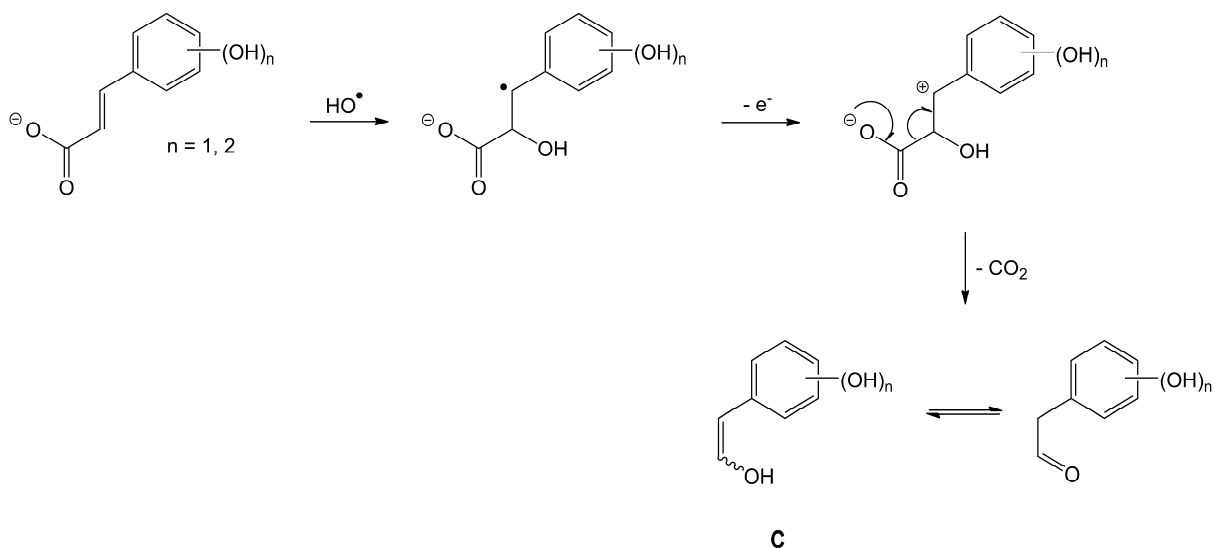
Figura 6.7 – Cromatograma G-MS (sistema Carlo Erba) de uma amostra derivatizada da mistura reacional de **5** com o radical HO[•] (gerado por radiólise). Os picos assinalados com asterisco são produtos de oxidação derivados de **4** (presente como impureza de **5**).

Para além dos três produtos de hidroxilação no anel (**2**, **3** e **4**) do ácido cinâmico (Figura 6.3), identificaram-se dois produtos principais (**A1** e **B1**) compatíveis com hidroxilação em C(2) e C(3) da cadeia lateral. Esta reacção é comum a todos os derivados do ácido cinâmico utilizados como substratos (produtos **A2** a **A5** e **B2** a **B5**, identificados nas Figuras 6.4 a 6.7, respectivamente). No Esquema 6.2 propõe-se o mecanismo de adição do radical hidroxilo à ligação dupla C=C exocíclica que conduz à formação destes produtos.



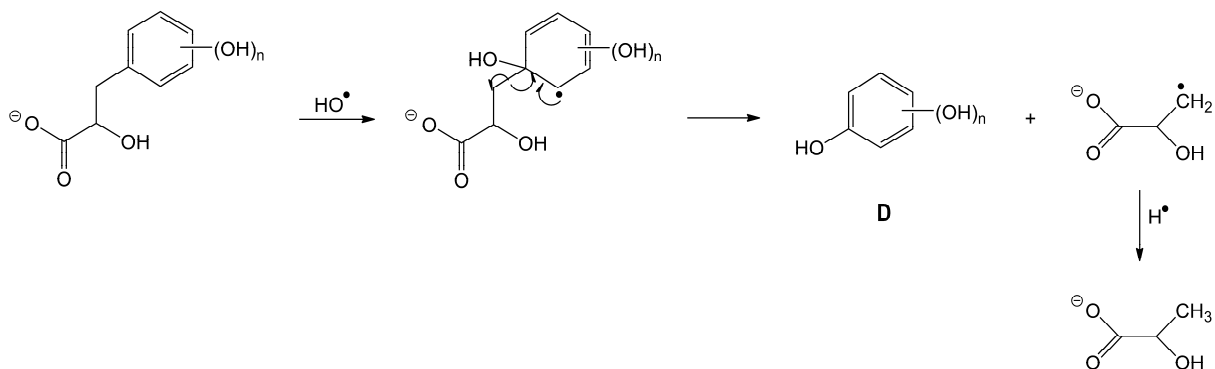
Esquema 6.2 – Mecanismo geral de hidroxilação por adição à ligação C=C exocíclica de ácidos cinâmicos com formação dos produtos **A** e **B**.

Nas soluções irradiadas dos ácidos cumáricos e cafeico identificaram-se produtos compatíveis com hidroxilação exocíclica e perda de um átomo de carbono (produtos **C2** a **C5**). No Esquema 6.3 propõe-se um mecanismo para a formação destes compostos (derivados do fenilacetaldeído, hidroxilados no anel benzénico). Estes compostos foram identificados pela forma derivatizada das respectivas formas enólicas. Embora o enol não predomine no equilíbrio tautomérico do acetaldeído, a reacção de derivatização desloca-o nesse sentido.



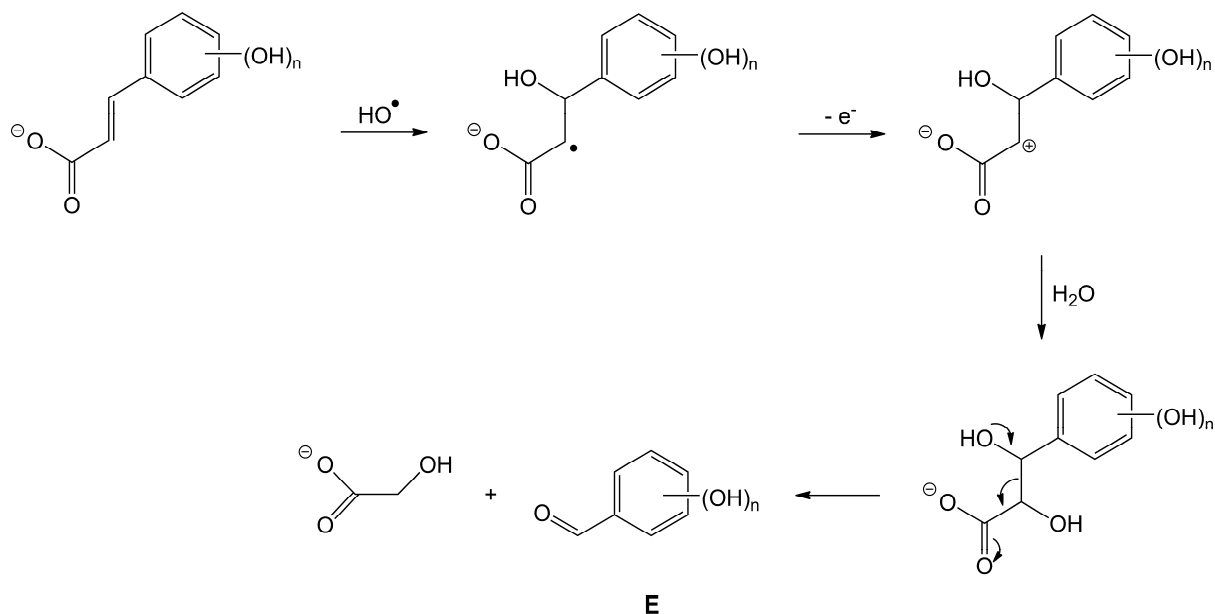
Esquema 6.3 – Mecanismo geral de hidroxilação por adição à ligação C=C exocíclica de ácidos cinâmicos seguida de descarboxilação com formação dos produtos **C**.

Nas mesmas misturas reaccionais observou-se também a formação de poli-hidroxibenzenos (compostos **D**). No Esquema 6.4 propõe-se a formação destes compostos por substituição *ipso* nos derivados do ácido 3-fenil-láctico (compostos **A2 a A5**), reacção em que se forma também ácido láctico como produto final, o que se verifica em todas as misturas reaccionais analisadas (Figuras 6.3 a 6.7). O átomo de carbono onde se dá esta substituição é mais nucleofílico no caso do ácido 3-fenil-láctico, em que a cadeia exocíclica se liga ao anel aromático através de um átomo de carbono sp^3 , do que no caso dos ácidos cinâmicos em que o átomo de carbono de ligação é sp^2 . Se uma reacção idêntica ocorresse num ácido cinâmico, formar-se-ia ácido acrílico em vez de ácido láctico, o que não se verificou experimentalmente.



Esquema 6.4 – Mecanismo geral de substituição *ipso* nos derivados hidroxilados do ácido 3-fenil-láctico com formação dos produtos **D**.

Nalguns casos (Figura 6.6 e Figura 6.7) verificou-se também a formação de hidroxibenzaldeídos (compostos **E**). No Esquema 6.5 propõe-se um mecanismo que envolve a hidroxilação em C(3) da cadeia lateral, com formação do aducto precursor do composto **B** descrito no Esquema 6.2, que em vez de sofrer redução é oxidado e hidrolisado.



Esquema 6.5 – Mecanismo geral de hidroxilação por adição à ligação C=C exocíclica de ácidos cinâmicos com formação dos produtos **E**.

6.3. Oxidação pelo radical anião sulfato

A formação de produtos com menos um átomo de carbono que o substrato inicial na oxidação dos ácidos cinâmicos pelo radical hidroxilo (formação de derivados do fenilacetaldeído, produtos **C**, Esquema 6.3) levou a admitir uma reacção de descarboxilação de um intermediário radicalar. Este tipo de mecanismo é frequente após oxidação monoelectrónica por transferência directa de electrão em diversos ácidos carboxílicos [17-20], pelo que se efectuou a oxidação do ácido cinâmico pelo radical anião sulfato gerado por via radiolítica (ver 3.4.3).

O cromatograma da Figura 6.8 mostra, de facto, a formação de fenilacetaldeído, cujo mecanismo reaccional se apresenta no Esquema 6.6.

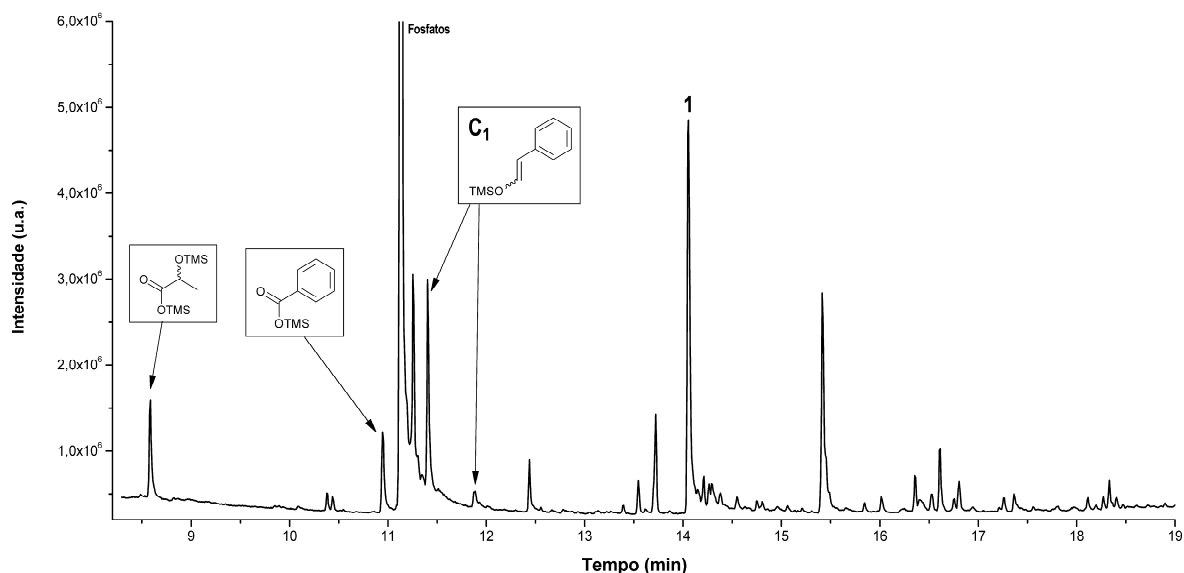
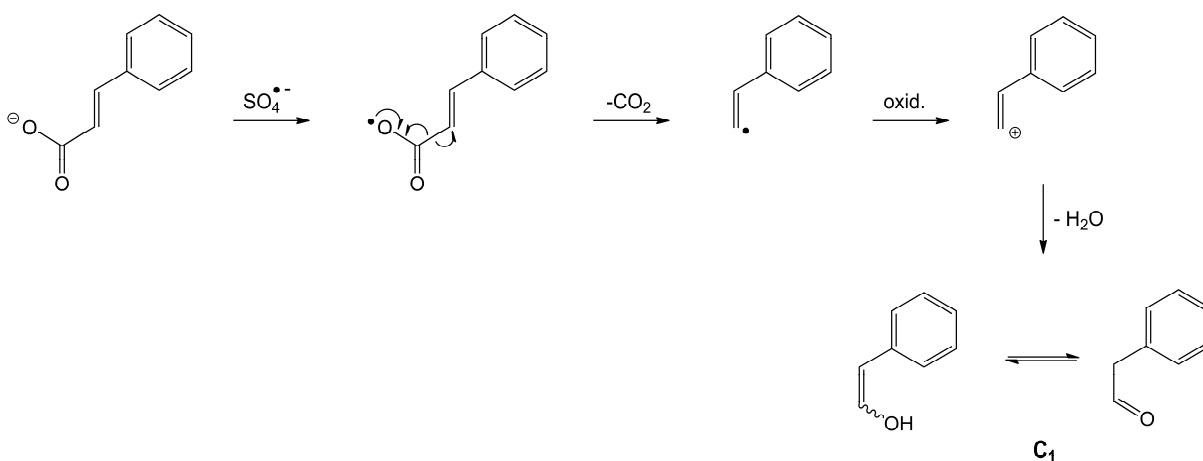


Figura 6.8 – Cromatograma GC-MS (sistema Carlo Erba) de uma amostra derivatizada da mistura reaccional de **1** com o radical anião $\text{SO}_4^{\bullet-}$ (gerado por radiólise).



Esquema 6.6 – Mecanismo de oxidação com descarboxilação do ácido cinâmico (**1**) a fenilacetaldeído (**C1**).

Na reacção de ácidos cinâmicos com o radical hidroxilo (ver 6.2) observou-se a formação de derivados de fenilacetaldeído, tendo-se proposto para tal um mecanismo de oxidação do respectivo radical precursor (Esquema 6.3). Este, por redução, dá origem ao ácido 3-fenil-láctico e seus derivados hidroxilados. Assim, é de admitir que a oxidação do ácido 3-fenil-láctico pelo radical anião sulfato, da qual resulta o mesmo radical precursor acima referido, possa conduzir à formação de fenilacetaldeído. Este resultado confirmou-se, tal como apresentado na Figura 6.9a. Neste caso, o radical anião sulfato foi gerado por via

química (sistema de Fenton com TiCl_3 em meio ácido), pelo que se apresenta também a reacção do ácido cinâmico nas mesmas condições (Figura 6.9b).

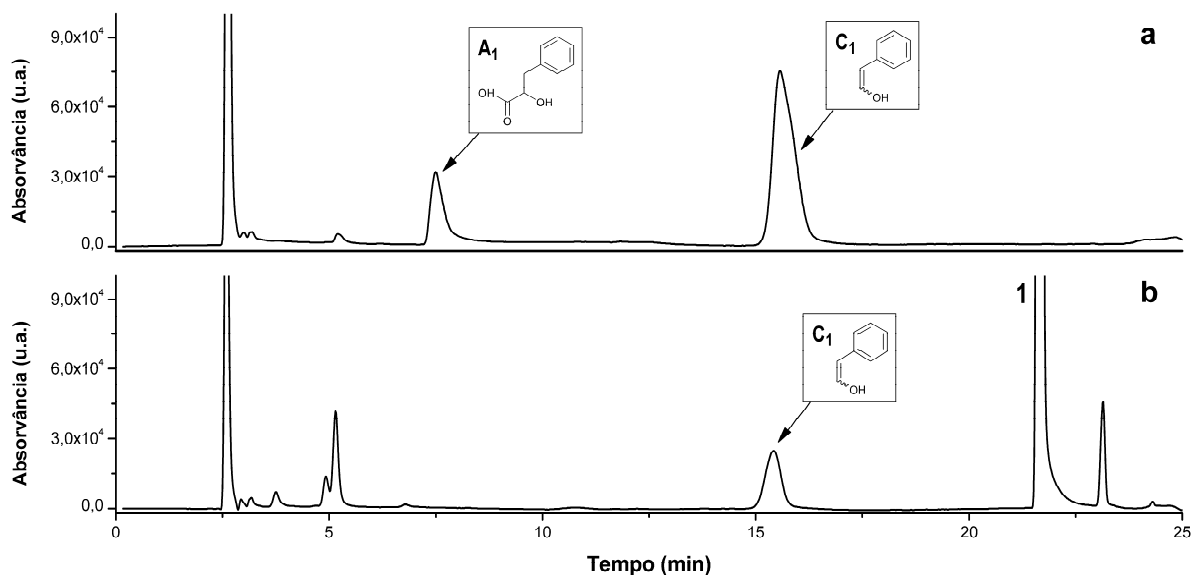
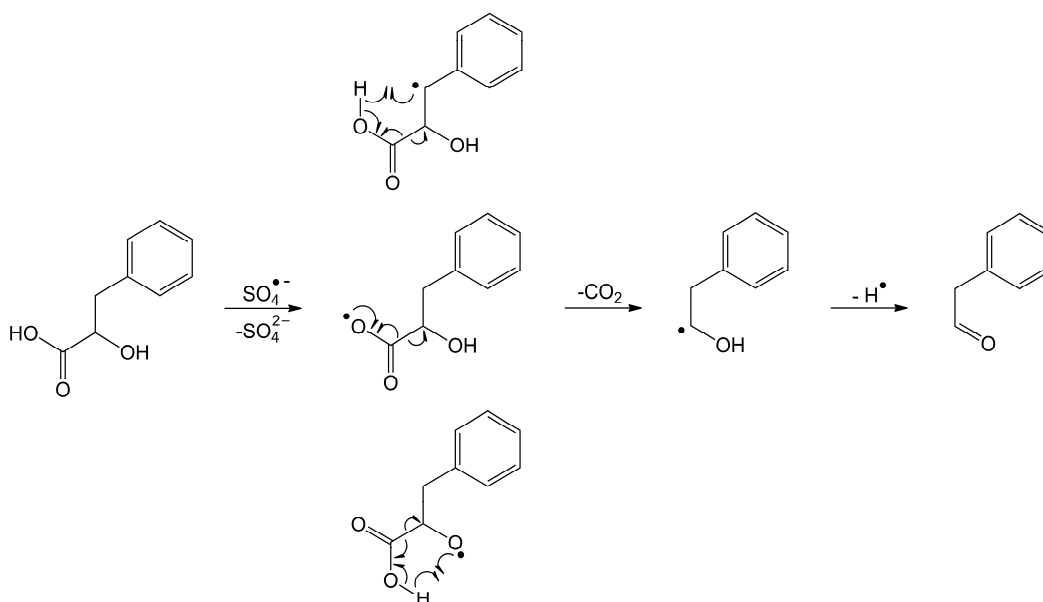


Figura 6.9 – Cromatogramas HPLC (sistema Waters) com detecção óptica das misturas reaccionais com o radical anião $\text{SO}_4^{\bullet-}$ a pH 2: (a) ácido 3-fenil-láctico 6 mM, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 60 mM, TiCl_3 5 mM, tempo de reacção 5 min, (b) ácido cinâmico 1 mM, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 40 mM, TiCl_3 0,5 mM, tempo de reacção 5 min.

No Esquema 6.7 apresenta-se o mecanismo da descarboxilação oxidativa do ácido 3-fenil-láctico a fenilacetaldeído pelo radical anião sulfato em meio ácido. A abstracção de hidrogénio pode dar-se a partir de C(3)-H, C(2)-OH ou do grupo carboxilo.



Esquema 6.7 – Mecanismo de oxidação com descarboxilação do ácido 3-fenil-láctico a fenilacetaldeído pelo radical anião sulfato em meio ácido.

Do mesmo modo, é de esperar que o ácido 3-fenil-láctico (ele próprio um produto de reacção do ácido cinâmico com o radical hidroxilo) origine fenilacetaldeído por oxidação com o radical hidroxilo. Os resultados apresentados na Figura 6.10 comprovam que, para além de produtos de hidroxilação no anel (identificados no caso do ácido cinâmico), se forma fenilacetaldeído por reacção do radical hidroxilo tanto com o ácido cinâmico (Figura 6.10b), como com o ácido 3-fenil-láctico (Figura 6.10a).

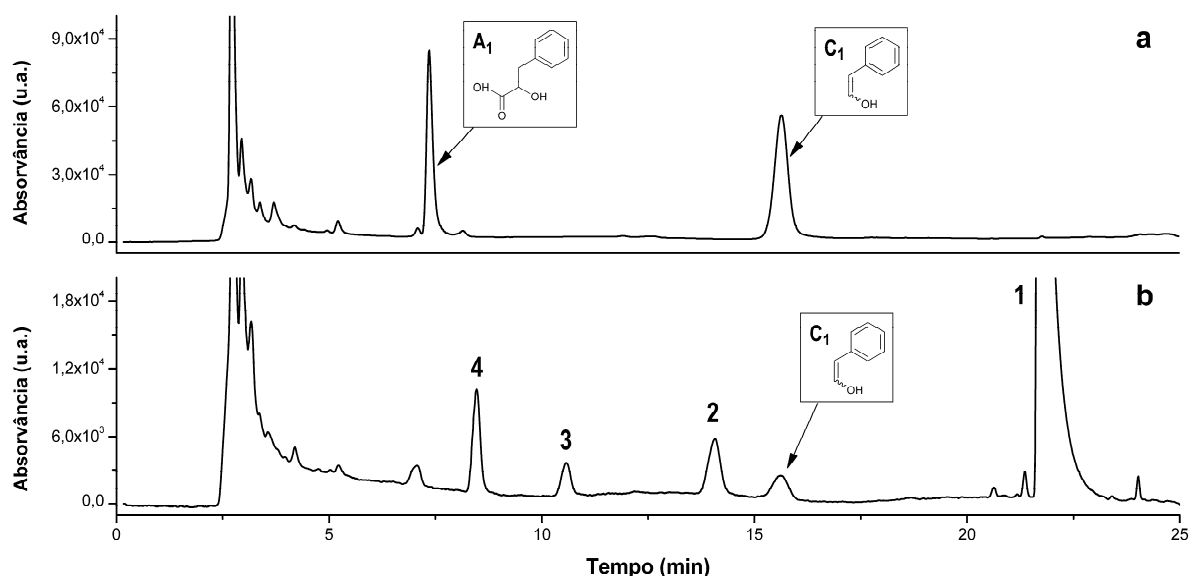
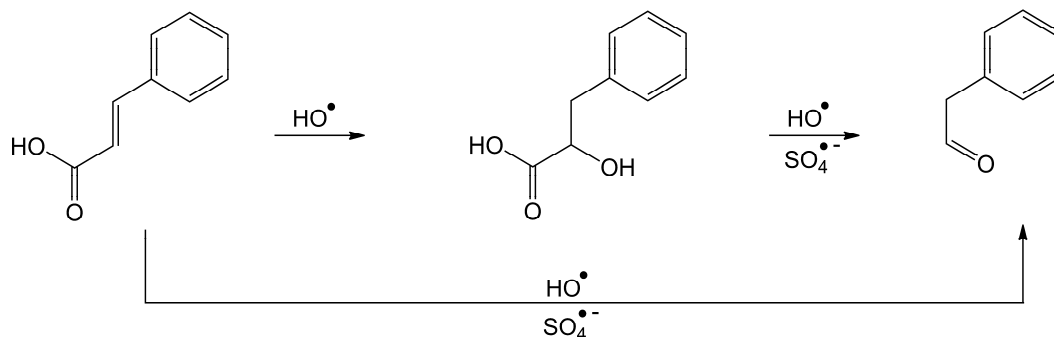


Figura 6.10 – Cromatogramas HPLC (sistema Waters) com detecção óptica das misturas reaccionais com o radical HO^\bullet a pH 2: (a) ácido 3-fenil-láctico 6 mM, H_2O_2 40 mM, FeSO_4 1 mM, tempo de reacção 5 min, (b) ácido cinâmico 1 mM, H_2O_2 20 mM, FeSO_4 1 mM, tempo de reacção 5 min.

O mecanismo de formação de fenilacetaldeído por reacção do ácido 3-fenil-láctico com o radical hidroxilo é idêntico ao apresentado para a reacção com o radical anião $\text{SO}_4^{\bullet-}$ apresentado no Esquema 6.7. Neste caso, e ao contrário dos mecanismos propostos anteriormente (ver 6.2), o radical HO^\bullet reage com o substrato por abstracção de hidrogénio. Além deste mecanismo, haverá igualmente adição do radical HO^\bullet ao anel benzénico do ácido 3-fenil-láctico com formação dos respectivos produtos de hidroxilação, que corresponderão a picos de muito baixo tempo de retenção no cromatograma da Figura 6.10a.

A formação de ácido 3-fenil-láctico a partir do ácido cinâmico observa-se apenas por reacção com o radical hidroxilo gerado por via radiolítica. Em todos os outros sistemas, reacção de Fenton ou geração radiolítica de radical anião sulfato, o meio é demasiado oxidante para permitir a redução do aducto em C(2) precursor do ácido 3-fenil-láctico.

Em conclusão, o fenilacetaldeído é um produto comum de oxidação tanto do ácido cinâmico como do ácido 3-fenil-láctico, quer pelo radical hidroxilo quer pelo radical anião sulfato (Esquema 6.8).



Esquema 6.8 – Formação de fenilacetaldeído.

Os espectros de massa dos principais produtos de oxidação dos ácidos cinâmicos encontram-se no Apêndice C.

6.4. Efeito protector sobre a degradação oxidativa da adenina

Uma vez que o ácido cinâmico e seus derivados, e em particular o ácido cafeico, são conhecidos pela suas propriedades antioxidantes, testou-se o seu efeito sobre a protecção da adenina contra o *stress* oxidativo, utilizando como modelo a reacção desta com o radical hidroxilo, cujos mecanismos se encontram bem documentados na literatura [21-24].

Na Figura 6.11 mostra-se a degradação da adenina e dos antioxidantes **1**, **4** e **5** por reacção com o radical hidroxilo produzido pelo sistema de Fenton a pH 7. Para tempos de reacção curtos, verifica-se que os quatro substratos se degradam a velocidades semelhantes, o que é compatível com as respectivas constantes de velocidade da mesma ordem de grandeza obtidas por radiólise pulsada apresentadas na Tabela 6.1.

Os resultados apresentados na Figura 6.11 mostram que ao fim de 20 min de reacção a adenina se consumiu em cerca de 90%. Afim de avaliar o eventual efeito protector dos ácidos cinâmicos sobre a degradação da adenina pelo radical hidroxilo, submeteram-se à reacção de Fenton misturas binárias equimolares de adenina e de cada um dos três antioxidantes e seguiu-se a evolução da concentração de cada um dos componentes das misturas ao longo do tempo. A Figura 6.12 mostra os resultados obtidos.

Tabela 6.1 – Constantes de velocidade de reacção de ácidos cinâmicos e da adenina com o radical HO[•] a pH 7.

Substrato	k (M ⁻¹ s ⁻¹)	
Adenina	4,3 x 10 ⁹	[25]
Ácido cinâmico	8,1 x 10 ⁹	[26, 27]
Ácido <i>p</i> -cumárico	8,2 x 10 ⁹	[28]
Ácido cafeico	3,24 x 10 ⁹	[29]
	5,5 x 10 ⁹	[30]
	7,4 x 10 ⁹	[31]

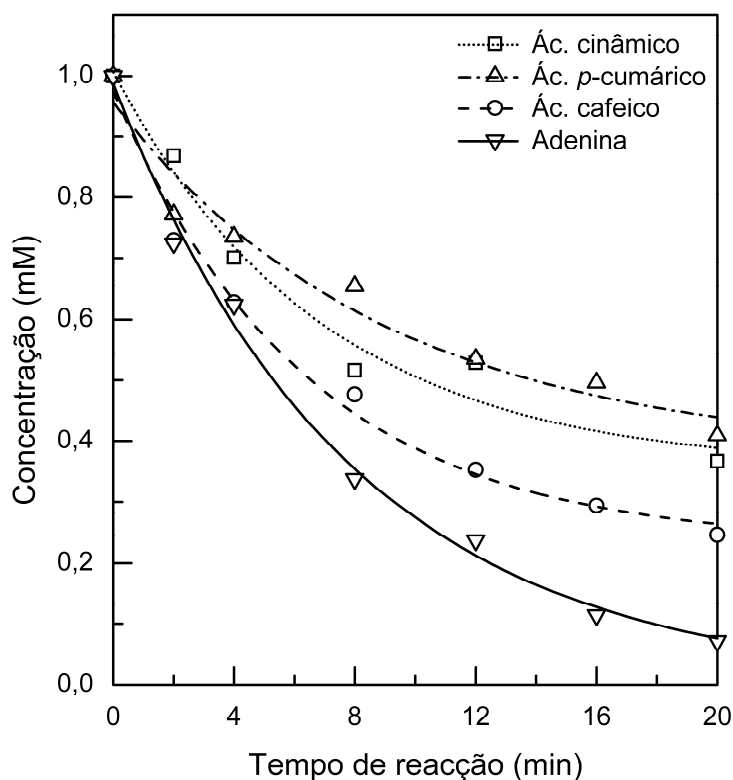


Figura 6.11 – Dependência da concentração da adenina e de três ácidos cinâmicos em função do tempo de reacção com o radical HO[•], seguida por HPLC (sistema Waters). Condições reaccionais: substrato 1 mM, H₂O₂ 200 mM, Fe^{II}EDTA 1 mM, ácido ascórbico 0,2 mM e tampão de fosfatos 5 mM (pH 7).

Em qualquer das misturas verifica-se uma forte protecção da adenina por qualquer dos antioxidantes. Enquanto que na ausência de antioxidante a adenina se degrada ao fim de 20 min de reacção em cerca de 90%, na presença do antioxidante o consumo de adenina inicial é da ordem de 10 a 15%.

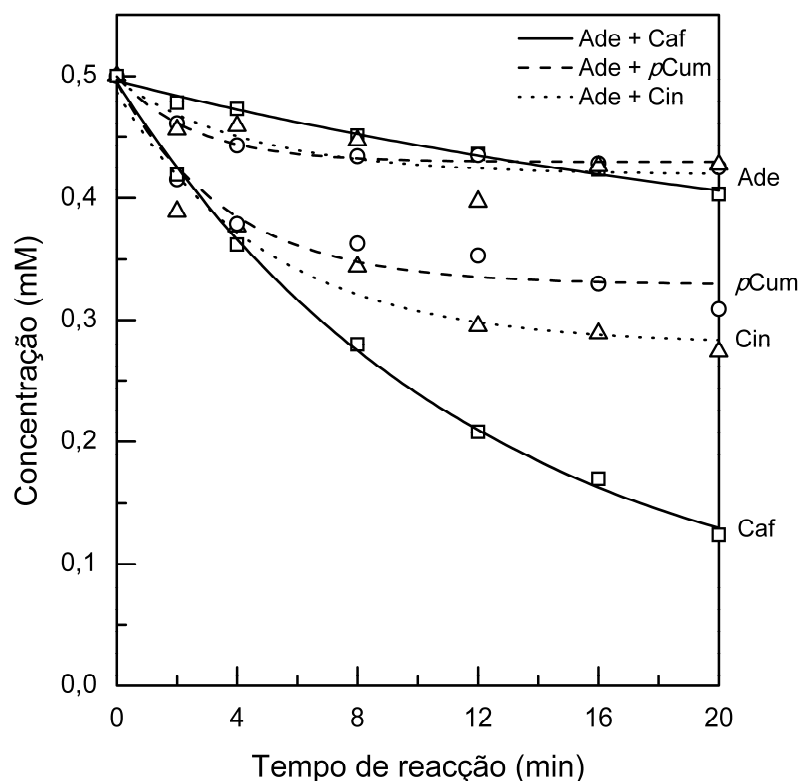


Figura 6.12 – Efeito reparador dos ácidos cinâmico (Cin), *p*-cumárico (*p*Cum) e cafeico (Caf) sobre a degradação oxidativa da adenina (Ade) pelo radical HO[•], seguido por HPLC (sistema Waters). Condições reaccionais: Ade e antioxidante 0,5 mM cada, H₂O₂ 100 mM, Fe^{II}EDTA 0,5 mM, ácido ascórbico 0,1 mM e tampão de fosfatos 5 mM (pH 7).

Considerando que as constantes de velocidade de qualquer destes compostos com o radical hidroxilo são semelhantes, seria de esperar que, admitindo uma mera competição cinética, a degradação da adenina fosse cerca de metade da que ocorre na ausência de antioxidante. O resultado obtido mostra que, para além de um efeito de captura do radical hidroxilo, os antioxidantes têm ainda um efeito reparador sobre a(s) espécie(s) resultante(s) da oxidação, conduzindo à adenina inicial. Uma possibilidade é a reparação por redução monoelectrónica dos radicais oxidantes resultantes da adição do radical hidroxilo à adenina seguida de desidratação [21]. Este tipo de efeito duplo foi também referido para a protecção pelo ácido cafeico da degradação da adenosina pelo radical anião sulfato [32].

Pelo contrário, a degradação dos antioxidantes nas misturas binárias é superior a metade da que ocorre na ausência da adenina, o que reforça a observação anterior. Este maior consumo de antioxidantes deve-se ao facto de, para além da reacção directa com o radical hidroxilo, parte do antioxidante ter sido consumido também na reparação dos radicais oxidantes da adenina.

Como é conhecido da literatura [11, 33-38], o ácido cafeico tem uma capacidade antioxidante superior aos ácidos cinâmico e cumáricos. Este resultado observa-se igualmente na Figura 6.12 para tempos de reacção muito curtos, onde a quantidade de adenina reparada é superior na presença de ácido cafeico.

No entanto, e ao fim de 20 min de reacção, a quantidade de adenina restante em qualquer das misturas é aproximadamente a mesma. Esta observação sugere a existência de uma capacidade antioxidante adicional para os casos dos compostos **1** e **4**. De facto, e como se verificou e discutiu atrás (ver 6.2), da reacção directa destes com o radical hidroxilo formam-se produtos de hidroxilação no anel benzénico, que possuem maior poder antioxidante. Deste modo, a formação desses produtos justifica por um lado o acréscimo da quantidade de adenina reparada que seria de esperar, assim como um menor consumo destes antioxidantes quando comparado com o consumo de **5**.

6.5. Conclusões

Na reacção de oxidação dos ácidos cinâmicos com o radical hidroxilo observa-se a formação de novos produtos, para além de produtos de hidroxilação no anel benzénico já referidos na literatura [27, 39]. De entre esses novos produtos, destacam-se os que resultam da hidroxilação da cadeia exocíclica em C(2) e C(3), os ácidos 3-fenil-lácticos e 3-fenil-3-hidroxipropiónicos respectivamente. Além destes, identifica-se um outro tipo de produtos, os fenilacetaldeídos, que resultam da adição do radical hidroxilo em C(2) seguida de descarboxilação. No caso do ácido cinâmico, o fenilacetaldeído forma-se também após oxidação por transferência de electrão com o radical anião sulfato.

Os resultados obtidos mostram que, para além dos novos produtos caracterizados, existem outros produtos ainda por identificar, o que justifica o interesse em continuar a estudar estes sistemas com vista a uma melhor caracterização dos mecanismos da sua actuação como antioxidantes, tanto mais que eles se revelaram eficazes na protecção de alvos biológicos (por exemplo a adenina) contra o *stress* oxidativo. Em particular, será interessante estudar o efeito da composição do meio reaccional no rendimento dos produtos formados, a utilização de derivados substituídos em posições estratégicas e o estabelecimento de condições experimentais que permitam a detecção de radicais transientes por espectroscopia de RPE.

Bibliografia

1. Rice-Evans C.A., "Screening of phenolics and flavonoids for antioxidant activity", in *Antioxidants food supplements in human health*, Packer L.H.M., Yoshikawa T, Editor. London: Academic Press. 1999. p. 239-253.
2. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G., "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids". *Free Radical Biology and Medicine*, 1996, **20**(7): 933-956.
3. Chen J.H., Ho C.T., "Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, **45**(7): 2374-2378.
4. Brandwilliams W., Cuvelier M.E., Berset C., "Use of a Free-Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity". *Food Science and Technology-Lebensmittel - Wissenschaft & Technologie*, 1995, **28**(1): 25-30.
5. Kancheva V.D., "Phenolic antioxidants - radical-scavenging and chain-breaking activity: A comparative study". *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2009, **111**(11): 1072-1089.
6. Cuvelier M.E., Richard H., Berset C., "Comparison of the Antioxidative Activity of Some Acid-Phenols - Structure Activity Relationship". *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1992, **56**(2): 324-325.
7. vonGadow A., Joubert E., Hansmann C.F., "Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -Tocopherol, BHT, and BHA". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, **45**(3): 632-638.
8. Moon J.H., Terao J., "Antioxidant activity of caffeic acid and dihydrocaffeic acid in lard and human low-density lipoprotein". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, **46**(12): 5062-5065.
9. Silva F.A.M., Borges F., Guimarães C., Lima J., Matos C., Reis S., "Phenolic acids and derivatives: Studies on the relationship among structure, radical scavenging activity, and physicochemical parameters". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, **48**(6): 2122-2126.
10. Nenadis N., Boyle S., Bakalbassis E.G., Tsimidou M., "An experimental approach to structure-activity relationships of caffeic and dihydrocaffeic acids-and related monophenols". *Journal of the American Oil Chemists Society*, 2003, **80**(5): 451-458.
11. Kikuzaki H., Hisamoto M., Hirose K., Akiyama K., Taniguchi H., "Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, **50**(7): 2161-2168.
12. Foti M.C., Daquino C., Geraci C., "Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH[•] radical in alcoholic solutions". *Journal of Organic Chemistry*, 2004, **69**(7): 2309-2314.
13. Aaby K., Hvattum E., Skrede G., "Analysis of flavonoids and other phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection: Relationship to antioxidant activity". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, **52**(15): 4595-4603.
14. Scherer R., Godoy H.T., "Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method". *Food Chemistry*, 2009, **112**(3): 654-658.
15. Baderschneider B., Winterhalter P., "Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from Riesling wine and screening for antioxidant activity". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, **49**(6): 2788-2798.
16. IUPAC, *Ionization Constants of Organic Acids in Aqueous Solutions*. Oxford: Pergamon Press. 1979.
17. Zemel H., Fessenden R.W., "Mechanism of Reaction of $\text{SO}_4^{\bullet-}$ with Some Derivatives of Benzoic Acid". *Journal of Physical Chemistry*, 1978, **82**(25): 2670-2676.

18. Hori H., Yamamoto A., Koike K., Kutsuna S., Osaka I., Arakawa R., "Persulfate-induced photochemical decomposition of a fluorotelomer unsaturated carboxylic acid in water". *Water Research*, 2007, **41**(13): 2962-2968.
19. Criquet J., Leitner N.K.V., "Degradation of acetic acid with sulfate radical generated by persulfate ions photolysis". *Chemosphere*, 2009, **77**(2): 194-200.
20. Hori H., Yamamoto A., Hayakawa E., Taniyasu S., Yamashita N., Kutsuna S., "Efficient decomposition of environmentally persistent perfluorocarboxylic acids by use of persulfate as a photochemical oxidant". *Environmental Science & Technology*, 2005, **39**(7): 2383-2388.
21. Vieira A.J.S.C., Steenken S., "Pattern of OH Radical Reaction with Adenine and Its Nucleosides and Nucleotides - Characterization of 2 Types of Isomeric OH Adduct and Their Unimolecular Transformation Reactions". *Journal of the American Chemical Society*, 1990, **112**(19): 6986-6994.
22. Dias R.M.B., Vieira A.J.S.C., "Structure and redox properties of one-electron oxidized radicals from adenine and derivatives". *Redox Report*, 1996, **2**(4): 279-283.
23. Dias R.M.B., Vieira A.J.S.C., "Effect of oxygen on the hydroxylation of adenine by photolytically generated hydroxyl radical". *Journal of Photochemistry and Photobiology A - Chemistry*, 1997, **109**(2): 133-136.
24. Dias R.M.B., Vieira A.J.S.C., "Substituent effect on superoxide elimination from peroxy radicals of adenine and methylated derivatives". *Journal of Photochemistry and Photobiology A - Chemistry*, 1998, **117**(3): 217-222.
25. Vieira A.J.S.C., Steenken S., "Pattern of OH Radical Reaction with N^6, N^6 -Dimethyladenosine - Production of 3 Isomeric OH Adducts and Their Dehydration and Ring-Opening Reactions". *Journal of the American Chemical Society*, 1987, **109**(24): 7441-7448.
26. Yadav P., Mohan H., Maity D.K., Suresh C.H., Rao B.S.M., "Oxidation of cinnamic acid derivatives: A pulse radiolysis and theoretical study". *Chemical Physics*, 2008, **351**(1-3): 57-64.
27. Bobrowski K., Raghavan N.V., "Pulse Radiolytic and Product Analysis Studies of the Reaction of Hydroxyl Radicals with Cinnamic Acid - the Relative Extent of Addition to the Ring and Side-Chain". *Journal of Physical Chemistry*, 1982, **86**(22): 4432-4435.
28. Bobrowski K., "Pulse-Radiolysis of Para-Hydroxycinnamic Acid in Aqueous-Solution". *Journal of the Chemical Society - Faraday Transactions I*, 1984, **80**: 1377-1389.
29. Kono Y., Kobayashi K., Tagawa S., Adachi K., Ueda A., Sawa Y., Shibata H., "Antioxidant activity of polyphenolics in diets - Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen". *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1997, **1335**(3): 335-342.
30. Li X.F., Cai Z.L., Katsumura Y., Wu G.Z., Muroya Y., "Reactions of reducing and oxidizing radicals with caffeic acid: a pulse radiolysis and theoretical study". *Radiation Physics and Chemistry*, 2001, **60**(4-5): 345-350.
31. Bors W., Michel C., Stettmaier K., Lu Y.R., Foo L.Y., "Pulse radiolysis, electron paramagnetic resonance spectroscopy and theoretical calculations of caffeic acid oligomer radicals". *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 2003, **1620**(1-3): 97-107.
32. Swaraga M.S., Charitha L., Adinarayana M., "Mechanism of protection of adenosine from sulphate radical anion and repair of adenosine radicals by caffeic acid in aqueous solution". *Journal of Chemical Sciences*, 2005, **117**(4): 345-350.
33. Cheng Z.Y., Ren J., Li Y.Z., Chang W.B., Chen Z.D., "Study on the multiple mechanisms underlying the reaction between hydroxyl radical and phenolic compounds by qualitative structure and activity relationship". *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2002, **10**(12): 4067-4073.

34. Cheng Z.Y., Li Y.Z., "Reducing power: the measure of antioxidant activities of reductant compounds?". *Redox Report*, 2004, **9**(4): 213-217.
35. Hotta H., Nagano S., Ueda M., Tsujino Y., Koyama J., Osakai T., "Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation ". *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 2002, **1572**(1): 23-32.
36. Jiang Y., Lin W.Z., Yao S.D., Lin N.Y., Zhu D.Y., "Pulse radiolytic study of electron transfer reaction for fast repair of the one-electron oxidized radicals of dAMP and dGMP by hydroxycinnamic acid derivatives". *Radiation Physics and Chemistry*, 1999, **54**(4): 349-353.
37. Jiang Y., Lin W.Z., Yao S.D., Lin N.Y., Zhu D.Y., "Fast repair of oxidizing OH adducts of DNA by hydroxycinnamic acid derivatives. A pulse radiolytic study". *Radiation Physics and Chemistry*, 1999, **54**(4): 355-359.
38. Pino E., Campos A.M., Lopez-Alarcon C., Aspee A., Lissi E., "Free radical scavenging capacity of hydroxycinnamic acids and related compounds". *Journal of Physical Organic Chemistry*, 2006, **19**(11): 759-764.
39. Breitfellner F., Solar S., Sontag G., "Effect of γ -irradiation on phenolic acids in strawberries". *Journal of Food Science*, 2002, **67**(2): 517-521.

Apêndices

Apêndice A

Caracterização da 4-(*N*-metil)-aminoantipirina

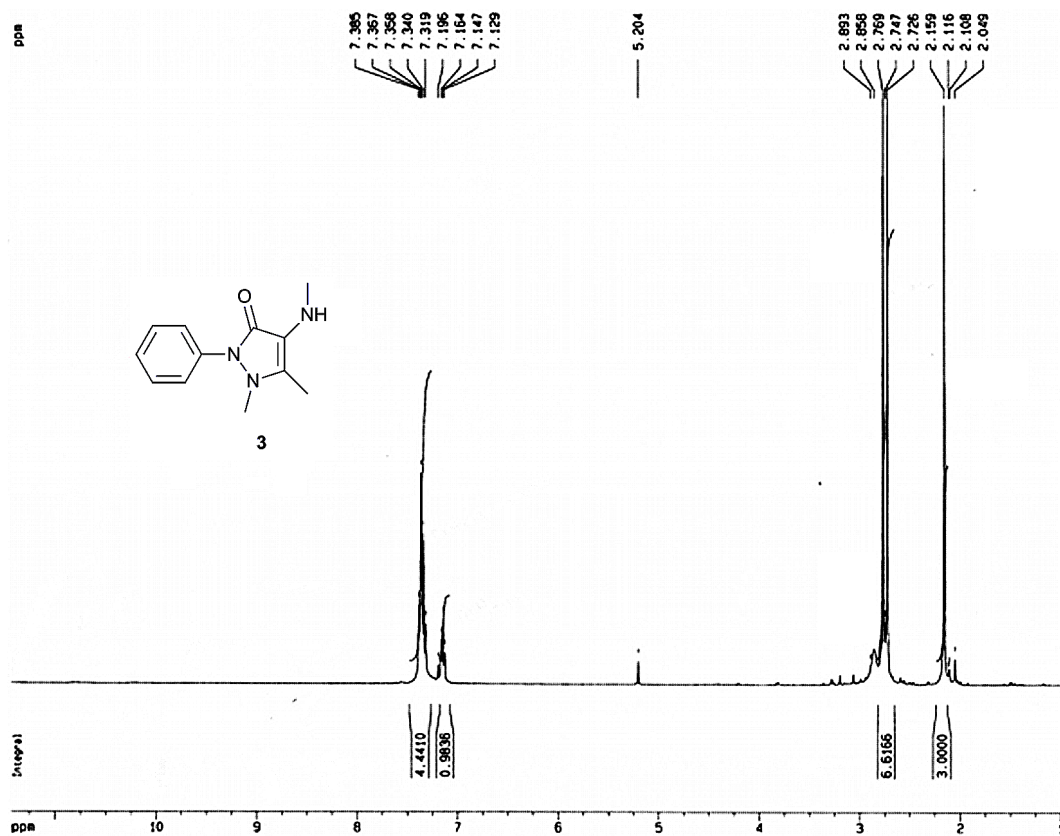


Figura A1 – Espectro ^1H NMR da 4-(*N*-metil)-aminoantipirina (composto **3**) em CDCl_3 .

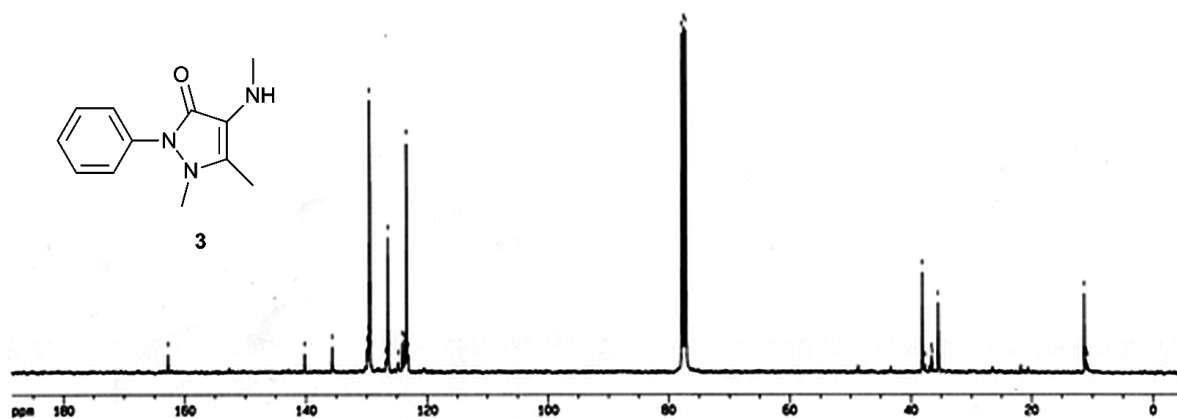


Figura A2 – Espectro ^{13}C NMR da 4-(*N*-metil)-aminoantipirina (composto **3**) em CDCl_3 .

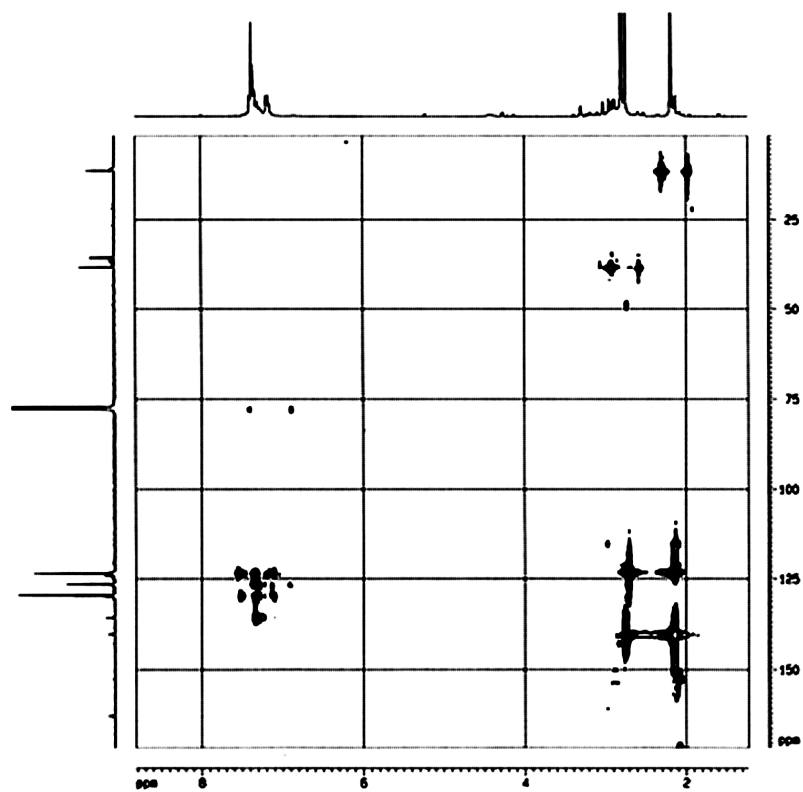


Figura A3 – Espectro HMBC da 4-(*N*-metil)-aminoantipirina (composto **3**) em CDCl₃.

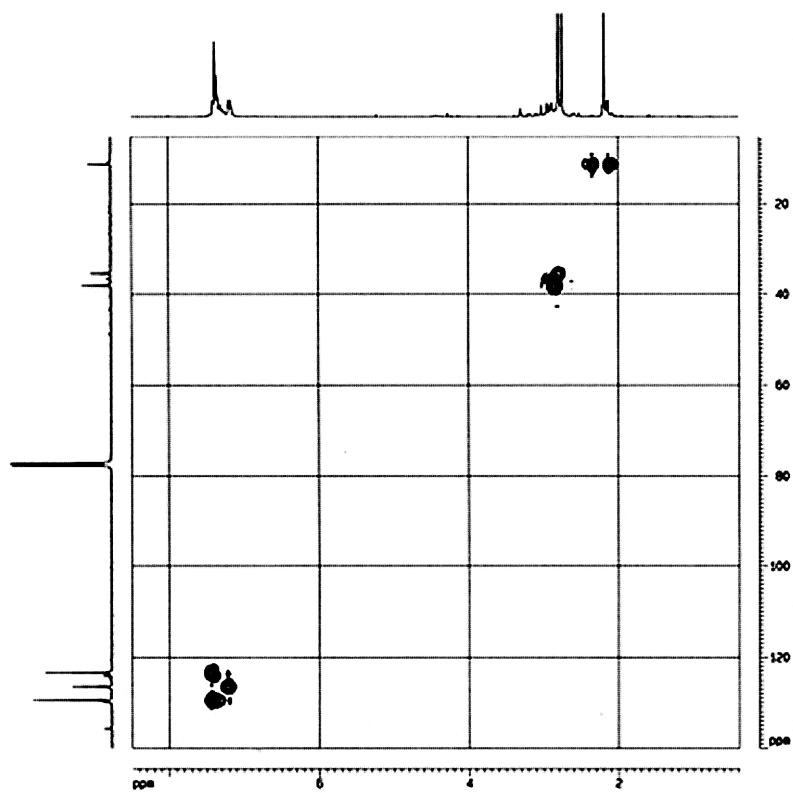


Figura A4 – Espectro HMQC da 4-(*N*-metil)-aminoantipirina (composto **3**) em CDCl₃.

Antipyrine(MSTFA) 200:3-3-250 110He split
ANTPYSIS 382 (8,184) Cm (372:397-(361:368+407:418))

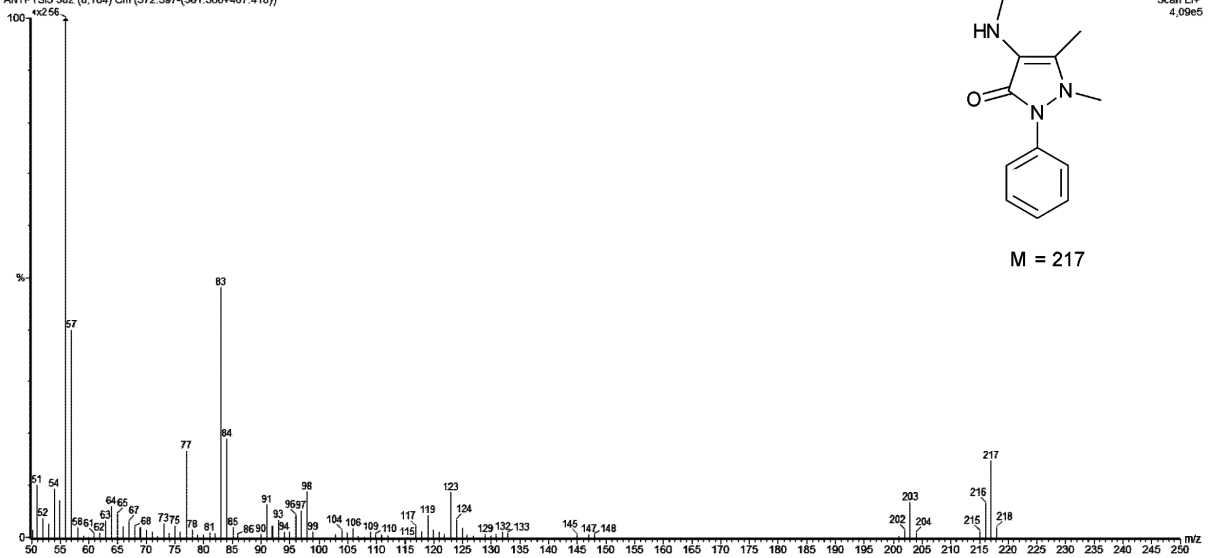


Figura A5 – Espectro de massa da 4-(*N*-metil)-aminoantipirina (composto **3**) obtido por GC-MS (EI).

Apêndice B

Espectros de massa dos produtos de hidroxilação no anel da 4-(*N,N*-dimetil)-aminoantipirina

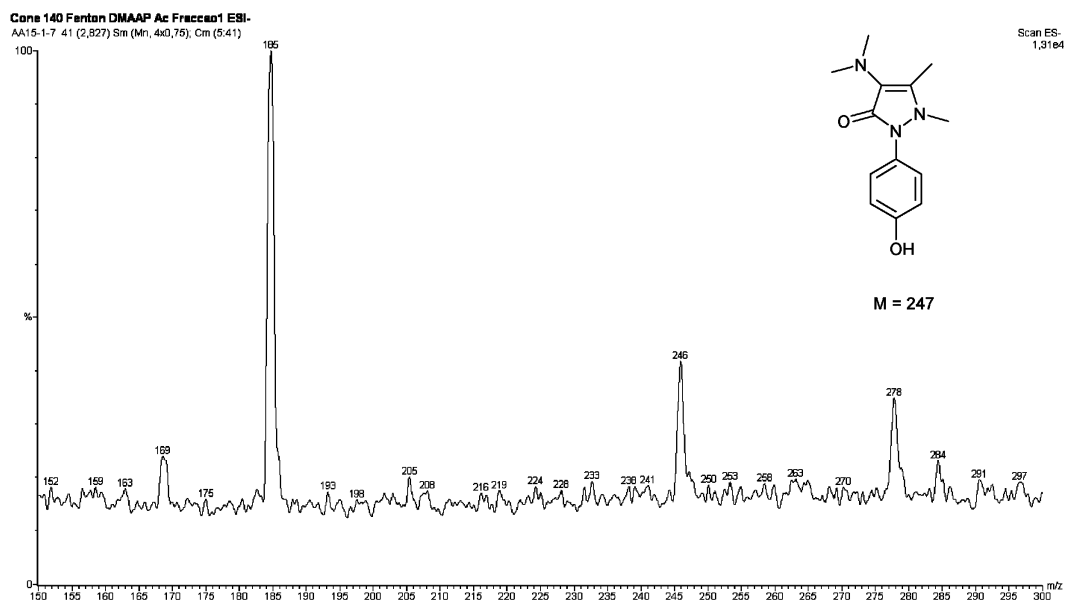


Figura B1 – Espectro de massa da *p*-hidroxi-4-(*N,N*-dimetil)-aminoantipirina (produto **A**) obtido por injeção directa (ESI).

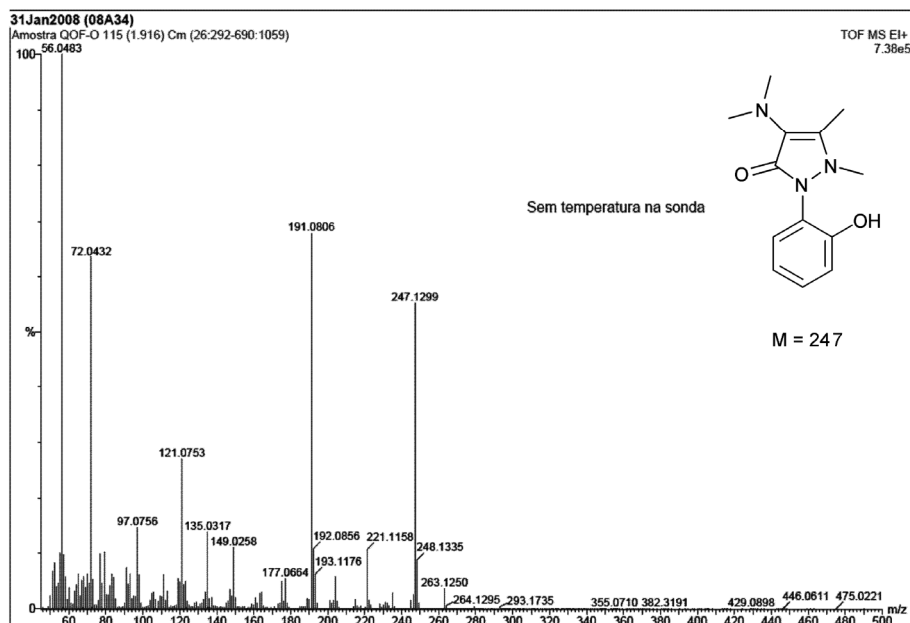


Figura B2 – Espectro de massa da *o*-hidroxi-4-(*N,N*-dimetil)-aminoantipirina (produto **B**) obtido por TOF-MS (EI).

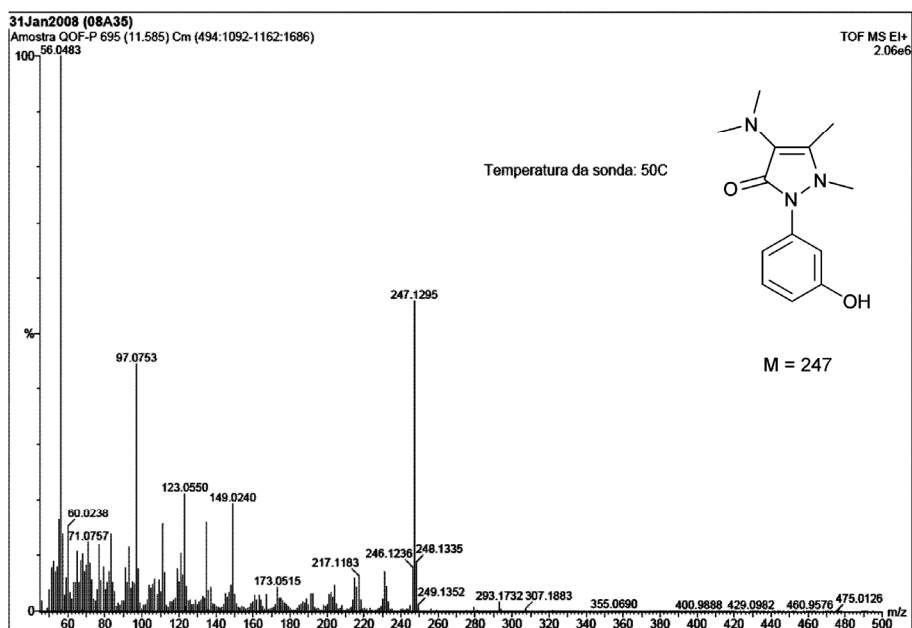


Figura B3 – Espectro de massa da *m*-hidroxi-4-(*N,N*-dimetil)-aminoantipirina (produto C) obtido por TOF-MS (EI).

Apêndice C

Espectros de massa dos principais produtos de oxidação de ácidos cinâmicos por via radiolítica

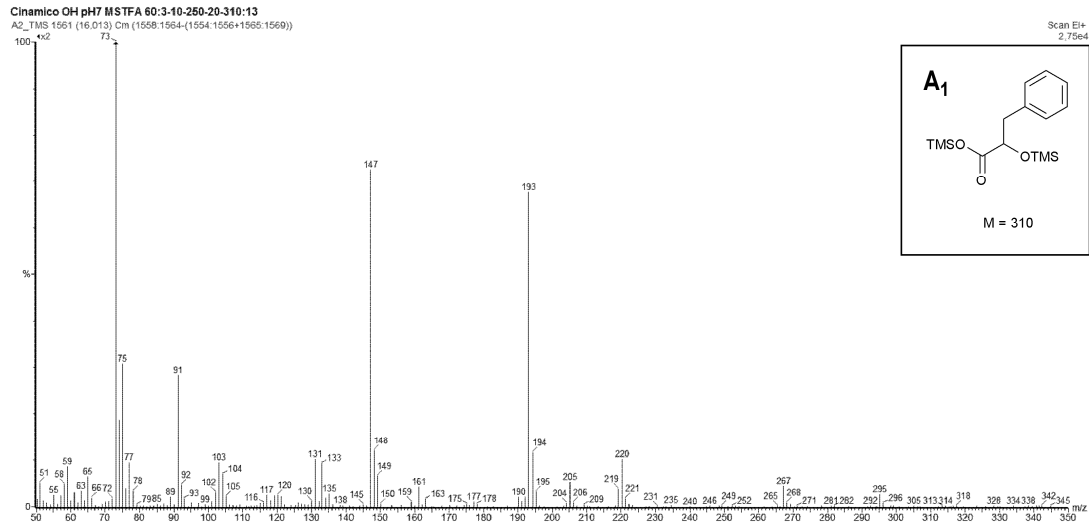


Figura C1 – Espectro de massa do produto **A1** (EI).

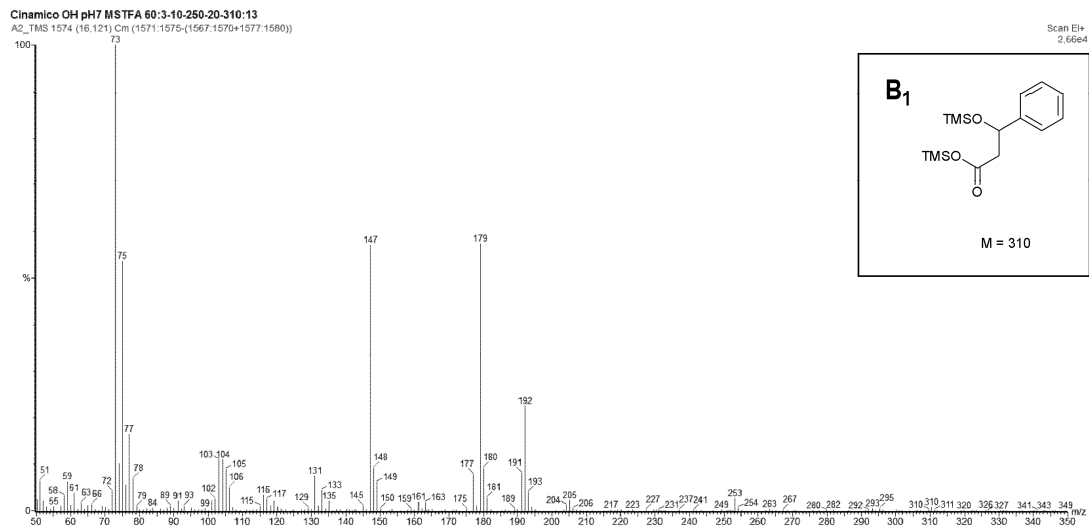


Figura C2 – Espectro de massa do produto **B1** (EI).

Cinamico SO4 pH7 MSTFA 40:3-15-250-20-310:10

A4_TMSa 688 (11.404) Cm (887.891-883.896+891.897)

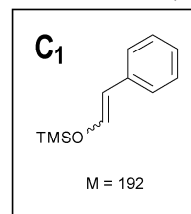
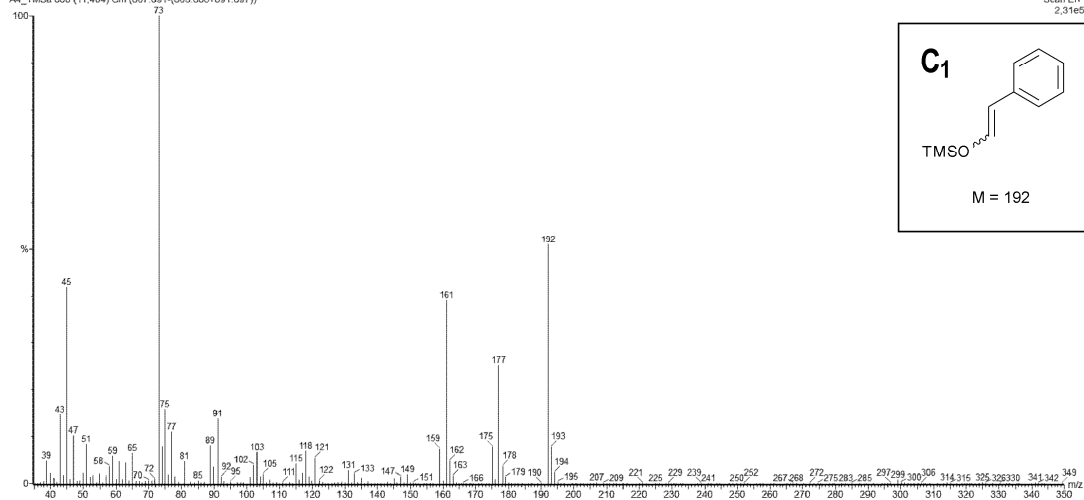


Figura C3 – Espectro de massa do produto **C1** (EI).

Cinamico OH pH7 MSTFA 60:3-10-250-20-310:13

A2_TMS 1908 (16.936) Cm (1907.1911-1905.1905+1913.1916)

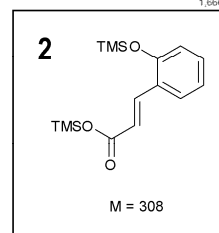
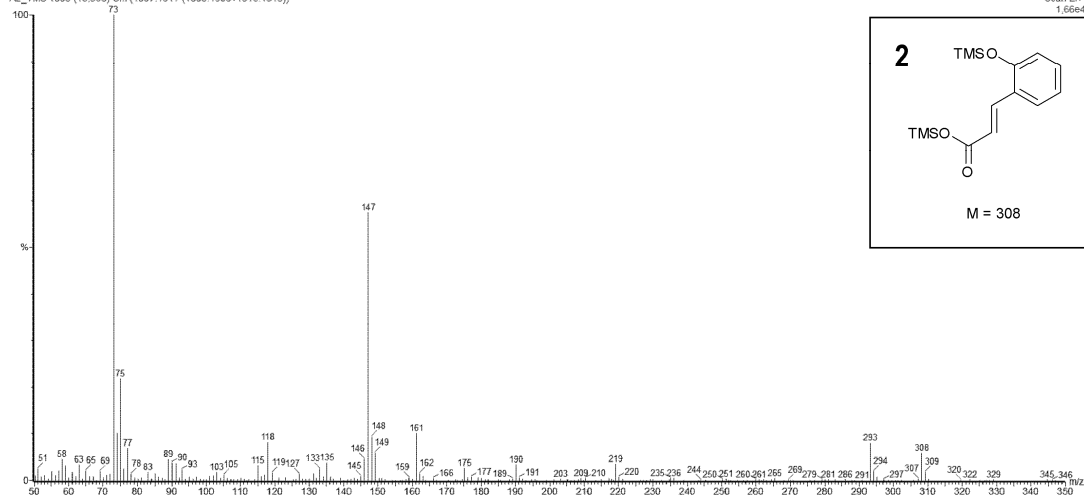


Figura C4 – Espectro de massa do produto **2** (EI).

Cinamico OH pH7 MSTFA 60:3-10-250-20-310:13

A2_TMS 2006 (19.723) Cm (2002.2008-1996.1999+2011.2015)

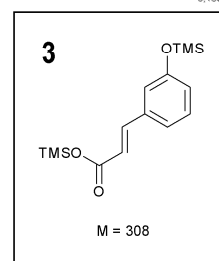
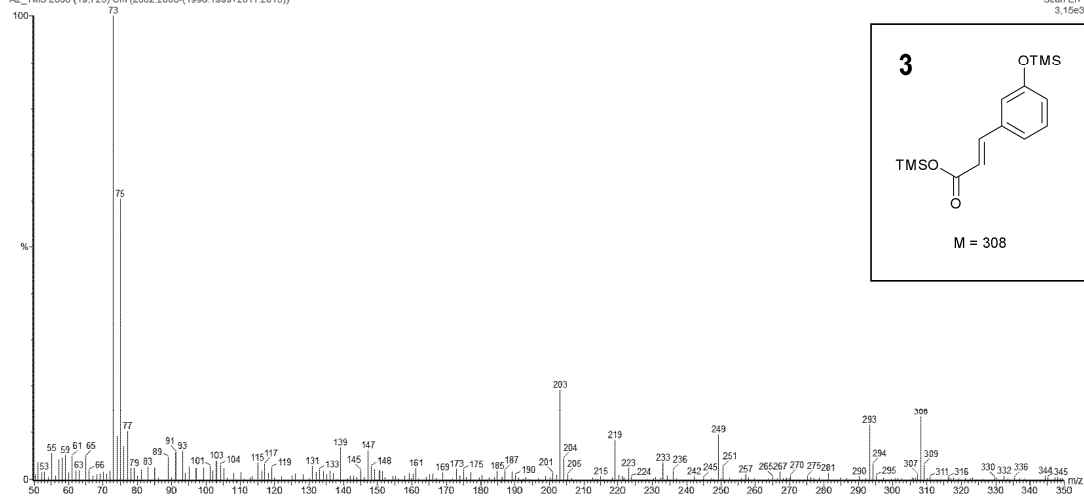


Figura C5 – Espectro de massa do produto **3** (EI).

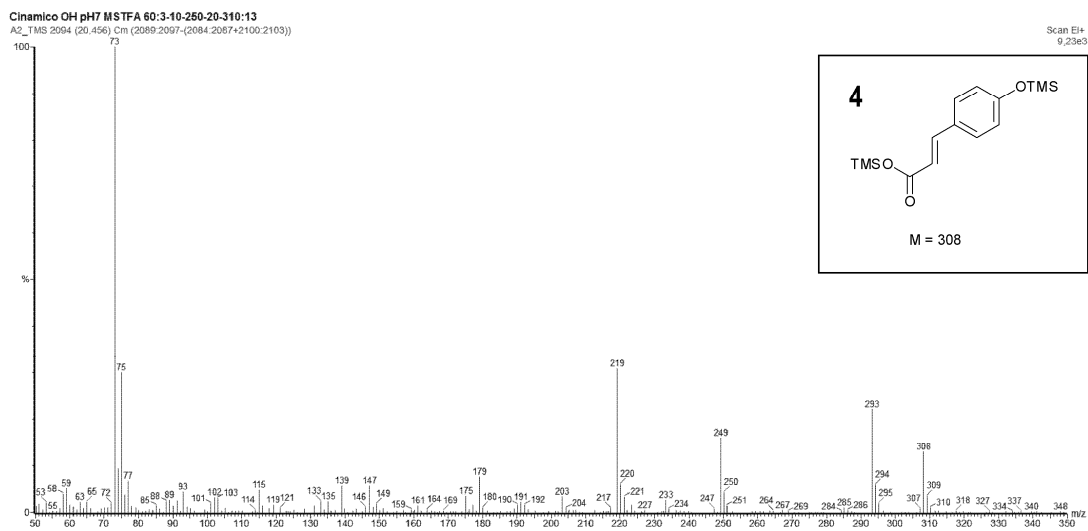


Figura C6 – Espectro de massa do produto **4** (EI).

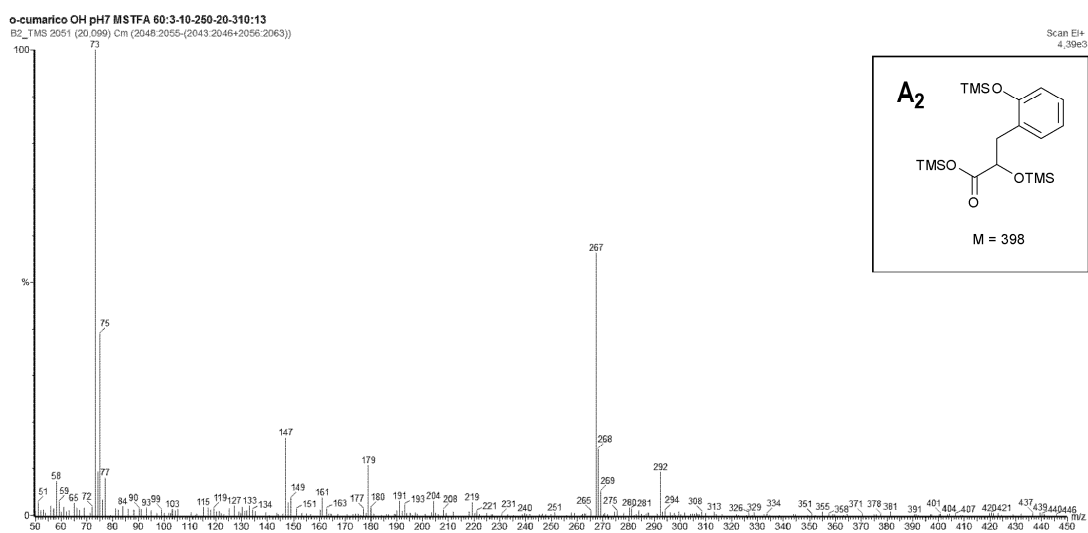


Figura C7 – Espectro de massa do produto **A₂** (EI).

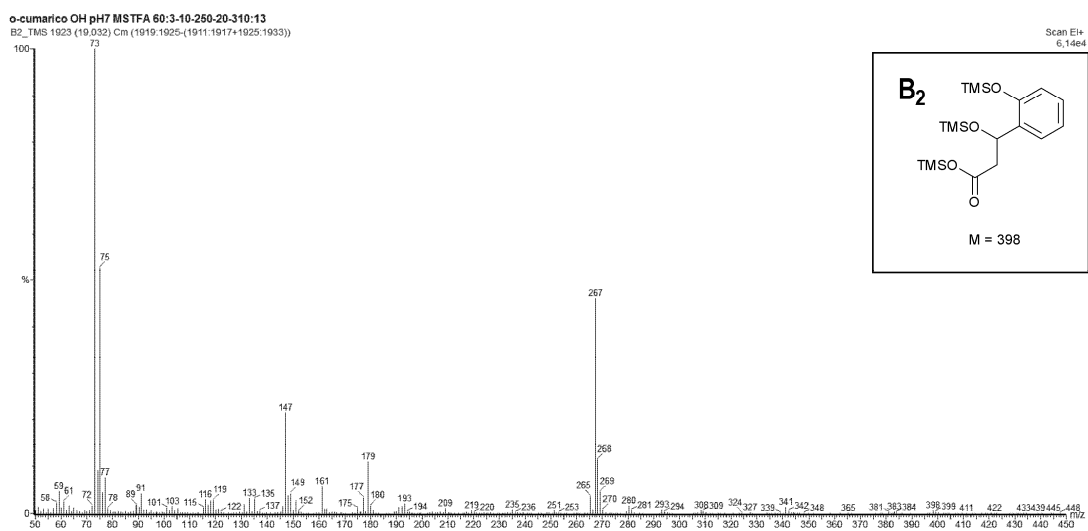


Figura C8 – Espectro de massa do produto **B₂** (EI).

o-cumarico OH pH7 MSTFA 60:3-10-250-20-310:13
B2_TMS 1564 (16.036) Cm (1561.1566-(1557.1560+1567.1573))

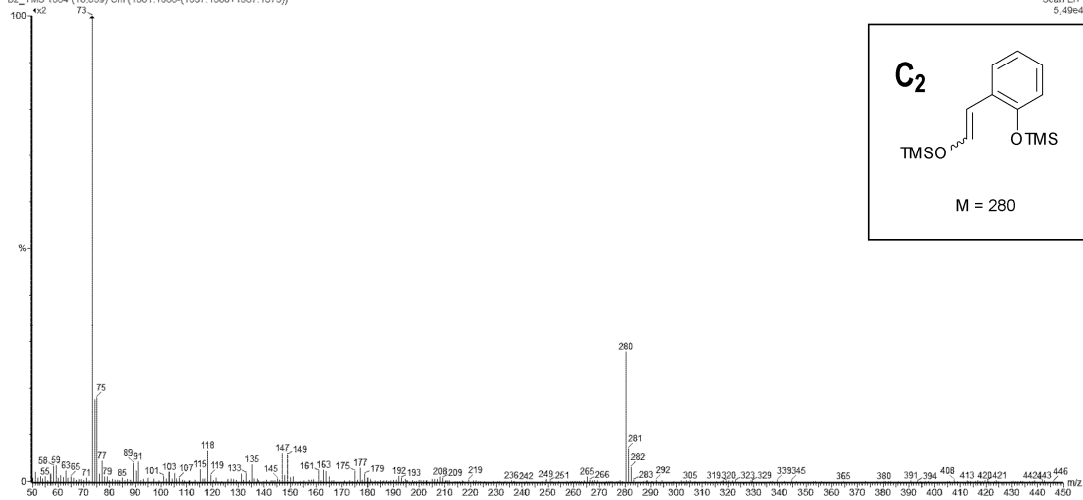


Figura C9 – Espectro de massa do produto **C2** (EI).

o-cumarico OH pH7 MSTFA 60:3-10-250-20-310:13
B2_TMS 1129 (12.412) Cm (1126.1131-(1121.1124+1133.1137))

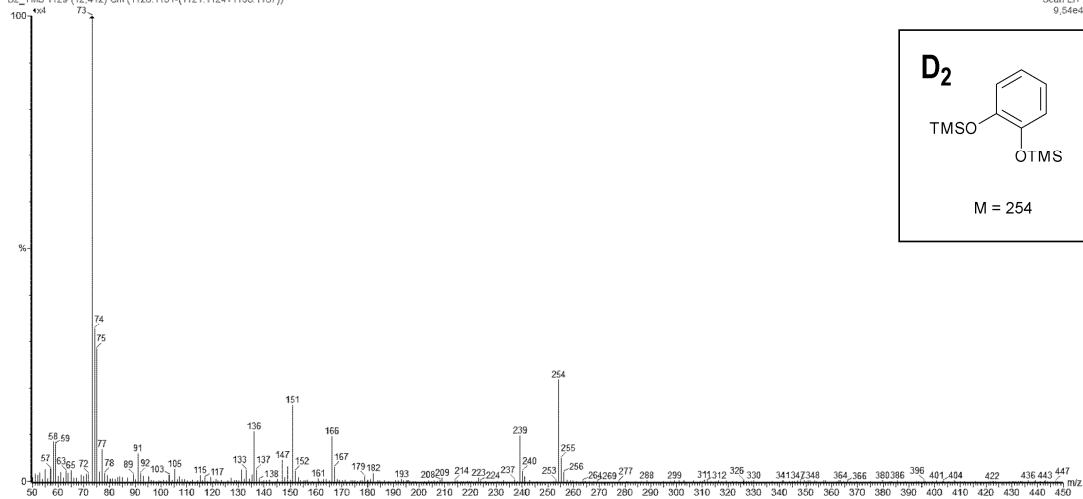


Figura C10 – Espectro de massa do produto **D2** (EI).

o-cumarico OH pH7 MSTFA 60:3-10-250-20-310:13
B2_TMS 2366 (22.723) Cm (2364.2369-(2360.2363+2372.2376))

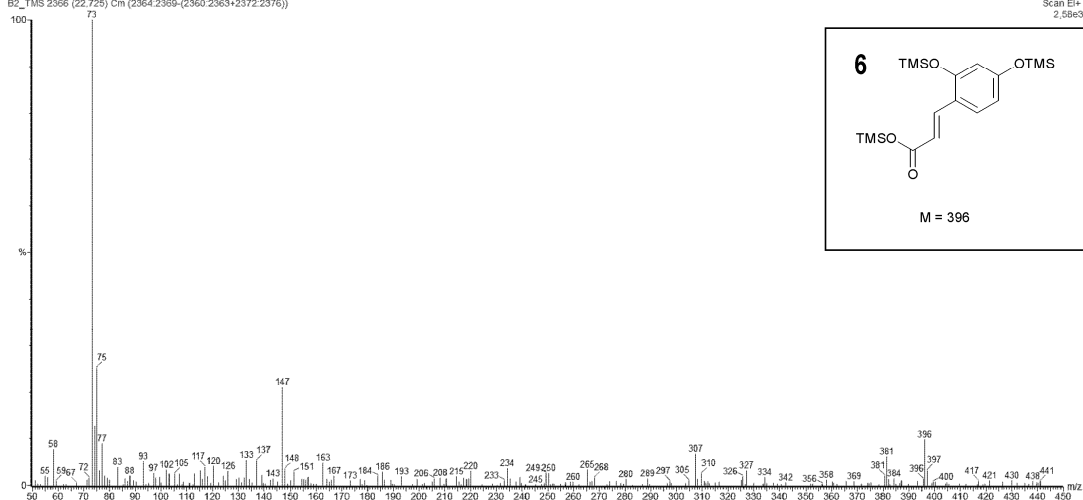


Figura C11 – Espectro de massa do produto **6** (EI).

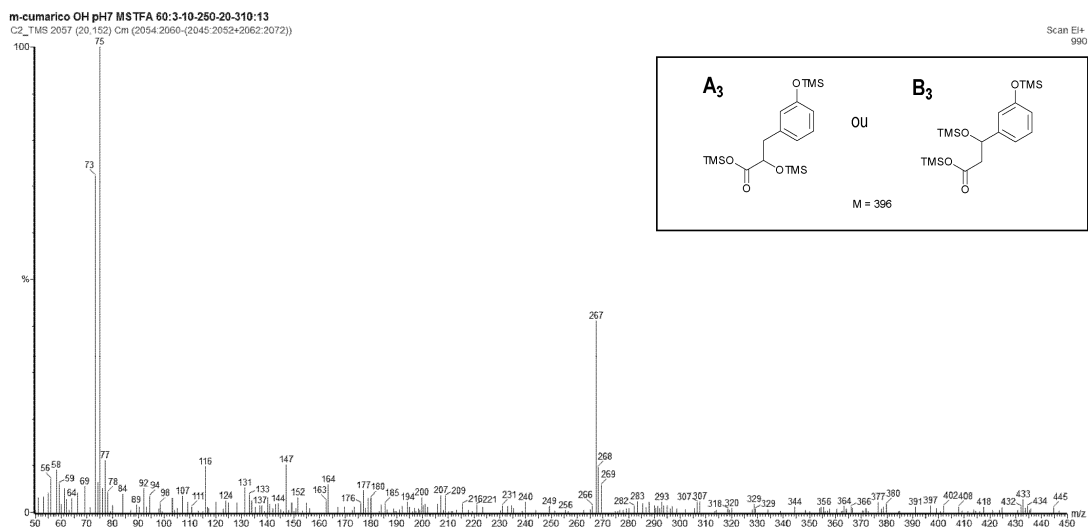


Figura C12 – Espectro de massa dos produtos **A₃** ou **B₃** (EI).

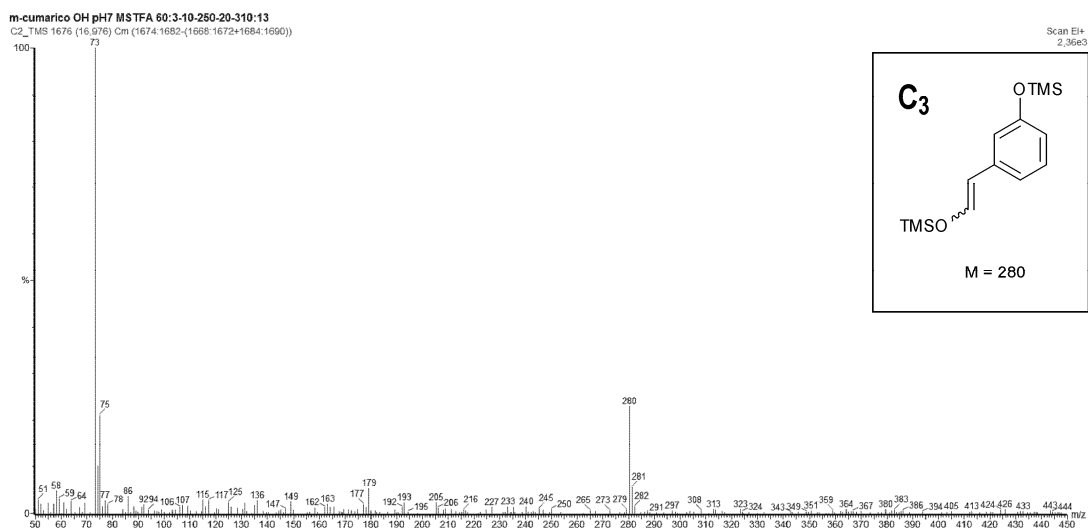


Figura C13 – Espectro de massa do produto **C₃** (EI).

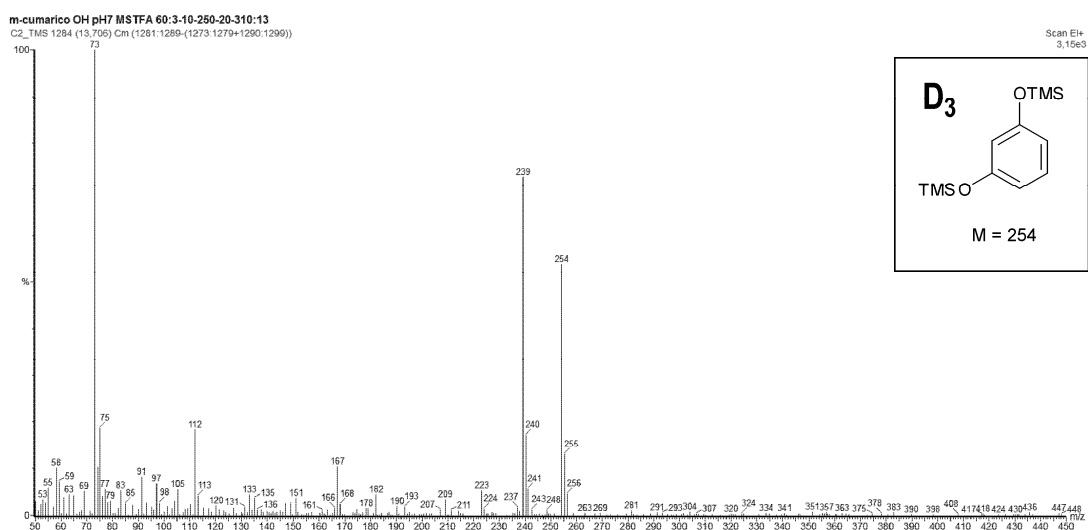


Figura C14 – Espectro de massa do produto **D₃** (EI).

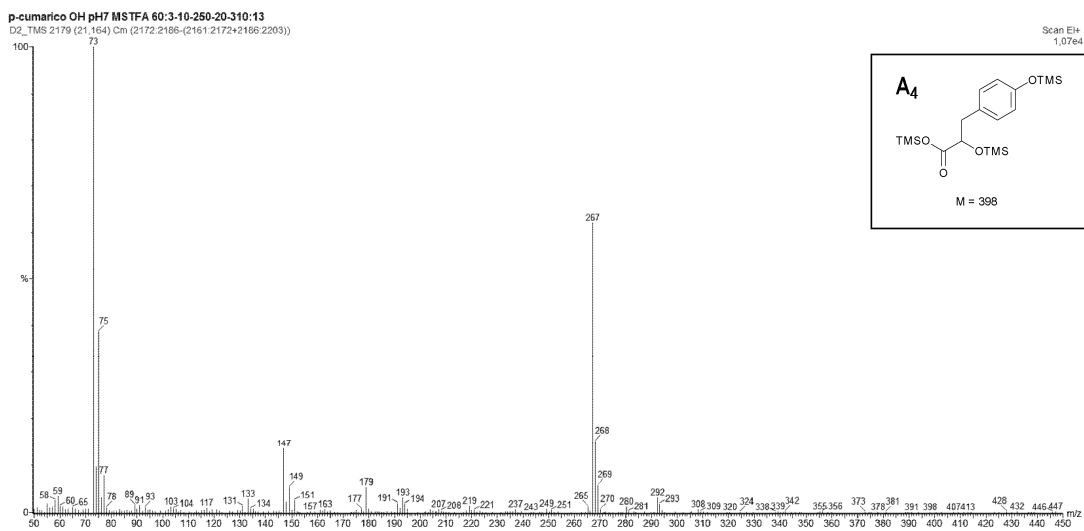


Figura C15 – Espectro de massa do produto **A₄** (EI).

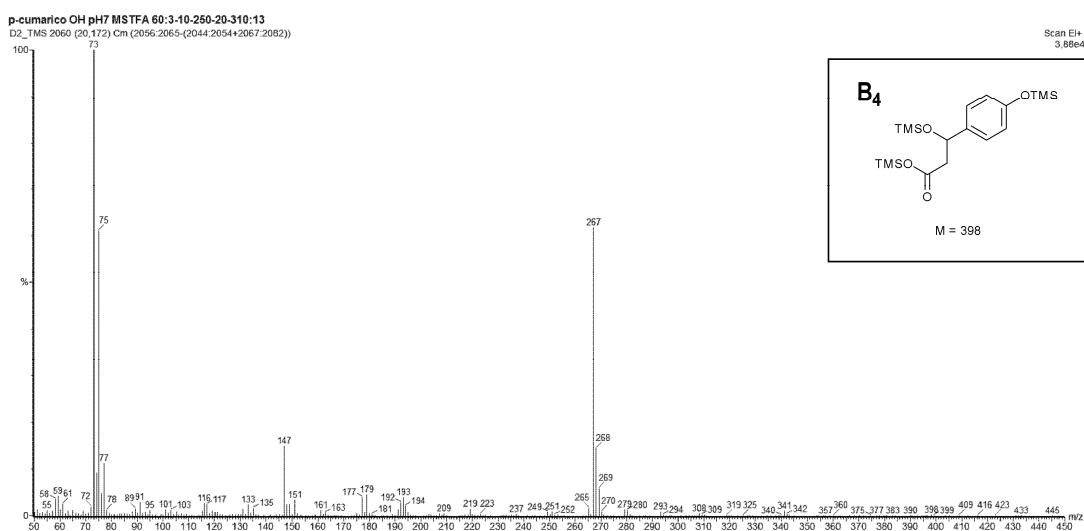


Figura C16 – Espectro de massa do produto **B₄** (EI).

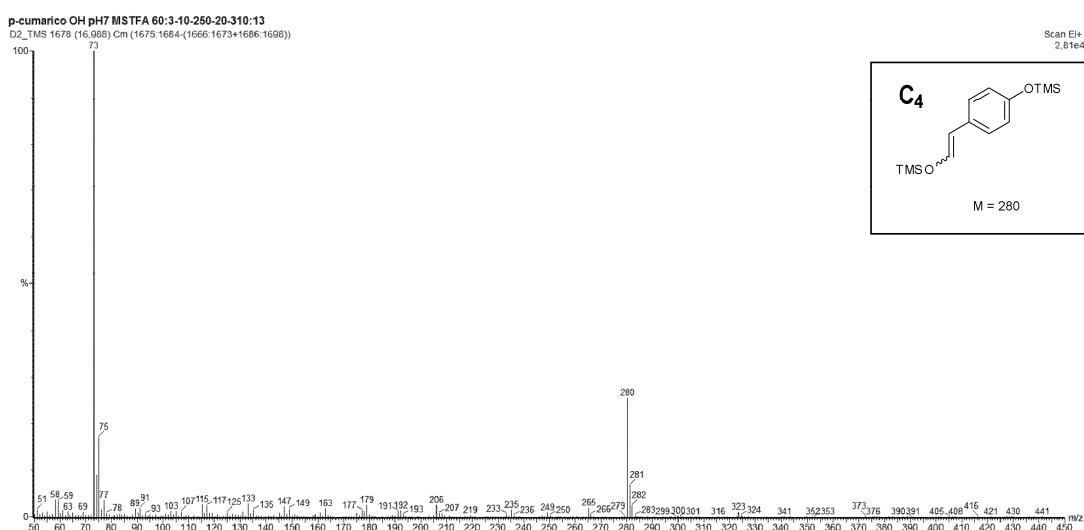


Figura C17 – Espectro de massa do produto **C₄** (EI).

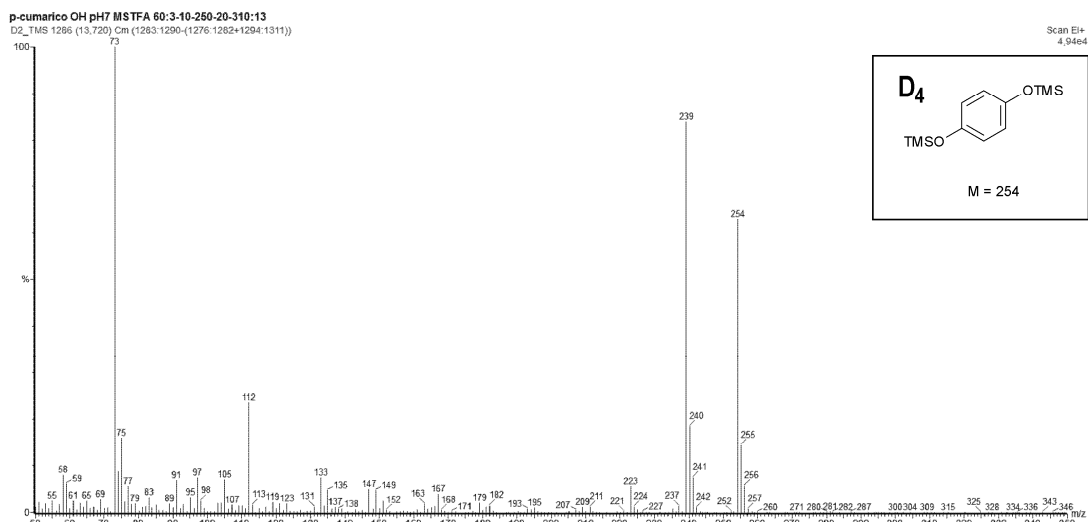


Figura C18 – Espectro de massa do produto **D4** (EI).

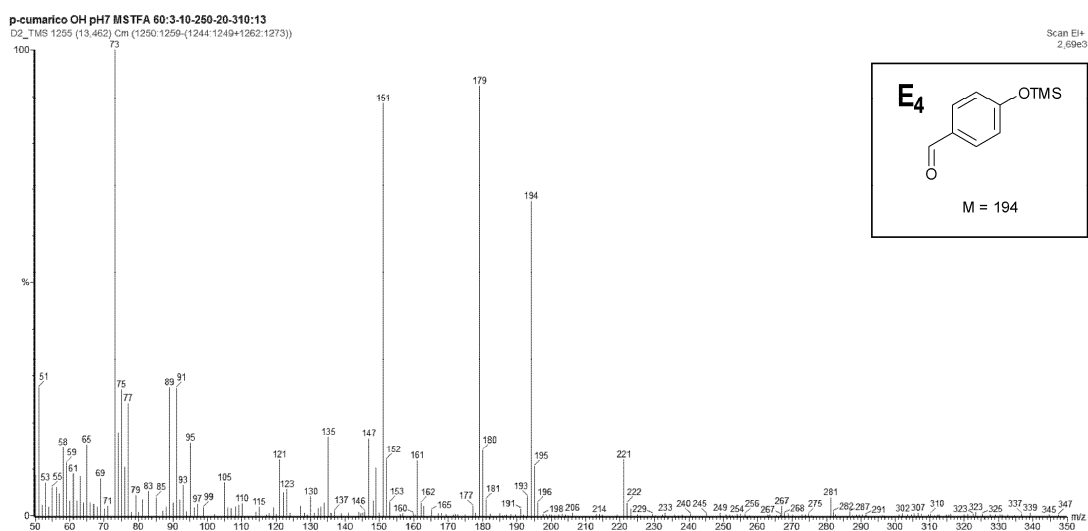


Figura C19 – Espectro de massa do produto **E4** (EI).

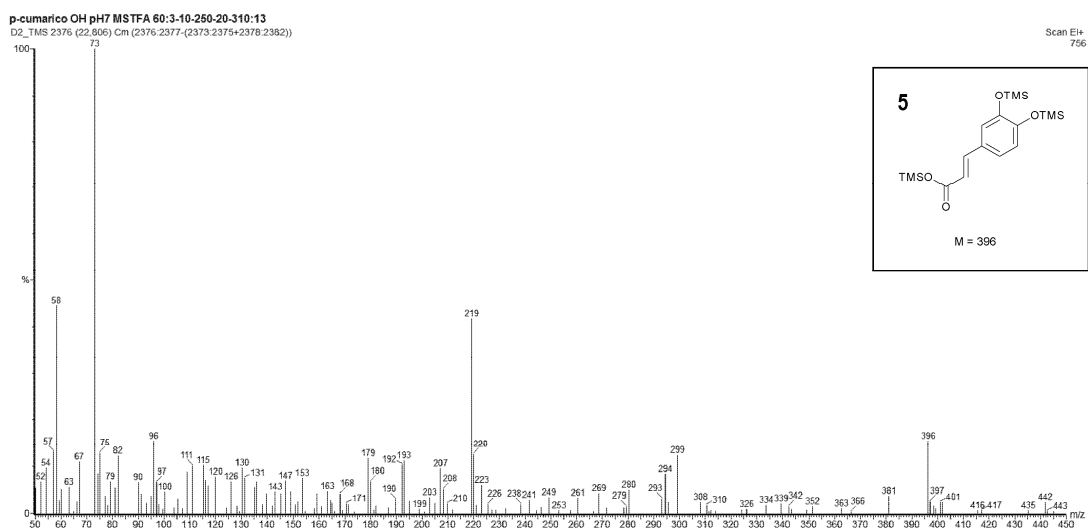


Figura C20 – Espectro de massa do produto **5** (EI).

Cafeico OH pH7 MSTFA 60:3-10-250-20-310:13
E2_TMS 2245 (21.715) Cm (2243:2249-(2235:2241+2253:2262))

Scan E1+
4.7064

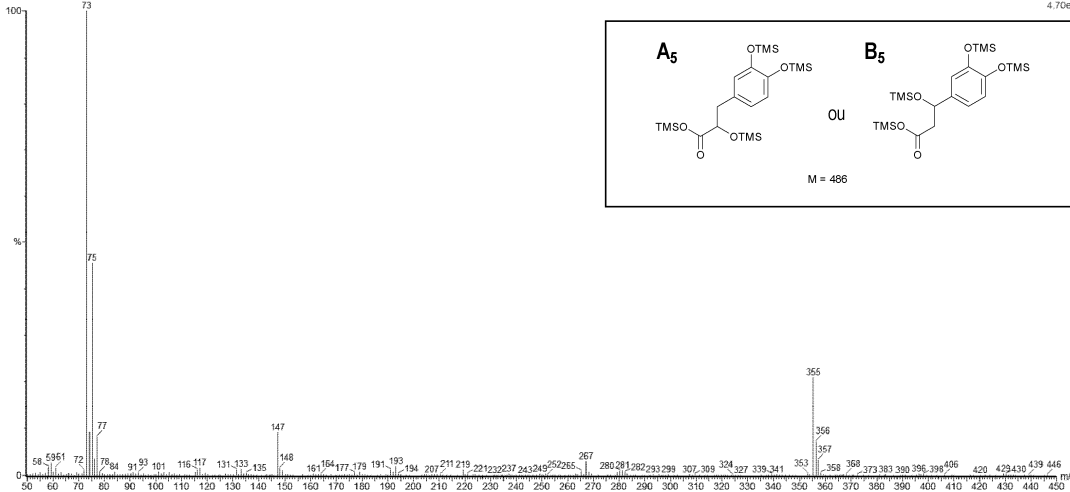


Figura C21 – Espectro de massa dos produtos **A₅** ou **B₅** (EI).

Cafeico OH pH7 MSTFA 60:3-10-250-20-310:13
E2_TMS 1980 (19.506) Cm (1977:1984-(1973:1975+1985:1988))

Scan E1+
1.0864

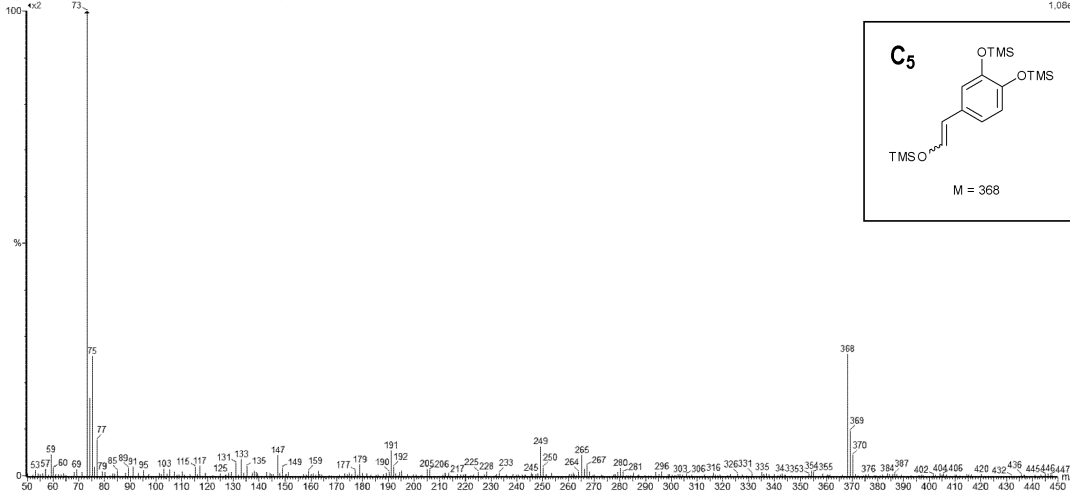


Figura C22 – Espectro de massa do produto **C₅** (EI).

Cafeico OH pH7 MSTFA 60:3-10-250-20-310:13
E2_TMS 1621 (16.514) Cm (1618:1623-(1614:1617+1625:1628))

Scan E1+
1.6063

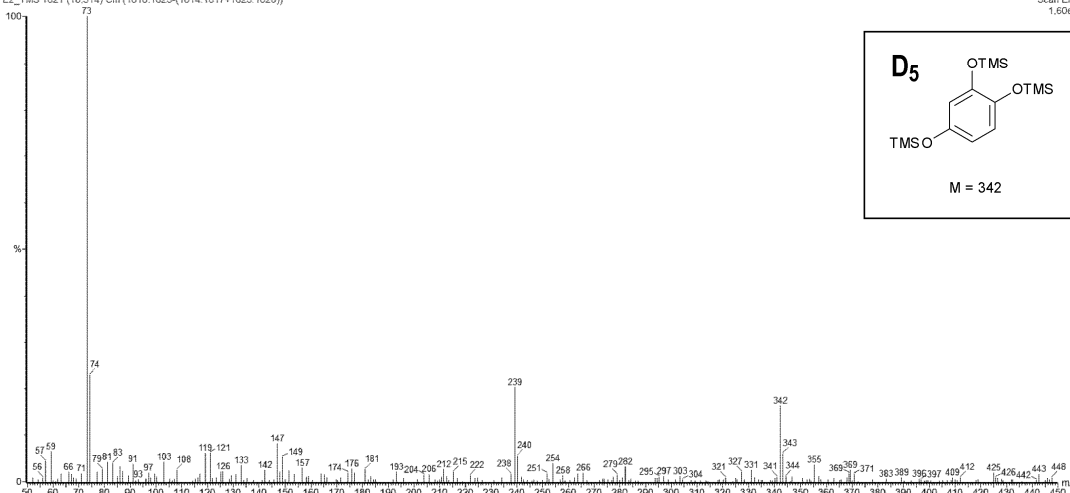


Figura C23 – Espectro de massa do produto **D₅** (EI).

Cafelco OH pH7 MSTFA 60:3-10-250-20-310:13
E2_TMS 1653 (16.780) Cm (1651:1657-(1646:1650+1660:1664))

Scan E1+
2.53e4

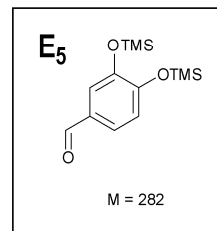
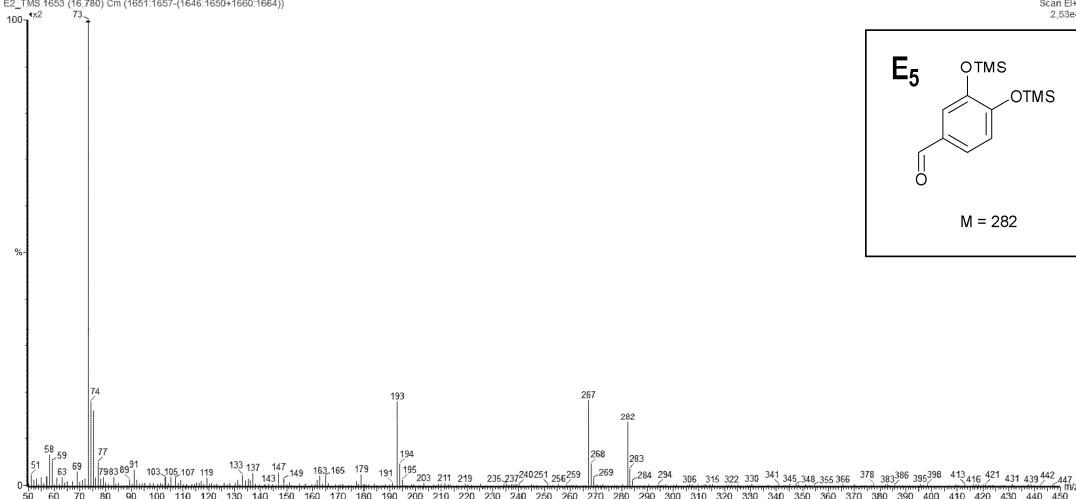


Figura C24 – Espectro de massa do produto E5 (EI).

