

# UFAL

**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
E BIOTECNOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE CACHAÇAS  
ENVELHECIDAS EM TONÉIS DE MADEIRA NATIVA DO BRASIL E  
DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA DE SEQUESTRO DE ÁCIDO  
HIPOCLOROSO EM SISTEMA EX-VIVO**

**WOODLAND DE SOUZA OLIVEIRA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins

57072-970 - Maceió - AL

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE CACHAÇAS  
ENVELHECIDAS EM TONÉIS DE MADEIRA NATIVA DO BRASIL E  
DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA DE SEQUESTRO  
DE ÁCIDO HIPOCLOROSO EM SISTEMA EX-VIVO**

Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ana Catarina Rezende Leite

**Catálogo na Fonte Universidade  
Federal de Alagoas Biblioteca Central  
Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

O48a Oliveira, Woodland de Souza.

Avaliação da capacidade antioxidante de cachaças envelhecidas em tonéis de madeira nativa do Brasil e desenvolvimento de uma metodologia de sequestro de ácido hipocloroso em sistema ex-vivo / Woodland de Souza Oliveira. – 2021.

153 f. : il., grafs., tabs. color.

Orientador: Josué Carinhanha Caldas Santos.

Coorientadora: Ana Catarina Rezende Leite.

Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 65-68.

Apêndice: f. 69-97.

Anexo: f. 97-151.

1. Cachaça - Envelhecimento. 2. Antioxidantes. 3. Ácido hipocloroso. 4. Neutrófilos. I. Título.

CDU: 661.43:663.541



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E  
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C.  
Simões Cidade Universitária,  
Tabuleiro dos Martins 57072-970,  
Maceió-AL, Brasil


Fone: (82) 3214-1144

Email: ppgqb.ufal@gmail.com

## FOLHA DE APROVAÇÃO


Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando **WOODLAND DE SOUZA OLIVEIRA** intitulada: “**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE: INFLUÊNCIA DA MADEIRA E TEMPO DE ENVELHECIMENTO DE CACHAÇAS E USO DA TIAMINA (VITAMINA B1) COMO SONDA FLUORESCENTE PARA ÁCIDO HIPOCLOROSO**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 9 de agosto de 2021, às 14h, por meio de videoconferência.


Comissão Examinadora:


Documento assinado digitalmente  
 Josue Carinhanha Caldas Santos  
Data: 10/08/2021 00:43:44-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos  
Orientador (PPGQB/IQB/UFAL)

Profa. Dra. Ana Catarina Rezende Leite  
Coorientadora (PPGQB/IQB/UFAL)

Documento assinado digitalmente  
 Marília Oliveira Fonseca Goulart  
Data: 10/08/2021 17:54:49-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>  
Profa. Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart  
(PPGQB/IQB/UFAL)

Documento assinado digitalmente  
 Luzia Valentina Modolo  
Data: 10/08/2021 08:41:04-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>  
Profa. Dra. Luzia Valentina Modolo  
(ICB/UFMG)

Documento assinado digitalmente  
 Jorge Mauricio David  
Data: 10/08/2021 15:17:27-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Dr Jorge Maurício David  
(IQ/UFBA)

MACEIÓ-AL

Agosto de 2021

Dedico este trabalho à minha família que sempre me deu suporte e discernimento para vencer todos os obstáculos impostos pela vida com união, fé e humildade.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a DEUS, pela proteção e coragem para enfrentar minhas dificuldades e limitações, mostrando que através da fé possível transpor todos os obstáculos;

À minha FAMÍLIA, que sempre me deu suporte, através do apoio em todas as etapas de minha vida com muito amor e união;

À minha mãe, Izabel Maria de Souza, por todo amor e dedicação estando sempre presente e dividindo comigo os momentos mais importantes da minha vida;

Aos meus lindos filhos, Lavínia e Vinícius, os maiores presentes da minha vida, por todo o amor, apoio, incentivo, companheirismo, compreensão e ensinamentos;

Ao meu bisavô, Manoel Martiniano de Souza (*in memoriam*) por ter me ensinado a ter fé nos momentos mais críticos da vida;

À minha linda namorada Sayarah Carol Mesquita dos Santos por toda a força, confiança e amor e companheirismo;

À minha amiga e companheira de muitos momentos, Tamires Oliveira de Melo, por toda a compreensão e apoio para comigo e nossos filhos;

Aos meus amigos irmãos da Universidade e do LINQA, em especial ao Elysson, Allyson, Jaelson, Fátima, Guimarães, Janaína, Amanda, Ari, Reginaldo, Aryana e Mayara apelo apoio, pelas experiências de vida, pelas trocas de conhecimento e companheirismo no decorrer dos anos;

Às minhas amigas Josivânia S. dos Santos e Maria Glória P. Calazans Soares por toda a força, apoio, compreensão e amizade;

Ao professor Josué C. Caldas Santos, que compartilhou comigo seus conhecimentos e experiências, aceitando o compromisso de me ajudar na produção deste estudo, orientando-me e assegurando a realização de meus ideais com muito compromisso, amizade e confiança;

À Nunes e Góes Beneficiamento e Comércio de Bebidas Ltda (Cachaça Engenho Nunes) pela colaboração na cessão das amostras de cachaça;

À Profa. Eduarda Fernandes e as pesquisadoras Dra Marisa A. C. Freitas e Dra Daniela Ribeiro da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto em Portugal pela colaboração;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo apoio financeiro;

Por fim, agradeço imensamente aos demais amigos e professores pela contribuição, direta e indireta, na realização de mais uma etapa de minha vida, através de suas palavras e gestos de incentivo sempre que precisei. Muito obrigado(a) a todos(as)!

“Conserve os olhos fixos num ideal sublime, e lute sempre pelo que deseja, pois só os fracos desistem e só quem luta é digno da vida”.

Autor desconhecido.

## RESUMO

A cachaça é uma bebida tipicamente brasileira e pode ser envelhecida em barris de diferentes madeiras visando agregar valor ao produto final. O processo de envelhecimento de cachaças em barris de madeira leva a extração de diversos compostos em sua maioria com propriedades antioxidantes, os quais, dependem do tipo de madeira e do tempo de envelhecimento. Dessa maneira, foi avaliada a capacidade antioxidante de cachaças envelhecidas em barris de diferentes espécies de madeiras em função do tempo (2 anos) e do reuso dos barris. As cachaças envelhecidas foram avaliadas quanto ao teor de compostos fenólicos totais (Folin-Ciocalteu) e a capacidade antioxidante foi medida a partir dos métodos de ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup> e sequestro do radical <sup>•</sup>NO, além da capacidade de redução do Fe(III) (FRAP). Como sistema controle os resultados foram comparados a cachaças não envelhecidas. O ácido gálico, quercetina e Trolox foram empregados como padrões e os resultados expressos em seus respectivos equivalentes (mg L<sup>-1</sup>). As cachaças envelhecidas em umburana, bálsamo e jatobá apresentaram a maior concentração de compostos fenólicos totais, sendo que para todas as cachaças a concentração destes compostos foi proporcional ao tempo de envelhecimento. O processo de reutilização dos barris levou a redução da concentração de compostos fenólicos extraídos. Comportamento similar foi obtido para a capacidade antioxidante pelos métodos de ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup> e FRAP. A capacidade de sequestro do radical <sup>•</sup>NO foi cerca de 70% após 150 min para todas as amostras. Os resultados do ABTS<sup>•+</sup> foram superiores aos do DPPH<sup>•</sup> indicando uma maior concentração de compostos antioxidantes hidrofílicos. Por fim, o tipo de madeira, o tempo e os processos envolvidos no envelhecimento da bebida são determinantes no perfil antioxidante da cachaça. O desenvolvimento de métodos para determinar a C<sub>AO</sub> e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio tem sido um desafio diante da complexidade amostras. Desta forma, procura-se o desenvolvimento de métodos que mimetizem as condições fisiológicas empregando moléculas biologicamente ativas como sondas. Uma vez que em elevadas concentrações de HOCl podem estar associadas a processos inflamatórios, a segunda etapa deste trabalho objetivou-se no desenvolvimento de um método simples, rápido e sensível para determinação da capacidade de sequestro (C<sub>sc</sub>) de HOCl de diferentes compostos e anti-inflamatórios baseada na inibição da oxidação da tiamina a tiocromo mediada pelo HOCl em condições fisiológicas simuladas. O método fundamenta-se na inibição da formação do tiocromo ( $\lambda_{ex} = 370 \text{ nm}$  e  $\lambda_{em} = 440 \text{ nm}$ ), produto da oxidação da tiamina pelo HOCl. Espécies que possam reagir com o HOCl diminuem a formação de tiocromo e como consequência da intensidade do sinal de fluorescência. O ácido gálico foi utilizado padrão e o percentual de inibição de fluorescência como resposta analítica. A seletividade da sonda foi analisada frente a sete espécies reativas biologicamente ativas e o parâmetro avaliado foi a sensibilidade analítica ( $S = \text{u.a.F } \mu\text{molL}^{-1}$ ), sendo os resultados obtidos: HOCl ( $23,4 \pm 1,2$ ), <sup>•</sup>NO ( $1,4 \pm 0,2$ ), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $1,8 \pm 0,2$ ), HO<sup>•</sup> ( $4,2 \pm 0,2$ ), t-BuOOH ( $0,6 \pm 0,1$ ), t-BuOOH<sup>•</sup> ( $0,70 \pm 0,05$ ), <sup>1</sup>O<sub>2</sub> ( $0,50 \pm 0,07$ ), O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ( $0,100 \pm 0,007$ ) e ONOO<sup>-</sup> ( $0,30 \pm 0,03$ ). A sonda empregada mostrou-se seletiva para HOCl. O método permitiu avaliar a C<sub>sc</sub> de 25 compostos de diferentes classes: fenólicos ( $n = 14$ ); tiólicos ( $n = 5$ ) e anti-inflamatórios não esteroides ( $n = 6$ ). A sonda foi aplicada em neutrófilos humanos, em condições inflamatórias mostrando-se seletiva a HOCl e permitindo determinar a C<sub>sc</sub> de compostos em meio celular. Assim, o método proposto mostrou-se seletivo e adequado para avaliação da capacidade de sequestro HOCl frente a compostos naturais e sintéticos.

**Palavras-chave:** Cachaça envelhecida. Capacidade antioxidante. Sonda seletiva. Ácido hipocloroso. Neutrófilos.



## ABSTRACT

Cachaça is a typically Brazilian drink and can be aged in barrels of different types of wood in order to add value to the final product. The aging process of cachaça in wooden barrels leads to the extraction of several compounds, mostly with antioxidant properties, which depend on the type of wood and the aging time. Thus, the antioxidant capacity of cachaça aged in barrels of different wood species was evaluated as a function of time (2 years) and barrel reuse. The aged cachaças were evaluated for the content of total phenolic compounds (Folin-Ciocalteu method) and the antioxidant capacity was measured using the ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup> and <sup>•</sup>NO radical scavenging methods, in addition to the ability to reduce Fe(III) (FRAP assay). As a control system, the results were compared to non-aged cachaça. Gallic acid, quercetin and Trolox were used as standards and the results expressed in their respective equivalents (mg L<sup>-1</sup>). The cachaças aged in umburana, balsam and Jatobá showed the highest concentration of total phenolic compounds, and for all cachaça the concentration of these compounds was proportional to the aging time. The process of reusing the barrels led to a reduction in the concentration of extracted phenolic compounds. Similar behavior was obtained for the antioxidant capacity by the ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup> and FRAP methods. The <sup>•</sup>NO radical scavenging capacity was about 70% after 150 min for all samples. The results of ABTS<sup>•+</sup> were superior to those of DPPH<sup>•</sup> indicating a higher concentration of hydrophilic antioxidant compounds. Finally, the type of wood, the time and the processes involved in the aging of the beverage are determinant in the antioxidant profile of the cachaça. The development of methods to determine the total antioxidant capacity (TAC) and reactive oxygen and nitrogen species has been a challenge given the complexity of the samples. Thus, the development of methods that mimic physiological conditions using biologically active molecules as probes is required. Since high concentrations of HOCl can be associated with inflammatory processes, the second step of this work aimed to develop a simple, fast, and sensitive method to determine the HOCl scavenging capacity (Csc) of different compounds and anti-inflammatory drugs based on the inhibition of HOCl-mediated thiamine to thiochrome oxidation under simulated physiological conditions. The method is based on the inhibition of thiochrome formation ( $\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$ ), a product of the oxidation of thiamine by HOCl. Species that can react with HOCl reduce the formation of thiochrome and, therefore, the intensity of the fluorescence signal. Gallic acid was used as standard, and the percentage of fluorescence inhibition was used as an analytical response. The probe selectivity was analyzed against seven biologically active reactive species and the parameter evaluated was the analytical sensitivity ( $S = \text{uaF } \mu\text{molL}^{-1}$ ), with the results obtained: HOCl ( $23.4 \pm 1.2$ ), <sup>•</sup>NO ( $1.4 \pm 0.2$ ), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $1.8 \pm 0.2$ ), HO<sup>•</sup> ( $4.2 \pm 0.2$ ), terc-BuOOH ( $0.6 \pm 0.1$ ), terc-BuOO<sup>•</sup> ( $0.70 \pm 0.05$ ), <sup>1</sup>O<sub>2</sub> ( $0.50 \pm 0.07$ ), O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ( $0.100 \pm 0.007$ ) and ONOO<sup>-</sup> ( $0.30 \pm 0.03$ ). The probe used was selective for HOCl. The method allowed evaluating the Csc of 25 compounds from different classes: phenolics (n = 14); thiolics (n = 5) and non-steroidal anti-inflammatory drugs (n = 6). The probe was applied to human neutrophils, under inflammatory conditions, showing selective HOCl and allowing to determine the Csc of compounds in cell media. Thus, the proposed method proved to be selective and suitable for evaluating the scavenging ability of HOCl against natural and synthetic compounds.

Keywords: Aged cachaça. Antioxidant capacity. Selective probe. Hypochlorous acid. Neutrophils.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 –	Principais países importadores de cachaça em 2020 em circulação de capital.....	22
Figura 1.2 –	Princípios das metodologias analíticas para determinação da capacidade antioxidante.....	25
Figura 2.1 –	Concentração de compostos fenólicos totais das amostras de cachaça analisadas.....	50
Figura 2.2 –	Capacidade de redução de Fe(III) das amostras de cachaças analisadas.....	53
Figura 2.3 –	Capacidade antioxidante das cachaças analisadas pelo método ABTS <sup>•+</sup> .....	55
Figura 2.4 –	Curva de consumo percentual do radical ABTS <sup>•+</sup> em função do tempo para as cachaças envelhecidas no primeiro ciclo de envelhecimento (mês 12).....	56
Figura 2.5 –	Capacidade antioxidante das cachaças analisadas pelo método DPPH <sup>•</sup> .....	58
Figura 2.6 –	Capacidade de sequestro de <sup>•</sup> NO das amostras de cachaça envelhecidas após 150 min de ensaio.....	60
Figura 2.7 –	Análise dos componentes principais: gráficos dos scores para relação PC1 × PC2 nos dois ciclos de envelhecimento das cachaças.....	63
Figura 3.1 –	Avaliação da intensidade de fluorescência de tiocromo em função do pH do meio.....	109
Figura 3.2 –	Figura 3.2 – Avaliação da oxidação da tiamina a tiocromo (fluoróforo) em função da concentração de HOCl e do pH.....	110
Figura 3.3 –	Proposta de mecanismo para a formação do tiocromo a partir da reação da tiamina com HOCl.....	111
Figura 3.4 –	Figura 3.4 – Avaliação do sistema na presença de AG como composto antioxidante.....	112
Figura 3.5 –	Avaliação da ordem de adição dos reagentes e cinética reacional.....	113
Figura 3.6 –	Influência dos parâmetros químicos do meio.....	114
Figura 3.7 –	Avaliação da proporção dos reagentes.....	115
Figura 3.8 –	Avaliação da metodologia proposta empregando diferentes tiaminas....	117

Figura 3.9 –	Avaliação da seletividade do método proposto frente a diferentes EROs e ERNs.....	118
Figura 3.10 –	Avaliação da capacidade de sequestro de HOCl de compostos fenólicos e antioxidantes, tiólicos e anti-inflamatórios.....	120
Figura 3.11 –	Produção de espécies reativas de neutrófilos humanos estimulados com Ca(II).....	124
Figura 3.12 –	Gráficos representativos de citometria de fluxo do efeito do pirofosfato de tiamina e do cloridrato de tiamina ( $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na viabilidade dos neutrófilos, medido pelo método de coloração com iodeto de propídio..	125
Figura 3.13 –	Detecção de HOCl em neutrófilos humanos empregando tiamina e pirofosfato de tiamina como sonda.....	126
Figura 3.14 –	Determinação da capacidade de sequestro de HOCl em em neutrófilos humanos empregando tiamina como sonda.....	127

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) de interesse biológico e suas principais características.....	19
Tabela 1.2 – Métodos empregados para determinação da capacidade antioxidante.....	27

## LISTA DE ABREVIATURA

%I	Percentual de inibição
%I <sub>tiamina</sub>	Percentual de inibição da formação de tiocromo a partir de tiamina
%I <sub>TMP</sub>	Percentual de inibição da formação de tiocromo a partir de fosfato de tiamina
%I <sub>TPP</sub>	Percentual de inibição da formação de tiocromo a partir de pirofosfato de tiamina
Abs	Absorvância de radiação eletromagnética
ABTS	Ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
AG	Ácido gálico
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
BAL	Cachaça envelhecida em barris de bálsamo
BHT	Hidroxitolueno de butila
C <sub>AG</sub>	Concentração de ácido gálico
C <sub>AO</sub>	Capacidade antioxidante
CAR	Cachaça envelhecida em barris de carvalho
CG	Cromatografia gasosa
CNE	Cachaça não envelhecida
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
C <sub>SC</sub>	Capacidade de sequestro de espécie reativa
C <sub>TF</sub>	Concentração de solução de tampão fosfato
CUPRAC	Poder antioxidante da redução do cobre
DAF	4,5-diaminofluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EC <sub>25</sub>	Concentração mínima necessária para inibição de um evento em 25%
EC <sub>50</sub>	Concentração mínima necessária para inibição de um evento em 50%
Eq.	Equivalente
ER	Espécie reativa
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
F <sub>440nm</sub>	Sinal de fluorescência em 440 nm
F <sub>amostra</sub>	Fluorescência da amostra
FC	Reagente de Folin-Ciocalteu
FRAP	Poder antioxidante de redução de Fe(III)
F <sub>referência</sub>	Fluorescência do branco analítico
FT	Fenólicos totais
HCA	Análise de Agrupamentos Hierárquicos
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBRAC	Instituto Brasileiro de Cachaça
IPE	Cachaça envelhecida em barris de ipê
ITA	Cachaça envelhecida em barris de itaúba
JAB	Cachaça envelhecida em barris de jaboti
JAT	Cachaça envelhecida em barris de jatobá
JEQ	Cachaça envelhecida em barris de jequitibá
KMBA	Ácido $\alpha$ -ceto- $\gamma$ -metiltiobutírico

LD	Limite de detecção
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento
MPO	Mieloperoxidase
NOC-5	3-(aminopropil)-1-hidroxi-3-isopropil-2-oxo-1-triazino
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORAC	Capacidade de absorção de radicais de oxigênio
PCA	Análise de componentes principais
PER	Cachaça envelhecida em barris de peroba
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
QU	Quercetina
RO•	Radical alcoxila
ROO•	Radical peroxila
R-PE	<i>R</i> -Ficoeritrina
TAH	Transferência de átomos de hidrogênio
t-BOO•	Radical <i>terc</i> -butil-peróxido
t-BOOH	<i>Terc</i> -Butil-peróxido
TE	Transferência de elétrons
TF	Solução tampão fosfato
TIM	Cachaça envelhecida em barris de timborana
TOSC	Capacidade antioxidante total
TPTZ	2,4,6-Tripiridil- <i>s</i> -triazina
TR	Trolox
TRAP	Parâmetro antioxidante para a captura total de radical
UMB	Barril de umburana
UV-Vis	Espectro na região do ultravioleta-visível
$\lambda_{em}$	Comprimento de onda de máxima emissão
$\lambda_{ex}$	Comprimento de onda de excitação
$\lambda_{max}$	Comprimento de onda de máxima absorção

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL .....	18
1.1	O consumo moderado de bebidas ricas em compostos antioxidantes pode estar associado a prevenção de doenças decorrentes do estresse oxidativo?.....	21
1.2	Métodos para determinação da capacidade antioxidante: aplicabilidade, limitações e desafios .....	24
1.3	Objetivos gerais .....	33
1.4	Contribuições para a sociedade .....	33
	REFERÊNCIAS .....	35
2.	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE CACHAÇAS ENVELHECIDAS: EFEITO DO TEMPO E DO TIPO DE MADEIRA NO PROCESSO DE ENVELHECIMENTO .....	40
2.1	Introdução.....	40
2.2	Objetivos específicos .....	42
2.3	Experimental.....	42
2.3.1	Reagentes, soluções e amostras .....	42
2.3.2	Amostras de cachaça analisadas .....	43
2.3.3	Preparo das amostras para espectroscopia de massas .....	44
2.3.4	Ensaio antioxidantes.....	44
2.3.4.1	Determinação de compostos fenólicos totais .....	44
2.3.4.2	Ensaio do sequestro do radical DPPH .....	45
2.3.4.3	Ensaio do sequestro do radical ABTS <sup>+</sup> .....	45
2.3.4.4	Ensaio do sequestro do radical ·NO .....	46
2.3.4.5	Ensaio de redução de Fe(III) .....	46
2.3.4.6	Tratamento estatístico dos dados.....	46
2.4	Resultados e discussão .....	47
2.4.1	Caracterização das amostras de cachaças quanto ao tipo de madeira e parâmetro de qualidade.....	47
2.4.2	Avaliação da capacidade antioxidante .....	48
2.4.2.1	Compostos fenólicos totais .....	48
2.4.2.2	Capacidade de redução de Fe(III) (FRAP).....	51
2.4.2.3	Capacidade antioxidante frente ao radical ABTS <sup>+</sup> .....	54
2.4.2.4	Capacidade antioxidante frente ao radical DPPH <sup>·</sup> .....	56
2.4.2.5	Capacidade de sequestro de óxido nítrico (·NO).....	59
2.4.2.6	Análise de correlação entre os dados .....	60
2.4.2.7	Análise multivariada da capacidade antioxidante em função do tempo de envelhecimento da cachaça .....	61
2.5	Conclusão .....	64

REFERÊNCIAS .....	65
APÊNDICE A .....	69
REFERÊNCIAS .....	95
ANEXO A .....	97
3 APLICAÇÃO DA TIAMINA COMO SONDA FLUORESCENTE PARA AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE SEQUESTRO DE HOCl EM CONDIÇÕES SIMULADAS DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	99
3.1 Introdução.....	99
3.2 Objetivos específicos.....	101
3.3 Experimental.....	103
3.3.1 Desenvolvimento e aplicação do método <i>in vitro</i> .....	103
3.3.1.1 Reagentes, soluções e amostras.....	103
3.3.1.2 Equipamentos utilizados .....	104
3.3.1.3 Método proposto para a determinação da capacidade de sequestro de HOCl .....	105
3.3.1.4 Tratamento estatístico dos dados.....	105
3.3.2 Aplicação da sonda em amostras de sangue humano .....	105
3.3.2.1 Amostras.....	106
3.3.2.2 Equipamentos utilizados .....	106
3.3.2.3 Isolamento de neutrófilos humanos.....	106
3.3.2.4 Avaliação da viabilidade de neutrófilos humanos após tratamento com pirofosfato de tiamina e cloridrato de tiamina .....	107
3.3.2.5 Detecção de ácido hipocloroso pelas sondas fluorescentes pirofosfato de tiamina e cloridrato de tiamina, em neutrófilos humanos estimulados por PMA .....	107
3.3.2.6 Avaliação do efeito inibitório da hidrazida de ácido aminobenzoico em neutrófilos humanos estimulados por PMA.....	108
3.3.2.7 Avaliação da capacidade de sequestro de HOCl de compostos antioxidantes e fármacos em neutrófilos humanos.....	108
3.4 Resultado e discussão .....	109
3.4.1 Estudos preliminares .....	109
3.4.2 Proposta de mecanismo de reação seletiva da tiamina com HOCl.....	110
3.4.4 Avaliação da ordem de adição dos reagentes e cinética reacional.....	112
3.4.5 Avaliação da concentração da solução tampão e efeito da força iônica.....	114
3.4.6 Avaliação da proporção $n_{HOCl} / n_{tiamina}$ .....	115
3.4.7 Avaliação da metodologia empregando diferentes de tiamina .....	116
3.4.8 Avaliação da seletividade do método proposto frente a espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....	117
3.4.9 Avaliação da capacidade de sequestro de HOCl frente a compostos antioxidantes, redutores e fármacos pelo método proposto.....	119



3.4.10	Sondas fluorimétricas propostas para determinação de HOCl em sistemas biológicos	122
3.4.11	Isolamento e aplicação de neutrófilos humanos como modelo para avaliar estresse oxidativo	123
3.4.12	Avaliação dos efeitos do pirofosfato de tiamina e do cloridrato de tiamina na viabilidade dos neutrófilos humanos isolados	124
3.4.13	Aplicação das sondas fluorimétricas propostas para determinação de HOCl em neutrófilos humanos isolados	126
3.4.14	Determinação de HOCl e capacidade antioxidante em neutrófilos humanos isolados	127
3.5	Conclusões	128
3.6	Perspectivas	128
	REFERÊNCIAS	129
	APÊNDICE B	136
4	CONCLUSÃO GERAL	152

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A prevenção de doenças associadas ao estresse oxidativo pelo uso de substâncias antioxidantes tem contribuído para pesquisas nas áreas de qualidade de alimentos, planejamento de fármacos e avaliações de substâncias biologicamente ativas. A geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e de Nitrogênio (ERNs) nas células ocorrem naturalmente durante as reações metabólicas essenciais à obtenção de energia e manutenção de uma série de funções fisiológicas (ELMASTAS et al., 2018). Em condições de homeostase, as EROs e ERNs exercem diversas funções fisiológicas importantes como neurotransmissores, sinalizadores e reguladores (VINCENT, 2010; SEILER et al., 2008; JABUREK et al., 2004; VALKO et al., 2007). Além de serem produzidas pelas células de defesa para eliminar agentes invasores (KANG et al, 2017; VASCONCELOS et al., 2007). A Tabela 1.1 apresenta as principais EROs e ERNs de interesse biológico.

Diversos fatores exógenos contribuem para o aumento da concentração de Espécies Reativas (ERs) no organismo. Entre os principais, se destaca a poluição, a nutrição inadequada, a exposição à radiação ultravioleta, o hábito de fumar e/ou ingerir bebidas alcoólicas em excesso, a prática inadequada de exercícios físicos, o uso de anestésicos e quimioterápicos e a exposição excessiva a pesticidas (NÚÑEZ-SELLES, 2005; BIANCHI; ANTUNES, 1999; SOARES, 2002; NAGENDRAPPA, 2005). O excesso de ERs causa danos oxidativos às células, inativando proteínas e enzimas e comprometendo a função de lipídios de membrana, carboidratos e ácidos nucleicos (HUSAIN et al, 1987; BIRBEN, et al., 2012; GULCIN, 2020).

Para inibir os efeitos deletérios causados pelas espécies reativas, o organismo produz compostos antioxidantes, contudo, os fatores exógenos têm sido determinantes para o aumento da incidência de diversas patologias. Antioxidantes são substâncias que quando presentes em pequenas concentrações inibem ou impedem a oxidação de biomoléculas como lipídios, carboidratos, proteínas, DNA e outros substratos oxidáveis *in vivo* e *in vitro* (HALLIWELL et al., 1995). Diversos estudos fazem a correlação entre o estresse oxidativo e os variados fatores de risco a saúde pública. Além do envelhecimento precoce, esta condição também tem sido relacionada à fisiopatologia de doenças crônicas, como as cardiopatias, neuropatias, doenças autoimunes, pulmonares, câncer e à propagação do vírus da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) em soropositivos e da COVID-19 (BARREIROS et al., 2006; VASCONCELOS et al, 2007; LAFORGE et al., 2020).

Tabela 1.1 – Espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) de interesse biológico e suas principais características.

(Continua...)

Espécie reativa	Formação	Parâmetros cinéticos ( $k$ ou $t_{1/2}$ )	Comentários
Ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )	Enzimática a partir do sistema xantina/NADPH oxidase e, adicionalmente, pela redução monoelétrica do $O_2$ molecular.	$\sim 5 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$ (pH 7,0)	Em fagócitos, é um dos microbicidas mais importantes, capaz de inativar proteínas ferro-sulfurosas das bactérias (BARBIOR, 2000; RIBEIRO et al., 2005).
Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )	Via enzimas como peróxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e peroxidases ligadas a tioredoxina.	$10^{-9} \text{ s}$	É pouco reativo frente a moléculas orgânicas na ausência de metais de transição, os quais catalisam a decomposição do $H_2O_2$ à $HO^{\bullet}$ (BARREIROS, et al., 2006; RIBEIRO et al., 2005).
Radical hidroxila ( $HO^{\bullet}$ )	Gerado a partir do $O_2^{\bullet-}$ e $H_2O_2$ na presença de íons metálicos de ferro e cobre. Também pode ser gerado pela reação entre $O_2^{\bullet-}$ , $^{\bullet}NO$ e $HOCl$ , nesta ordem.	$10^{-9} \text{ s}$	Radical mais deletério para as células, tendo como consequência dano ou morte celular, quando gerado no meio biológico (BARREIROS, et al., 2006; HALLIWELL; CROSS, 1994; RIBEIRO et al., 2005).
Radical alcoxila ( $RO^{\bullet}$ )	Gerado como intermediário da peroxidação lipídica.	$10^{-6} \text{ s}$	Possui efeitos nocivos a saúde e está associado à deterioração de alimentos e lipídeos (HALLIWELL; CROSS, 1994; RIBEIRO et al., 2005).
Radical peroxila ( $ROO^{\bullet}$ )	Formado a partir de hidroperóxidos gerados a em função da peroxidação lipídica.	$7 \text{ s}$	Esta espécie possui efeito deletério no organismo, causando morte celular por necrose ou apoptose, alterações da permeabilidade da membrana da mitocôndria, dano oxidativo que favorece a liberação de fatores pró-apoptóticos (BARREIROS, et al., 2006; RIBEIRO et al., 2005).
Ácido hipocloroso ( $HOCl$ )	O $HOCl$ é formado a partir da reação do $H_2O_2$ com o $Cl^-$ mediada/catalisada pela mieloperoxidase ( <i>MPO</i> ).	-	É produzido por neutrófilos e monócitos ativados, reage com $O_2^{\bullet-}$ para formar $HO^{\bullet}$ , sendo fundamental em processos inflamatórios (BARBIOR, 2000).

Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

**Tabela 1.1 – Espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) de interesse biológico e suas principais características.**

.....(Continuação...)

<b>Espécie reativa</b>	<b>Formação</b>	<b>Parâmetros cinéticos (<math>k</math> ou <math>t_{1/2}</math>)</b>	<b>Comentários</b>
Oxigênio singlete ( $^1O_2$ )	Gerado pela reação entre o $H_2O_2$ e o HOCl produzido pela MPO	4-6 $\mu$ s	Gerado em processos de terapia fotodinâmica. (BARREIROS, et al., 2006; RIBEIRO et al., 2005; RONSEIN, et al., 2006)
Oxido nítrico ( $^{\bullet}NO$ )	Gerado pela ação das enzimas óxido nítrico sintases (NOS), que catalisam a conversão do aminoácido L-arginina a $^{\bullet}NO$ e L-citrulina.	10 s	Relaxamento muscular, neurotransmissão, vasoregulação, sendo um potente vasodilatador, envolvido na regulação da pressão arterial (HUANG, et al., 2007; FRANÇA et al. 2013).
Peroxinitrito ( $ONOO^{\bullet}$ )	É formado a partir da reação do óxido nítrico com o radical superóxido.	$10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$	O papel principal do peroxinitrito é a modificação de proteínas por oxidação ou nitração de aminoácidos como tirosina, cisteína, metionina e triptofano (GABRUSIEWICZ; COLWELL; HEIMBERGER, 2017)

Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

A concentração de compostos antioxidantes endógenos não tem sido suficiente para conter os danos causados pelo excesso de ERs geradas e absorvidas pelo organismo, e este desbalanço redox é denominado estresse oxidativo (HALLIWELL; CROSS, 1994; RIBEIRO et al., 2005; OLIVEIRA, et al., 2009; EKINCI et al., 2016). Em função de um desbalanço redox, é necessária a ingestão de substâncias capazes de controlar a concentração de ERs no organismo. A ingestão de alimentos e bebidas ricas em compostos antioxidantes como a vitamina C, E e A, carotenoides e compostos fenólicos tem diminuído a incidência de danos relacionados ao estresse oxidativo, como o envelhecimento, as doenças cardiovasculares, o câncer e as inflamações (HUANG et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2009; PEREIRA et al., 2009).

### **1.1 O consumo moderado de bebidas ricas em compostos antioxidantes pode estar associado a prevenção de doenças decorrentes do estresse oxidativo?**

Os dados da literatura vêm mostrando a presença de compostos antioxidantes em bebidas alcoólicas como vinho, cerveja e uísque. Existem vários relatos sobre a relação entre o consumo moderado destas bebidas e a prevenção de doenças cardiovasculares, tipos de câncer, doenças neurodegenerativas, diabetes, alergias, osteoporose, entre outras. Estas propriedades estão associadas à diversidade de compostos antioxidantes presentes nestas bebidas, como ácidos fenólicos, flavonoides, lignanas e estilbenos. A diversidade de compostos antioxidantes possibilita, em determinadas bebidas, diferentes interações/proteção dos principais alvos biológicos, sendo crucial para alguns efeitos benéficos e promotores da saúde (FERNANDES et al., 2017; SOCHA et al., 2017; BARTOSZEK; POLAK, 2012).

Estudos realizados em amostras de uísque relatam a presença de compostos fenólicos como vanilina, siringaldeído, coniferaldeído, ácido vanílico e ácido gálico, encontrados na madeira que constitui o barril de carvalho. Assim, alguns pesquisadores têm avaliado a capacidade antioxidante destas bebidas *in vivo* e *in vitro* (NG; LAFONTAINE; HARNOIS, 2000; JELEN; MAJCHER; SZWENGIEL, 2019). Nesse caso, Duthie et al. (1998) analisaram a capacidade antioxidante de vinho e uísque em processos de oxidação no plasma, apontando que a capacidade antioxidante do uísque foi 40% menor quando comparada à do vinho. Contudo, o efeito redutor e a concentração de compostos fenólicos perduraram por mais tempo (120 min.).

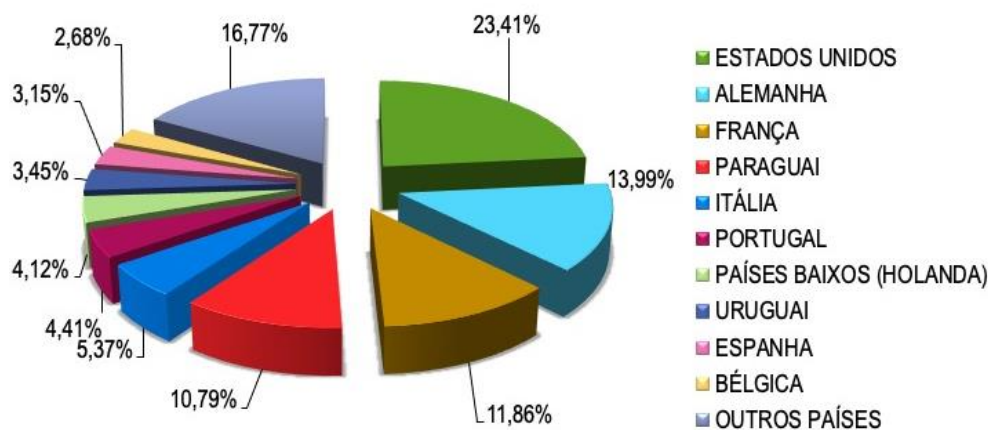
Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2018), as bebidas destiladas são as mais consumidas no mundo (44,8%), seguida pela cerveja (34,3%) e o vinho (13,5%). Nas Américas, a cerveja é a bebida mais consumida, seguida pelos destilados (31,7%) e o vinho

(13,5%). O padrão de consumo de bebidas alcoólicas no Brasil segue a mesma tendência do continente americano: cerveja (62%), destilados (34%) e vinho (3%) (WHO, 2018).

Ainda no Brasil, a bebida destilada mais consumida é a cachaça. Os principais estados consumidores são: São Paulo, Pernambuco, Rio de Janeiro, Ceará, Bahia e Minas Gerais. Em 2020, apesar da pandemia de COVID-19, a bebida brasileira foi exportada para 70 países por meio de 50 empresas exportadoras, gerando uma receita de US\$ 9,52 milhões (equivalente a 7,75 milhões de litros). Em 2020, os principais países de destino em valor foram: Estados Unidos, Alemanha, Paraguai, Portugal e Itália (Figura 1.1, com base na IBRAC, 2019).

Segundo o Instituto Brasileiro de cachaça (IBRAC), o Brasil tem uma capacidade instalada de produção de aproximadamente 1,2 bilhões de litros por ano, todavia, tem produzido menos de 800 milhões de litros. Os dados do censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) apontam a existência de 11.024 estabelecimentos produtores no país. Porém, apenas 1.086 destes são devidamente registrados no Ministério de Agricultura e Receita Federal (IBRAC, 2021; IBGE, 2016).

**Figura 1.1 – Principais países importadores de cachaça em 2020 em circulação de capital (valor total: US\$ 9.522.400,00)**



Fonte: Adaptado de IBRAC (2020).

Em termos conceituais, a legislação brasileira na forma do Decreto nº 6871/2009, define cachaça em seu art. 53 como “*denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de trinta e oito a quarenta e oito por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar*” (BRASIL, 2009), com características organolépticas próprias, podendo ser adicionada de até seis gramas de açúcares por litro.

O Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu parâmetros mínimos para a classificação da bebida envelhecida produzida a partir da cana-de-açúcar, na qual é classificada como uma bebida que contém 50% da bebida envelhecida em um barril (de uma determinada madeira) de capacidade máxima de 700 litros por um período não inferior a um ano. Ainda há a classificação *premium*, relacionada a bebida com 100% da aguardente envelhecida em barril (700 L de capacidade máxima) por um período não inferior a um ano. E, por fim, a *extra premium*, que é análoga a *premium*, porém com o tempo de envelhecimento no barril não inferior a três anos (BRASIL, 2005).

A qualidade da cachaça *premium* e *extra premium* depende de diversos fatores: a qualidade inicial do destilado, o tipo de madeira do barril de armazenamento e o tempo de envelhecimento. O armazenamento das bebidas em barris garante a migração entre as substâncias presentes na madeira e na bebida. A troca entre os componentes da madeira e a cachaça promovem reações entre os componentes voláteis não alcoólicos gerados na destilação melhorando aspectos sensoriais da bebida (NISHIMURA; MATSUYAMA, 1989).

Devido ao elevado custo dos barris de carvalho, que são importados dos Estados Unidos e da Europa, os produtores de cachaça compram barris já usados na maturação de outras bebidas, comprometendo a qualidade do produto brasileiro. Deste modo, o uso de barris de madeiras nativas da flora brasileira tem sido uma alternativa avaliada para o envelhecimento da cachaça, pois além da redução dos custos, reforça a identidade da cachaça como uma bebida tipicamente brasileira.

Entre as madeiras nativas mais utilizadas estão: amendoim (*Pterogyne nitens*), cerejeira (*Amburana cearensis*), cedro (*Cedrela fissilis*), jatobá (*Hymenaea carbouril*), ipê (*Tabebuia sp*), freijó (*Cordia goeldiana*), garapa (*Apuleia leiocarpa*), bálsamo (*Myroxylon peruiferum*), vinhático amarelo (*Plathymenia foliosa*) e jequitibá (*Cariniana legalis*), entre outras (MORI, et al., 2003; VICENTE, 2011). Apesar de ser uma bebida tradicionalmente brasileira e bastante exportada para o exterior, a produção de cachaça não é padronizada. Assim, estudos são essenciais para o controle e o aprimoramento da bebida produzida e estes fatores possibilitam o aumento da aceitabilidade da cachaça por diversos públicos bem como do seu valor agregado (MIRANDA et al., 2006; MENDONÇA-FILHO, 2014).

Diante do contexto, motivado pela demanda do mercado externo, existe uma preocupação entre os produtores e os pesquisadores para estabelecer parâmetros qualitativos e quantitativos quanto à composição orgânica das bebidas para o monitoramento e melhoramento do produto final. Neste contexto, diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar

a composição química das bebidas envelhecidas em barris de diferentes madeiras, para garantir uma maior variabilidade do produto (ODELLO et al., 2009).

Nesse sentido, Silva et al. (2009) avaliaram a composição química de amostras de cachaça envelhecidas em barris de diferentes madeiras nativas da flora brasileira e carvalho (americano e europeu). Os autores identificaram a boa variedade de compostos fenólicos e também a existência de dezesseis compostos antioxidantes: catequina, coniferaldeído, cumarina, ácido elágico, epicatequina, eugenol, ácido gálico, miricetina, quercetina, escopoletina, sinapaldeído, siringaldeído, ácido siríngico, *trans*-resveratrol, ácido vanílico e vanilina.

Diante do exposto, este trabalho buscou avaliar e responder as seguintes questões: *Os compostos fenólicos extraídos durante o processo de maturação das bebidas agregam à cachaça características antioxidantes? Há uma proporcionalidade entre o tempo de maturação e a capacidade antioxidante de cachaças envelhecidas? A reutilização dos barris para o envelhecimento de novas bebidas produz perdas significativas quanto ao perfil antioxidante? Qual a influência do tempo e da madeira neste processo quanto às propriedades antioxidantes da cachaça?*

## **1.2 Métodos para determinação da capacidade antioxidante: aplicabilidade, limitações e desafios**

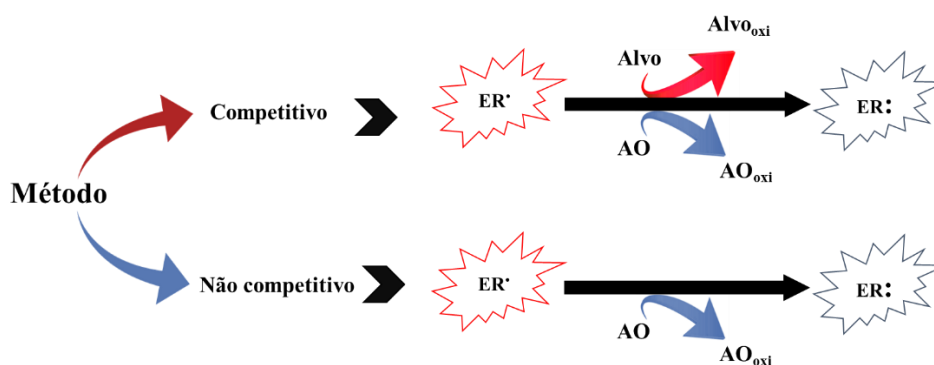
Há uma grande diversidade de metodologias analíticas para a determinação da capacidade antioxidante ( $C_{AO}$ ) de bebidas, alimentos e amostras biológicas. Não há um consenso quanto as metodologias e os parâmetros reacionais para a avaliação das amostras de interesse. Fatores como a diversidade e a reatividade de EROs e ERNs, bem como os diferentes mecanismos de oxidação dificultam o desenvolvimento de um método padronizado que possa quantificar a capacidade antioxidante nos diversos sistemas de interesse (DAVID et al., 2010). A Tabela 1.2 apresenta as condições reacionais de uma série de metodologias aplicadas para determinação da  $C_{AO}$  em diferentes sistemas.

De forma geral, as metodologias se baseiam na capacidade de sequestro de EROs e ERNs específicos, na habilidade de sequestrar radicais não biológicos e na capacidade redutora da amostra frente a agentes oxidantes. Os mecanismos comumente explorados são por transferência de elétrons (TE) e/ou de átomo de hidrogênio (TAH). Os ensaios empregados para determinação da capacidade antioxidante *in vitro* se pautam em dois princípios: (i) O princípio competitivo, onde o alvo – que pode ser representado por uma biomolécula que deveria ser



atacada *in vivo* ou uma sonda – e os compostos antioxidantes competem pela espécie reativa (radicalar ou não). Nesse sistema, a capacidade antioxidante é verificada a partir da variação do sinal analítico obtido pela sonda e/ou biomolécula alvo e (ii) Os ensaios não competitivos, onde os compostos antioxidantes interagem diretamente com as espécies reativas sem que haja uma espécie alvo concorrente, e a sonda analítica para monitorar a reação é a espécie reativa (MAGALHÃES et al., 2008) (Figura 1.2).

**Figura 1.2 – Princípios das metodologias analíticas para determinação da capacidade antioxidante.**



Fonte: Elaborado pelo autor (2021) – Adaptado de Magalhães et al., 2008

Métodos e estratégias vêm sendo desenvolvidos para minimizar as divergências dos resultados obtidos pelos diferentes ensaios empregados. A complexidade das amostras de alimentos e bebidas tem dificultado a quantificação da capacidade individual dos compostos antioxidantes, com isso, grande parte das metodologias determinam a capacidade antioxidante total (HUANG et al., 2005). De maneira geral, há uma dificuldade de comparação entre os resultados obtidos, pois não há uma padronização dos métodos empregados.

Um dos problemas mais críticos está no composto empregado como padrão de calibração, que muitas vezes não tem correlação com a amostra analisada (MAGALHÃES et al., 2008). Os compostos mais empregados são: trolox, ácido gálico, quercetina, ácido cafeico, ácido ascórbico, entre outros. E isto varia de acordo com o método, o grupo de pesquisa e a natureza da amostra. Segundo David et al. (2010), as divergências apresentadas na literatura serão minimizadas devido ao desenvolvimento e aperfeiçoamento de métodos mais seletivos capazes de definir em quais condições e quais produtos são inibidos e formados pelos antioxidantes.

Em função dos aspectos abordados anteriormente, Prior et al. (2005) propuseram uma série de requisitos para padronização de métodos analíticos desenvolvidos para a determinação da capacidade antioxidante *in vitro*. Para os autores, um método para determinar a  $C_{AO}$  deve:

(i) utilizar de espécies (radicalares ou não) de relevância biológica, (ii) de aplicação simples e rápida, (iii) ter mecanismo de ação e ponto final definido, (iv) instrumentação prontamente disponível, (v) boa reprodutibilidade, (vi) ser adaptável para antioxidantes de caráter hidrofílico e lipofílico e (vii) que apresente alta frequência analítica visando análises de rotina e controle de qualidade. Além disso, devem ser considerados aspectos relativos à faixa analítica de trabalho, efeito de matriz, repetitividade e reconhecimento de possíveis interferentes.

Como pode ser observado na Tabela 1.2, de modo geral, as metodologias analíticas para determinação da capacidade antioxidante não mimetizam as condições fisiológicas. Esta condição limita a qualidade dos resultados, pois não avaliam a eficiência das moléculas de forma análoga às condições que elas vão atuar após a sua ingestão. Alguns métodos citados empregam condições fisiológicas e espécies reativas presentes no meio fisiológico. Contudo, o custo pode ser elevado. Em meio a estes métodos, se ressalta o ensaio da capacidade de absorção de oxigênio (ORAC, do inglês, “*Oxygen Radical Absorbance Capacity*”) que utiliza a *R*-ficoeritrina como sonda fluorescente (1,0 mg custa R\$ 1.412,00), a capacidade antioxidante total (TRAP, do inglês, “*Total Radical Trapping Antioxidant Parameter Assay*”), a inibição da peroxidação lipídica (1,0 g de ácido linoleico custa R\$ 534,00) e o ensaios quimioluminescentes que empregam luminol como sonda analítica (5 g custam R\$ 376,00) (Sigma Aldrich, 2021).

O ensaio para avaliar radical  $\bullet$ NO por fluorescência molecular (não descrito na Tabela 1.2) usa como sonda analítica o 4,5-diaminofluoresceína (DAF, sendo 1 mg por R\$ 4.898,00) e como fonte de geração do radical com cinética de primeira ordem o 3-(aminopropil)-1-hidroxi-3-isopropil-2-oxo-1-triazino (NOC-5). O NOC-5 foi descontinuado pela Sigma Aldrich no Brasil, sendo importado por US\$ 438,09 por 10 mg (Sigma Aldrich, 2021). Assim, o desenvolvimento de métodos seletivos, rápidos e simples que possam avaliar a capacidade antioxidante em sistemas biológicos simulados é de fundamental importância.

Tabela 1.2 – Métodos empregados para determinação da capacidade antioxidante.

(Continua...)

Método	Espécie reativa	pH	Técnica	Mecanismo	Parâmetro de analítico usado	Amostras	Vantagens e desvantagens
ORAC	ROO <sup>•</sup> , HO <sup>•</sup> , HOO <sup>•</sup> , ONOO <sup>•</sup> e O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> (ERO)	7,4	Fluorescência molecular $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 538 \text{ nm}$	THA	Área sobre a curva	Bebidas, alimentos, sangue e plasma.	A C <sub>AO</sub> é medida a partir da variação da fluorescência da R-ficoeritrina (R-PE). Este método pode ser aplicado a antioxidantes hidro e lipofílicos. Contudo, requer um sistema com temperatura controlada (37°C), pois variações de temperatura diminuem a reprodutibilidade (PRIOR et al. 2005; KARADAG et al., 2009; HUANG et al., 2005).
TRAP	ROO <sup>•</sup> (ERO)	7,4	Fluorescência molecular $\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 575 \text{ nm}$	THA	EC <sub>50</sub>	Soro e plasma	O ensaio TRAP envolve o início da peroxidação lipídica gerando radicais peroxil solúveis em água e é sensível a praticamente todos os antioxidantes que inibem o processo. É relativamente complexo e demorado, exigindo elevada experiência do analista. A instabilidade dos antioxidantes e a presença de proteínas e ácido úrico no fluido biológico possuem efeito significativo no método (PRIOR et al. 2005; MACDONALD-WICKS et al., 2006).
Fenólicos totais (Folin-Ciocalteu (FC))	Fenolatos	10	UV-vis $\lambda_{\text{abs}} = 765 \text{ nm}$	TE	Variação do sinal analítico	Bebidas, alimentos e extratos	O método de FC é simples, rápido e reproduzível, assim tem sido amplamente utilizado no estudo de antioxidantes fenólicos. Vale salientar que o reagente FC não é seletivo a compostos fenólicos. Compostos redutores geram resultados positivos, pois o método baseia-se na capacidade de transferência de elétrons. As medidas são realizadas em meio básico para induzir a formação dos respectivos íons fenolato, capaz de reduzir o reagente de FC (PRIOR et al. 2005; MACDONALD-WICKS et al., 2006).
FRAP (azul da Prússia)	-	6,6	UV-vis $\lambda_{\text{abs}} = 700 \text{ nm}$	TE	Variação do sinal analítico	Bebidas, alimentos e extratos	É uma metodologia simples, rápida, de baixo custo, reproduzível, de fácil automatização, empregada para avaliação da capacidade antioxidante de diversas amostras (DEEPSHIKHA, 2015; BADARINATH et al., 2010). Este método é baseado na capacidade de redução de íons Fe(III), contudo, as condições experimentais do sistema (pH, força iônica, complexo de Fe(II)) não mimetizam as condições fisiológicas.

Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

Tabela 1.2 – Métodos empregados para determinação da capacidade antioxidante.....(Continuação...)

Método	Espécie reativa	pH	Técnica	Mecanismo	Quantificação	Amostras	Vantagens e desvantagens
FRAP (Fe-TPTZ)	-	3,6	UV-vis $\lambda_{\text{abs}} = 595 \text{ nm}$	TE	Variação do sinal analítico	Bebidas, alimentos, extratos, plasma.	O FRAP é simples, rápido, barato e robusto. Pode ser automatizado ou manuais. No entanto, o ponto final da reação entre o complexo de ferro e com ácido cafeico, ácido tânico, ácido ferúlico, ácido ascórbico, e quercetina, pode durar horas, comprometendo a aplicação da metodologia. Outra limitação importante é que compostos tiólicos como a glutathione não reduzem o complexo (BADARINATH et al., 2010; PRIOR et al 2005; KARADAG et al., 2009).
CUPRAC	-	3,6 a 10,0	UV-vis $\lambda_{\text{abs}} = 450 \text{ nm}$	TE	Variação do sinal analítico	Bebidas, alimentos, extratos.	O CUPRAC tem vantagens sobre o FRAP para ensaios antioxidantes em que todas as classes de antioxidantes, incluindo tióis. A cinética é mais rápida, contudo, como no FRAP, antioxidantes volumosos e amostras complexas reagem lentamente (30-60 min) com o complexo de cobre, requerendo a otimização da cinética reacional das amostras analisadas (BADARINATH et al., 2010; PRIOR et al 2005; KARADAG et al., 2009; MACDONALD-WICKS et al., 2006).
TEAC	ABTS <sup>•+</sup> (ERN)	7,4	UV-vis $\lambda_{\text{abs}} = 735 \text{ nm}$	TE / THA	EC <sub>50</sub>	Bebidas, alimentos, extratos e amostras biológicas.	O ABTS <sup>•+</sup> reage com grande variedade de compostos antioxidantes (30 min) e pode ser usado em uma ampla faixa de pH. No entanto, tem mostrado limitações quanto a análise de amostras complexas, pois o ponto final é comprometido. Outra limitação é a oxidação prévia do ABTS com persulfato por 16 h para a formação do radical (KARADAG et al., 2009; DEEPSHIKHA, 2015).
DPPH	DPPH <sup>•</sup> (ERN)	-	UV-vis $\lambda_{\text{abs}} = 515 \text{ nm}$	THA / TE	EC <sub>50</sub>	Bebidas, alimentos e extratos.	Método é simples, rápido e de instrumentação disponível a grande parte dos laboratórios. O DPPH <sup>•</sup> é comercial. Muito utilizado para determinação da C <sub>AO</sub> . No entanto, os carotenoides são interferentes, pois apresentam absorção na mesma região. Antioxidantes volumosos reagem lentamente, ou sequer reagem com o radical, devido ao impedimento estérico (PRIOR et al 2005; KARADAG et al., 2009).

Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

Tabela 1.2 – Métodos empregados para determinação da capacidade antioxidante.

.....(Continuação...)

Método	Espécie reativa	pH	Técnica	Mecanismo	Quantificação	Amostras	Vantagens e desvantagens
Clareamento de crocina e de $\beta$ -caroteno	ROO <sup>*</sup> (ERO)	7,0	UV-vis $\lambda_{\text{abs}} = 440 \text{ nm}$	TAH	EC <sub>50</sub>	Bebidas e alimentos	Esta metodologia permite a avaliação da capacidade antioxidante das amostras baseado em parâmetros cinéticos. O controle da temperatura é um ponto crítico. A crocina não é comercialmente disponível. A sonda é extraída da planta <i>Crocus sativus L.</i> Muitos pigmentos alimentares absorvem na mesma região da sonda. O $\beta$ -caroteno, frequentemente usado como alvo (sonda), pode sofrer descoloração por múltiplas vias dificultando a interpretação dos resultados (MACDONALD-WICKS et al., 2006; PRIOR et al 2005; KARADAG et al., 2009).
Inibição de peroxidação lipídica	ROO <sup>*</sup> (ERO)	7,4	UV-vis $\lambda_{\text{abs}} = 234 \text{ nm}$	TAH	Variação do sinal analítico	Amostras de alimentos e extratos	Este método induz artificialmente a auto oxidação do ácido linoleico, LDL ou proteínas séricas sem isolamento prévio. A reação pode ser em sistemas micelares ou aquo-orgânicos. Em água, o ácido linoleico pode formar micelas e dificultar a medida direta. A utilização de Cu(II) como gerador de radical ROO <sup>*</sup> , é um limitante, pois os compostos antioxidantes podem atuar como pró-oxidantes (MACDONALD-WICKS et al, DAVID et al., 2010).
Capacidade de sequestro de <sup>*</sup> NO (reagente de Griess)	<sup>*</sup> NO (ERN)	7,4	UV-vis $\lambda_{\text{abs}} = 446 \text{ nm}$	TE	% Inibição e variação do sinal analítico	Bebidas, alimentos e amostras biológicas	Neste método, o óxido nítrico ( <sup>*</sup> NO) é gerado a partir decomposição do nitroprussiato em pH fisiológico. A medida é feita de forma indireta, pois o reagente de Griess reage com nitrito, gerado a partir da oxidação do <sup>*</sup> NO não sequestrado pela amostra. A medida da capacidade antioxidante das amostras é comprometida, pois os compostos podem ser oxidados pelo radical e/ou pelo nitroprussiato. O ensaio antioxidante tem a duração de ~3 h para cada amostra, dificultando a sua automatização, bem como a aplicação para avaliação de parâmetro de qualidade (ALAM et al., 2012).

Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

Tabela 1.2 – Métodos empregados para determinação da capacidade antioxidante.

.....(Continuação...)

Método	Espécie reativa	Ph	Técnica	Mecanismo	Quantificação	Amostras	Vantagens e desvantagens
Lipoproteína de baixa densidade (LDL)	ROO <sup>•</sup> (ERO)	7,4	UV-vis $\lambda_{\text{abs}} = 234 \text{ nm}$	THA	Varição do sinal analítico	Extratos de vegetais	Este método tem como vantagem a utilização de um alvo biológico para monitorar a eficiência do antioxidante frente ao radical ROO <sup>•</sup> . Contudo, a reprodutibilidade dos resultados é comprometida, visto que a LDL é extraída de indivíduos diferentes. Além disto, o método sofre grande interferência espectral, pois grande parte dos compostos orgânicos absorvem próximo à 234 nm (MACDONALD-WICKS et al., 2006; ALAM et al., 2012).
Capacidade antioxidante total (TOSC)	<sup>•</sup> OH, LO(O) <sup>•</sup> e ONOO <sup>•</sup> (ERO e ERN)	-	Cromatografia gasosa	THA	% Inibição	Alimentos e extratos	O método é baseado na oxidação do ácido $\alpha$ -ceto- $\gamma$ -metiolbutírico (KMBA) gerando etileno. É um método robusto, pois permite a avaliação da C <sub>AO</sub> frente a ERs de interesse biológico. Contudo, o método não é facilmente adaptável para análises de alto rendimento, pois requer múltiplas injeções de uma única amostra em CG. Não existe uma relação linear entre a cinética reacional e a inibição das amostras (HUANG et al., 2005; KARADAG et al., 2009)
Ensaio quimioluminescente (CL)	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> , <sup>•</sup> OH, HOCl, LO(O) <sup>•</sup> , OONO <sup>•</sup> e <sup>1</sup> O <sub>2</sub>		Luminescência molecular (430-455 nm)	THA	% Inibição	Amostras biológicas	A variação do TRAP permite a avaliação dos compostos antioxidantes frente a ERs de interesse biológico empregando luminol como sonda analítica. O método é adaptável a sistemas automáticos e a utilização de microplacas. Contudo, a variação do sinal do luminol é dependente da espécie reativa no sistema, assim, o uso de vários oxidantes simultaneamente pode dificultar a interpretação dos resultados (PRIOR et al., 2005).

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Moléculas presentes no sistema fisiológico que possuem propriedades espectroscópicas diferentes quando oxidadas podem ser uma alternativa para o desenvolvimento de sondas e métodos para determinar a capacidade antioxidante (MAGALHÃES et al., 2008). Nesta perspectiva, a tiamina (vitamina B1) surge como uma possibilidade de sonda para o desenvolvimento de métodos analíticos para determinação da  $C_{AO}$ . Em meio biológico a tiamina sofre reações de oxidação por via enzimática ou pelo ataque de espécies reativas. Entre os produtos de oxidação, se destaca o tiocromo, que diferente da tiamina, apresenta rigidez estrutural, planaridade e elevada conjugação (FUJIWARA; MATSUI, 1953; LIDDICOAT et al., 2015). Portanto, este composto apresenta fluorescência intrínseca e quando excitado com radiação eletromagnética na região do UV ( $\lambda_{ex} = 370 \text{ nm} / \phi = 0,28$ ) tem sido utilizado como sonda para quantificação de vitamina B1 em amostras de alimentos e fluidos biológicos. Entre os oxidantes mais utilizados para determinação da tiamina *in vitro* é o  $K_3Fe(CN)_6$  que se sobressai (PREEDY, 2013; TAN, et al., 2015).

Dentre as espécies reativas de oxigênio produzidas pelo organismo, o ácido hipocloroso (HOCl) têm se destacado nos últimos anos. Em elevadas concentrações, esta ERO está associada a processos inflamatórios que podem causar danos a tecidos mesmo na ausência de um agente infeccioso (KOCH et al., 2021). Dentre as patologias associadas ao excesso de HOCl destacam-se doenças inflamatórias como artrite reumatoide (PROKOPOWICZ et al., 2012), doenças neurodegenerativas (PANASENKO et al., 2013), cardiovasculares (XXXX), diabetes (ZANG et al., 2011), aterosclerose (GURODKO et al., 2016) colite ulcerativa (CERANOWICZ et al., 2017) e COVID-19 (LAFORGE et al., 2020).

Diante do exposto, estudos têm sido desenvolvidos para avaliação da atividade de MPO como biomarcador assim como possível alvo terapêutico. Assim, em função da demanda, diversas estratégias têm sido utilizadas para a síntese de sondas fluorescentes seletivas a HOCl. A maioria das sondas sintetizadas são baseadas no conceito OFF-ON, ou seja, a oxidação da sonda pelo HOCl gera um produto fluorescente. Grande parte das sondas sintetizadas possuem em sua estrutura mais de um centro fluoróforo. O *design* das estruturas sintetizadas permite que a reação destas moléculas com o HOCl (ou  $ClO^-$ ) provoque aumento ou diminuição da intensidade de fluorescência para cada centro emissor, permitindo assim, a avaliação ratiométrica, aumentando a seletividade dessas sondas e suas possibilidades de aplicação como marcadores para imageamento para sistemas *in vivo*. Como pôde ser observado na Tabela SB7 (Apêndice B), as variações nos sinais de fluorescência ocorrem por meio de diversos mecanismos como a clivagem de ligações C=C conjugadas, a oxidação de grupos tiólicos, a formação de cloroaminas, reações de desformilação, dentre outros.

A oxidação da tiamina a tiocromo foi utilizada para determinação de  $\text{ClO}^-$  em amostras de água. A partir do estudo que Zhu et al. (2014) desenvolveram, chegaram-se a constatação que a concentração de  $\text{ClO}^-$  ocorre de forma indireta. Para a quantificação, os autores usaram a seguinte estratégia: inicialmente o  $\text{ClO}^-$  oxida o  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  em excesso, em seguida, o produto oxidado ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ) reage com a tiamina em meio básico (pH 12) gerando tiocromo. Porém, os autores indicaram que o  $\text{ClO}^-$  não é capaz de oxidar a tiamina a tiocromo nas condições avaliadas, além disso, não foi avaliada a eficiência do  $\text{HOCl}$  nesse processo. Adicionalmente, não existem sondas comerciais seletivas a quantificação de ácido hipocloroso.

Logo, em função do que foi exposto nesta etapa do trabalho, se buscou avaliar as seguintes questões: *A inibição da oxidação da tiamina a tiocromo pode ser utilizado princípio de um método para avaliação da capacidade sequestradora de  $\text{HOCl}$  frente a compostos antioxidantes, tiólicos e anti-inflamatórios em condições fisiológicas simuladas? A tiamina irá apresentar seletividade ao  $\text{HOCl}$  comparada a espécies reativas de oxigênio e nitrogênio? A tiamina pode ser utilizada como uma sonda fluorimétrica para determinação do  $\text{HOCl}$  em meio celular?* A segunda etapa do trabalho desenvolvido buscou avaliar tais aspectos.



### 1.3 Objetivos gerais

Diante da importância dos compostos antioxidantes na prevenção dos danos causados pelo estresse oxidativo, os objetivos gerais deste trabalho foram:

- (i) Avaliar a capacidade antioxidante de cachaças envelhecidas em nove barris de madeiras, sendo a maioria nativas na flora brasileira, como: jequitibá (*Cariniana sp.*, Lecythidaceae), bálsamo (*Myroxylon balsamum*, Leguminosae), peroba (*Paratecoma peroba*, Bignoniaceae), jatobá (*Hymenaea spp.*, Leguminosae), itaúba (*Mezilaurus itauba*, Lauraceae), jaboti (*Erisma uncinatum*, Vochysiaceae), timborana (*Piptadenia suaveolens*, Leguminosae) e umburana (*Amburana cearenses*, Leguminosae);
- (ii) Desenvolver e otimizar uma metodologia analítica simples, rápida, sensível e de baixo custo, utilizando uma molécula biologicamente ativa para determinação da capacidade de sequestro de HOCl de compostos antioxidantes, tiólicos e anti-inflamatórios.

### 1.4 Contribuições para a sociedade

A avaliação da capacidade antioxidante de cachaças envelhecidas em madeiras nativas da flora brasileira é de suma relevância para o aprimoramento da qualidade da bebida produzida no Brasil. Além dos benefícios associados à proteção contra os danos causados pelo estresse oxidativo, a presença dos diversos compostos antioxidantes característicos das madeiras propicia a produção de uma maior variedade de bebidas e reforça a identidade da bebida como tipicamente brasileira. Todos estes benefícios podem levar ao aumento da rentabilidade produtiva através da exportação e da abrangência de diferentes públicos.

Nessa perspectiva, o estado de Alagoas tem um grande potencial para a produção deste tipo de bebida, pois tem tradição na produção de produtos oriundos da cana-de-açúcar. De acordo com os dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), em decorrência da crise financeira sofrida pelas usinas de cana-de-açúcar no território alagoano, a produtividade vem diminuindo, todavia, os dados também apontam que em 2018/19, cerca de 293,2 mil hectares de terra, foram destinados ao plantio da cana, apesar do estado não ser o maior representante entre os grandes produtores de cachaça.

O desenvolvimento de sondas e metodologias analíticas para a avaliação da capacidade antioxidante e sequestradora de espécies reativas é essencial para o desenvolvimento de diversas áreas, como qualidade de alimentos, planejamento de fármacos e avaliação de

substâncias biologicamente ativas. A determinação da capacidade antioxidante frente a espécies reativas presentes no meio biológico em condições fisiológicas tem sido um grande desafio para pesquisadores em todo o mundo. Diversas sondas têm sido sintetizadas para a determinação seletiva de EROs e ERNs. No entanto, elas possuem estruturas complexas que dificultam a sua obtenção e elevam o custo da síntese.

Outra grande limitação é a possível toxicidade das moléculas sintetizadas que inviabilizam a realização de estudos *in vivo*. Entre as espécies reativas mais relevantes no meio biológico destaca-se o ácido hipocloroso que possui um papel fundamental no organismo, atuando no sistema imunológico, na sinalização celular e na homeostase. Entretanto, elevadas concentrações de HOCl estão associadas a processos inflamatórios. Estudos relacionados a COVID-19, mostram uma relação muito importante entre as complicações e mortalidade de pessoas acometidas com a doença em decorrência do excesso de HOCl produzido pelo processo inflamatório causado pelo vírus SARS COV-2 (LAFORGE et al., 2020; GOUD; BAI; ABUSOUD, 2021).

Ainda não há uma sonda comercial seletiva para a determinação de HOCl. Neste sentido, a determinação seletiva da capacidade sequestradora de HOCl de diferentes compostos e anti-inflamatórios, empregando a tiamina como sonda, possibilita a avaliação destas moléculas diante de um sistema composto por substâncias que estão presentes e são atuantes em condições de estresse oxidativo real. Métodos com estas características, podem ser aplicados para a seleção de novas substâncias naturais e sintéticas capazes de inibir o efeito danoso de concentrações elevadas de HOCl no organismo.

## REFERÊNCIAS

- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 143-152, 2013.
- BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **The American Journal of Medicine**, v. 109, p. 33-44, 2000.
- BADARINATH, A. V. et al. A Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations and Considerations. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, n. 2, p. 1276-1285, 2010.
- BARBIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **Physiology in Medicine**, v. 109, p. 33-44, 2000.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. N.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química. Nova**, v.29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BARTOSZEK, M.; POLAK, J. An electron paramagnetic resonance study of antioxidant properties of alcoholic beverages. **Food Chemistry**, v. 132, p. 2089-2093, 2012.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130,1999.
- BIRBEN, E. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **WAO Journal**, v. 5, p. 9-19, 2012.
- BRASIL. DECRETO Nº 6.871, DE 4 JUN. 2009. **Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas.**
- CERANOWICZ, P. et al. Essential role of growth hormone and IGF-1 in therapeutic effect of ghrelin in the course of acetic acid-induced colitis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1-14, 2017.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, v. 5 - Safra 2018/19, n. 2 - Segundo levantamento**, Brasília: 1-86, 2018.
- DAVID, J.M. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- DEEPSHIKHA G. Methods for determination of antioxidant capacity: a review. **International Journal Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, n. 2, p. 546-566. 2015.
- DUTHIE, G. G. et al. The effect of whisky and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 52, p. 733-36, 1998.

EKINCI, A. F. N.; GULCIN, İ; ALWASEL, S. A Comparative study on the antioxidant effects of hesperidin and ellagic acid against skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, p. 114-118, 2016.

ELMASTAS, M. et al. Antioxidant activity of an Anatolian herbal tea- *Origanum minutiflorum*: isolation and characterization of its secondary metabolites. **International Journal of Food Properties**, v. 21, n. 1, p. 374-384, 2018.

FERNANDES, I. et al. Wine Flavonoids in Health and Disease Prevention. **Molecules**, v. 22, p. 292-232, 2017.

FERRIÈRES, J. The French Paradox: Lessons For Other Countries. **Heart**, v. 90, p. 107-111, 2004.

FRANÇA, B. K. et al. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 20, n. 5, p. 199-206, 2013.

FUJIWARA, M.; MATSUI, K. Determination of Thiamine by the Thiochrome Reaction. **Analytical Chemistry**, v. 25, n. 5, p. 810-812, 1953.

GABRUSIEWICZ, K.; COLWELL, N. A.; HEIMBERGER, A.B. **Translational Immunotherapy of Brain Tumors**. Chapter 4 - The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Immunosuppression in Brain Tumors. London: Elsevier, p. 63-82, 2017

GORUDKO, I. V. et al. Binding of human myeloperoxidase to red blood cells: Molecular targets and biophysical consequences at the plasma membrane level. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 591, 87-97, 2016.

GOUD, P. T.; BAI, D.; ABU-SOUD, H. M. A Multiple-Hit Hypothesis Involving Reactive Oxygen Species and Myeloperoxidase Explains Clinical Deterioration and Fatality in COVID-19. **International Journal of Biological Sciences**, v. 17, p. 62-72, 2021

GULCIN, I. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. **Archives of Toxicology**, v. 94, p. 651-715, 2020.

HALLIWELL, B.; CROSS, E. C. Oxygen-derived Species: Their relation to human disease and environmental stress. *Environmental Health Perspectives*, v. 102, n. 10, p. 5-12, 1994.

HALLIWELL, B.; MURCIA, M.A.; CHIRICO, S.; ARUOMA, O.I **Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work**. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 35, p. 7-20, 1995.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

HUANG, G-J. et al. Inhibition of reactive nitrogen species in vitro and ex vivo by thioredoxin h2 from sweet potato 'Tainong 57' storage roots. **Food Chemistry**, v. 131, p. 552-557, 2007.

HUSAIN, S. R.; CILLARD, J; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2489-2491, 1987.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Disponível em:  
<<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9827-censo-agropecuario.html?>> acesso em 15 jul 2021.

IBRAC – Instituto Brasileiro da Cachaça, Disponível em:  
<<http://www.ibrac.net/index.php/servicos/estatisticas/mercado-externo>> acesso em 15 jul 2021.

JABUREK, M. et al. Hydroperoxy fatty acid cycling mediated by mitochondrial uncoupling protein UCP-2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 53097-53102, 2004.

JELLEN, H. H.; MAJCHER, M.; SZWENGIEL, A. Key odorants in peated malt whisky and its differentiation from other whisky types using profiling of flavor and volatile compounds. **LWT- Food Science and Technology**, v. 107, p. 56-63, 2019.

KANG, J. A solvent depend on ratiometric fluorescent probe for hypochlorous acid and its application in living cells. **Dyes and Pigments**, v. 136, p. 852-858, 2017.

KARADAG, A.; OZEELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, p. 41-60, 2009.

KOCH, M. S. et al. General aspects of Myeloperoxidase and its involvement in diseases: a brief review. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 28677-28691, 2021.

LAFORGE, M. et al. Tissue damage from neutrophil-induced oxidative stress in COVID-19. **Nature Reviews**, v. 20, p. 515-516, 2020.

LIDDICOAT, C. et al. Thiamin analysis in red wine by fluorescence reverse phase-HPLC. **Food Chemistry**, v. 177, p. 325-329, 2015.

MACDONALD-WICKS, L. K.; WOOD, L. G.; GARG, M. L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. **Journal Science Food Agriculture**, v. 86, p. 2046-2056, 2006.

MAGALHÃES, L.M.; SEGUNDO, M.A.; REIS, S.; LIMA, J.L.F.C. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, p. 1-19, 2008.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Instrução normativa nº 13 de 29/6/ 2005, Diário Oficial da União, Brasília, 30/6/2005, Seção 1, acesso em 15 jul. 2021.

MENDONÇA-FILHO, J. R. H. **efeito do tempo de armazenamento na composição inorgânica, capacidade antioxidante e fenólicos totais em cachaças durante o processo de envelhecimento em barris de diferentes madeiras**. Maceió: Dissertação (mestrado), 2014.

MIRANDA, M. B.; HORII, J; ARCADE, A. R. Estudo do efeito da irradiação gamma ( $^{60}\text{Co}$ ) na qualidade da cachaça e no tonel de envelhecimento. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 4, p. 772-778, 2006.

MORI, F. A. *et al.* Use of wood of *Eucalyptus sp* and native in the storage of the sugar cane spirit. **Food Science and Technology**, v. 23, n. 3, p. 396-400, 2003.

NAGENDRAPPA, G. An appreciation of free radical chemistry 3, free radicals in diseases and health. **Resonance**, v. 10, p. 65-74, 2005.

NG, L. K.; LAFONTAINE, P.; HARNOIS J. Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of acids and phenols in distilled alcohol beverages: application of anion-exchange disk extraction combined with in-vial elution and silylation. **Journal of Chromatography A**, v. 873, p. 29-38, 2000.

NISHIMURA, K.; MATSUYAMA. R. **Maturation and maturation chemistry**. The science and technology of whiskies. New York: Longman Scientific & Technical, p. 235-263, 1989.

NÚÑEZ-SELLÉS, A. J. Antioxidant Therapy: Myth or Reality?. **Journal Brazilian Chemistry Society**, v. 16, n. 4, p. 699-710, 2005.

ODELLO, L. *et al.* Avaliação sensorial de cachaça. **Química Nova**, v. 32, p. 1839-1844, 2009.

OLIVEIRA, A. C. *et al.* Fontes vegetais naturais de antioxidantes, **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

PANASENKO, O. M. *et al.* Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems. **Biochemistry**, v. 78, p. 1466-1489, 2013.

PREEDY, V. R. B Vitamins and folate: chemistry, analysis, function and effects. **Neurochemistry International**, 40, 493-504, 2001. Food and Nutritional Components in Focus n. 4, The Royal Society of Chemistry, 2013. Promote neurodegeneration.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for determination os antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

PROKOPOWICZ, Z. *et al.* Neutrophil myeloperoxidase: Soldier and statesman. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 60, p. 43–54, 2012.

RIBEIRO, S. M. R. *et al.* A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

RONSEIN, G. E. *et al.* Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 563-568, 2006.

SEILER, A. *et al.* Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. **Cell Metabolism**, v. 8, p. 237-248, 2008.

SIGMA ALDRICH, Disponível em: < <https://www.sigmaaldrich.com/chemistry.html> > acesso em 10 jul 2021.

SILVA, A. A. et al. Coumarins and phenolic fingerprints of oak and Brazilian woods extracted by sugarcane spirit. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 3681-3691, 2009.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOCHA et al, R. Antioxidant activity and the most abundant phenolics in commercial dark beers. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 1, p. 595-609, 2017.

TAN, H. et al. A sensitive fluorescent assay for thiamine based on metal-organic frameworks with intrinsic peroxidase-like activity. **Analytica Chimica Acta**, v. 856, p. 90-95, 2015.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VICENTE, C. D. **Determinação de Compostos Fenólicos, Capacidade Antioxidante, Congêneres, Contaminantes e Carbamato de Etila em Cachaças Envelhecidas em Barris de Diferentes Madeiras**. Maceió: Tese (Doutorado), 2011.

VINCENT, S. R. Nitric oxide neurons and neurotransmission. **Progress in Neurobiology**, v. 90, p. 246-255, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global status report on alcohol and health 2018**. Geneva: 2018.

ZHANG, W. et al. Inflammation and diabetic retinal microvascular complications. **Journal of Cardiovascular Disease Research**, v. 2, p. 96-103, 2011.

## **2. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE CACHAÇAS ENVELHECIDAS: EFEITO DO TEMPO E DO TIPO DE MADEIRA NO PROCESSO DE ENVELHECIMENTO**

### **2.1 Introdução**

A cachaça é um produto tipicamente brasileiro obtido a partir da destilação simples do caldo da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) fermentado. Este produto possui teor alcoólico entre 38 à 48% (v/v) à 20 °C e características sensoriais próprias, como cor, aroma e sabor (PARAZZI et al., 2008; CASTRO et al., 2020). O processo de envelhecimento é determinante para as características organolépticas da bebida devido a extração de compostos orgânicos a partir da madeira dos barris, a redução do teor alcoólico do destilado o que acentua o sabor, além de melhorar sua qualidade química, levando a um produto final de maior valor agregado (CARVALHO et al., 2020; CASTRO et al., 2020). Em 2019, o consumo de cachaça ocupou o segundo lugar no ranking do mercado de bebidas alcoólicas do Brasil. Em 2020, o país exportou a cachaça (envelhecida e não envelhecida) para 70 países gerando receita de US\$ 10 milhões (6 milhões de litros), sendo os Estados Unidos, Alemanha, França, Paraguai, Itália e Portugal os maiores países importadores (IBRAC, 2021).

Os efeitos do envelhecimento na cachaça são influenciados por vários fatores, tais como o tipo de madeira empregada, o tempo de maturação e a qualidade da bebida usada (VERRUMA-BERNARDI et al., 2012). Além dos componentes majoritários água, etanol e açúcares da cachaça, o processo de maturação no barril é determinante para adição de compostos secundários, uma vez que ocorrem interações físico-químicas cachaça-barril, permitindo a transferência de compostos voláteis e não voláteis da madeira para a bebida durante o processo de envelhecimento. Assim, contribuindo para a riqueza e complexidade sensorial (ou organoléptica) da cachaça (ALCARDE et al., 2014; PARAZZI et al., 2008). Além da extração direta de componentes da madeira do barril, podem ser introduzidos novos compostos a partir da decomposição de algumas macromoléculas ou reações entre os compostos secundários da destilação com compostos provenientes da madeira (BORTOLETTO et al., 2016; SILVELLO et al., 2021).

Diferentemente de outras bebidas destiladas (vodka, tequila, rum, uísque, licor e gim, entre outras), a cachaça é a única bebida na qual são utilizados mais de 30 tipos de madeira para armazenamento e envelhecimento, o que lhe confere uma rica variedade de cores, aromas e sabores. O carvalho é a madeira tradicionalmente empregada na manufatura dos barris para o processo de envelhecimento, fornecendo qualidade sensorial ao destilado por extração de compostos aromáticos e taninos hidrolisáveis da madeira (BORTOLETTO et al., 2016;



MIRANDA et al., 2006). Contudo, além do elevado custo, o carvalho não é uma planta nativa do Brasil e, desta forma, é necessário importá-lo da Europa e América do Norte. Devido à grande diversidade da flora brasileira, outras madeiras têm sido testadas como alternativa para o envelhecimento da cachaça, tais como amburana, bálsamo, jequitibá, jatobá e ipê (DIAS et al., 1998; VICENTE et al., 2011; BORTOLETTO et al., 2013). De forma geral, a cachaça envelhecida possui uma elevada concentração de compostos fenólicos antioxidante que são extraídos da madeira (BETTIN et al, 2002; Dias et al., 1998), com destaque para o ácido gálico, ácido elágico, ácido vanílico, ácido sirínico, quercetina, *trans*-resveratrol, catequina, epicatequina, eugenol, miricetina, dentre outros (AQUINO et al., 2006; BETTIN et al 2002; SILVA et al., 2009).

Diversos estudos demonstram a relação entre o consumo moderado de bebidas alcoólicas como vinho, cerveja e uísque e a prevenção de doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer, doenças neurodegenerativas, diabetes, alergias, osteoporose, entre outras. Estas propriedades estão associadas a diversidade de compostos antioxidantes presentes nestas bebidas como ácidos fenólicos, flavonoides, lignanas e estilbenos. A diversidade de compostos antioxidantes possibilita a proteção de alvos biológicos, sendo crucial para alguns efeitos benéficos e promotores da saúde (FERNANDES et al., 2017; SOCHA et al., 2017; BARTOSZEK; POLAK, 2012).

Embora seja uma bebida de grande tradição nacional, um produto de exportação crescente e de bom retorno econômico, ainda não se tem totalmente estabelecida uma padronização quanto à produção. Assim, é primordial o investimento no aprimoramento e no controle de qualidade da bebida para atender melhor aos padrões do mercado internacional e aumentar o consumo de cachaça por classes sociais mais altas e com maior grau de exigência (MIRANDA et al., 2007).

Desta forma, diante do que foi apresentado, se avaliou o perfil fitoquímico e antioxidante de cachaças envelhecidas em carvalho e em madeiras nativas da flora brasileira para verificar a influência destas na qualidade do produto maturado. Estudos desta natureza são necessários para o beneficiamento do produto, possibilitando a produção de uma bebida de qualidade a nível internacional a partir de insumos nativos e reforçando a identidade da bebida brasileira.

## 2.2 Objetivos específicos

- a)* Avaliar o perfil fitoquímico de cachaças envelhecidas em madeiras da flora nativa brasileira por espectrometria de massas (ESI-);
- b)* Quantificar os compostos fenólicos totais das bebidas envelhecidas empregando o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu;
- c)* Determinar a capacidade antioxidante das amostras de bebidas frente a espécies reativas de nitrogênio em meio hidro e lipofílico por meio dos métodos do ABTS<sup>++</sup> e DPPH<sup>•</sup>;
- d)* Comparar o perfil do sequestro do radical óxido nítrico (<sup>•</sup>NO) dos extratos (cachaças) em função do tempo de envelhecimento e da madeira do barril;
- e)* Avaliar a capacidade de redução de íons Fe(III) das amostras de cachaça empregando o método do azul da Prússia;
- f)* Avaliar os resultados os resultados da capacidade antioxidante das madeiras de forma multivariada.

## 2.3 Experimental

### 2.3.1 Reagentes, soluções e amostras

Todos os reagentes utilizados nos ensaios são de grau analítico de pureza, sem a necessidade de etapas de purificação prévia. As soluções foram preparadas em água ultrapura (condutividade < 0,1  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) obtidas a partir de purificador Mater System MS2000 (GEHAKA, São Paulo, Brazil). As soluções de ácido 2,2'-aziobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) (Sigma-Aldrich, EUA), Folin-Ciocalteu (Vetec, Brasil), hexacianoferrato(III) de potássio (Merk, EUA), sulfato ferroso (Vetec, Brasil), cloreto de ferro(III) (Sigma-Aldrich, EUA), ácido tricloroacético (Vetec, Brasil), nitropussiato de potássio (Merk, EUA), carbonato de sódio (Merk, EUA), monohidrogenofosfato de sódio (Merk, EUA), ácido fosfórico (Merk, EUA), ácido clorídrico (Merk, EUA), ácido ascórbico (Merk, EUA), ácido gálico (Sigma-Aldrich, EUA), hidróxido de sódio (Merk, EUA), persulfato de potássio (Merk, EUA) e cloridrato de naftiletlenodiamino (Sigma-Aldrich, EUA) foram solubilizados em água ultrapura. A solução de sulfonilamida (Vetec, Brasil) foi solubilizada em ácido fosfórico 5% (v/v) (Vetec, Brasil). As soluções de quercetina (Sigma-Aldrich, EUA), ácido cafeico (Sigma-Aldrich, EUA) e Trolox<sup>®</sup> (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (Sigma-Aldrich, EUA). As soluções de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH<sup>•</sup>) foram preparadas diretamente em metanol (Merk, EUA).

### 2.3.2 Amostras de cachaça analisadas

As amostras de cachaça utilizadas neste estudo foram cedidas pela empresa Nunes e Góes Beneficiamento e Comércio de Bebidas Ltda. As bebidas foram envelhecidas em nove barris de 20 L cada, com dimensões 33 cm de diâmetro da base, 28 cm de diâmetro de topo e 44 cm de altura, todos com a mesma geometria (tronco de cone). Os barris adquiridos, foram construídos com madeiras nativas da flora brasileira, com exceção do barril de carvalho (europeu) que foi reformado para a maturação da bebida. As madeiras usadas nos barris foram identificadas botanicamente pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT, São Paulo, Brazil). As madeiras constituintes dos nove barris foram: carvalho (*Quercus sp.*, Fagaceae), jequitibá (*Cariniana sp.*, Lecythidaceae), bálsamo (*Myroxylon balsamum*, Leguminosae), peroba (*Paratecoma peroba*, Bignoniaceae), jatobá (*Hymenaea spp.*, Leguminosae), itaúba (*Mezilaurus itauba*, Lauraceae), jaboti (*Erismia uncinatum*, Vochysiaceae), timborana (*Piptadenia suaveolens*, Leguminosae) e umburana (*Amburana cearensis*, Leguminosae).

A cachaça armazenada nos barris utilizados neste estudo foi adquirida de uma destilaria local, J. Gomes Neto – Me (Joaquim Gomes, Alagoas, Brasil). A bebida foi armazenada nos barris por 12 meses (primeira utilização, Ciclo 1) na posição vertical e no mesmo ambiente de envelhecimento, com pouca iluminação, temperatura entre 19 e 26,5°C, e umidade relativa do ar entre 67 e 80%, registrada três vezes por semana, sempre nos mesmos dias e horários. Após esse período a cachaça envelhecida foi retirada e os barris, lavados com água potável e, após a drenagem de todo o líquido, foi então, reutilizado em um novo ciclo de envelhecimento (segunda utilização, ciclo 2). Para todos os ciclos de reuso dos nove barris adotou-se o mesmo procedimento. As amostras inseridas nos barris eram sempre do mesmo lote. A cada ciclo, 20 L de cachaça não envelhecida (CNE) foram armazenados, em reservatórios de vidro, e mantidos como padrão de comparação.

Vale salientar que todos os ciclos de envelhecimento foram conduzidos de forma convencional, ou seja, sem aditivos de qualquer natureza, como lascas de madeira, pó de serra, extrato, entre outros. O processo de envelhecimento foi acompanhado a partir de amostragens mensais, durante os doze meses do ano e os parâmetros físico-químicos das cachaças envelhecidas eram comparados à CNE (mantida em condições similares às cachaças em processo de envelhecimento). Todas as amostras coletadas foram armazenadas em freezer a -8 °C.

Das amostras armazenadas em freezer, foram retiradas alíquotas de 30 mL e armazenadas a temperatura ambiente antes de proceder as análises. Foram analisadas um total de 56 amostras de cachaça, considerando as CNE e as cachaças em envelhecimento nos barris de nove diferentes tipos de madeiras. Neste estudo foram analisadas a amostras com 3, 6 e 12 meses nos ciclos 1 e 2 de envelhecimento.

### 2.3.3 Preparo das amostras para espectroscopia de massas

Para a avaliação do perfil fitoquímico das amostras por espectrometria de massas foram coletados 5 mL das bebidas envelhecidas por 12 meses e da cachaça não envelhecida. As amostras foram colocadas em sistema de rotaevaporador para a remoção da fração alcoólica da bebida. Em seguida as amostras foram resfriadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 24 h e liofilizada por mais 24 h. A amostra foi então diluída em 1,00 mL de metanol. Para análise se empregou a mistura compostas por 250  $\mu\text{L}$  da amostra, 650  $\mu\text{L}$  de metanol e 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (10% m/v). Por fim, injetou-se 2  $\mu\text{L}$  da solução em um espectrômetro de massa Thermo Fisher LTQ (Massachusetts, USA) TOF-MS/MS modo negativo com fonte de ionização eletrospray.

### 2.3.4 Ensaios antioxidantes

Para esta avaliação da capacidade antioxidante das amostras de cachaça envelhecida e não envelhecidas foram escolhidos três compostos como padrões de referência antioxidante de diferentes classes e grau de hidrofobicidade. Assim, selecionou-se dois compostos fenólicos naturais já reportados na literatura em amostras de cachaça envelhecida: ácido gálico (AG) (ácido fenólico) e quercetina (QU) (flavonoide). Buscando um composto de hidrofobicidade intermediária optou-se pelo Trolox<sup>®</sup> (TR), que é um mimético da vitamina E, tradicionalmente utilizado para determinação da capacidade antioxidante em diversas metodologias. Todos os resultados foram expressos em equivalência de cada composto ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

#### 2.3.4.1 Determinação de compostos fenólicos totais

A concentração de compostos fenólicos totais foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu. Para este ensaio utilizou-se 500  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin-Ciocalteu previamente diluído (1:10) e da solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ( $75 \text{ g L}^{-1}$ ), respectivamente. Em seguida adicionou-se 2,0 mL da amostra ou solução de referência. O volume final foi ajustado para 5 mL com água

deionizada e aguardou-se 30 min. As medidas espectrofotométricas foram realizadas em 770 nm (SANTOS et al., 2015).

#### 2.3.4.2 Ensaio do sequestro do radical DPPH

Para avaliação da capacidade de sequestro do radical DPPH transferiu-se 0,2 mL da solução metanólica do radical DPPH (600  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), 1,0 mL da amostra previamente diluída ou solução de referência e 2,80 mL de uma solução metanólica 30% (v/v). Após 30 min de incubação ao abrigo da luz, realizou-se a medida espectrofotométrica em 527 nm (GRANJA et al., 2018). A capacidade antioxidante foi calculada a partir da inibição do radical pela seguinte equação:

$$\%I = \left[ 1 - \left( \frac{\text{Abs}_{\text{amostra}}}{\text{Abs}_{\text{ref.}}} \right) \right] \times 100 \quad \text{Equação 2.1}$$

#### 2.3.4.3 Ensaio do sequestro do radical ABTS<sup>•+</sup>

Para a realização do método empregando o radical ABTS<sup>•+</sup> procedeu-se de forma similar ao DPPH. Adicionou-se 0,22 mL da solução do radical ABTS<sup>•+</sup> (5 mmol L<sup>-1</sup>) a 1,0 mL da solução padrão ou da amostra previamente diluída e 2,80 mL de água deionizada. Após 15 min realizou-se a medida espectrofotométrica em 734 nm. O sinal de referência foi obtido a partir de uma solução semelhante a anterior, no entanto, a amostra foi substituída por água (GÜLÇİN et al., 2010). A capacidade antioxidante foi calculada de forma análoga ao método DPPH a partir da equação 1. A solução estoque do radical ABTS<sup>•+</sup> 5 mmol L<sup>-1</sup> foi preparada pela dissolução de 26 mg de ABTS e 4 mg de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> em 10 mL de água. Após 16 h de incubação ao abrigo da luz, a solução foi diluída para 25 mL com tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup> com pH ajustado para 7,4 ± 0,1 (SANTOS et al., 2015).

#### 2.3.4.4 Ensaio do sequestro do radical $\cdot\text{NO}$

Para avaliação do sequestro do radical  $\cdot\text{NO}$  adicionou-se 0,5 mL da solução de nitroprussiato de sódio  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em tampão fosfato ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0) e 2,5 mL das amostras ou padrões ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ). O volume final foi ajustado para 5,0 mL. A solução resultante foi incubada à temperatura ambiente por 150 min (MAIA et al., 2010). O sinal de referência (branco) foi obtido a partir de uma solução semelhante a anterior, no entanto, a amostra ou padrão foi substituído por água ultrapura. Em intervalos de 30 min alíquotas de 1,0 mL das amostras incubadas foram coletadas e misturadas a 1,0 mL do reagente de Griess. O cromóforo gerado foi medido em 546 nm (GÜLÇİN et al., 2010).

#### 2.3.4.5 Ensaio de redução de $\text{Fe(III)}$

A avaliação da capacidade de redução de  $\text{Fe(III)}$  foi realizada a partir da adição de 0,75 mL das soluções das amostras ou dos padrões, 1,25 mL da solução  $\text{K}_3[\text{Fe(CN)}_6]$  a 1,0% (m/v) previamente diluída em tampão fosfato pH 6,0 e, 1,25 mL de água ultrapura. A mistura foi incubada por 20 min a  $50^\circ\text{C}$ . Em seguida, adicionou-se 1,25 mL de ácido tricloroacético 10% (m/v) e 0,5 mL de  $\text{FeCl}_3$  a 0,1% (m/v) para a formação do complexo denominado azul da Prússia (cromóforo), o qual apresenta máxima absorvância em 700 nm (GÜLÇİN et al., 2010). O branco foi preparado a partir da substituição do padrão ou da amostra por água ultrapura.

#### 2.3.4.6 Tratamento estatístico dos dados

Os resultados obtidos foram expressos em termo de média  $\pm$  SD, para análises em triplicata ( $n = 3$ ). A avaliação estatística dos resultados para os diferentes métodos empregados foi realizada a partir do teste  $t$  pareado de Student, ANOVA (Análise de Variância) e a partir de análise correlação baseado em procedimentos de regressão linear. Para todos os procedimentos foi considerada uma distribuição normal dos dados (erro aleatório) e um intervalo de confiança igual a 95%. Para verificar a correlação dos resultados em função dos padrões usados nos métodos para determinação da capacidade antioxidante empregou-se o coeficiente de correlação linear de Pearson.

Na Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada a de uma matriz contendo nove linhas (representando as madeiras dos nove barris), e quatro colunas (resultados dos métodos antioxidantes: fenólicos totais,  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ ,  $\text{DPPH}^{\cdot}$  e FRAP). Cada PCA foi determinada

em função do tempo de envelhecimento, neste sendo avaliou-se para cada ciclo de envelhecimento 3, 6 e 12 meses, perfazendo um total de seis períodos distintos de avaliação. Os resultados referentes as diferentes metodologias foram auto escalonados a partir da média e desvio padrão global. Em todas as avaliações empregou-se o programa Origin<sup>®</sup> 9.0 (EUA) foi utilizado para tratamento estatístico dos resultados.

## 2.4 Resultados e discussão

### 2.4.1 Caracterização das amostras de cachaças quanto ao tipo de madeira e parâmetro de qualidade

O processo de envelhecimento das cachaças em barris de diferentes madeiras levou a extração de diferentes compostos, os quais atuam como marcadores químicos (BORTOLETTO; ALCARDE, 2014). Para tanto, utilizou-se ESI/TOF-MS/MS para identificar os principais compostos extraídos de cada madeira, uma vez que esta técnica permite análise de uma grande variedade de moléculas com alta polaridade, termicamente instáveis e massa molar variável (BANERJEE; MAZUMDAR, 2011). Neste trabalho, o perfil fitoquímico das amostras foi investigado no modo negativo (ESI), sendo possível identificar a presença de compostos de diferentes classes. Dentre os principais compostos encontrados nas amostras, destacam-se o ácido gálico (m/z 169), siringaldeído (m/z 181), coniferaldeído (m/z 177) e sinapaldeído (m/z 207), os quais são considerados marcadores químicos de envelhecimento de cachaças (AQUINO et al., 2006). Além destes, compostos antioxidantes como quercetina (m/z 301), ácido ferúlico (m/z 193), dihidrokaempferol (m/z 287), ácido elágico (m/z 301), narigenina (m/z 271), liquirigenina (m/z 255) e isoliquirigenina (m/z 255), dentre outros, foram identificados. A sumarização dos principais compostos e marcadores químicos encontrados nas amostras de cachaças envelhecidas em diferentes madeiras é descrita e comparada com a literatura (Tabela SA1 e Fig. SA1).

Um dos principais parâmetros de qualidade da cachaça é a acidez acética, a qual foi avaliada nas amostras de cachaça não envelhecida (CNE) e nas bebidas envelhecidas nos nove barris para cada ciclo (1 e 2). A acidez acética (expressa em ácido acético) das amostras de CNE apresentou concentrações de 53 a 101 mg / 100 mL de álcool anidro, enquanto as amostras de cachaças envelhecidas variaram de 63,3 (itaúba) a 199,1 (umburana) mg / 100 mL. De acordo com a legislação brasileira vigente a acidez volátil de cachaças não deve ser superior a 150 mg / 100 mL de álcool anidro expressa em ácido acético (BRASIL, 2005). Portanto, todas as

amostras apresentaram resultados dentro dos limites da legislação nacional, exceto as cachaças envelhecidas em umburana no ciclo 1, em que o teor de acidez acética variou entre 182 e 199,1 mg / 100 mL. Alcarde et al. (2010) também encontraram perfis semelhantes em seu trabalho com cachaça envelhecida por 24 meses em barris de diferentes madeiras (amendoim, araruna, jequitibá, cabreúva, pereira, carvalho, umburana, grápia e ipê-roxo), sendo que o aumento da acidez foi relacionado à oxidação do etanol a ácido acético. Além disso, compostos originários da madeira como ácidos orgânicos não voláteis, componentes secundários, taninos e compostos fenólicos, favorecem o aumento da acidez da aguardente no processo de envelhecimento.

## 2.4.2 Avaliação da capacidade antioxidante

### 2.4.2.1 Compostos fenólicos totais

A concentração de compostos fenólicos totais foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (eq. AG / mg L<sup>-1</sup>), quercetina (eq. QU / mg L<sup>-1</sup>) e Trolox® (eq. TR / mg L<sup>-1</sup>) (Fig. 2.1). As concentrações das amostras de cachaça foram calculadas a partir das seguintes equações:

$$A_{770\text{nm}} = 0,050(\pm 0,001) \cdot C_{\text{AG}} + 0,020(\pm 0,005), r = 0,9995 \quad (n = 7) \quad (\text{Eq. 2.2})$$

$$A_{770\text{nm}} = 0,030(\pm 0,001) \cdot C_{\text{QU}} + 0,03(\pm 0,01), r = 0,9971 \quad (n = 10) \quad (\text{Eq. 2.3})$$

$$A_{770\text{nm}} = 0,010(\pm 0,001) \cdot C_{\text{TR}} + 0,010(\pm 0,004), r = 0,9971 \quad (n = 11) \quad (\text{Eq. 2.4})$$

onde A corresponde ao sinal analítico e C<sub>AG</sub>, C<sub>QU</sub> e C<sub>TR</sub> concentrações (mg L<sup>-1</sup>) de ácido gálico, quercetina e Trolox®, respectivamente. A diferenças entre os parâmetros analíticos dos padrões ocorrem em função da variação estrutural e propriedades físico-químicas, como solubilidade e potencial redox, por exemplo. Por ser um método baseado na transferência de elétrons os antioxidantes com maior tendência a oxidação são oxidados mais eficientemente pelo reagente de Folin-Ciocalteu (GULCIN, 2020). Assim, de acordo com as curvas analíticas, o AG (E<sub>φ</sub> = 0,550 V / Ag|AgCl) apresentou maior sensibilidade, seguido pela QU (E<sub>φ</sub> = 0,505 V / Ag|AgCl) e o TR (E<sub>φ</sub> = 0,480 V / radiólise de pulso) (KILMARTIN, 2001; JOVANOVI et al., 1996). Assim, os resultados expressos em equivalentes dos padrões seguem a seguinte sequência que os valores dos potenciais formais quanto a força de redução (TR < QU < AG).

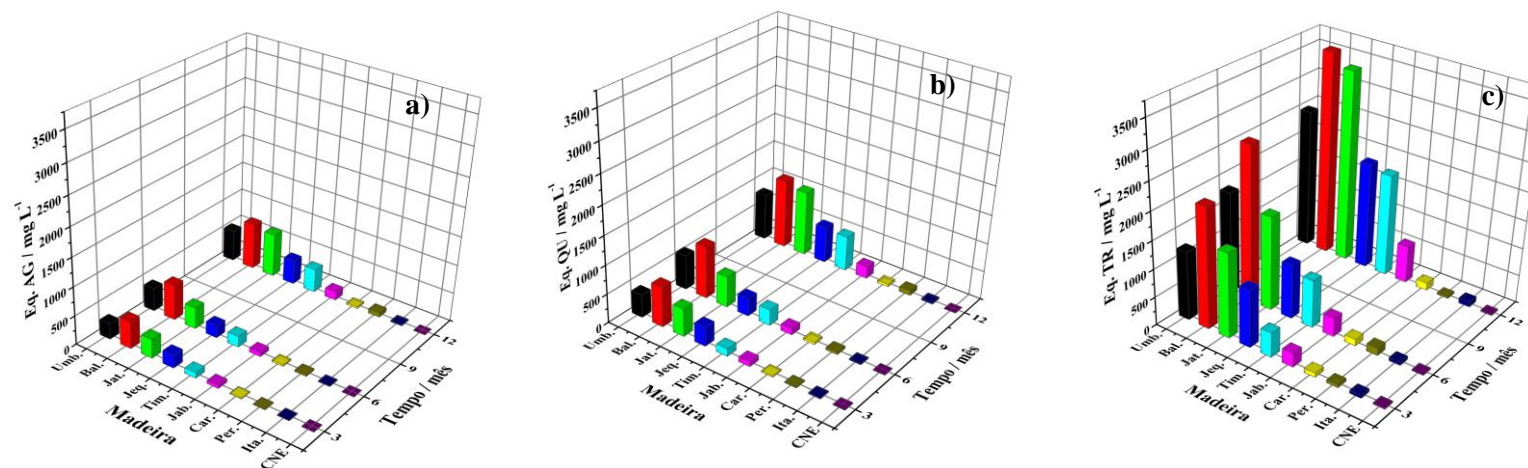
A concentração de compostos fenólicos aumentou proporcionalmente com o tempo de envelhecimento das bebidas em ambos os ciclos de uso dos barris (Fig. 2.1 e Tabela SA2). As maiores concentrações de compostos fenólicos totais foram determinadas no último mês do primeiro ciclo (1.12) de envelhecimento. Destacando-se as bebidas envelhecidas em barris de



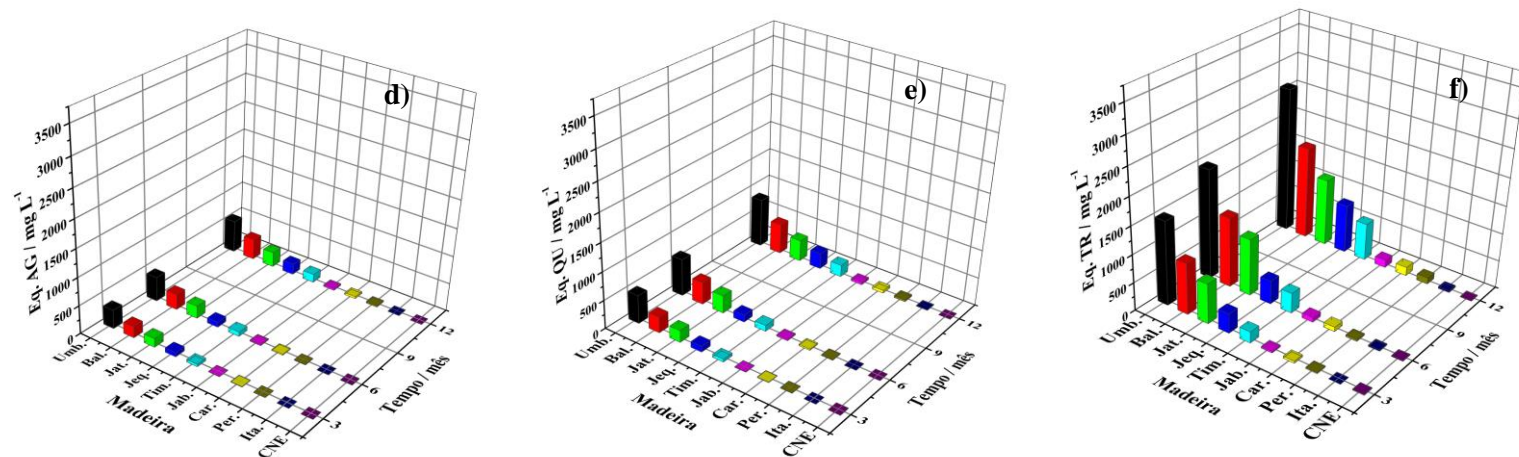
bálsamo ( $802 \pm 16$  AG,  $1206 \pm 40$  QU e  $3625 \pm 362$  TR), jatobá ( $756 \pm 15$  AG,  $1134 \pm 38$  QU e  $3417 \pm 342$  TR), umburana ( $548 \pm 11$  AG,  $814 \pm 20$  QU e  $2483 \pm 248$  TR), jequitibá ( $422 \pm 8$  AG,  $636 \pm 21$  QU e  $1908 \pm 191$  TR) e timborana ( $405 \pm 8$  AG,  $610 \pm 20$  QU e  $1833 \pm 183$  TR), nesta ordem. Analogamente, estas amostras apresentaram as maiores concentrações de compostos fenólicos totais para o segundo ciclo de envelhecimento. Apenas para a cachaça envelhecida em umburana as concentrações de compostos fenólicos totais não apresentaram variação entre os ciclos de envelhecimento ( $t_{cal} = 2,26 < t_{cri} = 4,30$ ,  $p = 0,054 > \alpha = 0,05$ ). Vale destacar que o barril de carvalho utilizado neste estudo foi reformado para uso. Assim, a extração de compostos orgânicos pode ter sido comprometida. Portanto, fatores associados ao processo de reuso do barril (ciclo 2), como raspagem e lavagem, possivelmente comprometeram o processo de extração dos compostos orgânicos entre o ciclo 1 e 2, levando a redução do teor de compostos fenólicos totais para o ciclo 2.

Figura 2.1 – Concentração de compostos fenólicos totais em equivalentes ( $\text{mg L}^{-1}$ ) das amostras de cachaça analisadas. Sendo: a) ácido gálico; b) quercetina e c) Trolox®.

Ciclo 1



Ciclo 2



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

Vale ressaltar que, mesmo com o decréscimo da concentração de fenólicos totais no segundo ciclo, as amostras de umburana, bálsamo e jatobá apresentaram níveis próximos a amostras de em vinho branco (295 mg L<sup>-1</sup> eq. AG) e tinto (1538 mg L<sup>-1</sup> eq. AG) (SANTOS et al, 2015). Além disto, já tem sido reportado o potencial de cachaças envelhecidas em barris de bálsamo, umburana, jequitibá, jatobá e timborana quanto a capacidade antioxidante destas. Vicente et al. (2011), determinaram a concentração de fenólicos totais (eq. AG) em cachaças envelhecidas em barris de diferentes madeiras brasileiras, sendo as amostras envelhecidas em de bálsamo (777 mg L<sup>-1</sup>), peroba (727 mg L<sup>-1</sup>) e timborana (405 mg L<sup>-1</sup>) apresentaram elevada concentração de compostos fenólicos. Rodrigues et al. (2016) determinaram o teor de fenólicos totais (eq. AG) em amostras envelhecidas em carvalho (96,0 mg L<sup>-1</sup>), umburana (73,3 mg L<sup>-1</sup>), bálsamo (31,1 mg L<sup>-1</sup>) e jequitibá (23,0 mg L<sup>-1</sup>). Adicionalmente, Silva et al. (2009) analisaram amostras envelhecidas de cachaça (eq. AG) em barris de carvalho (236 ± 12 a 488 ± 24 mg L<sup>-1</sup>) e jatobá (169 ± 8 a 800 ± 40 mg L<sup>-1</sup>). Por fim, a variabilidade dos resultados apresentados está associada a diferenças nos protocolos experimentais estabelecidos, aos fatores sazonais que exercem influência na composição de extrativos nas madeiras e ao tempo de envelhecimento das amostras de cachaça analisadas.

#### 2.4.2.2 Capacidade de redução de Fe(III) (FRAP)

Elevadas concentrações de Fe(II) no organismo podem desencadear o aumento da concentração de espécies deletérias como o radical hidroxila (<sup>•</sup>OH) por meio da reação de Fenton (SUN; PHAM; WAITE, 2016). Assim buscou-se avaliar a capacidade redutora de íons Fe(III) das amostras de cachaça pelo método espectrofotométrico do azul da Prússia (RODRIGUES et al., 2016). A capacidade redutora das amostras foi determinada a partir das curvas analíticas apresentadas abaixo:

$$A_{700\text{nm}} = 0,040(\pm 0,002) \cdot C_{\text{AG}} + 0,10(\pm 0,02), r = 0,9915 \quad (n = 9) \quad (\text{Eq. 2.5})$$

$$A_{700\text{nm}} = 0,030(\pm 0,001) \cdot C_{\text{QU}} + 0,10(\pm 0,01), r = 0,9975 \quad (n = 10) \quad (\text{Eq. 2.6})$$

$$A_{700\text{nm}} = 0,010(\pm 0,001) \cdot C_{\text{TR}} + 0,10(\pm 0,04), r = 0,9990 \quad (n = 11) \quad (\text{Eq. 2.7})$$

onde  $A_{700\text{ nm}}$ , corresponde ao sinal analítico e  $C$  a concentração dos compostos antioxidantes. As curvas analíticas foram similares as obtidas pelo método de Folin-Ciocalteu, uma vez que, os mecanismos dos métodos são baseados na transferência de elétrons. As amostras de cachaça com maiores concentrações de fenólicos totais se destacaram no ensaio de capacidade de redução de íons Fe(III). No primeiro ciclo (Figura 2; Tabela SA2), as amostras mais eficientes (eq. mg L<sup>-1</sup>) foram as cachaças envelhecidas em barris de bálsamo (693 ± 35 AG; 818 ± 27 QU

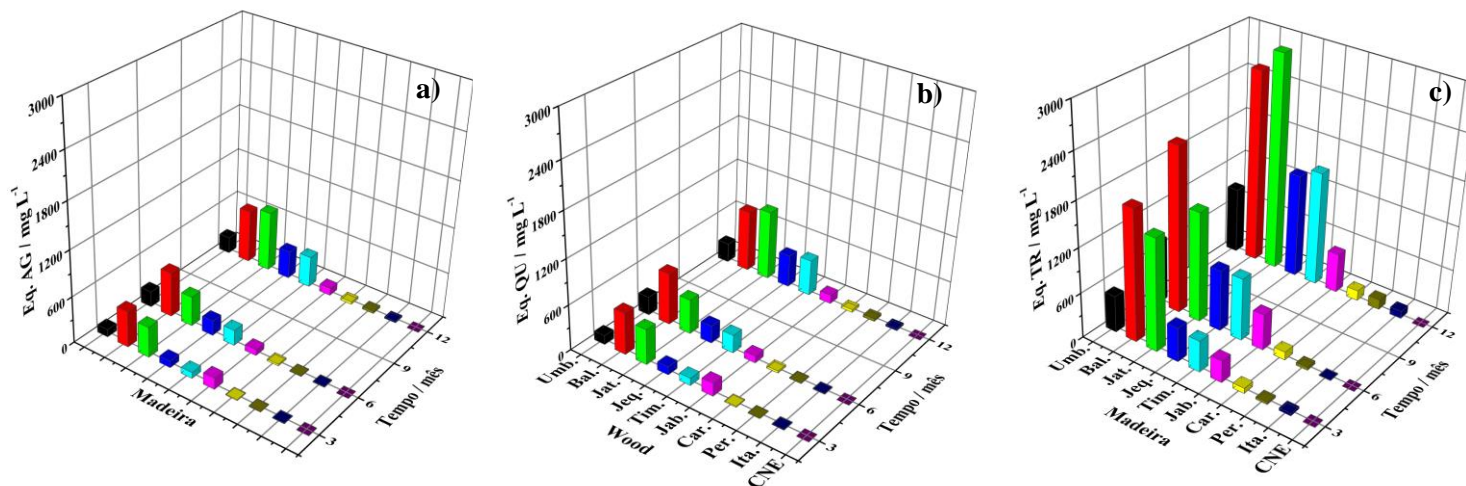
e  $2600 \pm 260$  TR), jatobá ( $783 \pm 39$  AG;  $924 \pm 31$  QU e  $2906 \pm 290$  TR), timborana ( $405 \pm 20$  AG;  $479 \pm 16$  QU e  $1538 \pm 154$  TR), jequitibá ( $363 \pm 18$  AG,  $430 \pm 14$  QU e  $1396 \pm 140$  TR) e umburana ( $215 \pm 11$  AG;  $256 \pm 9$  QU e  $888 \pm 89$  TR). As cachaças envelhecidas em carvalho, peroba e itaúba foram cerca de 90% menos eficientes que as demais.

Considerando a média geral dos resultados em relação a cada madeira, a capacidade redutora dos íons Fe(III) das cachaças diminuiu ~50% para o segundo ciclo. Os resultados para as cachaças envelhecidas nos barris de umburana ( $285 \pm 14$  AG;  $339 \pm 11$  QU e  $1129 \pm 113$  TR), bálsamo ( $334 \pm 17$  AG;  $396 \pm 13$  QU e  $1296 \pm 130$  TR) e jatobá ( $276 \pm 14$  AG;  $328 \pm 11$  QU e  $1096 \pm 110$  TR) no segundo ciclo apresentaram a mesma tendência que o primeiro ciclo de envelhecimento. Por fim, as amostras envelhecidas em umburana mantiveram a capacidade redutora nos dois ciclos, uma vez que a variação total foi inferior a 5%.

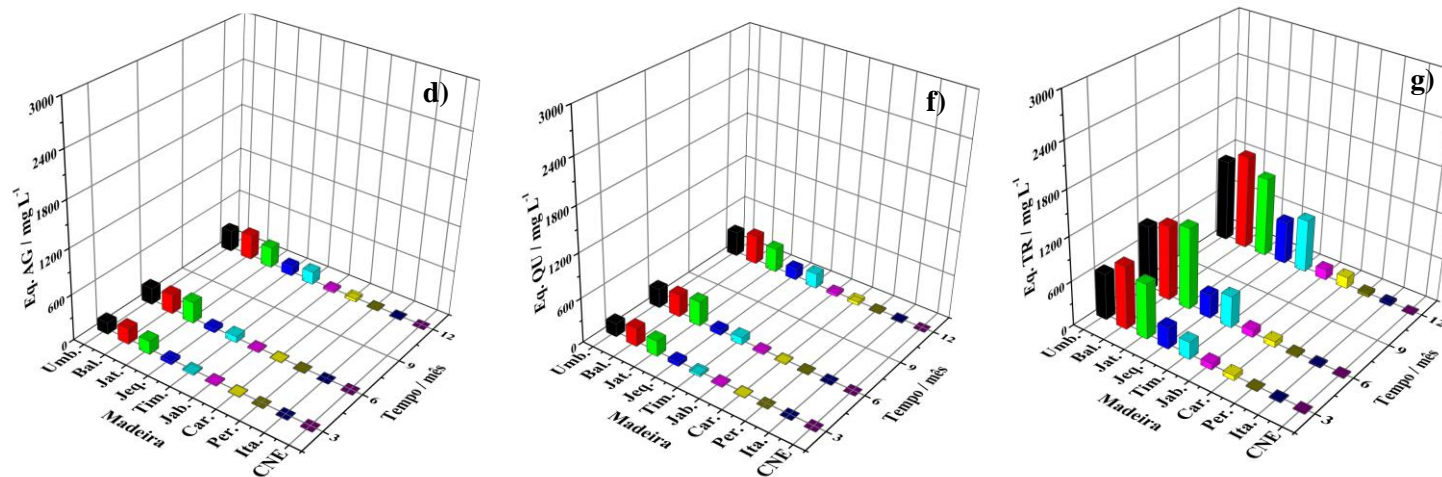
Rodrigues et al. (2016) verificaram que cachaças envelhecidas em carvalho (15 anos), bálsamo (3 anos) e umburana (8 anos) apresentaram eficiência similar ao ácido ascórbico ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ). Duthie et al. (1998) realizaram experimentos de FRAP em sistemas biológicos, verificando que o consumo de vinho e uísque envelhecido em barris de carvalho levou a redução de íons Fe(III) em amostras de plasma humano. As amostras de uísque apresentaram maior eficiência (~60% maior) quando comparadas as de vinho. Além disto, o efeito redutor do uísque (2 h) foi mais prolongado em relação ao do vinho (1 h). Desta forma, estes resultados mostram o potencial benéfico que as amostras de cachaça envelhecida podem apresentar como bebida envelhecida.

Figura 2.2 – Capacidade de redução de Fe(III) em equivalentes ( $\text{mg L}^{-1}$ ) das amostras de cachaça analisadas. Sendo: a) ácido gálico; b) quercetina e c) Trolox®.

Ciclo 1



Ciclo 2



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

### 2.4.2.3 Capacidade antioxidante frente ao radical ABTS<sup>•+</sup>

Para avaliar o potencial antioxidante das amostras de cachaças em meio hidrofílico (pH 7,4), empregou-se o método do radical ABTS<sup>•+</sup>. Os resultados obtidos foram expressos em equivalentes dos padrões (mg L<sup>-1</sup>) calculados a partir das respectivas curvas analíticas. Os parâmetros analíticos são apresentados nas seguintes equações:

$$\%I = 34,6(\pm 1,1) \cdot C_{AG} + 4,0(\pm 1,6), r = 0,9970 (n = 9) \quad (\text{Eq. 2.8})$$

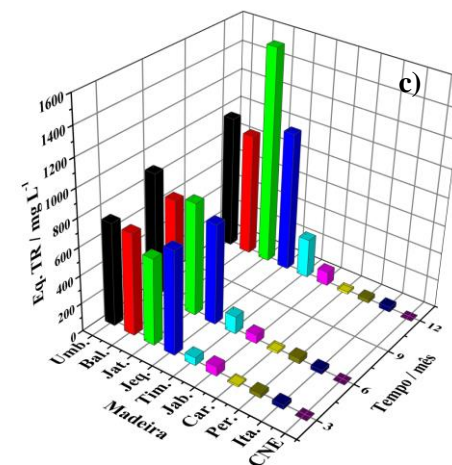
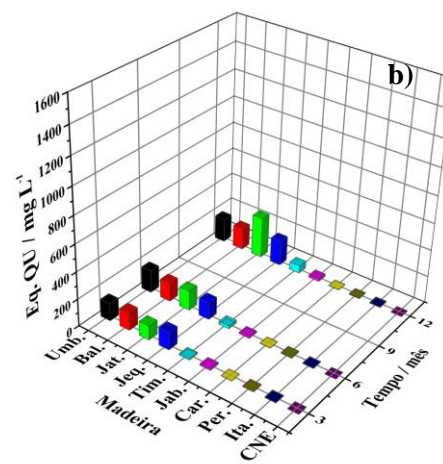
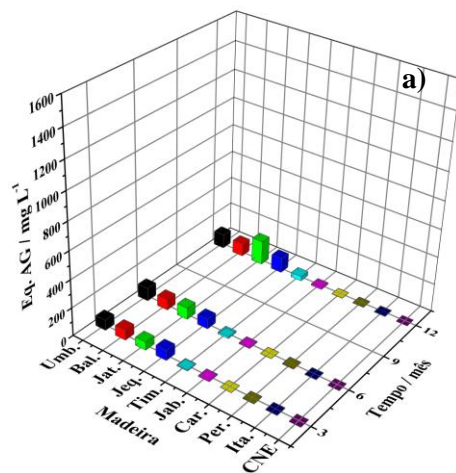
$$\%I = 19,6 (\pm 0,7) \cdot C_{QU} + 3,9(\pm 1,9), r = 0,9954 (n = 7) \quad (\text{Eq. 2.9})$$

$$\%I = 4,2 (\pm 0,2) \cdot C_{TR} + 1,5(\pm 1,6), r = 0,9962 (n = 7) \quad (\text{Eq. 2.10})$$

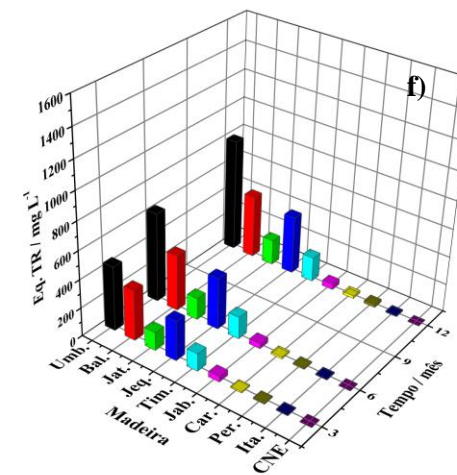
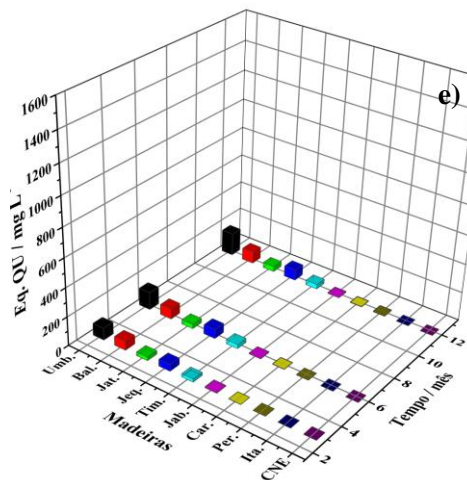
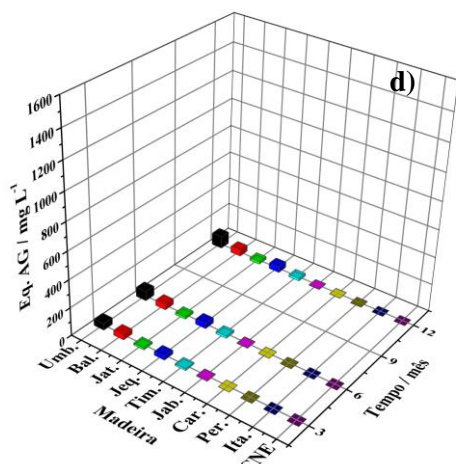
As amostras mais eficientes (eq. mg L<sup>-1</sup>) frente ao radical ABTS<sup>•+</sup> foram as de jatobá (172 ± 6 AG, 304 ± 11 QU e 1548 ± 72 TR), jequitibá (106 ± 3 AG, 187 ± 7 QU, 1002 ± 47 TR), umburana (100 ± 3 AG, 178 ± 6 QU e 958 ± 44 AG) e bálsamo (91 ± 3 AG, 161 ± 6 QU e 881 ± 41 TR) (Figura 2.3; Tabela SA2). Estas amostras não apresentaram variações significativas da capacidade antioxidante no primeiro ciclo de maturação em função dos diferentes padrões utilizados para expressar os resultados (ANOVA, F<sub>cal</sub> = 0,09 < F<sub>cri</sub> = 2,9 a 95% de confiança). Para o segundo ano as cachaças envelhecidas nos barris de bálsamo, jatobá e jequitibá reduziram em 49, 75 e 43%, respectivamente, os valores de capacidade antioxidante, comparando o último mês de cada ciclo. Adicionalmente, a cachaça envelhecida em barril de balsamo apresentou a menor variação média da capacidade antioxidante entre dois ciclos (26%).

Figura 2.3 – Capacidade antioxidante das amostras de cachaça analisadas em equivalentes ( $\text{mg L}^{-1}$ ) pelo método  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ . Sendo: a) ácido gálico; b) quercetina e c) Trolox®.

Ciclo 1



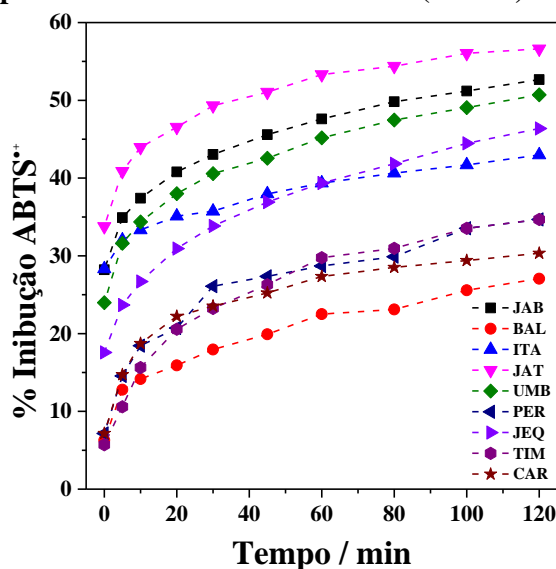
Ciclo 2



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

Com o objetivo avaliar o efeito da composição de cada cachaça em relação a capacidade antioxidante de acordo com as características das madeiras, realizou-se o ensaio de  $ABTS^{+}$  normalizando a concentração de fenólicos totais de todas as amostras (1.12) em 1.0 eq. AG ( $mg L^{-1}$ ) a partir dos resultados pelo método de Folin-Ciocalteu. Neste estudo, o perfil cinético (até 120 min) quanto a capacidade de sequestro do radical  $ABTS^{+}$  foi estabelecido (Figura 2.4).

**Figura 2.4 – Curva de consumo percentual do radical  $ABTS^{+}$  em função do tempo para as cachaças envelhecidas no primeiro ciclo de envelhecimento (mês 12).**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

O sequestro do radical  $ABTS^{+}$  variou de forma mais significativa nos primeiros 20 min. De forma análoga aos ensaios anteriores as cachaças envelhecidas em jatobá, umburana e jequitibá apresentaram maior capacidade de redução da espécie radicalar. A bebida envelhecida em jatobá apresentou inibição superior a 50%, enquanto para o bálsamo foi o menos efetivo. Vale salientar que as cachaças envelhecidas em jaboti e itaúba foram eficientes, indicando que a composição química da amostra, como a concentração dos compostos são parâmetros determinantes quanto ao sequestro de espécies reativas.

#### 2.4.2.4 Capacidade antioxidante frente ao radical DPPH

Para avaliar a capacidade antioxidante das amostras de cachaças em meio aquo/orgânico e avaliar a capacidade dos compostos presentes nas bebidas como doadores de átomos de hidrogênio ( $H^{\bullet}$ ), empregou-se o método de sequestro do radical DPPH. Os resultados obtidos foram calculados a partir das seguintes relações matemáticas:



$$\%I = 6,0(\pm 0,3) \cdot C_{AG} + 0,9(\pm 1,2), r = 0,9913 (n = 6) \quad (\text{Eq. 2.11})$$

$$\%I = 4,3 (\pm 0,2) \cdot C_{QU} + 7,3(\pm 2,6), r = 0,9917 (n = 6) \quad (\text{Eq. 2.12})$$

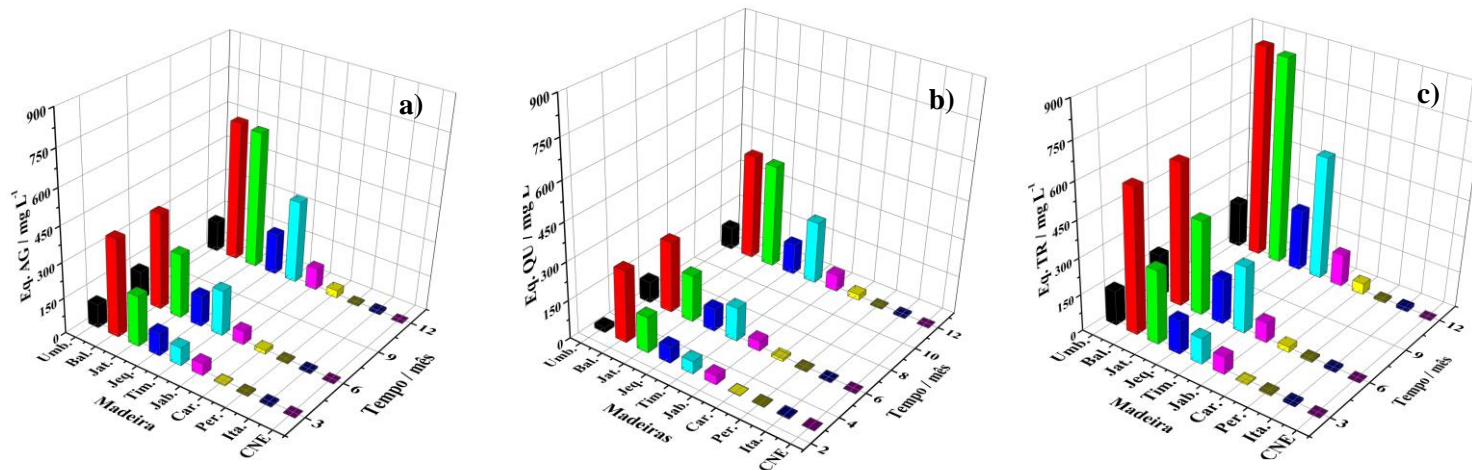
$$\%I = 3,7 (\pm 0,2) \cdot C_{TR} - 3,8(\pm 2,2), r = 0,9961 (n = 6) \quad (\text{Eq. 2.13})$$

De forma geral, os resultados para o método do DPPH<sup>·</sup> foram menores, entre 12 e 72% quando comparados o ABTS<sup>·+</sup>. Esta variação pode ser justificada pela natureza dos compostos antioxidantes extraídos das madeiras no processo de envelhecimento das bebidas, os quais apresentam compostos de baixa massa molar e menor grau de lipofilicidade (PRIOR et al., 2005). Uma vez que fatores como a polaridade e volume molar dos compostos afetam a eficiência do método do DPPH<sup>·</sup> em função da composição das amostras (KARADAG; OZEELIK; SANER, 2009). Os resultados obtidos para este o método do DPPH<sup>·</sup>, de forma geral, seguiu tendência similar aos ensaios anteriores (Figura 2.5; Tabela SA2), sendo que as amostra mais efetivas em reagir com radical (eq mg L<sup>-1</sup>) foram de bálsamo (601 ± 30 AG, 418 ± 19 QU e 871 ± 40 TR) e jatobá (590 ± 30 AG, 409 ± 19 QU e 854 ± 40 TR). Contudo, as cachaças envelhecidas em barris de umburana e jequitibá apresentaram menor eficiência comparando o perfil geral em relação ao método do ABTS<sup>·+</sup>. Por fim, para o segundo ciclo de uso dos barris houve diminuição nos valores de capacidade antioxidante das amostras de cachaça, especialmente para bálsamo (87%) e jatobá (69%).

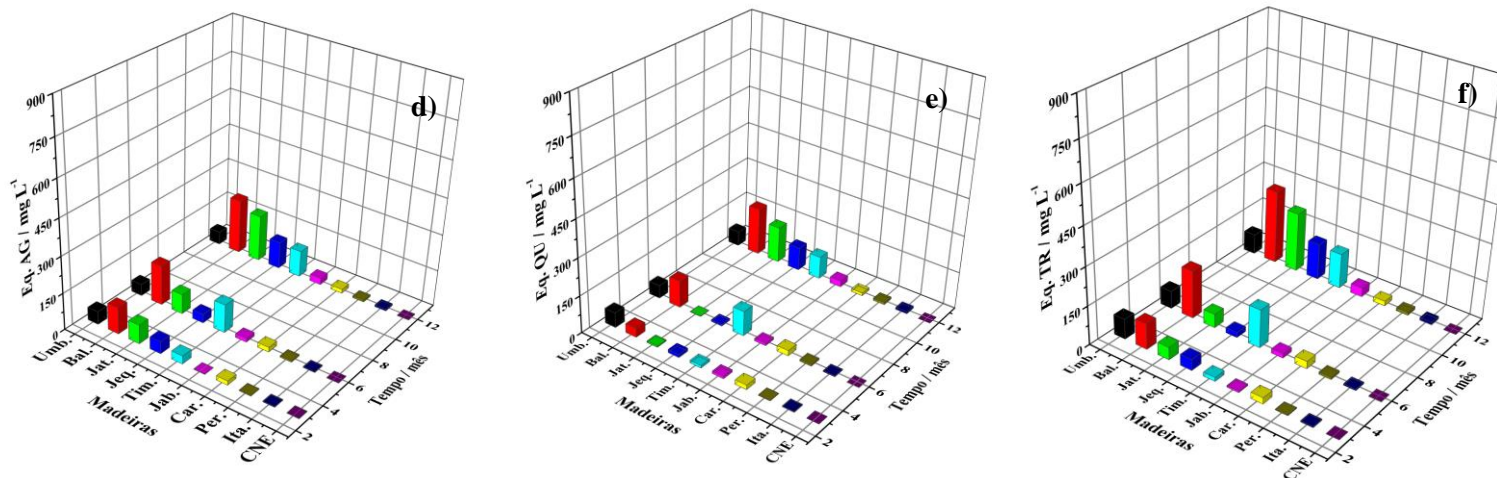
Rodrigues et al. (2016) avaliaram extratos alcoólicos de amostras de cachaças envelhecidas em umburana (8 anos), bálsamo (3 anos), carvalho (15 anos) e jequitibá (2 anos). Neste estudo, as amostras de umburana e carvalho apresentaram inibição entre 50 e 67%, superiores ao BHT (500 mg L<sup>-1</sup>; %I ~ 45%). Contudo, as amostras de bálsamo e jequitibá, não apresentaram inibição significativa do radical DPPH<sup>·</sup>. Vicente et al. (2011) reportaram que amostras de cachaça envelhecidas (18 meses) em timborana, bálsamo e peroba sequestraram mais de 90% do radical, enquanto as amostras de carvalho e jaboti sequestraram 34 e 19%, respectivamente.

Figura 2.5 – Capacidade antioxidante das amostras de cachaça analisadas em equivalentes ( $\text{mg L}^{-1}$ ) pelo método DPPH $^{\bullet}$ . Sendo: a) ácido gálico; b) quercetina e c) Trolox $^{\text{®}}$ .

Ciclo 1



Ciclo 2



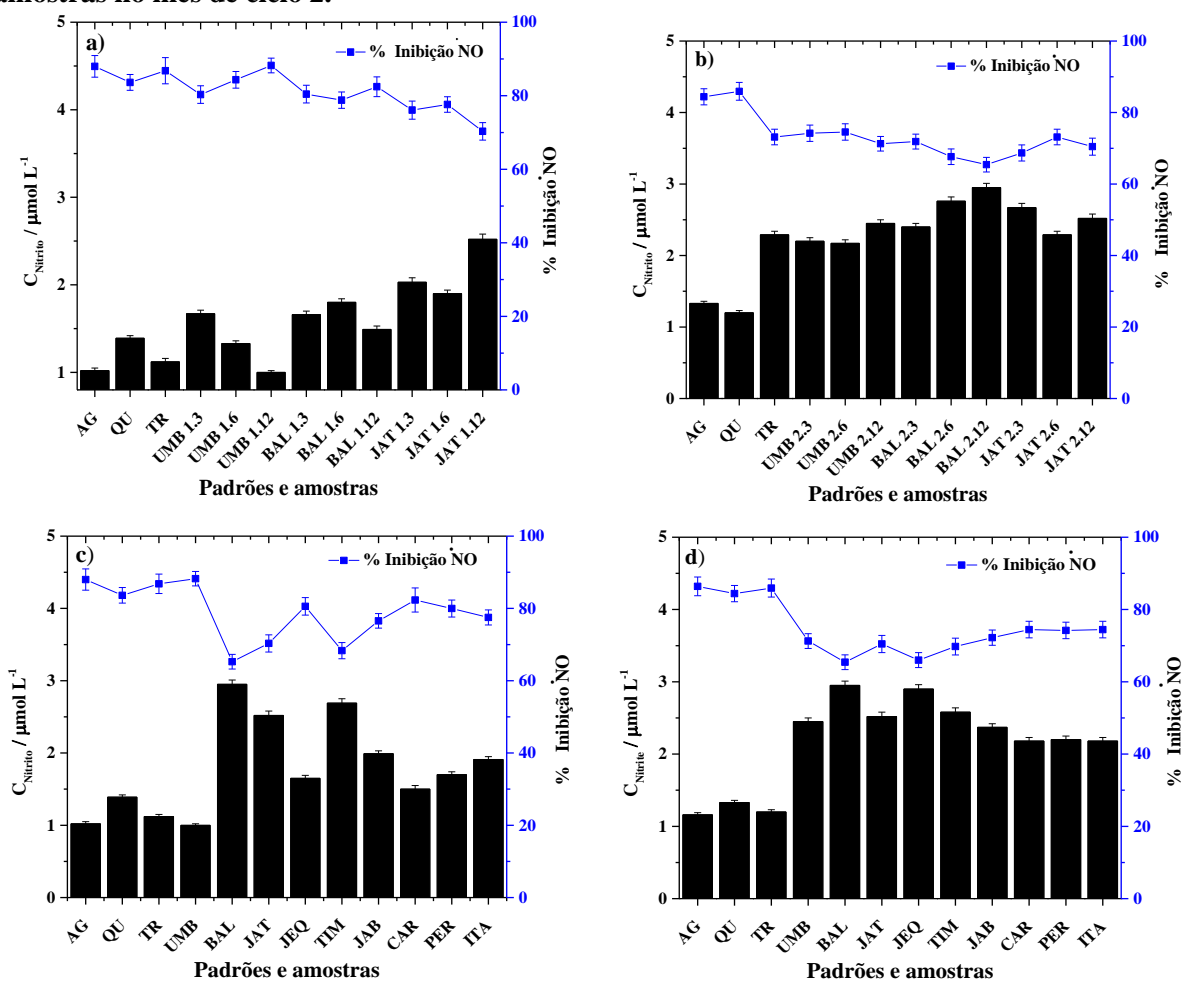
Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

#### 2.4.2.5 Capacidade de sequestro de óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ )

O  $\cdot\text{NO}$  é uma espécie reativa produzida no organismo associada a uma série de funções fisiológicas, atuando como neurotransmissor, relaxante muscular e vasodilatador (COOMBS et al., 2021). Contudo, em elevadas concentrações apresenta efeitos deletérios, pois é capaz de reagir com macromoléculas, compostos tiólicos e gerar outras espécies reativas, como o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (KURIN; MUČAJI; NAGY, 2012). Rebelo et al. (2014), avaliaram a capacidade de extratos de vinho para o sequestro de  $\cdot\text{NO}$  produzido por macrófagos. Neste estudo, as amostras analisadas apresentaram inibição máxima de  $\sim 70\%$ . Assim, tendo em vista, a realização do ensaio para amostras de bebida com elevada concentração de compostos fenólicos, e em função dos resultados anteriores, avaliou-se o perfil das cachaças envelhecidas frente a capacidade de sequestro do radical  $\cdot\text{NO}$ .

Neste estudo, empregaram-se as amostras no período de maior concentração de compostos fenólicos (mês 12 dos ciclos 1 e 2). Os resultados foram expressos em percentual de sequestro do radical  $\cdot\text{NO}$  e em concentração de nitrito remanescente. Assim como nos resultados anteriores, observou-se o aumento da capacidade antioxidante das amostras de umburana, jatobá e balsamo no decorrer do ciclo de maturação (Figura 2.6; Tabela SA3). A reutilização dos barris, levou a diminuição da capacidade antioxidante ( $t_{\text{cri}} = 2,30 < t_{\text{cal}} = 3,08$  para 95% de confiança). Contudo, a redução do radical  $\cdot\text{NO}$  no meio ainda assim, foi superior a 66%. As amostras de cachaça envelhecidas em umburana (88,2%), bálsamo (82,4%) e carvalho (82,3%) (ciclo 1) apresentaram resultados similares aos obtidos para os padrões AG (%I = 87,9%), QU (%I = 83,6%) e TR (%I = 86,8%) a  $100 \text{ mg L}^{-1}$  não possuem diferença significativa para 95% de confiança ( $t_{\text{cri}} = 2,78 > t_{\text{cal}} = 0,77$ ), indicando a eficiência das bebidas avaliadas.

Figura 2.6 – Capacidade de sequestro de  $\cdot\text{NO}$  das amostras de cachaça envelhecidas após 150 min de ensaio. Sendo: a) amostras de umburana, bálsamo e jatobá no ciclo 1 e b) amostras de umburana, bálsamo e jatobá no ciclo 2; c) todas as amostras no mês de ciclo 1 e d) todas as amostras no mês de ciclo 2.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

#### 2.4.2.6 Análise de correlação entre os dados

A partir dos resultados dos compostos fenólicos totais, capacidade redutora de  $\text{Fe(III)}$  e capacidade antioxidante pelos métodos de  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  e  $\text{DPPH}^{\cdot}$  foram calculados os coeficientes de correlação linear entre todas as amostras do primeiro e do segundo ciclo em função do padrão usado (Tabela SA5). Todas as correlações foram positivas indicando a proporcionalidade dos métodos empregados em relação aos compostos extraídos. De forma geral a concentração de fenólicos totais apresentou elevada correlação ( $r \geq 0,8051$ ) comparando-o aos demais métodos.

As correlações mais elevadas foram obtidas para  $\text{FT} \times \text{FRAP}$  ( $0,9490 \leq r \leq 0,9179$ ), possivelmente devido ao mecanismo de transferência de elétrons, o qual é comum para ambos os métodos. As mais baixas correlações foram observadas entre os métodos de  $\text{DPPH}^{\cdot} \times \text{ABTS}^{\cdot+}$

( $0,6743 \leq r \leq 0,7077$ ). Estas diferenças são justificadas pelas características entre as metodologias como mecanismos de reação, que podem ocorrer por transferência de elétrons e/ou de prótons, reatividade, polaridade do meio, estereoquímica dos radicais e composição química das amostras analisadas (GULCIN, 2020).

Por fim, entre os padrões empregados, o AG e a QU apresentaram alta correção entre os métodos empregados, indicando que independentemente do padrão usado na calibração dos métodos, os resultados obtidos terão a mesma tendência, não comprometendo a interpretação e aplicabilidade dos mesmos.

#### *2.4.2.7 Análise multivariada da capacidade antioxidante em função do tempo de envelhecimento da cachaça*

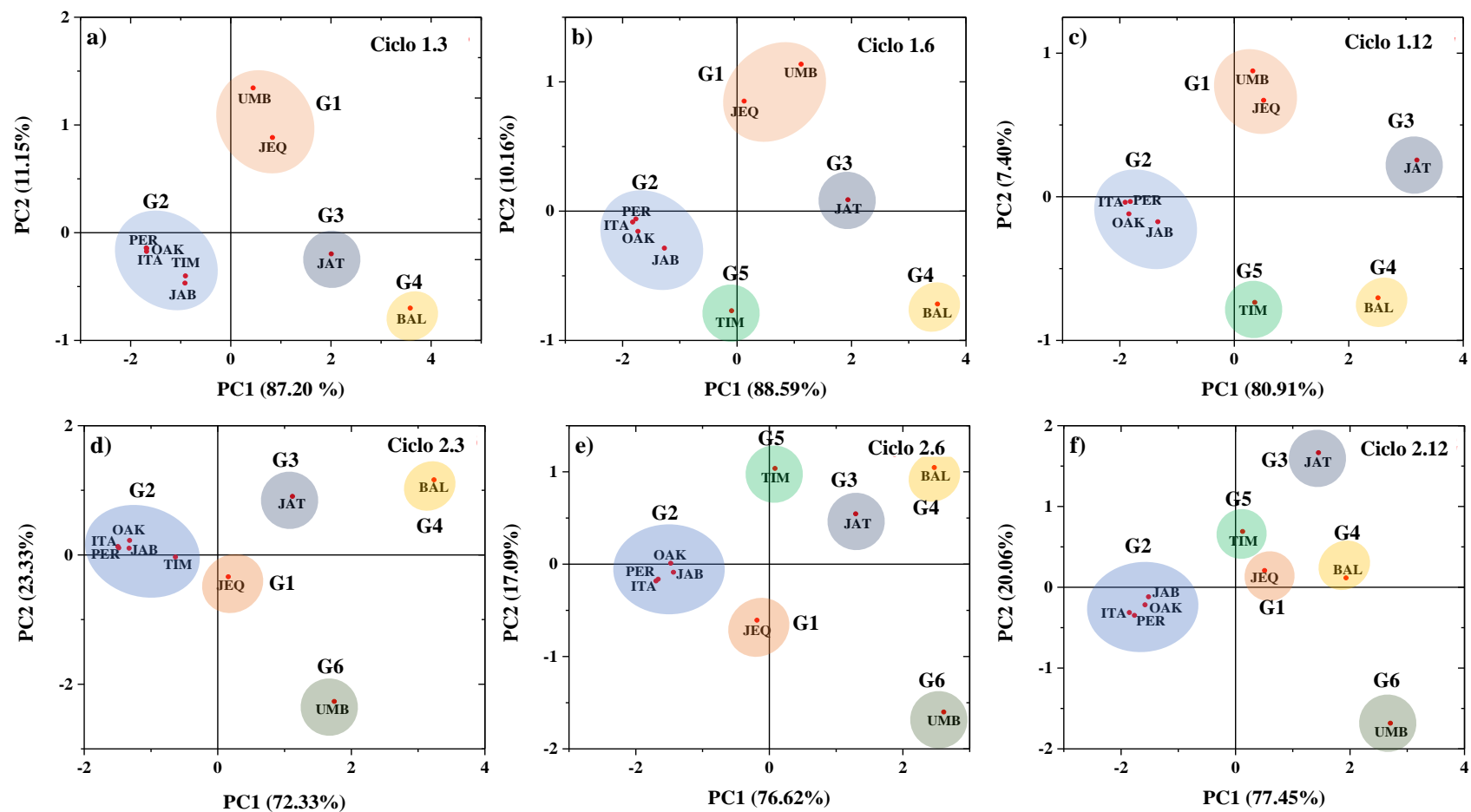
A partir da análise exploratória multivariada pôde-se inferir sobre as similaridades e diferenças entre as amostras de cachaça, considerando a influência da variação do tempo de envelhecimento e dos ciclos de utilização dos barris após a raspagem e lavagem dos recipientes avaliados. Assim, empregou-se a análise de componentes principais (PCA) a partir da concentração de fenólicos totais e dos resultados obtidos pelos métodos de FRAP e sequestro dos radicais ABTS<sup>•+</sup> e DPPH<sup>•</sup> como variáveis. Para este estudo a relação PC1×PC2 variou de 94,2 a 98,8% em relação a variância total dos diferentes sistemas avaliados (Fig. 2.7 e Fig SA5). Esta avaliação sugere que a capacidade antioxidante total das amostras de cachaça sofre influência não só da concentração das espécies, mas também das características dos compostos extraídos durante o envelhecimento das bebidas. Para os ciclos iniciais 1.3 e 2.3 observou-se a discriminação do grupo formado pelas cachaças envelhecidas em ITA, PER, OAK, JAB e TIM (G1) (Fig. 2.7a e 2.7d). As cachaças envelhecidas em JAT (G2) e BAL (G3) se mantiveram discriminados das demais amostras durante os dois ciclos (Fig. 2.7a-e).

As amostras de TIM separaram-se do grupo inicial após seis meses de envelhecimento em ambos os ciclos (G5) (Fig. 7b-c e 7e-f). A principal variável para a discriminação dessa amostra foram os ensaios de DPPH<sup>•</sup>. Essas variações podem ser justificadas pela maior concentração de compostos antioxidantes de baixa massa molecular gerada durante o ciclo, pois antioxidantes volumosos reagem lentamente, ou sequer reagem com o radical DPPH<sup>•</sup>, devido ao impedimento estérico (PRIOR et al, 2005; GOLCIN, 2020). As amostras de UMB e JEQ (G2) apresentaram similaridades durante o primeiro ciclo de envelhecimento. Contudo, a amostra de UMB se discriminou no segundo ciclo (G6) (Fig. 7d-f). O principal fator que

influenciou nessa mudança foram os resultados para o ensaio de fenólicos totais, uma vez que este parâmetro praticamente não variou entre os ciclos de reuso.

Entre cada ciclo, os recipientes foram raspados e tratados termicamente e as características dos compostos extraídos dependem das madeiras utilizadas. Neste sentido, LEÃO et al (2011), avaliaram a influência do tratamento térmico das madeiras na composição dos extrativos presentes em amostras de cachaça envelhecidas em umburana, bálsamo e carvalho. Neste estudo, observou-se que este procedimento levou a diminuição da concentração de extrativos totais (12-19%) e de compostos hidrossolúveis (18-71%) e o aumento da concentração de compostos de baixa solubilidade (18-20%). Estas variações ocorreram devido a volatilização de algumas classes de compostos e a degradação térmica de outros. Além disto, compostos fenólicos de baixa massa molecular derivados da lignina da madeira dos barris influenciam na composição de bebidas destiladas e o tempo de maturação leva ao aumento da concentração destes. Assim o tempo de envelhecimento de bebidas como whisky, conhaque e destilados de vinho influencia no teor de compostos fenólicos derivados de lignina (Castro et al., 2020). Logo, tais parâmetros podem estar associados a discriminação dos grupos.

Figura 2.7 – Análise dos componentes principais: gráficos dos scores para relação PC1 × PC2 nos dois ciclos de envelhecimento das cachaças.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

## 2.5 Conclusão

A partir da análise fitoquímica por espectrometria de massas foi possível verificar a presença de compostos considerados como marcadores químicos de envelhecimento de cachaças como, o ácido gálico, sinrigaldeído, coniferaldeído e sinapaldeído, Além destes, compostos antioxidantes como quercetina, ácido ferúlico, dihidrokaempferol, ácido elágico, narigenina, liquiritigenina e isoliquiritigenina, dentre outros, foram identificados. Todas as amostras apresentaram resultados dentro dos limites da legislação vigente, para a acidez acética ( $\leq 150$  mg / 100 mL de ácido acético), exceto as cachaças envelhecidas em umburana no primeiro ciclo.

A capacidade antioxidante das cachaças envelhecidas, de forma geral, aumentou com passar do tempo durante os ciclos de utilização dos barris. Os melhores resultados foram encontrados para amostras envelhecidas em barris de umburana, jatobá, jequitibá e timborana no primeiro ciclo. A partir do início do segundo ciclo observou-se a diminuição da capacidade antioxidante das bebidas. Estes resultados estão associados a menor concentração de compostos extrativos nas madeiras, bem como a degradação/oxidação dos compostos antioxidantes passíveis de extração. Nesse sentido, as amostras de umburana se destacaram, pois mantiveram a capacidade antioxidante similar entre os dois ciclos de reuso.

As metodologias empregadas mostraram correlação positiva entre os resultados. As cachaças com maiores concentrações de compostos fenólicos foram mais eficientes frente as espécies reativas analisadas ( $ABTS^{\bullet+}$ ,  $DPPH^{\bullet}$  e  $\cdot NO$ ). No entanto, quando avaliadas em condições equivalentes ( $FT = 1,0$  mg  $L^{-1}$ ), amostras como jaboti e itaúba que estavam entre as bebidas com menor capacidade antioxidante apresentaram % I > 35% do radical  $ABTS^{\bullet+}$ , indicando que mesmo em baixas concentrações as amostras possuem em sua composição antioxidantes eficientes.



## REFERÊNCIAS

ALCARDE, A. R.; SOUZA, P. A. DE; BELLUCO, A. E. de S. Aspectos da composição química e aceitação sensorial da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de diferentes madeiras. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, 30, 226-232, 2010.

ALCARDE, R. A.; SOUZA, L. M.; BORTOLETTO, A. M. Formation of volatile and maturation-related congeners during the aging of sugarcane spirit in oak barrels. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, p. 529-536, 2014.

ALI, S. E. Profiling Metabolites and Biological Activities of Sugarcane (*Saccharum officinarum* Linn.) Juice and Its Product Molasses via a Multiplex Metabolomics Approach. **Molecules**, v. 24, p. 934-955, 2019.

AQUINO, F. W. B. et al. Determinação de marcadores de envelhecimento em cachaças. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 26, n. 1, 145-149, 2006.

BANERJEE, S.; MAZUMDAR, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2012, p. 1-41, 2012.

BARTOSZEK, M.; POLAK, J. An electron paramagnetic resonance study of antioxidant properties of alcoholic beverages. **Food Chemistry**, v. 132, p. 2089-2093, 2012.

BETTIN, S.M., et al. Phenols and metals in sugar-cane spirits. Quantitative analysis and effect on radical formation and radical scavenging. **European Food Research and Technology**, 215, 169-175, 2002.

BORTOLETTO, A. M.; ALCARDE, A. R. Aging marker profile in cachaça is influenced by toasted oak chips. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 121, p. 70-77, 2015.

BORTOLETTO, A. M.; CORREIA, A. C.; ALCARDE, A. R. Aging practices influence chemical and sensory quality of cachaça. **Food Research International**, 86, 46-53, 2016.

BRASIL - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Instrução normativa nº 13 de 29/6/ 2005, Diário Oficial da União, Brasília, 30/6/2005, Seção 1, acesso em 03 julho. 2021.

CARVALHO, D. G. et al. Determination of the concentration of total phenolic compounds in aged cachaça using two-dimensional fluorescence and mid-infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 329, p. 1-8, 2020.

CASTRO, M. C. Lignin-derived phenolic compounds in cachaça aged in new barrels made from two oak species. **Heliyon**, v. 6, p. 1-7, 2020.

- COOMBS, G. B. et al. Global Reach 2018: Nitric oxide-mediated cutaneous vasodilation is reduced in chronic, but not acute, hypoxia independently of enzymatic superoxide formation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 172, p. 451-458, 2021.
- DIAS, S.; MAIA, A.; NELSON, D. Efeito de diferentes madeiras sobre a composição da aguardente de cana envelhecida. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 18, n.3, p. 331-334, 1998.
- DUTHIE, G. G. et al. The effect of whisky and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 52, p. 733-36, 1998.
- FERNANDES, D. D. S. et al. Simultaneous identification of the wood types in aged cachaças and their adulterations with wood extracts using digital images and SPA-LDA. **Food Chemistry**, v. 273, p. 77-84, 2019.
- FERNANDES, I. et al. Wine Flavonoids in Health and Disease Prevention. **Molecules**, v. 22, p. 292-232, 2017.
- GRANJA, B. S. et al. Exploring MBTH as spectrophotometric probe for total phenolic compounds determination in beverage samples. **Analytical Methods**, v. 10, p. 2197-2204, 2018.
- GULCIN, I. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. **Archives of Toxicology**, v. 94, p. 651-715, 2020.
- GÜLÇİN, L. et al. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2227-2238, 2010.
- IBRAC – Instituto Brasileiro da Cachaça, Disponível em: <  
<https://ibrac.net/servicos/mercado-interno> > acesso em 03 junho 2021.
- JOVANOVIC, S. V. et al. Reduction potentials of flavonoid and model phenoxy radicals. Which ring in flavonoids is responsible for antioxidant activity?. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**, v. 2, p. 2497-2504, 1996.
- KARADAG, A., OZEELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, p. 41-60, 2009.
- KILMARTIN, P. A. Electrochemical Detection of Natural Antioxidants: Principles and Protocols. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 3, n. 6, 941-955, 2001.
- KURIN, E.; MUČAJI, P; NAGY, M. In Vitro Antioxidant Activities of Three Red Wine Polyphenols and Their Mixtures: An Interaction Study. **Molecules**, v. 17, p. 14336-14348, 2012.
- LEÃO, M. M.; SPOTO, M. H. F.; BRITO, J. O. Influence of thermal treatment of wood on the aroma of a sugar cane spirit (cachaça) model-solution. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 427-429, 2011.

- MAIA, R. M. et al. Avaliação do sequestro do óxido nítrico (NO) pelo extrato metanólico da alga *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) Howe. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p.489-493, 2010.
- MIRANDA, M. B.; HORII, J; ARCADE, A. R. Estudo do efeito da irradiação gamma ( $^{60}\text{CO}$ ) na qualidade da cachaça e no tonel de envelhecimento. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 26, n. 4, p. 772-778, 2006.
- PARAZZI, C.; ARTHUR, C. M.; LOPES, J. J. C.; BORGES, M. T. M. R. Avaliação e caracterização dos principais compostos químicos da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de carvalho (*Quercus sp.*). **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 28, p. 193-199, 2008.
- PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for determination os antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.
- RAMIREZ-RAMIREZ, G. **Étude de la sorption des composés d'arôme du vin par le bois de chêne en système modèle d'élevage en fûts**. Thesis Ph.D., Dijon, França: Université de Bourgogne, 346, 2002.
- Rebelo, R. J. et al. Phenolic profile of Douro wines and evaluation of their  $\cdot\text{NO}$  scavenging capacity in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Food Chemistry**, v. 163, p. 16-22, 2014.
- RIVERO-CRUZ, J. F. et al. Prediction of Antimicrobial and Antioxidant Activities of Mexican Propolis by  $^1\text{H-NMR}$  Spectroscopy and Chemometrics Data Analysis. **Molecules**, v. 22, p. 1184-1201, 2017.
- RODRIGUES, L. M. A. et al. Phenolic extracts of cachaça aged in different woods and quantifying antioxidant activity and antifungal properties. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, p. 644-652, 2016.
- SANTOS, J. C. C. et al. Evaluation of the radical, diethyl-1,4-phenylenediamine (DEPD) as a spectrophotometric probe for determining antioxidant capacities in beverages. **Química Nova**, v. 38, p. 948-956, 2015.
- SILVA, A. A. et al. Coumarins and phenolic fingerprints of oak and Brazilian woods extracted by sugarcane spirit. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 3681-3691, 2009.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6<sup>a</sup> edição. Rio de Janeiro, LTC, 2000.
- SOCHA, R. et al. Antioxidant activity and the most abundant phenolics in commercial dark beers. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 1, p. 595-609, 2017.
- SUN, Y.; PHAM, A. N.; WAITE, D. Elucidation of the interplay between Fe(II), Fe(III), and dopamine with relevance to iron solubilization and reactive oxygen species

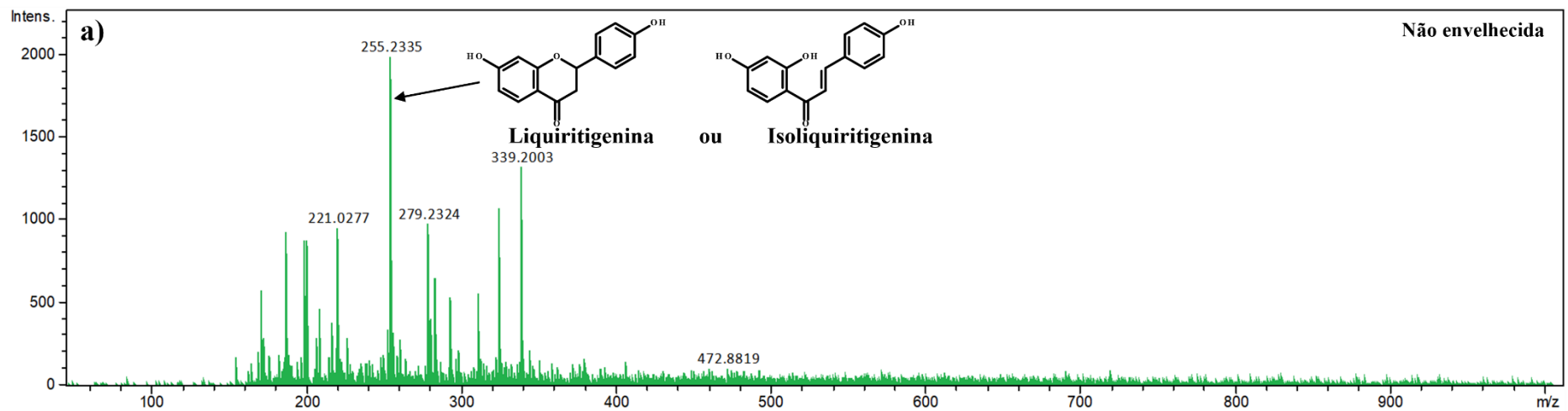
generation by catecholamines. **Journal of Neurochemistry**, v. 137, n. 6, p. 955–968, 2016.

VERRUMA-BERNARDI, M. R.; et al. Efeito do envelhecimento de aguardentes nas características sensoriais e preferência. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 14, n. 2, 219-224, 2012.

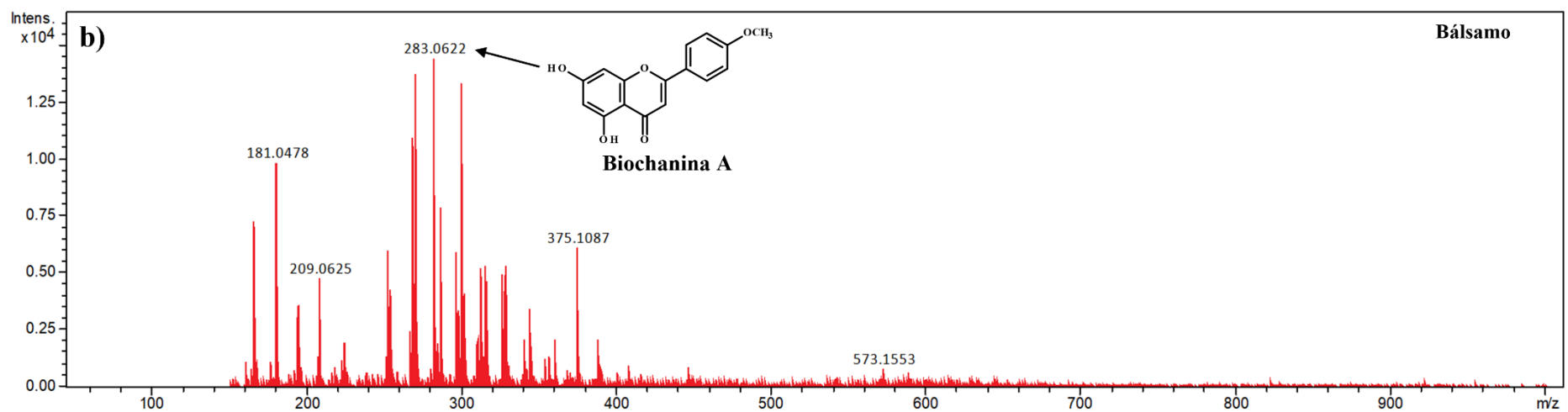
VICENTE, C. D.; ABREU, F. C.; GOULART, M. O. F.; VASCONCELOS, J. N. Phenolic Constituents, Furfuraldehyde and Antioxidant Capacity of Sugar Cane Spirit Aged in Woods Casks. **American Journal of Food Technology**, v. 6, p. 631-646, 2011.

**APÊNDICE A**

Figura SA1 – Espectros de massa (ESI) das amostras de cachaça envelhecidas por 12 meses



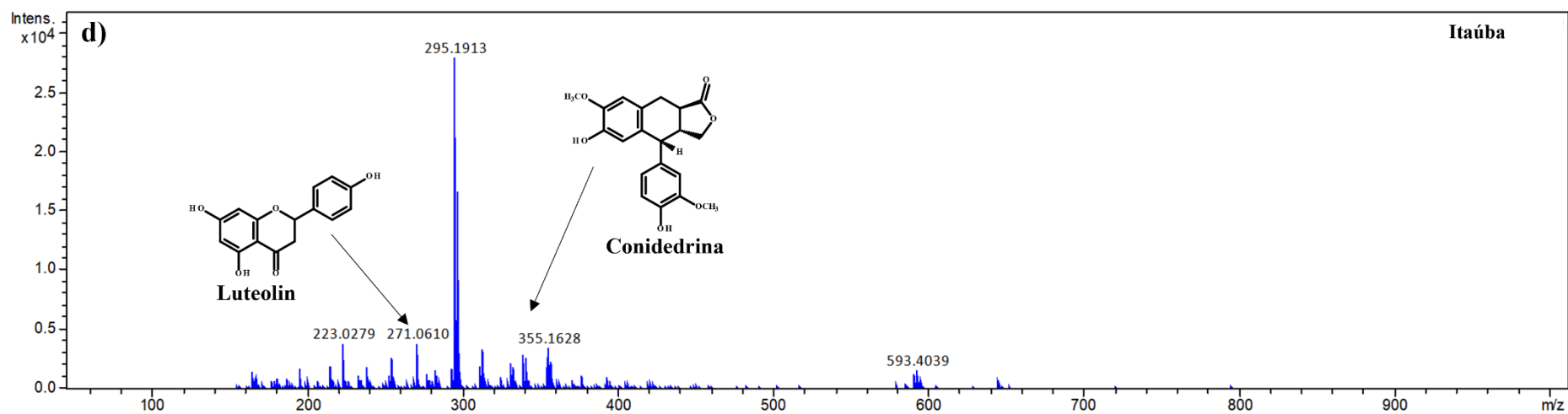
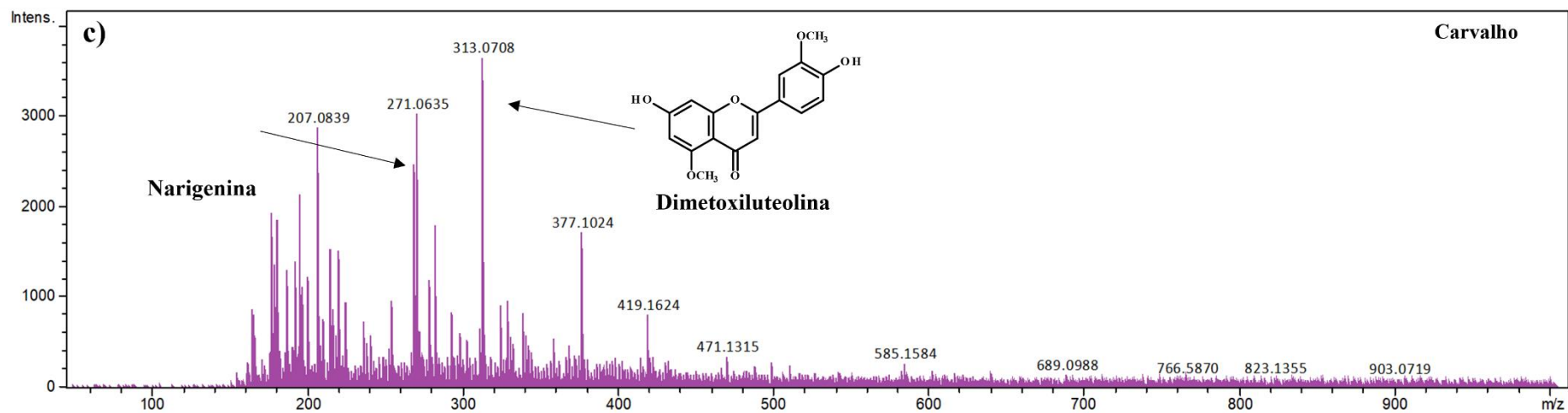
(Continua...)



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Figura SA1 – Espectros de massa (ESI) das amostras de cachaça envelhecidas por 12 meses

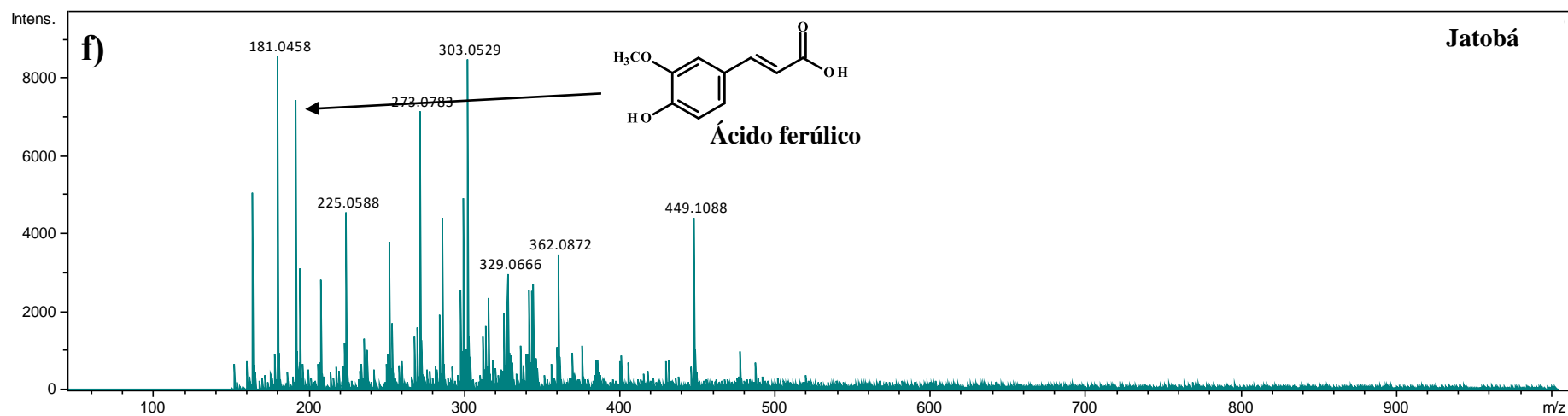
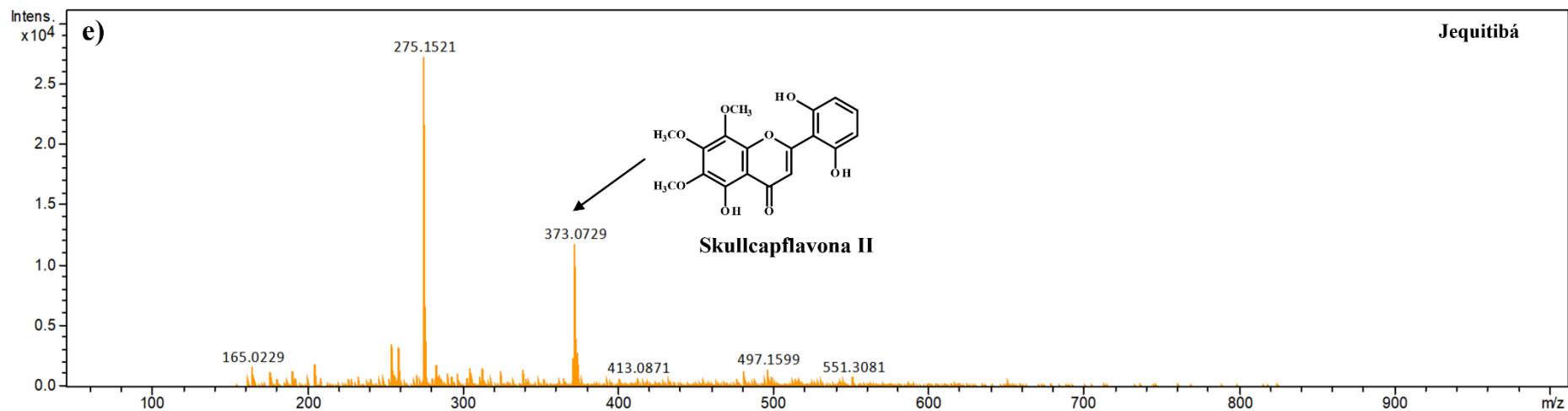
(Continua...)



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Figura SA1 – Espectros de massa (ESI) das amostras de cachaça envelhecidas por 12 meses

(Continua...)

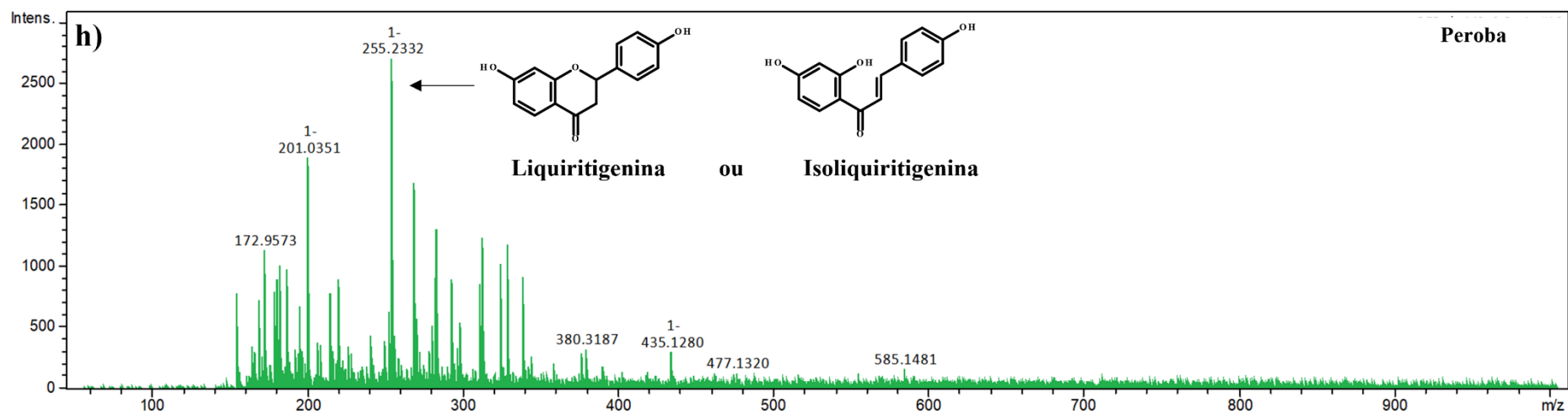
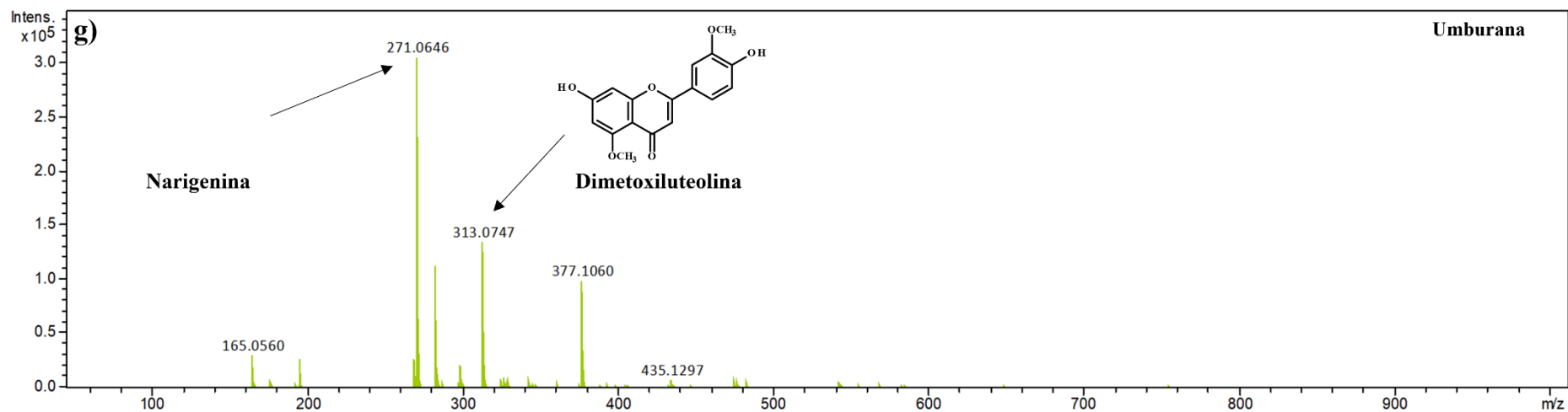


Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.



Figura SA1 – Espectros de massa (ESI) das amostras de cachaça envelhecidas por 12 meses

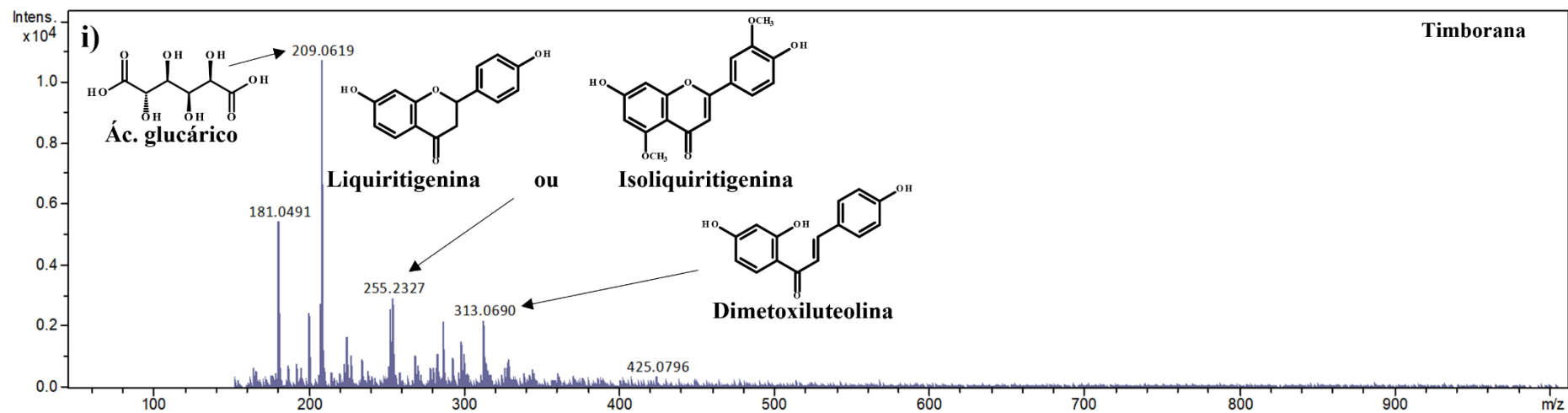
(Continua...)



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Figura SA1 – Espectros de massa (ESI) das amostras de cachaça envelhecidas por 12 meses

(Continua...)



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Figura SA1 – Espectros de massa (ESI) das amostras de cachaça envelhecidas por 12 meses

.....(Conclusão)

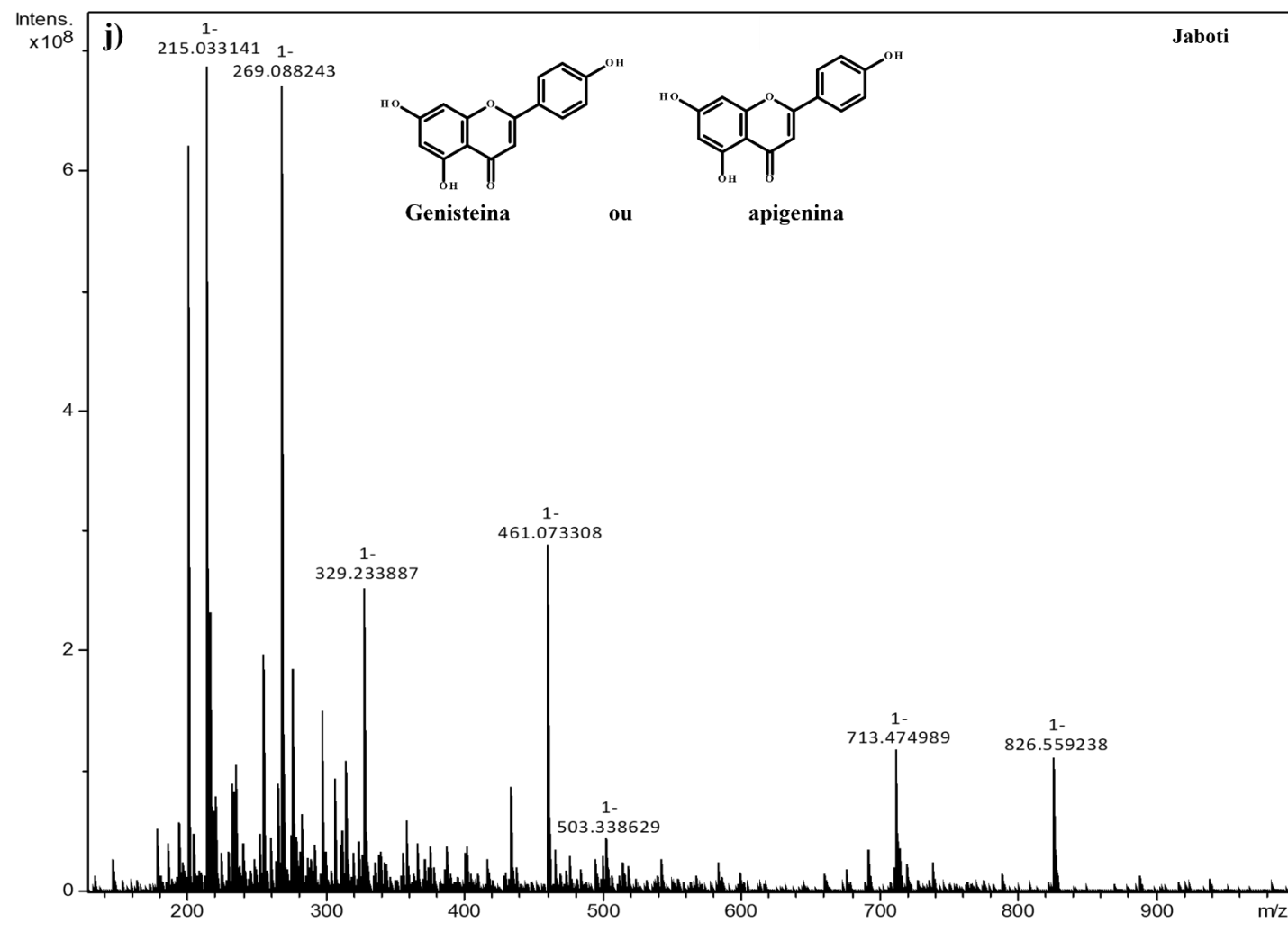


Tabela SA1 – Sinais m/z atribuídos a partir de dados (ESI<sup>-</sup>) para as amostras de cachaça envelhecida

(Continua...)

Amostra	Composto proposto	Massa	[M – H] <sup>-</sup>	Referência
Cachaça não envelhecida	Sinapaldeído	208	207	Silva et al., 2009. Sanz et al., 2012.
	Ácido pentadecanóico	242	241	Tosato et al., 2018
	Ácido palmitoléico	254	253	Tosato et al., 2018.
	Ácido palmítico; Liquiritigenina; Isoliquiritigenina	256	255	Tosato et al., 2018. Li et al., 2016
	Ácido oleico	282	281	Tosato et al., 2018
	Biochanina A; Wogonina	284	283	Santos et al., 2007. Zhang et al., 2008. Li et al., 2016
	Rhazinilam; Normacusina B; Longistilina CB	294	293	Lyon et al., 1973. Liu et al., 2010
	Hidrato de estaquiose ou isômeros	720.5	719.5	Tosato et al., 2018

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Tabela SA1 – Sinais m/z atribuídos a partir de dados (ESI<sup>-</sup>) para as amostras de cachaça envelhecida

(Continua...)

Amostra	Composto proposto	Massa	[M – H] <sup>-</sup>	Referência
Bálsamo	Ácido vanílico	168	167	Vicente et al., 2011; Sanz et al., 2012
	Siringadeído Harmane; D-iditol; D-glucitol	182	181	Sanz et al., 2012. Silva et al., 2019; Bortoletto; Alcarde, 2013. Azevedo et al., 2016.
	Genisteína; Apigenina	270	269	Santos et al., 2007. Liu et al., 2010
	(+)-7-Hidróxi-4'-metoxiisoflavanona; Naringenina	272	271	Oliveira et al., 1978. Fathoni et al., 2017. Li et al., 2016
	Biochanina A	284	283	Souza et al., 2007.
	(±) -7,3'-Diidróxi-4'-metoxiisoflavanona Dihidrokaempferol	288	287	Oliveira et al., 1978 Said et al., 2017
	Dimetilgenisteína	298	297	Santos et al., 2007
	Ácido elágico Quercetina	302	301	Souza et al., 2007; Fathoni et al., 2017.
	Dimetoxiluteolina	314	313	Fathoni et al., 2017.
	Ácido trihidróxi-octadecadienóico	328	327	Said et al., 2017
	Ácido trihidróxi-octadecanóico	330	329	Said et al., 2017
	Cicoolivil; Olivil.	376	375	Sanz et al., 2012.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Tabela SA1 – Sinais m/z atribuídos a partir de dados (ESI<sup>-</sup>) para as amostras de cachaça envelhecida

(Continua...)

Amostra	Composto proposto	Massa	[M – H] <sup>-</sup>	Referência
Carvalho	Coniferaldeído	178	177	Bortoletto; Alcarde, 2013. Sanz et al., 2012.
	Siringaldeído Harmane; D-itol; D-glucitol	182	181	Sanz et al., 2012. Silva et al., 2019; Bortoletto; Alcarde, 2013. Azevedo et al., 2016.
	Ácido hidroxigálico	188	187	Fathoni et al., 2017
	Ácido ferúlico	194	193	Dias, et al., 1998. Sanz et al., 2012.
	Etil galato Ácido siríngico	198	197	Souza et al., 2007. Bortoletto; Alcarde, 2013. Sanz et al., 2012.
	Sinapaldeído	208	207	Silva et al., 2009. Sanz et al., 2012.
	Ácido palmítico; Liquiritigenina; Isoliquiritigenina	256	255	Tosato et al., 2018. Li et al., 2016

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Tabela SA1 – Sinais m/z atribuídos a partir de dados (ESI<sup>-</sup>) para as amostras de cachaça envelhecida

(Continua...)

Amostra	Composto proposto	Massa	[M – H] <sup>-</sup>	Referência
Carvalho	Genisteína; Apigenina	270	269	Santos et al., 2007. Liu et al., 2010
	(+)-7-Hidroxi-4'-metoxiisoflavanona; Naringenina	272	271	Oliveira et al., 1978. Fathoni et al., 2017. Li et al., 2016
	5,7-dihidroxi-3- (p-tolil) cromen-4-ona; Rhazinilam; Normacusina B; Longistilina CB	284	283	Souza et al., 2007. Lyon et al., 1973. Liu et al., 2010
	Ácido elágico Quercetina	302	301	Souza et al., 2007; Fathoni et al., 2017; Said et al., 2017.
	Dimetoxiluteolina	314	313	Fathoni et al., 2017.
	Ácido trihidroxi-octadecanoico	330	329	Said et al., 2017
	Ácido cafeoil-2-hidroxietano-1,1,2- tricarboxílico	340	339,20	Said et al., 2017
	Ácido sinápico	224	223	Sinosaki et al., 2020
	(+)-7-Hidroxi-4'-metoxiisoflavanona; Naringenina	272	271	Oliveira et al., 1978. Fathoni et al., 2017. Li et al., 2016
	Luteolina	286	285	Fathoni et al., 2017
Itauba	Derivado do ácido cafeico	296	295	Francescato et al., 2013
	Dimetoxiluteolina	314	313	Fathoni et al., 2017.
	(3S)-2-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3,5,7-trimetil- 2,3-dihidrobenzofuran-6-ol	340	339	Yañez, et al., 1986.
	Conidendrina	356	355	Sanz et al., 2012.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Tabela SA1 – Sinais m/z atribuídos a partir de dados (ESI<sup>-</sup>) para as amostras de cachaça envelhecida

(Continua...)

Amostra	Composto proposto	Massa	[M – H] <sup>-</sup>	Referência
Jequitibá	Siringaldeído Harmane; D-itol; D-glucitol	182	181	Sanz et al., 2012. Silva et al., 2019; Bortoletto; Alcarde, 2013. Azevedo et al., 2016.
	Ácido ferúlico	194	193	Dias, et al., 1998. Sanz et al., 2012.
	Kaempferol	286	285	Fathoni et al., 2017. Said et al. 2017. Li et al., 2016
	(±) -7,3'-Diidroxí-4'-metoxiisoflavonona; Dihidrokaempferol	288	287	Oliveira et al., 1978 Said et al., 2017
	Gliricidina; 3-O-metilorobol; Baicaleína Z	300	299	Said et al., 2017. Zhang et al. 2008
	Skullcapflavona II	374	373	Zhang et al., 2008
	Dímero da Sakuranetina	552	551	Chen et al., 2016

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.



Tabela SA1 – Sinais m/z atribuídos a partir de dados (ESI<sup>-</sup>) para as amostras de cachaça envelhecida

(Continua...)

Amostra	Composto proposto	Massa	[M – H] <sup>-</sup>	Referência
Jatobá	Ácido elágico Quercetina	302	301	Souza et al., 2007; Fathoni et al., 2017. Said et al., 2017.
	Ácido Labd-8(20),13-dien-15-óico (ácido copalico), metil ester; Ácido Labd-8,13-dien-15-óico, metil ester; Ácido Labd-7,13-dien-15-óico, metil ester; Ácido cleroda-3,13-dien-15-oico; Ácido kolavenic, metil éster.	318	317	Doménech-Carbó et al., 2009
	Ácido trihidroxi-octadecadienoico	328	327	Said et al., 2017
	Ácido trihidroxi-octadecanóico	330	329	Said et al., 2017
	5,4'-dihidroxi-7,3'-dimetoxi8-metil homoisoflavanona	344	343	Ye et al., 2005
	(+)-7-Hidroxi-4'-metoxiisoflavanona; Naringenina	272	271	Oliveira et al., 1978. Fathoni et al., 2017. Li et al., 2016
Umburana	5,7-dihidroxi-3-(p-tolil) cromen-4-ona; Dimetoxiluteolina	284	283	Souza et al., 2007.
	5-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-3-(p tolil)croman-4-ona	314	313	Fathoni et al., 2017.
		378	377	Souza et al., 2007

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Tabela SA1 – Sinais m/z atribuídos a partir de dados (ESI<sup>-</sup>) para as amostras de cachaça envelhecida

(Continua...)

Amostra	Composto proposto	Massa	[M – H] <sup>-</sup>	Referência
Peroba	Ácido gálico	170	169	Fathoni et al., 2017. Li et al., 2016 Zhang et al., 2008
	Siringaldeído Harmane; D-iditol; D-glucitol	182	181	Sanz et al., 2012. Silva et al., 2019; Bortoletto; Alcarde, 2013. Azevedo et al., 2016.
	Ácido hidroxigálico	188	187	Fathoni et al., 2017
	Harmanocarboxylic acid	226	225	Pereira et al., 2007
	Genisteína; Apigenina	270	269	Santos et al., 2007. Liu et al., 2010
	(+)-7-Hidroxi-4'-metoxiisoflavanona; Naringenina	272	271	Oliveira et al., 1978. Fathoni et al., 2017. Li et al., 2016
	5,7-dihidroxi-3- (p-tolil) cromo-4-ona;	284	283	Souza et al., 2007.
	Rhazinilam; Normacusina B; Longistilina CB	294	293	Lyon et al., 1973. Liu et al., 2010
	Dimetoxiluteolina	314	313	Fathoni et al., 2017.
	Ácido trihidroxi-octadecanoico	330	329	Said et al., 2017

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Tabela SA1 – Sinais m/z atribuídos a partir de dados (ESI<sup>-</sup>) para as amostras de cachaça envelhecida

(Continua...)

Amostra	Composto proposto	Massa	[M – H] <sup>-</sup>	Referência
Timborana	Siringaldeído Harmane; D-itol; D-glucitol	182	181	Sanz et al., 2012. Silva et al., 2019; Bortoletto; Alcarde, 2013. Azevedo et al., 2016.
	Ácido glicárico	210	209	Fernández-Poyatos et al., 2019
	Ácido palmítico; Liquiritigenina; Isoliquiritigenina	256	255	Tosato et al., 2018. Li et al., 2016
	(±) -7,3'-Diidroxi-4'-metoxiisoflavanona Dihidrokaempferol	288	287	Oliveira et al., 1978 Said et al., 2017
	Dimetoxiluteolina	314	313	Fathoni et al., 2017.
Jaboti	Siringaldeído Harmane; D-itol; D-glucitol	182	181	Sanz et al., 2012. Silva et al., 2019; Bortoletto; Alcarde, 2013. Azevedo et al., 2016.
	Sinapaldeído	208	207	Silva et al., 2009. Sanz et al., 2012.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Tabela SA1 – Sinais m/z atribuídos a partir de dados (ESI<sup>-</sup>) para as amostras de cachaça envelhecida

(Continua...)

Amostra	Composto proposto	Massa	[M – H] <sup>-</sup>	Referência
Jaboti	Ácido palmítico; Liquiritigenina; Isoliquiritigenina	256	255	Tosato et al., 2018. Li et al., 2016
	Formononetina	268	267	Li et al., 2016
	Genisteina; Apigenina	270	269	Santos et al., 2007. Liu et al., 2010
	(+)-7-Hidroxi-4'-metoxiisoflavanona; Naringenina	272	271	Oliveira et al., 1978. Fathoni et al., 2017. Li et al., 2016
	5,7-Dihidróxi-3- (p-tolil) cromen-4-ona;	284	283	Souza et al., 2007.
	Biochanina; Wogonina	284	283	Santos et al., 2007. Zhang et al., 2008. Li et al., 2016
	Catequina Epicatequina	290	289	Said et al., 2017
	Rhazinilam; Normacusina B; Longistilina B	294	293	Lyon et al., 1973. Liu et al., 2010
	Derivado de dimetilpelargonidina	301	300	Said et al., 2017

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Tabela SA1 – Sinais m/z atribuídos a partir de dados (ESI<sup>-</sup>) para as amostras de cachaça envelhecida

.....(Conclusão)

Amostra	Composto proposto	Massa	[M – H] <sup>-</sup>	Referência
Jaboti	Ácido elágico Quercetina	302	301	Souza et al., 2007; Fathoni et al., 2017; Said et al., 2017.
	Cajanol	316	315	Liu et al., 2010
	Ácido 5- <i>O-p</i> -cumaroilhiquímico (5- <i>p</i> -CoSA); Ácido 4- <i>O-p</i> -cumaroilhiquímico (3- <i>p</i> -CoSA)	320	319	Said et al., 2017
	Ácido trihidroxi-octadecadienoico	328	327	Said et al., 2017
	Ácido trihidroxi-octadecanoico	330	329	Said et al., 2017
	5,4'-dihidroxi-7,3'-dimetoxi8-metil homoisoflavanona	344	343	Ye et al., 2005
	Ácido Pentahidroxi-octadecanóico	348	347	Said et al., 2017
	Conidendrina	356	355	Sanz et al., 2012.
	Secoisolariciresinol	362	361	Sanz et al., 2012.
	Skullcapflavona II	374	373	Zhang et al., 2008
	Cicoolivil; Olivil.	376	375	Sanz et al., 2012.
	Oleosideo	390	389	Sanz et al., 2012
	Mangiferina; Isomangiferina	422	421	Zhang et al. 2008
	Crisoeriol hexosídeo; Verbasosídeo; 2,3-Dihidro-oroxilosídeo; 2,3-Dihidro-wogonosídeo	462	461	Said et al., 2017. Sanz et al.,2012. Zhang et al. 2008
	Oxipaeoniflorina	496	495	Li et al., 2016
	Ácido 3,4-Di- <i>O</i> -( <i>E</i> )-cafeoilquínico	516	515	El Sayed et al., 2016
	Ácido 5- <i>O-p</i> -coumaroil-4- <i>O</i> -cafeoil-4- metilpentanóico-5-hidroxi-3-quinato	694	693	Said et al., 2017

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

**Tabela SA2 – Capacidade antioxidante das amostras de cachaça envelhecida em diferentes madeiras pelos métodos de Folin-Ciocalteu, ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup> e FRAP.**

(Continua...)

Amostras		Resultados dos métodos (eq, mg L <sup>-1</sup> )											
		FC			ABTS <sup>•+</sup>			DPPH <sup>•</sup>			FRAP		
Madeiras	Ciclo.mês	AG	QU	TR	AG	QU	TR	AG	QU	TR	AG	QU	TR
UMB	1.3	269±5	400±13	1221±122	73±2	129±5	732±34	100±5	66±3	143±7	98±5	119±4	488±49
	1.6	401±8	814±27	1813±181	93±3	164±6	895±42	125±6	83±4	179±8	204±10	243±8	850±85
	1.12	548±11	603±20	2483±248	100±3	178±6	958±45	132±7	88±4	189±9	215±11	256±9	888±89
BAL	1.3	472±9	697±23	2142±214	72±2	127±5	724±34	412±21	282±13	594±28	468±23	553±18	1754±175
	1.6	611±12	911±30	2767±277	77±2	136±5	767±36	409±20	280±13	589±27	580±29	686±23	2213±221
	1.12	802±16	1206±40	3625±362	91±3	161±6	881±41	601±30	417±19	871±40	693±35	818±27	2600±260
JAT	1.3	331±7	480±16	1508±151	59±2	104±4	615±29	214±11	140±7	304±14	394±20	466±16	1500±150
	1.6	369±7	537±18	1675±167	82±3	145±5	804±37	273±14	183±8	391±18	385±19	456±15	1471±147
	1.12	756±15	1134±38	3417±342	172±5	304±11	1548±72	590±29	409±19	854±40	783±39	924±31	2906±291
JEQ	1.3	226±5	333±11	1025±102	74±2	130±4	737±34	97±5	63±3	137±6	194±10	232±8	817±82
	1.6	213±4	313±10	967±97	71±2	126±5	719±33	131±7	87±4	187±9	88±4	108±4	454±45
	1.12	422±8	636±21	1908±191	106±3	187±7	1003±47	177±9	121±6	255±12	363±18	430±14	1396±140
TIM	1.3	95±2	131±4	438±44	6±0,2	11±0,4	56±3	76±4	48±2	106±5	77±4	95±3	417±42
	1.6	187±4	273±9	850±85	12±0,4	21±0,8	124±6	192±10	131±6	276±13	199±10	238±8	833±83
	1.12	405±8	610±20	1833±183	31±1	55±2	282±13	354±18	247±11	514±24	405±20	479±16	1538±154
JAB	1.3	55±1	82±3	249±25	6,4±0,2	11±0,4	66±3	49±2	34±2	71±3	146±7	172±6	530±53
	1.6	73±2	110±4	331±33	5,8±0,2	10±0,4	61±3	56±3	39±2	82±4	77±4	91±3	293±29
	1.12	147±3	211±7	671±67	10±0,3	19±0,7	99±5	92±5	65±3	134±6	95±5	116±4	479±48

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

**Tabela SA2 – Capacidade antioxidante das amostras de cachaça envelhecida em diferentes madeiras pelos métodos de Folin-Ciocalteu, ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup> e FRAP.**

(Continua...)

Amostras		Resultados dos métodos (eq. mg L <sup>-1</sup> )											
		FC			ABTS <sup>•+</sup>			DPPH <sup>•</sup>			FRAP		
Madeira	Ciclo.Mês	AG	QU	TR	AG	QU	TR	AG	QU	TR	AG	QU	TR
CAR	1.3	16±0,3	22±1	75±7	1,1±0,1	2,0±0,2	10±1	4,4±0,3	2,0±0,3	6±1	11±1	14±0,5	69±7
	1.6	26±0,5	36±1	117±12	1,6±0,1	2,8±0,2	14±1	16±1	10±1	22±1	22±1	27±1	106±11
	1.12	29±0,6	41±1	130±13	1,7±0,1	3,0±0,2	15±1	32±2	22±1	46±2	31±2	37±1	135±14
PER	1.3	12±0,2	18±0,5	54±5	2,5±0,1	4,3±0,2	27±1	4,5±0,3	3±0,4	7±1	8±0,5	9±0,4	29±3
	1.6	29±0,6	41±1	131±13	3,6±0,1	6,4±0,3	36±2	5,6±0,3	4±0,4	8±1	10±0,5	12±0,5	38±4
	1.12	74±2	83±3	35±3	2,5±0,1	4,4±0,2	27±1	5,7±0,3	4±0,5	8±1	30±1	36±1	132±13
ITA	1.3	12±0,2	17±0,6	52±5	2,6±0,1	4,6±0,2	28±1	5,7±0,3	4±0,4	8±1	8±0,4	11±0,4	31±3
	1.6	13±0,3	19±0,6	58±6	2,6±0,1	4,6±0,2	28±1	6,0±0,3	4±0,5	9±1	8±0,4	10±0,4	8±1
	1.12	21±0,4	29±1	97±10	3,4±0,1	6,0±0,3	34±2	10±1	7±0,6	15±1	20±1	24±1	98±10
CNE	1	5±0,1	7±0,2	22±2	0,2±0,1	0,4±0,1	2±0,5	2±0,2	1±0,2	2±1	1±0,1	2±0,1	1±0,1

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

**Tabela SA2 – Capacidade antioxidante das amostras de cachaça envelhecida em diferentes madeiras pelos métodos de Folin-Ciocalteu, ABTS<sup>+</sup>, DPPH<sup>•</sup> e FRAP.**

(Continua...)

Amostras		Resultados dos métodos (eq. mg L <sup>-1</sup> )											
Madeira	Ciclo.Mês	FC			ABTS <sup>+</sup>			DPPH <sup>•</sup>			FRAP		
		AG	QU	TR	AG	QU	TR	AG	QU	TR	AG	QU	TR
UMB	2.3	333±7	499±17	1508±151	47±2	84±3	454±21	53±3	60±3	78±4	153±8	182±6	630±63
	2.6	435±9	656±22	1967±197	69±2	122±4	632±29	47,4±2	52±3	69 ±3	218±11	260±9	900±90
	2.12	578±12	860±29	2617±262	89±3	158±6	801±37	53±3	59±3	78±4	285±14	339±11	1129±113
BAL	2.3	200±4	277±9	917±92	35±1	62 ±2	355±17	109±5	36±2	99±5	206±10	246±8	858±86
	2.6	274±5	391±13	1250±125	40±1	71±3	396±18	163±8	108±5	186±9	254±13	302±10	1021±102
	2.12	367±7	534±18	1667±167	46±1	82±3	447±21	225±11	191±9	287±13	334±17	396±13	1296±130
JAT	2.3	156±3	209±7	717±72	14±0,4	25±1	129±6	78±4	5±0,5	49±2	174±9	209±7	750±75
	2.6	222±4	311±10	1017±102	17±0,5	30±1	153±7	80±4	1±0,3	53±3	280±14	333±11	1113±111
	2.12	265±5	377±13	1208±121	20±1	36±1	179±8	191±10	146±7	232±11	276±14	328±12	1096±110
JEQ	2.3	76±2	101±3	350±35	26±1	46±2	278±13	50±3	13±1	43±2	40±2	52±2	292±29
	2.6	92±2	126±4	421±42	36±1	64±2	364±17	36±2	6±1	20±1	49±2	62±2	321±32
	2.12	192±4	280±9	871±87	42±1	75±3	413±19	111±6	94±4	141±7	128±6	155±5	592±59
TIM	2.3	43±1	50±2	200±20	12±0,4	21±1	124±6	33±2	10±1	15±1	23±1	32±1	233±23
	2.6	78±2	104±3	358±36	16±0,5	28±1	155±7	115±6	99±5	148±7	81±4	99±3	429±43
	2.12	147±3	211±7	671±67	18±0,6	32±1	174±8	108±5	90±4	137±6	168±8	202±7	729±73
JAB	2.3	6±1	7±1	30±3	4±0,1	7±3	38±2	1±0,2	10±1	6±1	15±1	18±1	81±8
	2.6	18±1	24±1	81±8	4±0,1	6±0,3	37±2	15,1±1	9±1	17±1	19±1	23±1	96±10
	2.12	29±1	42±1	134±13	4±0,1	7±0,3	39±2	26±1	24±1	35±2	32±2	38±1	140±14

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.



**Tabela SA2 – Capacidade antioxidante das amostras de cachaça envelhecida em diferentes madeiras pelos métodos de Folin-Ciocalteu, ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup> e FRAP.**

.....(Conclusão)

Amostras		Resultados dos métodos (eq. mg L <sup>-1</sup> )											
Madeira	Ciclo.Mês	FC			ABTS <sup>•+</sup>			DPPH <sup>•</sup>			FRAP		
		AG	QU	TR	AG	QU	TR	AG	QU	TR	AG	QU	TR
CAR	2.3	8±0,2	9±1	36±4	0,9±0,1	2±0,2	8±0,6	16,7±1	18±1	24±1	10±0,5	12±0,5	63±6
	2.6	17±1	24±1	80±8	1±0,1	3±0,2	13±1	19,3±1	21±1	28±1	13±1	17±1	77±8
	2.12	34±1	49±2	155±16	2±0,1	4±0,2	18±1	16,3±1	11±1	19±1	36±2	44±1	155±15
PER	2.3	5±0,1	7±0,2	21±2	0,7±0,1	1,3±0,2	8±0,5	3±0,2	2±0,4	3±1	2±0,1	3±0,2	11±1
	2.6	7±0,2	10±0,3	32±3	0,9±0,1	1,6±0,2	9±1	6±0,3	6±1	8±1	6±0,3	7±0,3	24±2
	2.12	24±1	34±1	110±11	2,0±0,1	3,8±0,2	19±1	8±0,4	9±1	11±1	12±1	13±0,5	44 ±4
ITA	2.3	1±0,1	0,4±0,02	5±1	0,7±0,1	1,2±0,2	7±1	3±0,2	3±0,4	4±1	3±0,1	3±0,2	13±1
	2.6	4±0,1	5,6±0,2	21±2	0,9±0,1	1,4±0,2	8±1	4±0,3	4±0,5	5±1	4±0,2	5 ±0,3	18±2
	2.12	7±0,2	9±0,3	31±3	0,9±0,1	1,6±0,2	9±1	7±0,4	8±1	10±1	8±0,4	10±0,4	31±3
CNE	2	2±0,1	3±0,1	11±1	0,2±0,1	0,4±0,1	2±0,5	1±0,2	0,6±0,2	1±0,3	1±0,1	2±0,1	7±1

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Tabela SA3 – Resultados da avaliação da capacidade de sequestro de oxido nítrico (NO)

(Continua...)

Ciclo	Tempo (min)	Ref, C*NO $\mu$ M	Padrões se amostras / C*NO $\mu$ M											
			AG	QU	TR	UMB 1.3	UMB 1.6	UMB 1.12	BAL 1.3	BAL 1.6	BAL 1.12	JAT 1.3	JAT 1.6	JAT 1.12
Ano 1	0	2,48 $\pm$ 0,05	0,77 $\pm$ 0,02	0,81 $\pm$ 0,02	0,82 $\pm$ 0,02	1,12 $\pm$ 0,03	1,01 $\pm$ 0,03	1,13 $\pm$ 0,03	1,40 $\pm$ 0,04	1,11 $\pm$ 0,03	1,84 $\pm$ 0,04	1,50 $\pm$ 0,04	1,44 $\pm$ 0,04	2,23 $\pm$ 0,05
	30	4,70 $\pm$ 0,1	0,85 $\pm$ 0,02	0,84 $\pm$ 0,03	0,93 $\pm$ 0,02	1,26 $\pm$ 0,03	1,11 $\pm$ 0,03	1,26 $\pm$ 0,03	1,35 $\pm$ 0,03	1,42 $\pm$ 0,04	1,28 $\pm$ 0,03	1,62 $\pm$ 0,04	1,46 $\pm$ 0,04	2,33 $\pm$ 0,05
	60	6,24 $\pm$ 0,1	0,95 $\pm$ 0,02	0,99 $\pm$ 0,02	0,95 $\pm$ 0,02	1,41 $\pm$ 0,03	1,09 $\pm$ 0,03	1,25 $\pm$ 0,03	1,63 $\pm$ 0,03	1,57 $\pm$ 0,04	1,68 $\pm$ 0,03	1,61 $\pm$ 0,03	1,73 $\pm$ 0,04	2,51 $\pm$ 0,05
	90	7,40 $\pm$ 0,2	0,96 $\pm$ 0,03	1,13 $\pm$ 0,03	1,02 $\pm$ 0,03	1,25 $\pm$ 0,03	1,35 $\pm$ 0,04	1,32 $\pm$ 0,04	1,69 $\pm$ 0,04	1,83 $\pm$ 0,04	1,60 $\pm$ 0,04	1,65 $\pm$ 0,05	2,00 $\pm$ 0,05	2,36 $\pm$ 0,05
	120	8,19 $\pm$ 0,2	0,98 $\pm$ 0,03	1,34 $\pm$ 0,03	1,08 $\pm$ 0,03	1,34 $\pm$ 0,03	1,42 $\pm$ 0,03	1,33 $\pm$ 0,03	1,81 $\pm$ 0,04	1,55 $\pm$ 0,04	1,63 $\pm$ 0,04	1,76 $\pm$ 0,04	2,04 $\pm$ 0,05	2,41 $\pm$ 0,05
	150	8,49 $\pm$ 0,2	1,02 $\pm$ 0,03	1,39 $\pm$ 0,03	1,12 $\pm$ 0,04	1,67 $\pm$ 0,04	1,33 $\pm$ 0,03	1,00 $\pm$ 0,02	1,66 $\pm$ 0,04	1,80 $\pm$ 0,04	1,49 $\pm$ 0,04	2,03 $\pm$ 0,05	1,90 $\pm$ 0,04	2,52 $\pm$ 0,06
Ano 2	0	2,52 $\pm$ 0,06	0,75 $\pm$ 0,03	0,83 $\pm$ 0,03	0,82 $\pm$ 0,03	1,36 $\pm$ 0,03	1,48 $\pm$ 0,04	1,51 $\pm$ 0,04	1,49 $\pm$ 0,04	1,66 $\pm$ 0,04	1,9 $\pm$ 0,04	1,5 $\pm$ 0,04	1,57 $\pm$ 0,04	1,47 $\pm$ 0,04
	30	4,65 $\pm$ 0,1	0,85 $\pm$ 0,03	0,87 $\pm$ 0,03	0,95 $\pm$ 0,03	1,81 $\pm$ 0,4	1,74 $\pm$ 0,04	1,66 $\pm$ 0,04	1,74 $\pm$ 0,04	1,83 $\pm$ 0,04	2,13 $\pm$ 0,05	2,27 $\pm$ 0,05	1,89 $\pm$ 0,04	1,71 $\pm$ 0,04
	60	6,48 $\pm$ 0,1	0,97 $\pm$ 0,03	0,99 $\pm$ 0,03	0,99 $\pm$ 0,02	1,8 $\pm$ 0,04	1,77 $\pm$ 0,04	1,82 $\pm$ 0,04	2,05 $\pm$ 0,05	2,13 $\pm$ 0,05	2,32 $\pm$ 0,05	2,05 $\pm$ 0,05	2,14 $\pm$ 0,05	1,93 $\pm$ 0,04
	90	7,36 $\pm$ 0,1	0,99 $\pm$ 0,03	1,17 $\pm$ 0,03	1,06 $\pm$ 0,03	2,09 $\pm$ 0,05	1,85 $\pm$ 0,04	1,97 $\pm$ 0,04	2,29 $\pm$ 0,05	1,99 $\pm$ 0,04	2,32 $\pm$ 0,05	2,30 $\pm$ 0,05	2,26 $\pm$ 0,05	2,09 $\pm$ 0,05
	120	8,22 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,03	1,29 $\pm$ 0,03	1,13 $\pm$ 0,03	2,25 $\pm$ 0,05	2,09 $\pm$ 0,05	2,09 $\pm$ 0,05	2,4 $\pm$ 0,05	2,23 $\pm$ 0,05	2,57 $\pm$ 0,06	2,53 $\pm$ 0,06	2,38 $\pm$ 0,05	2,23 $\pm$ 0,05
	150	8,53 $\pm$ 0,2	1,16 $\pm$ 0,03	1,33 $\pm$ 0,03	1,2 $\pm$ 0,03	2,29 $\pm$ 0,05	2,2 $\pm$ 0,05	2,17 $\pm$ 0,05	2,45 $\pm$ 0,05	2,40 $\pm$ 0,05	2,76 $\pm$ 0,06	2,95 $\pm$ 0,06	2,67 $\pm$ 0,06	2,29 $\pm$ 0,05

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Tabela SA3 – Resultados da avaliação da capacidade de sequestro de oxido nítrico (NO)

.....(Conclusão)

Período	Tempo (min)	Ref, C <sub>NO</sub> μM	Padrões e amostras / C <sub>NO</sub> μM								
			AG	QU	TR	JEQ	TIM	JAB	CAR	PER	ITA
Ciclo 1	0	2,48±0,2	0,77±0,03	0,81±0,03	0,82±0,03	1,08±0,05	1,99±0,05	1,23±0,05	0,76±0,05	1,18±0,05	1,12±0,06
	30	4,70±0,1	0,85±0,03	0,84±0,03	0,93±0,03	1,07±0,03	2,38±0,05	1,53±0,04	1,01±0,03	1,32±0,03	1,25±0,03
	60	6,24±0,1	0,95±0,03	0,99±0,03	0,95±0,03	1,28±0,03	2,46±0,05	1,53±0,04	1,38±0,03	1,39±0,04	1,50±0,04
	90	7,40±0,2	0,96±0,03	1,13±0,03	1,02±0,03	1,64±0,04	2,43±0,05	1,79±0,04	1,22±0,03	1,41±0,04	1,58±0,04
	120	8,19±0,2	0,98±0,03	1,34±0,03	1,08±0,03	1,70±0,04	2,51±0,05	1,67±0,04	1,56±0,04	1,51±0,04	1,68±0,04
	150	8,49±0,2	1,02±0,03	1,39±0,03	1,12±0,03	1,65±0,04	2,69±0,06	1,99±0,04	1,5±0,05	1,70±0,04	1,91±0,04
Ciclo 2	0	2,52±0,1	0,75±0,03	0,83±0,03	0,82±0,03	1,26±0,03	1,34±0,03	1,23±0,03	1,26±0,03	1,25±0,03	1,21±0,03
	30	4,65±0,1	0,85±0,03	0,87±0,03	0,95±0,03	1,91±0,04	1,81±0,04	1,55±0,04	1,47±0,04	1,64±0,04	1,47±0,04
	60	6,48±0,1	0,97±0,03	0,99±0,03	1,11±0,03	2,42±0,05	2,12±0,05	1,64±0,04	1,7±0,04	1,75±0,04	1,79±0,04
	90	7,36±0,1	0,99±0,03	1,17±0,03	1,06±0,03	2,55±0,06	2,41±0,05	2,07±0,05	1,74±0,04	1,97±0,05	2,04±0,06
	120	8,22±0,2	1,1±0,03	1,29±0,03	1,13±0,03	2,49±0,05	2,40±0,05	2,17±0,05	1,95±0,04	2,13±0,05	2,04±0,05
	150	8,53±0,2	1,16±0,03	1,33±0,03	1,20±0,03	2,90±0,06	2,58±0,06	2,37±0,05	2,18±0,05	2,2±0,05	2,18±0,05

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Tabela SA4 - Matriz de correlação entre compostos fenólicos totais e os resultados para os diferentes métodos e padrões avaliados.

	Metodo-Padrão												
	FC-AG	FC-QC	FC-TR	ABTS-AG	ABTS-QC	ABTS-TR	DPPH-AG	DPPH-QC	DPPH-TR	FRAP-AG	FRAP-QC	FRAP-TR	
FC-AG	-												
FC-QC	0,9909	-											
FC-TR	0,9293	0,9208	-										
ABTS-AG	0,9009	0,8996	0,8592	-									
ABTS-QC	0,9009	0,8995	0,8592	1,0000	-								
ABTS-TR	0,8873	0,8855	0,8207	0,7616	0,7615	-							
DPPH-AG	0,8294	0,8276	0,8216	0,7077	0,7077	0,7880	-						
DPPH-QC	0,8196	0,8191	0,8051	0,7011	0,7010	0,7922	0,9883	-					
DPPH-TR	0,8060	0,8082	0,8138	0,7533	0,7533	0,6743	0,9300	0,9133	-				
FRAP-AG	0,9069	0,9037	0,8490	0,7895	0,7894	0,8315	0,9364	0,9064	0,8974	-			
FRAP-QC	0,9081	0,9049	0,8505	0,7911	0,7911	0,8331	0,9364	0,9063	0,8968	1,0000	-		
FRAP-TR	0,9179	0,9141	0,8630	0,8043	0,8042	0,8464	0,9351	0,9046	0,8889	0,9973	0,9978	-	

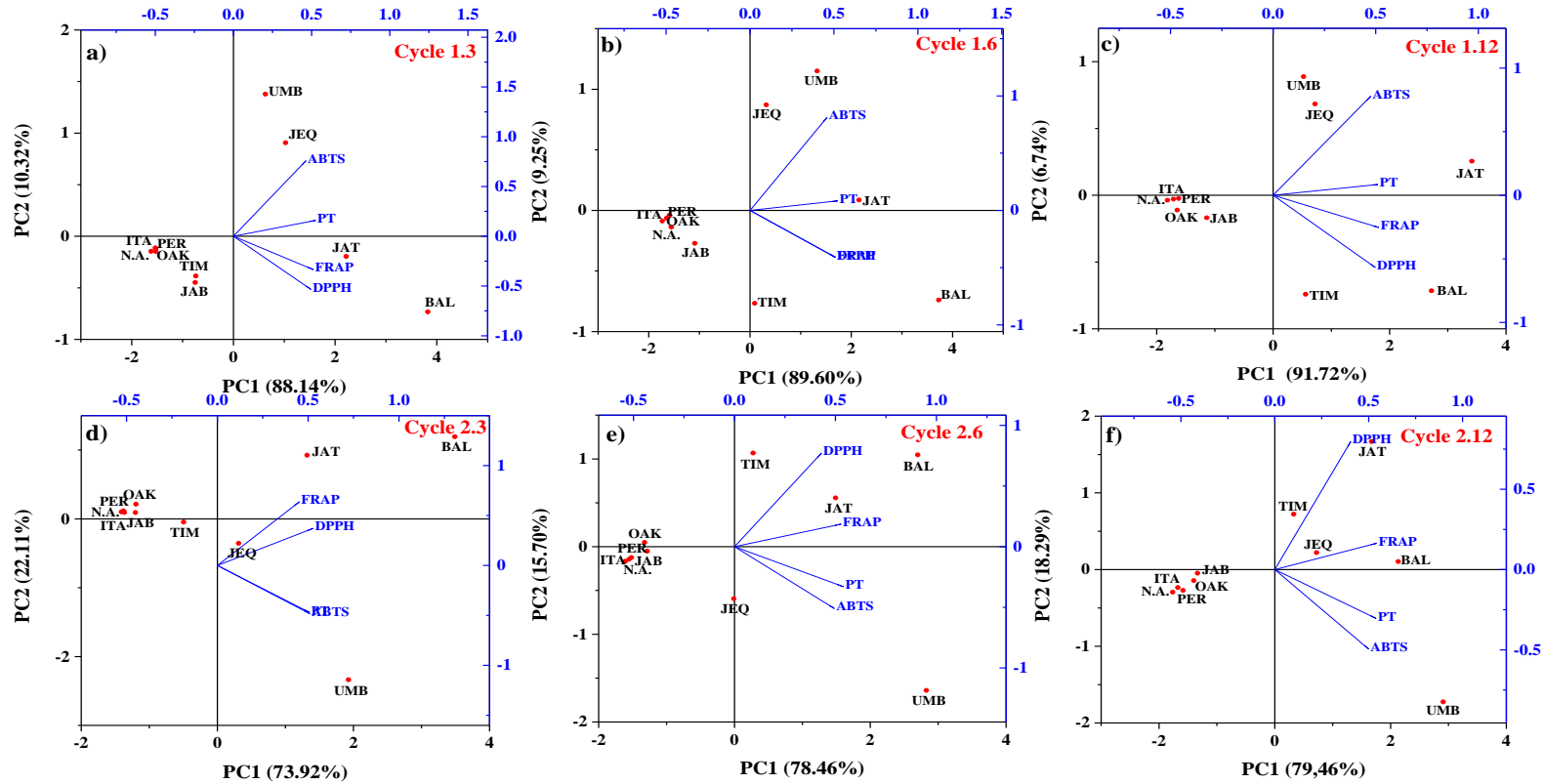
Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Tabela SA5 – Acidez acética das cachaças em processo de envelhecimento nos barris de nove diferentes madeiras.

Ciclo.Mês	Madeiras									
	CNE	BAL	CAR	JAB	PER	JAT	JEQ	ITA	TIM	UMB
Ciclo 1										
1.3	58,3	119,4	69,5	66,1	80,8	105,3	84,5	63,3	81,5	199,1
1.6	56,7	118,7	69,9	68,9	82,2	104,2	86,2	65,6	79,3	196,6
1.12	53,7	121,4	70,5	72,7	93,0	110,8	95,8	63,3	81,3	182,0
Ciclo 2										
2.3	101,1	122,1	106,4	103,8	95,0	122,8	106,5	108,1	113,0	128,8
2.6	99,8	124,6	109,2	103,9	96,0	120,1	109,4	108,0	115,1	131,5
2.12	99,1	130,5	111,5	103,4	95,9	116,2	118,1	105,9	114,4	132,7

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Figura SA5– Análise dos componentes principais: gráficos dos scores e loading para relação PC1 × PC2 nos dois ciclos de envelhecimento das cachaças.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

## REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, F. M. et al. Constituintes Químicos e avaliação da Letalidade de *Pseudopiptadenia Contorta* (DC.) G. P. Lewis & M. P. Lima (Fabaceae) frente à *Artemia salina* Leach. **Revista Virtual da Química**, v. 8, n. 1, p. 78-86, 2016.
- BORTOLETTO, A. M.; ALCARDE, A. R. Congeners in sugar cane spirits aged in casks of different woods. **Food Chemistry**, v. 139, p. 695-701, 2013.
- CHEN, G. et al. Analysis of Flavonoids in *Rhamnus davurica* and Its Antiproliferative Activities. **Molecules**, v. 21, p. 1-14, 2016.
- DIAS, S. et al. Efeito de Diferentes Madeiras Sobre a Composição da Aguardente de Cana Envelhecida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18 (3), p. 1-9, 1998.
- DOMÉNECH-CARBÓ, M. T. et al. Ageing behaviour and analytical characterization of the Jatobá resin collected from *Hymenaea stigonocarpa* Mart. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 284, p. 81-92, 2009.
- EL SAYED, A. M. et al. In vivo diabetic wound healing effect and HPLC–DAD–ESI–MS/MS profiling of the methanol extracts of eight Aloe species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 352-362, 2016.
- FATHONI, A. et al. "Identification of nonvolatile compounds in clove (*Syzygium aromaticum*) from Manado", **AIP Conference Proceedings** 1862, 030079 (2017).
- FRANCESCATO, L. N. et al. Identification of phenolic compounds in *Equisetum giganteum* by LC–ESI-MS/MS and a new approach to total flavonoid quantification. **Talanta**, v. 105, p. 192-203, 2013.
- LI, F. et al. Metabolic profiling of Shu-Yu capsule in rat serum based on metabolic fingerprinting analysis using HPLC-ESI-MS<sup>n</sup>. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, p. 4191-4204, 2016.
- LIU, W. et al. Determination and quantification of active phenolic compounds in pigeon pea leaves and its medicinal product using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 4723-4731, 2010.
- LYON, R. L. et al. Biological and Phytochemical Evaluation of Plants XI: Isolation of Aspidospermine, Quebrachidine, Rhazinilam, ( - )-Pyrifolidine, and Akuammidine from *Aspidosperm quebracho-blanco* (Apocynaceae). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62 (2), p. 218-221, 1973.
- OLIVEIRA, A. B. et al. Isoflavonoids from *Myroxylon Balsamum*\*. **Phytochemistry**, v. 17, p. 593-595, 1978.
- SAID, R. B. et al. Tentative Characterization of Polyphenolic Compounds in the Male Flowers of *Phoenix dactylifera* by Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry and DFT. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 512, p. 1-18, 2017.

SANZ, M. et al. LC-DAD/ESI-MS/MS study of phenolic compounds in ash (*Fraxinus excelsior* L. and *F. americana* L.) heartwood. Effect of toasting intensity at cooperage. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, n. 7, p. 905-918, 2012.

SILVA, A. A. et al. Coumarins and phenolic fingerprints of oak and Brazilian woods extracted by sugarcane spirit. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 3681-3691, 2009.

SILVA, C. P. et al. Identification and action of phenolic compounds of Jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stagnocarpa* Mart.) on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activities and flour effect on glycemic response and nutritional quality of breads. **Food Research International**, v. 116, p. 1076-1083, 2019.

SINOSAKI, N. B. M. et al. Structural Study of Phenolic Acids by Triple Quadrupole Mass Spectrometry with Electrospray Ionization in Negative Mode and H/D Isotopic Exchange. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 2, p. 402-408, 2020.

SOUZA, P. P. et al. Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting of Brazilian Artisan Cachaça Aged in Different Wood Casks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 2094-2102, 2007.

TOSATO, F. et al. Paper spray ionization mass spectrometry allied to chemometric tools for quantification of whisky adulteration with additions of sugarcane spirit. **Analytical Methods**, v. 10, p. 1952-1960, 2018.

VICENTE, C. D. et al. Phenolic Constituents, Furfuraldehyde and Antioxidant Capacity of Sugar Cane Spirit Aged in Woods Casks. **American Journal of Food Technology**, v. 6, n. 8, p. 631-646, 2011.

YAÑES, X. et al. Neolignans from *Mezilaurus Itaubá*\*. **Phytochemistry**, v. 25 (8), p. 1953-1956, 1986.

YE, M. et al. Analysis of Homoisoflavonoids in *Ophiopogon japonicus* by HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 16, p. 234 -243, 2005.

ZHANG, J. et al. Analysis of Major Chemical Constituents in Luan-Pao-Prescription Using Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Natural Product Communications**, v. 3, n. 5, p. 697-704, 2008.

FERNÁNDEZ-POYATOS, M. P. Phenolic Characterization, Antioxidant Activity, and Enzyme Inhibitory Properties of *Berberis thunbergii* DC. Leaves: A Valuable Source of Phenolic Acids. **Molecules**, v. 24, n.22, p. 4171-4185, 2019.



## ANEXO A

Laudo da identificação das espécies das madeiras utilizadas para confecção dos tonéis de envelhecimento da cachaça.



Laboratório de Madeira e Produtos Derivados

1/2

### RELATÓRIO DE ENSAIO Nº 1 008 531 - 203

**CLIENTE: Cecília Dantas Vicente**  
Rua Dr. Pompeu de Miranda Sarmiento, 163, apto 604 - Ponta Verde  
57035-050 - Maceió, AL

**NATUREZA DO TRABALHO: Identificação Botânica.**

REFERÊNCIA: Orçamento CT-FLORESTA/LMPD-384/10 de 7 de abril de 2010,  
aprovado em 7 de abril de 2010.

Ficha de controle de ensaio nº 53/10.

#### 1 MATERIAL

Uma amostra fornecida pelo cliente constituída por 12 segmentos de madeira codificados pelo cliente como: castanheira 20L, ipê 20L, bálsamo 20L, carvalho 20L, jequitibá 20L, peroba 20L, umburana 20L, timborana 20L, jatobá 20L, castanheira 15 120L, carvalho 14 e jequitibá 30.

Segundo declaração do cliente os segmentos de madeiras foram extraídos de tonéis para armazenamento de cachaça.

#### 2 MÉTODO UTILIZADO

**2.1** Procedimento CT-FLORESTA-LMPD-ID-PE-001 - "Identificação botânica de madeiras". De acordo com esse método, a identificação botânica foi obtida pelo processo macroscópico e microscópico de exame da anatomia do lenho.

**2.2** Os equipamentos, instrumentos e dispositivos utilizados no ensaio foram:

Descrição	Código
faça para polimento	não há
lupa conta fios (10 vezes de aumento)	não há
micrótomo de deslize, Tipo B 111176, Reichert	ID-MT-002
microscópio óptico, Jenamed 2 Histology, Carl Zeiss Jena	ID-MC-007

Observação: equipamentos não calibráveis.

#### 3 RESULTADOS

**3.1** segmento: castanheira 20L,  
nome popular: cedrinho,  
nome científico: *Erisma uncinatum*, Vochysiaceae.

**3.2** segmento: ipê 20L,  
nome popular: peroba-do-campo,  
nome científico: *Paratecoma peroba*, Bignoniaceae.

**3.3** segmento: bálsamo 20L,  
nome popular: cabriúva-vermelha,  
nome científico: *Myroxylon balsamum*, Leguminosae.

**3.4** segmentos: carvalho 20L e carvalho 14,

Atenção: Este é um arquivo digital para consulta. O original deste Relatório de Ensaio, impresso em papel com a marca d'água IPT e devidamente assinado, é o único documento que possui validade legal.

Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A. - IPT  
Av. Prof. Almeida Prado, 532 - Butantã - 05508-901 - São Paulo - SP - Tel: (11) 3767-4000 - [www.ipt.br](http://www.ipt.br)  
Serviço de Atendimento ao Cliente - SAC - Tel: (11) 3767-4126, 3767-4456 e 3767-4744 - Fax(11) 3767-4002 - [sac@ipt.br](mailto:sac@ipt.br)

nome popular: carvalho,  
nome científico: *Quercus* sp., Fagaceae.

3.5 segmentos: jequitibá 20L e jequitibá 30,  
nome popular: jequitibá,  
nome científico: *Cariniana* sp., Lecythidaceae.

3.6 segmento: peroba 20L,  
nome popular: itaúba,  
nome científico: *Mezilaurus itauba*, Lauraceae.

3.7 segmento: umburana 20L,  
nome popular: cerejeira,  
nome científico: *Amburana cearensis*, Leguminosae.

3.8 segmento: timborana 20L,  
nome popular: timborana,  
nome científico: *Piptadenia* sp., Leguminosae.

3.9 segmento: jatobá 20L,  
nome popular: jatobá,  
nome científico: *Hymenaea* sp., Leguminosae.

3.10 segmento: castanheira 15 120L,  
nome popular: castanheira,  
nome científico: *Bertholletia excelsa*, Lecythidaceae.

Parte dos segmentos de madeira recebidos encontra-se à disposição do cliente. Os segmentos não retirados até 60 dias da data de emissão deste Relatório de Ensaio serão descartados pelo Laboratório.

São Paulo, 23 de abril de 2010.

CENTRO DE TECNOLOGIA DE RECURSOS FLORESTAIS  
Laboratório de Madeira e Produtos Derivados

Mestre em Ciência e Tecnologia de Madeiras  
Maria José de A. C. Miranda  
Responsável pelo Laboratório  
CRA nº15245 - RE nº 6121.8

#### EQUIPE TÉCNICA

Maria José de A. C. Miranda - Pesquisadora  
Raphael Jaquier Bossler Pigozzo – Assistente de pesquisa  
Antonio Carlos Franco Barbosa - Técnico  
Claudia Janice Colombelli Agostini - Técnica  
Francisco Pereira da Silva – Técnico  
Richard Kleiber Soares – Técnico

Atenção: Este é um arquivo digital para consulta. O original deste Relatório de Ensaio, impresso em papel com a marca d'água IPT e devidamente assinado, é o único documento que possui validade legal.  
Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A. – IPT  
Av. Prof. Almeida Prado, 532 – Butantã – 05508-901- São Paulo – SP – Tel: (11) 3767-4000 – [www.ipt.br](http://www.ipt.br)  
Serviço de Atendimento ao Cliente – SAC – Tel: (11) 3767-4126, 3767-4456 e 3767-4744 – Fax(11) 3767-4002 – [sac@ipt.br](mailto:sac@ipt.br)

### **3 APLICAÇÃO DA TIAMINA COMO SONDA FLUORESCENTE PARA AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE SEQUESTRO DE HOCl EM CONDIÇÕES SIMULADAS DE ESTRESSE OXIDATIVO.**

#### **3.1 Introdução**

O estresse oxidativo tem sido associado ao envelhecimento e a fisiopatologia de uma série de doenças. Fatores genéticos, como exposição a agentes xenobióticos infecciosos, poluição, luz UV, cigarro, entre outros, estão associados ao aumento da produção e absorção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) no organismo. A maior exposição a estes agentes nocivos aumenta a ocorrência de doenças associadas a processos inflamatórios, como o câncer, doenças pulmonares, síndrome metabólica, cardiopatias, doenças autoimunes, propagação do vírus da AIDS, complicações da COVID-19; por exemplo (LIU et al., 2017; GOMES; FERNANDES; LIMA, 2007; ZHANG; SONG; YUAN, 2018; LAFORGE et al., 2020).

Em processos inflamatórios, as células endoteliais, células de Kupffer, neutrófilos e macrófagos produzem EROs como mecanismo de defesa contra espécies patogênicas (ZHANG; SONG; YUAN, 2018). Dentre as espécies reativas produzidas nesses processos destaca-se o ácido hipocloroso (HOCl), o qual é gerado a partir da oxidação de íons cloreto na presença de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) mediada pela enzima mieloperoxidase, esta representa 5% do total de proteínas dos neutrófilos. Devido à alta concentração de cloreto em fluidos biológicos (100 a 400 mM), mais de 80% do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é usado para a geração de 20 a 400 μM de HOCl por hora. O HOCl em excesso no organismo reage com aminoácidos, proteínas (oxidando grupos tiólicos e amino) e nucleotídeos (LAPENNA; CUCCURULLO, 1996; ZHANG; SONG; YUAN, 2018). Além disso, o HOCl reage com o ânion radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) levando à formação do radical hidroxil (•OH), uma espécie ainda mais deletéria que o ácido hipocloroso (ZHANG; SONG; YUAN, 2018).

O desequilíbrio redox causado pelo excesso de espécies reativas em condições inflamatórias torna necessária a ingestão/administração de compostos capazes de inativar ou inibir a formação destas espécies, protegendo assim, o organismo contra os possíveis danos que possam a ser causados (HUANG et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2009; PEREIRA et al., 2009; SIWAK et al., 2013). Estudos relatam a eficiência de anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDs) frente a EROs, impedindo a superprodução de espécies reativas por meio da inibição de enzimas envolvidas na produção destas espécies reativas, bem como, pela inativação direta

de espécies reativas, a exemplo do HOCl produzido por fagócitos (MAGALHÃES et al., 2007; NÈVE; PARIJ; MOGUILVSKY, 2001; PAINO et al., 2005).

Neste sentido, é de fundamental importância o desenvolvimento de procedimentos analíticos rápidos, simples e seletivos para a quantificação de HOCl em sistemas biológicos, além de possibilitar a avaliação da capacidade de sequestro dessa espécie reativa por substâncias em condições inflamatórias. Assim, diversas estratégias e sondas têm sido desenvolvidas para quantificar HOCl *in vivo* e *in vitro* empregando métodos espectrofotométricos (LIU et al., 2011), eletroquímicos (ORDEIG et al., 2005), potenciométricos (SOLDATKIN et al., 1997), cromatográficos (NEJDL et al., 2013), quimioluminescentes (SONG et al., 2013) e baseados em fluorescência molecular (HU; YE; YANG, 2017; ZHANG; SONG; YUAN, 2018).

Entre as técnicas mencionadas, a fluorescência molecular tem se destacado como uma ferramenta para detecção de EROs em amostras biológicas e ambientais, devido à sua elevada sensibilidade, rapidez e eficiência, permitindo também o monitoramento das espécies reativas por meio de técnicas de imageamento em diferentes sistemas celulares (JIANG et al., 2018). Assim, nos últimos anos, diversas sondas fluorimétricas baseadas nos conceitos ON-OFF e OFF-ON, têm sido desenvolvidas para detecção/quantificação seletiva de HOCl (CHENG et al., 2014). Para a monitorar esta espécie reativa, as moléculas sondas desenvolvidas possuem grupos passíveis de reação com o HOCl. De forma geral, as sondas possuem grupos doadores de elétrons ( $-S-$ ,  $-Se-$  e  $-Te-$ ), derivados de oxima, aminas, dentre outros (HU; YE; YANG, 2017; ZHANG; SONG; YUAN, 2018). Contudo, de forma geral, as moléculas sondas empregadas para o monitoramento de HOCl não são biologicamente disponíveis.

Neste contexto, a vitamina B1 (tiamina) é uma substância indispensável para o metabolismo de carboidratos e na geração de trifosfato de adenosina (ATP) nas mitocôndrias, atuando como cofator do complexo enzimático piruvato desidrogenase (NABOKIKHIN; SUBRAMANIAN; SAID, 2016). Por não ser sintetizada pelo organismo, o suplemento de vitamina B1 ocorre por meio da ingestão de grãos como feijão e ervilha. No organismo humano a concentração de tiamina mais elevada é encontrada nos rins (2,4 a 5,8 mg g<sup>-1</sup>), no fígado (2,0 a 7,6 mg g<sup>-1</sup>) e no cérebro (1,4 a 4,4 mg g<sup>-1</sup>) (COSTA et al., 2014; SEBRELL; HARRIS, 1972; LIMA et al., 2011).

No organismo, a tiamina pode sofrer reações de oxidação devido a ação de enzimas, ou o ataque de espécies reativas. Dentre os produtos gerados pela oxidação da tiamina destaca-se o tiocromo, que tem sido aplicado como sonda para quantificação direta da vitamina B1 em amostras de interesse biológico (PREEDY, 2013; TAN, et al., 2015; TABRIZI, 2006). Além

de ser empregada como sonda fluotimétrica, a reação da tiamina com diversos oxidantes tem sido empregada para o desenvolvimento de métodos analíticos indiretos para determinação da capacidade antioxidante em bebidas e alimentos (OLIVEIRA; SANTOS, 2020; NI et al., 2021, tióis (YAO et al., 2020; NI et al., 2018), fármacos (GAO et al., 2021), enzimas como a fosfatase alcalina (ZHAO et al., 2021) e hipoclorito (ZHU et al., 2014). Todas essas aplicações ocorrem devido as propriedades espectroscópicas do tiocromo, que diferente da tiamina, apresenta rigidez estrutural, planaridade e conjugação com anel aromático, desta forma, é um composto fluorescente ( $\Phi = 0,28 / \lambda_{em} = 440 \text{ nm}$ ) quando excitado com radiação eletromagnética na região do UV ( $\lambda_{ex} = 370 \text{ nm}$ ) (FUJIWARA; MATSUI, 1953; LIDDICOAT et al., 2015).

Considerando os aspectos apresentados neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia analítica utilizando uma sonda biologicamente disponível. Assim, selecionou-se a tiamina (vitamina B1) como sonda a qual está presente no corpo humano e em uma variedade de alimentos. A aplicação de uma molécula com estas características como sonda fluorescente para a avaliação da capacidade de sequestro de HOCl possibilita a análise de moléculas com possibilidade de aplicação em condições de estresse oxidativo *in vivo*.

### 3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar as condições reacionais para geração e inibição da formação de tiocromo como sonda espectrofluorimétrica para avaliar o sequestro do HOCl;
- b) Estudar e propor o mecanismo de reação da sonda com HOCl por espectrometria de massas;
- c) Otimizar o método desenvolvido quanto aos parâmetros químicos e físicos: ordem de adição dos reagentes, cinética reacional, pH do meio, composição da solução tampão, concentração da solução tampão, concentração e proporção (HOCl e tiamina);
- d) Avaliar o sistema otimizado com tiaminas fosforiladas (monofosfato e pirofosfato de tiamina) quanto ao sequestro do HOCl pelo ácido gálico;
- e) Avaliar a seletividade da sonda frente a espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERN), a saber: ácido hipocloroso (HOCl), óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ), *terc*-butil peróxido ( $\text{t-BuOOH}$ ), radical *terc*-butil peroxila ( $\text{t-BuOO}\cdot$ ), oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), ânion radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) e peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ).
- f) Avaliar a capacidade de sequestro do HOCl usando tiamina como sonda espectrofluorimétrica frente a diferentes substâncias com atividade antioxidante, compostos tiólicos e anti-inflamatórios não esteroides;

- g)** Avaliar a capacidade de sequestro do HOCl usando tiamina como sonda espectrofluorimétrica frente a diferentes substâncias com atividade antioxidante em neutrófilos humanos estimulados com Ca(II);
- h)** Avaliar a seletividade da sonda em neutrófilos humanos em condições pró-inflamatória

### 3.3 Experimental

#### 3.3.1 Desenvolvimento e aplicação do método *in vitro*

##### 3.3.1.1 Reagentes, soluções e amostras

Todos os reagentes utilizados nos ensaios são de grau analítico de pureza. As soluções foram preparadas em água ultrapura (condutividade  $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) obtidas a partir de purificador Master System MS2000 (Gehaka, São Paulo, Brasil). As soluções estoque de cloridrato de tiamina, fosfato de tiamina, pirofosfato de tiamina, ácido gálico, ácido ascórbico, ácido ferúlico, ácido tânico, *N*-acetilcisteína, glutatona, penicilamina, captopril e 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (todos da Sigma, EUA) e cisteína (Vetec, Brasil) foram preparadas em água ultrapura. As soluções de ácido cafeico (Sigma, EUA), ácido *o*-cinâmico (Acros Organics) e ácido *p*-cinâmico (Acros Organics), foram preparadas a partir da dissolução direta dos reagentes em etanol e diluídas em água deionizada. De forma, similar as soluções estoques de quercetina, ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox<sup>®</sup>), butil-hidroxitolueno (BHT), *N*-propilgalato, kaempferol, rutina, L-dopa, ibuprofeno, dipirona (Todos Sigma-Aldrich, EUA) e nimesulida Galena (Brasil) foram preparadas em etanol. Adicionalmente, as soluções estoques de piroxicam (Sigma, Brasil), indometacina (Merk, Brasil), meloxicam, Histopaque 1077, Histopaque 1119, azul de tripano 0,4% (m/v), solução salina tampão de fosfato de Dulbecco sem íons de cálcio e magnésio (PBS), iodeto de propídio (PI), luminol, forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (Sigma Sigma-Aldrich, EUA) foram preparados em dimetilsulfóxido (DMSO).

A solução de HOCl foi preparada a partir de uma solução de NaClO a 1% (v/v) comercial (Dinâmica, Brasil). O pH da solução foi ajustado para 6,2 com solução de ácido sulfúrico (Merk, Brasil) a  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ . A concentração de HOCl foi determinada por espectrofotometria a 235 nm ( $\lambda_{\text{max}}$ ), utilizando o coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon = 100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (MAGALHÃES et al., 2007). A solução contendo  $\cdot\text{NO}$  a  $2,27 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada a partir de *S*-nitroso-*N*-acetil-DL-penicilamina (SNAP) (WO et al., 2017). As soluções de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Dinâmica, Brasil) e *tert*-BuOOH (Sigma, Brasil) foram a partir da diluição em água ultrapura. A concentração da solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi determinada a partir do coeficiente de absorvidade molar a 240 nm ( $\epsilon = 43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013). As soluções contendo os radicais  $\text{HO}\cdot$  e *tert*-BuOO $\cdot$  foram preparadas pela geração destas espécies *in situ* a partir da reação de Fenton usando  $\text{H}_2\text{O}_2$  e *tert*-BuOOH (MAGALHÃES

et al., 2007; WO et al., 2017). A solução de oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) foi preparada pela geração desta espécie a partir da reação entre  $\text{NaMoO}_4$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (MAGALHÃES et al., 2007). A solução referente a  $\text{O}_2^-$  foi obtido a partir da solubilização direta de  $\text{KO}_2$  (MAGALHÃES et al., 2007). A solução de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) foi preparada de acordo com a metodologia reportada por Saha et al. (1997), onde foram misturadas soluções equimolares de  $\text{NaNO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  em meio de  $\text{HCl}$ . A solução tampão fosfato  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $\text{pH } 7,4 \pm 0,1$ ) foi preparada a partir da dissolução de  $1,4196 \text{ g}$  de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Vetec, Brasil). O  $\text{pH}$  da solução tampão fosfato foi ajustado para  $7,4$  com solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  (Merck, Brasil).

O ácido gálico foi utilizado como padrão de referência para as curvas analíticas nas etapas de otimização do método. Os sinais analíticos de referência (branco) foram obtidos a partir de soluções análogas às aquelas contendo os analitos substituindo que foi substituído por água deionizada.

### *3.3.1.2 Equipamentos utilizados*

As medidas espectrofluorimétricas foram realizadas em espectrofluorímetro Shimadzu (modelo RF 5301PC, Japão) utilizando cubetas de quartzo com  $1 \text{ cm}$  de caminho óptico e capacidade de  $4,0 \text{ mL}$ . Para as medidas espectrofotométricas utilizou-se um espectrofotômetro de varredura com feixe duplo Micronal (modelo AJX-6100PC, Brasil), com cubetas de quartzo ou de vidro de  $1,0 \text{ cm}$  de caminho óptico.

Para as medidas de  $\text{pH}$  utilizou-se um medidor de  $\text{pH}$  (Gehaka, modelo PG 1800, Brasil) incerteza de  $\pm 0,01$  acoplado a um eletrodo combinado de vidro. As massas dos padrões e reagentes foram medidas em duas balanças analíticas: (i) balança analítica (Gehaka, modelo AG 200, Brasil) com precisão de  $0,1 \text{ mg}$  para medidas  $\geq 10 \text{ mg}$  e (ii) balança analítica Mettler Toledo-AG245 com precisão de  $0,01 \text{ mg}$  (para massas  $< 10 \text{ mg}$ ).

Os espectros de massas foram obtidos a partir de um espectrômetro Shimadzu (LCMS-IT-TOF) equipado com fonte de ionização eletro spray (ESI) e vazão de  $4 \mu\text{L min}^{-1}$ . Os espectros foram obtidos no modo positivo. Metanol puro foi usado para ajuste no procedimento de calibração interna e limpeza do capilar. A reação da tiamina com  $\text{HOCl}$  foi preparada nas condições otimizadas e a reação de referência de acordo com Oliveira e Santos (2020).



### 3.3.1.3 Método proposto para a determinação da capacidade de sequestro de HOCl

Para avaliação da capacidade de sequestro de HOCl dos compostos antioxidantes, tiólicos e anti-inflamatórios, foram adicionadas quantidades crescentes dos compostos analisados (0,005 - 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), 250  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 100  $\text{mmol L}^{-1}$  (pH 7,4  $\pm$  0,1), 90  $\mu\text{L}$  de cloridrato de tiamina a 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$  e 90  $\mu\text{L}$  de HOCl 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$ , nesta ordem. Por fim, ajustou-se o volume final para 2,5 mL com água ultrapura. Aguardou-se pelo menos 30 min para que a reação se processasse e as medidas espectrofluorimétricas ( $\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$ ) foram realizadas. O sinal de referência foi obtido substituindo-se o volume da solução padrão ou amostra por água deionizada. A capacidade de sequestro de HOCl pelos compostos foi determinada a partir da inibição do sinal analítico (% $I_F$ ), sendo calculada a partir da equação 3.1:

$$\% I_F = \left( 1 - \frac{F_{\text{amostra}}}{F_{\text{referencia}}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 3.1}$$

onde  $F_{\text{amostra}}$  corresponde à intensidade de fluorescência após a adição da amostra ou padrão analítico à solução contendo o HOCl e  $F_{\text{referencia}}$  a intensidade de fluorescência relativa ao branco analítico (sem adição do composto antioxidante).

### 3.3.1.4 Tratamento estatístico dos dados

Para otimização de alguns parâmetros analíticos foi empregado como critério à sensibilidade analítica a partir do valor de coeficiente angular da respectiva curva analítica em uma determinada condição de estudo. A curva analítica avaliada foi construída com no mínimo cinco pontos de acordo com a relação:  $\% I_F = aC_{SC} + b$ , sendo  $\% I_F$  o percentual de inibição,  $C_{SC}$  a concentração do composto,  $a$  o coeficiente angular e  $b$  o coeficiente linear. O coeficiente de correlação linear ( $r$ ) foi calculado visando avaliar a disposição dos pontos quanto à adequação ao comportamento linear (MILLER; MILLER, 2005). A capacidade de sequestro de HOCl dos compostos analisados foi expressa de acordo com o  $EC_{50}$  (concentração necessária para inibir 50% do sinal de fluorescência).

### 3.3.2 Aplicação da sonda em amostras de sangue humano

Os ensaios envolvendo a geração de ERs em neutrófilos e aplicações de sondas derivadas de tiaminas foi realizado e colaboração com a Profa. Eduarda Fernandes e as

pesquisadoras Dra Marisa Andreia C. Freitas e Dra Daniela Ribeiro da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto em Portugal.

### *3.3.2.1 Amostras*

As amostras de sangue humano foram obtidas a partir de voluntários (CAAE: 57998116.8.0000.5013 do comitê de ética da UFAL no Hospital Geral de Santo Antônio (Porto, Portugal). Todos os procedimentos cumprem a Declaração de Helsínque, onde os voluntários foram devidamente informados sobre o objetivo do trabalho e o consentimento obtido por escrito. Os ensaios foram realizados com cinco indivíduos sadios e o sangue foi coletado por venipuntura de fossa antecubital direita, em tubos a vácuo contendo K<sub>3</sub>EDTA.

### *3.3.2.2 Equipamentos utilizados*

Os neutrófilos humanos isolados foram contados sob um microscópio óptico (Nikon, modelo Eclipse E 200, Japão). Os sinais de intensidade de fluorescência para avaliação da viabilidade celular foram coletados por meio de citômetro de fluxo (Accuri C6, BD, Becton, Dickinson and Company, EUA). As análises no módulo de intensidade de fluorescência foram realizadas em leitor de microplacas (Synergy HT, BIO-TEK, Winoosky, EUA).

### *3.3.2.3 Isolamento de neutrófilos humanos*

O isolamento de neutrófilos humanos foi realizado pelo método de centrifugação em gradiente de densidade, conforme relatado por Freitas et al. (2008). Esse método, inicialmente descrito por Boyum em 1968 e aprimorado por English e Anderson em 1974, baseia-se na separação dos hemocomponentes de acordo com suas diferentes densidades, quando é aplicada uma força centrífuga. Neste procedimento, a solução contendo Tris-glicose (25 mmol L<sup>-1</sup> Tris, 1,26 mmol L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 5,37 mmol L<sup>-1</sup> KCl, 0,81 mmol L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>, 140 mmol L<sup>-1</sup> NaCl e 5,55 mmol L<sup>-1</sup> D-glicose) foi utilizada como meio de incubação para a avaliação da produção de HOCl de neutrófilos.

### 3.3.2.4 Avaliação da viabilidade de neutrófilos humanos após tratamento com pirofosfato de tiamina e cloridrato de tiamina

Para avaliar a toxicidade das sondas fluorescentes em estudo (pirofosfato de tiamina e cloridrato de tiamina) empregou-se protocolo descrito por Soares et al. (2016), com modificações. Assim, adicionou-se 960  $\mu\text{L}$  da suspensão de neutrófilos ( $5 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ), 40  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-glicose (solvente das sondas) e 40  $\mu\text{L}$  das sondas fluorescentes ( $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em uma microplaca de poliestireno transparente de 48 poços durante 1 h, a  $37^\circ\text{C}$ . Após o tempo de incubação, o conteúdo de cada poço foi coletado e centrifugados a  $400 \times g$ , por 5 min, a  $20^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e material biológico depositado no corpo de fundo foi ressuspensão em 1,2 mL de tampão fosfato. Posteriormente, realizou-se uma segunda centrifugação ( $400 \times g$ , por 5 min a  $20^\circ\text{C}$ ). O sobrenadante resultante foi novamente descartado e o material biológico depositado no corpo de fundo ressuspensão em 100  $\mu\text{L}$  de solução de iodeto de propídio ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os microtubos foram incubados por 15 min ao abrigo da luz e temperatura ambiente. Por fim, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato e as medidas de fluorescência foram realizadas em citômetro de fluxo. Os sinais de fluorescência para pelo menos 10.000 células foram coletados no modo logarítmico, seguidos no canal 3 (FL3) e os dados foram analisados usando o software C Flow (Accuri<sup>®</sup>, EUA). Cada estudo correspondeu a pelo menos, dois ensaios independentes.

### 3.3.2.5 Detecção de ácido hipocloroso pelas sondas fluorescentes pirofosfato de tiamina e cloridrato de tiamina, em neutrófilos humanos estimulados por PMA

A avaliação da geração de HOCl por neutrófilos estimulados por PMA foi avaliada com pirofosfato de tiamina e cloridrato de tiamina. Para esse fim, os neutrófilos humanos recém-isolados ( $1 \times 10^6$  -  $5 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) foram ressuspensos em 10  $\mu\text{L}$  tampão Tris-glicose pré-incubados com pirofosfato de tiamina ou cloridrato de tiamina ( $6$  -  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) por 5 min a  $37^\circ\text{C}$ . Em seguida, adicionou-se PMA ( $160$  -  $400 \text{ nmol L}^{-1}$ ) e aguardou-se 2 h para as medidas espectrofluorimétricas ( $\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$ ). As medidas de intensidade de fluorescência foram realizadas em um espectrofluorímetro de microplaca. As análises foram realizadas em triplicata ( $n = 3$ ) e o percentual de ativação dos neutrófilos foram calculados de acordo com a equação 3.2:

$$\% \text{ Ativação de neutrófilos} = \left[ \left( \frac{F_{PMA} - F_{Ref}}{F_{Ref}} \right) \times 100 \right] - 100 \quad \text{Equação 3.2}$$

Onde  $F_{PMA}$  e  $F_{Ref}$  correspondem a intensidade de fluorescência do ensaio na presença e na ausência de PMA, respectivamente.

### 3.3.2.6 Avaliação do efeito inibitório da hidrazida de ácido aminobenzoico em neutrófilos humanos estimulados por PMA

Neste estudo, os neutrófilos humanos isolados foram incubados com pirofosfato de tiamina ou cloridrato de tiamina (500  $\mu\text{M}$ ) e ABAH (0,3 - 500  $\mu\text{M}$ ) por 5 min a 37°C. O sinal de referência foi obtido substituindo-se as células por DMSO (solvente de ABAH). Por fim, adicionou-se PMA (400  $\text{nmol L}^{-1}$ ) e aguardou-se por 2 h a 37 °C. para realizar as medidas espectrofluorimétricas ( $\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$ ). Todos os ensaios foram feitos em triplicata ( $n = 3$ ) e o efeito inibitório de ABAH contra a produção de HOCl induzida por PMA nos neutrófilos foi calculado de acordo com a equação 3.3:

$$\% \text{ Inibição} = \left( \frac{F_{ABAH} - F_{Ref}}{F_{PMA} - F_{Ref}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 3.3}$$

Onde  $F_{ABAH}$ , corresponde a intensidade de fluorescência do neutrófilo estimulado com PMA, mas com a adição do inibidor ABAH,  $F_{PMA}$  sinal de fluorescência do neutrófilo estimulado com PMA e  $F_{Ref}$  a intensidade de fluorescência do sistema referência.

### 3.3.2.7 Avaliação da capacidade de sequestro de HOCl de compostos antioxidantes e fármacos em neutrófilos humanos

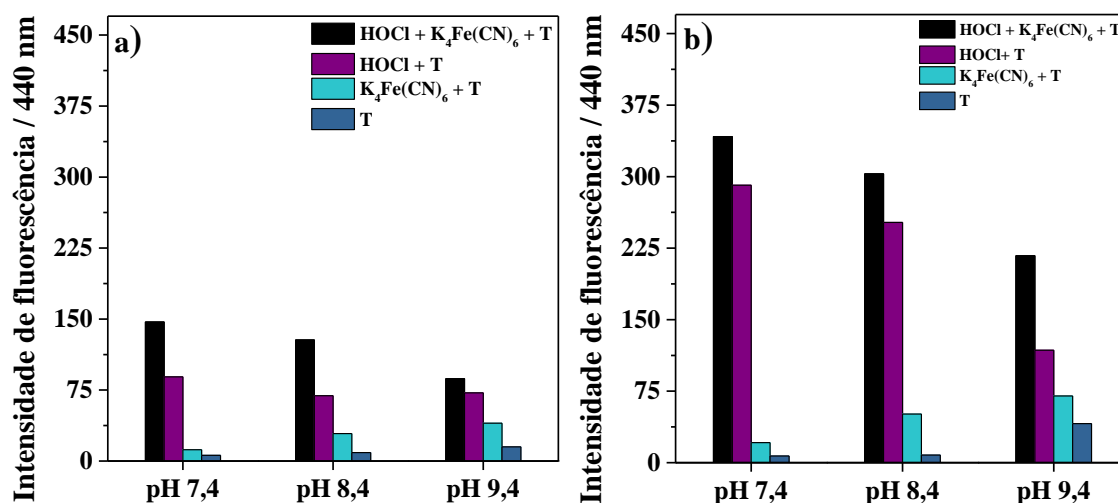
Neutrófilos humanos ( $5 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) estimulados conforme o item 3.3.2.5, foram incubados com diferentes concentrações dos compostos analisados e pirofosfato de tiamina (500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), por 2h. Por fim, medidas fluorimétricas foram realizadas ( $\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$ ). Os resultados obtidos foram expressos a partir da inibição do sinal analítico da sonda conforme a equação 3.1.

### 3.4 Resultado e discussão

#### 3.4.1 Estudos preliminares

Ensaio preliminares foram realizados com o objetivo de estabelecer os parâmetros experimentais iniciais. Os estudos foram iniciados adotando-se as condições experimentais estabelecidas por Zhu et al. (2014), que desenvolveram um método analítico para determinação espectrofluorimétrica de hipoclorito em amostras de água por meio da oxidação catalítica de tiamina a tiocromo na presença de hexacianoferrato(II) em meio básico (pH 12). Inicialmente, avaliou-se a variação do sinal de fluorescência do tiocromo gerado ( $\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$ ) em função do pH do meio (7,4 - 9,4) em tampão fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ ) e carbonato ( $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_3^{2-}$ ). Assim, foram analisados quatro sistemas: (i) HOCl +  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  + Tiamina, (ii) HOCl + Tiamina, (iii)  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  + Tiamina e (iv) Tiamina (T) (Fig. 3.1).

**Figura 3.1 – Avaliação da intensidade de fluorescência de tiocromo em função do pH do meio: a) tampão carbonato e b) tampão fosfato.** Condições experimentais:  $C_{\text{Tiamina}} = 12,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $C_{\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6} = 4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $C_{\text{HOCl}} = 4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $C_{\text{Tampão}} = 20 \text{ mmol L}^{-1}$ .



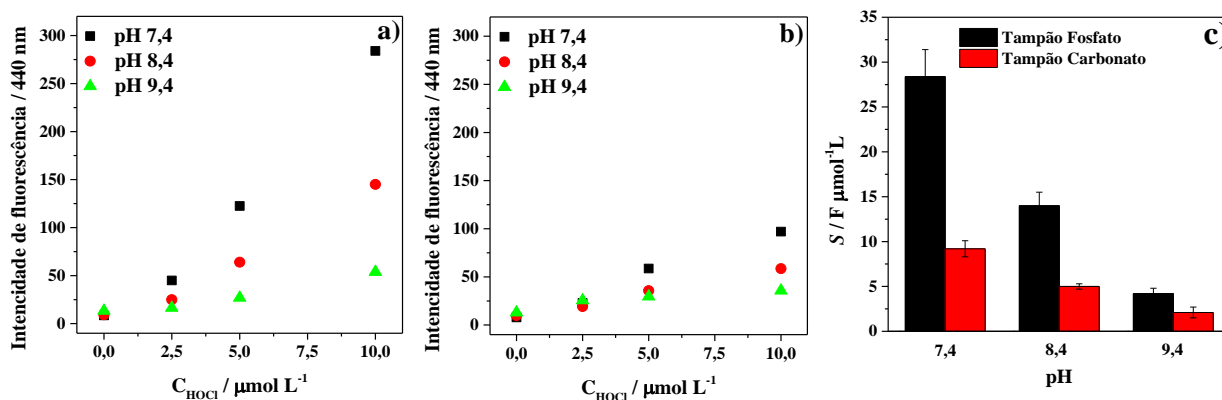
Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

De forma geral, os sinais de fluorescência observados em tampão fosfato foram superiores aos obtidos em tampão carbonato, embora o perfil de resposta em função do pH tenha sido similar entre os dois tipos de solução tampão. Os maiores sinais de fluorescência foram obtidos na presença de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  e HOCl. Assim, o HOCl adicionado poderia oxidar diretamente a tiamina, assim como o  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ , gerando  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  e este então, atuar como agente oxidante (principal ou auxiliar). Logo, a maior concentração de tiocromo gerado (maior intensidade do sinal) pode ter ocorrido pelo efeito aditivo dos oxidantes. Contudo, de forma

inédita observou-se a possibilidade da oxidação da tiamina a tiocromo mediada pelo HOCl/NaClO. Com o aumento do pH, observou-se a diminuição do sinal analítico. Essa tendência pode ser atribuída à diminuição da concentração de HOCl ( $pK_a = 7,4 / E^\circ = +1,63 \text{ V}$ ), que é um oxidante mais eficiente quando comparado ao íon  $\text{ClO}^-$  ( $E^\circ = +0,89 \text{ V}$ ) (ZHANG; SONG; YUAN, 2018). Assim, outros parâmetros foram investigados quanto a este processo.

Avaliou-se a influência da solução tampão e do pH quanto a sensibilidade da sonda ao HOCl. Para isto, manteve-se a concentração de tiamina constante e variou a concentração de HOCl ( $2,5 - 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato e carbonato no intervalo de pH de 7,4 a 9,4 (Fig 3.2).

**Figura 3.2 – Avaliação da oxidação da tiamina a tiocromo (fluoróforo) em função da concentração de HOCl e do pH. a) tampão fosfato; b) tampão carbonato e c) sensibilidades das curvas de calibração.** Condições experimentais:  $C_{\text{Tiamina}} = 12 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $C_{\text{Tampão}} = 20 \text{ mmol L}^{-1}$ .



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Como pode ser observado na Fig. 3.2a e 3.2b, a sensibilidade da sonda foi inversamente proporcional ao pH sendo mais eficiente em tampão fosfato pH 7,4 (Fig. 3.3c). Assim, para as próximas etapas de otimização, empregou-se o tampão fosfato (pH 7,4).

### 3.4.2 Proposta de mecanismo de reação seletiva da tiamina com HOCl

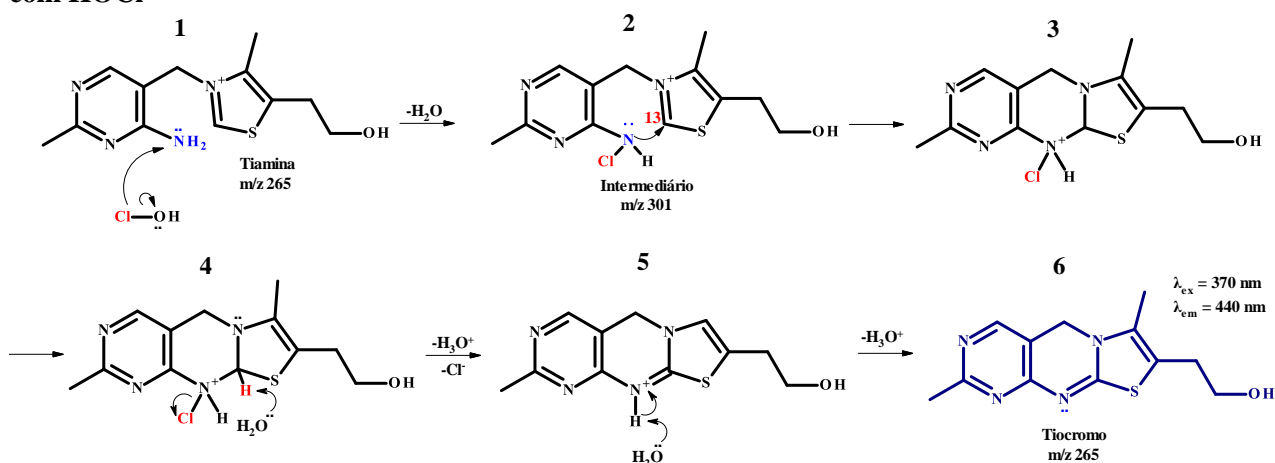
Diante dos resultados apresentados anteriormente, buscou-se avaliar os possíveis mecanismos envolvidos na formação do tiocromo (ou derivado) a partir da oxidação da tiamina pelo HOCl. Para tanto, utilizou-se MS-IT-TOF no modo positivo (ESI+) para identificar os produtos gerados pelas reações estudadas. Assim, foram preparadas duas reações: (i) tiamina +  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  como referência e (ii) tiamina + HOCl.

Inicialmente, analisou-se a tiamina para identificar os picos característicos do reagente de partida. Assim, identificou-se os picos referentes a sonda  $m/z 265 \text{ M}^+$  (Fig. SB2b, Apêndice

B) e seus fragmentos característicos  $m/z$  122  $M^+$  e  $m/z$  144  $[M+H]^+$  (Fig. SB2c, Apêndice B) (STECKEL; SCHLOSSER, 2019). A partir da reação da tiamina com  $Fe(CN)_6^{3-}$ , contatou-se a formação do tiocromo a partir dos picos  $m/z$  263  $[M+H]^+$  e do fragmento  $m/z$  232  $M^+$  (Fig. SB3, Apêndice B). Após a reação tiamina + HOCl, pôde-se identificar a presença da tiamina  $m/z$  265  $M^+$ , de um composto clorado derivado da sonda 301  $[M+H]^+$  e do tiocromo gerado pela reação correspondente a  $m/z$  285  $[M+Na]^+$  (Fig. SB2d, Apêndice B).

Em função dos resultados obtidos pode-se sugerir o mecanismo de oxidação da tiamina a tiocromo pelo HOCl (Figura 3.3). O ácido hipocloroso reage com a amina primária do anel pirimidínico (etapa 1) resultando na formação da cloroamina (etapa 2) (PRUTZ, 1998). Então, o nitrogênio ativado da cloroamina ataca o carbono (13) do anel tiazólico levando à formação de um ciclo de seis membros (etapa 3). Na etapa seguinte, ocorre a liberação do próton ligado ao carbono (13) após reação com o solvente concomitante a liberação de íon cloreto e, desta forma, levando a formação da ligação C=N. Por fim, ocorre a desprotonação do N e a formação do tiocromo, composto com propriedades fluorescentes.

**Figura 3.3 – Proposta de mecanismo para a formação do tiocromo a partir da reação da tiamina com HOCl**

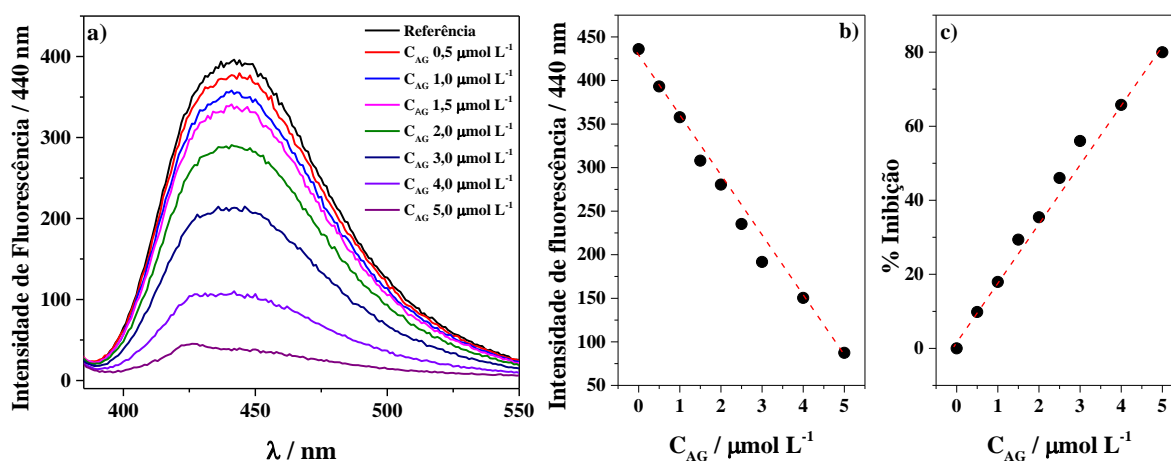


Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

### 3.4.3 Avaliação da linearidade do método proposto frente a um composto antioxidante

Com o objetivo de aplicar a tiamina como sonda para determinar a capacidade de sequestro de HOCl, realizou-se um estudo para avaliar a resposta analítica do método proposto na presença de um composto antioxidante. Deste modo, o ácido gálico (GA) foi selecionado como padrão, devido a sua rápida velocidade reacional sendo utilizado em diversas metodologias analíticas para a determinação da capacidade antioxidante (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Neste ensaio, os reagentes foram adicionados na seguinte ordem: HOCl + AG + tiamina, variando a concentração de AG na presença de excesso de HOCl (Figura 3.4).

**Figura 3.4 – Avaliação do sistema na presença de AG como composto antioxidante: a) Espectros de fluorescência da tiamina em função da concentração de AG; e b) relação entre o sinal analítico e concentração de AG e c) curva analítica de  $I_F$  em função de  $C_{AG}$ .** Condições reacionais:  $C_{Tiamina} = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $C_{HOCl} = 15 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $C_{Tampão} = 20 \text{mmol L}^{-1}$  (pH 7,4).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

A presença de um composto antioxidante no meio levou a redução do sinal de fluorescência. No intervalo de concentração analisada (0,5 a 5,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) o AG inibiu de 10 a 80% do sinal de referência correspondendo a equação  $\%I_F = 16,1(\pm 0,6)C_{AG} + 2,9(\pm 1,7)$  ( $r = 0,9945$ ,  $n = 9$ ). Desta forma, nas próximas etapas de otimização, utilizou-se como parâmetro analítico a sensibilidade (S) referente a curva de inibição da oxidação da tiamina pelo HOCl na presença de AG.

### 3.4.4 Avaliação da ordem de adição dos reagentes e cinética reacional

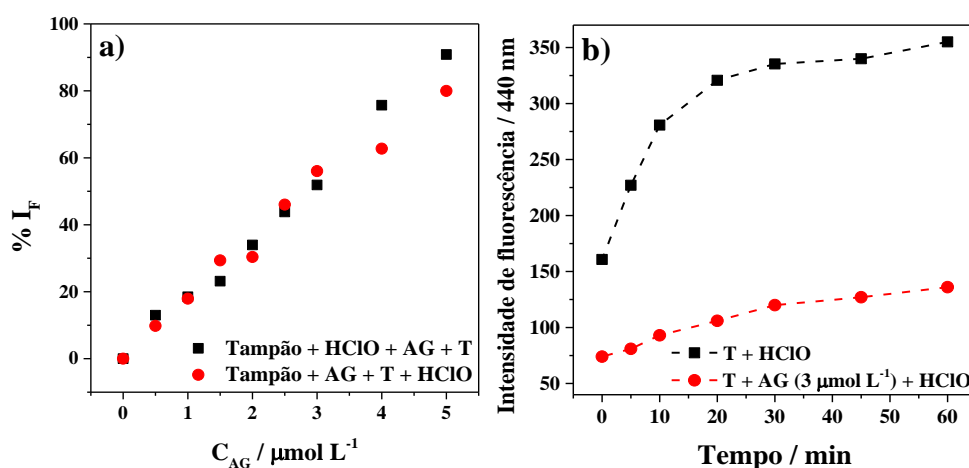
A ordem de adição dos reagentes foi avaliada visando estabelecer o princípio do método (competitivo ou não competitivo). Neste sentido foram avaliadas duas ordens distintas



quanto a adição dos reagentes em diferentes concentrações de AG, sendo: HOCl + AG + tiamina (ordem 1) e tiamina + AG + HOCl (ordem 2) (Figura 3.5a).

Em ambas as ordens de adição observou-se a inibição do sinal analítico em função do aumento da concentração de AG e a sensibilidade das curvas analíticas foram semelhantes independente da ordem de adição ( $18 \pm 1$  e  $16 \pm 1$  %I  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para ordem 1 e 2, respectivamente). Desta forma, nas próximas etapas utilizou-se a ordem (2), pois, nesta condição o mecanismo do método ocorre por competição, onde a sonda e o composto antioxidante (ou fármaco) competem pela espécie reativa, tornando o método mais adequado para avaliação da capacidade de sequestro de diferentes compostos frente ao HOCl na presença da tiamina.

**Figura 3.5 – Avaliação da ordem de adição dos reagentes (a) e cinética reacional (b).**  $C_{\text{Tiamina}} = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $C_{\text{HOCl}} = 15 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $C_{\text{Tampão}} = 20 \text{mmol L}^{-1}$  (pH 7,4)



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

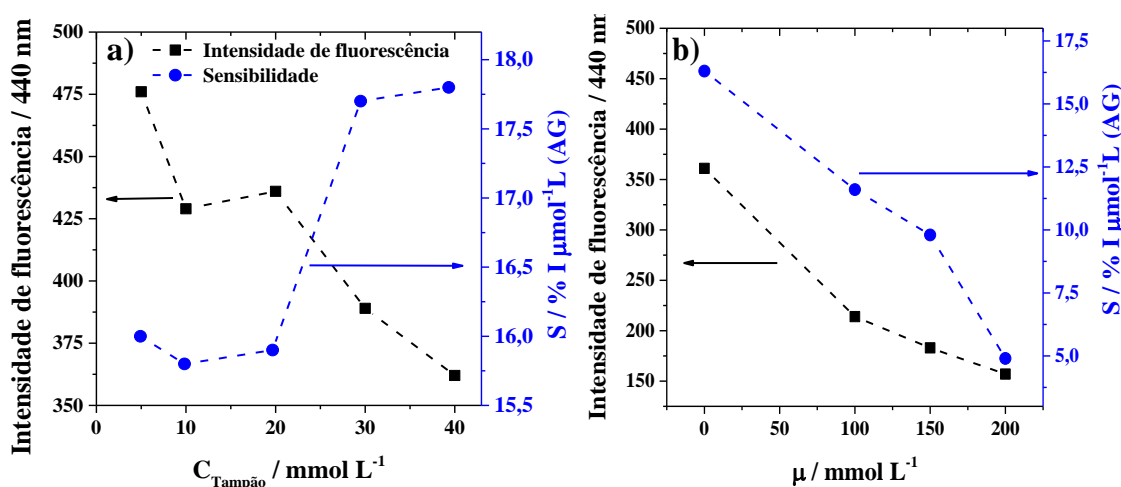
A cinética da reação entre a tiamina e HOCl foi analisada na ausência ou na presença de um composto antioxidante ( $\text{AG } 3 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). A reação se processou de forma rápida e a presença do AG não alterou o perfil cinético, somente a magnitude do sinal analítico. Desta forma, o tempo mínimo de 30 min após adição dos reagentes para medida da intensidade de fluorescência foi selecionado como parâmetro da metodologia proposta (Figura 3.5b).

### 3.4.5 Avaliação da concentração da solução tampão e efeito da força iônica

Após a seleção do sistema tampão e seu respectivo valor de pH, avaliou-se o efeito da concentração da solução tampão fosfato ( $C_{TF}$ ) e da força iônica na metodologia proposta na presença de concentrações crescentes de AG ( $0,5$  a  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). De acordo com os resultados apresentados na Figura 3a, observou-se que a sensibilidade do sistema aumentou de  $16 \pm 1$  para  $18 \pm 1$  [%I  $\mu\text{mol}^{-1} \text{L}$  (AG)], perfazendo um aumento de 12%, enquanto a intensidade do sinal analítico de referência diminuiu 114 u.a.F (variação de 24%) quando a concentração da solução tampão fosfato variou de  $5,0$  a  $40 \text{ mmol L}^{-1}$ . A sensibilidade das curvas analíticas variou de 16 a 18 %I  $\text{mmol L}^{-1}$ . Quando a concentração da solução tampão foi mais concentrada ( $30$  e  $40 \text{ mmol L}^{-1}$ ) a sensibilidade aumentou  $\sim 11\%$  em relação as concentrações menores. O aumento da sensibilidade em concentrações maiores da solução tampão pode ser justificado pela redução nos valores dos sinais de referência ( $476$  a  $362$  u.a.F). Assim, quando uma menor quantidade de tiocromo é gerado, ocorre um aumento da variação de sinal causada pela presença de AG (Figura 3.6a; Tabela SB1, Apêndice B). Assim, a concentração de  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  da solução tampão fosfato foi selecionada.

Para avaliar a influência da força iônica na eficiência da metodologia, foram avaliados quatro níveis diferentes de concentrações de cloreto de sódio (NaCl), sendo:  $0$ ,  $100$ ,  $150$  e  $200 \text{ mmol L}^{-1}$ , respectivamente (Figura 3.6b; Tabela SB2, Apêndice B).

**Figura 3.6 – Influência dos parâmetros químicos do meio. Sendo: a) concentração de tampão fosfato e b) influência da força iônica no meio.** Condições experimentais:  $C_{\text{Tiamina}} = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $C_{\text{HOCl}} = 15 \mu\text{mol L}^{-1}$ , ordem de adição: HOCl + AG + tiamina.



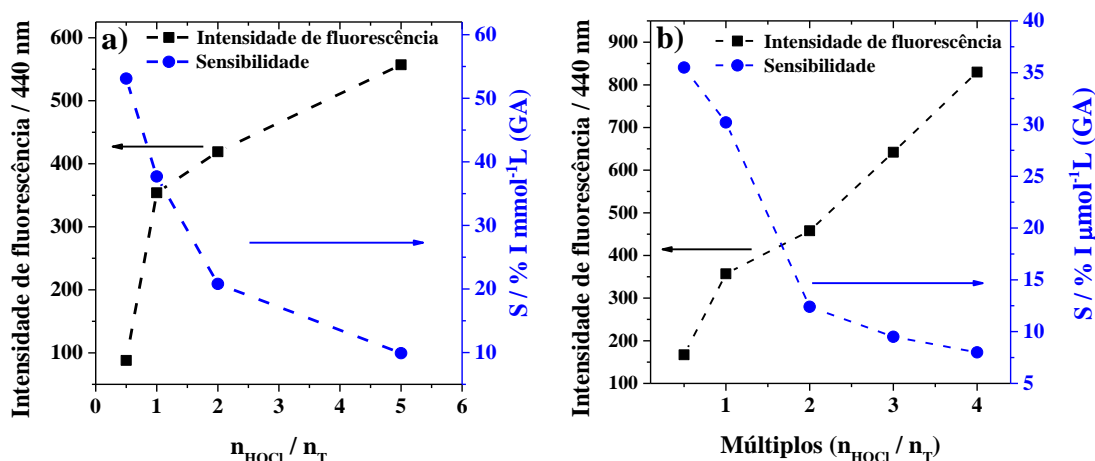
Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

O aumento da força iônica levou a uma diminuição da sensibilidade e do sinal de referência proporcional a concentração de NaCl. Esta variação pode estar associada a dois fatores: (i) a variação dos coeficientes de atividade das espécies no meio, pois a medida que a força iônica aumenta, a concentração efetiva das espécies diminuem devido as interações eletrostáticas e a menor disponibilidade destas no sistema reacional (SKOOG et al., 2006); e (ii) o HOCl ( $E^{\circ}_{\text{HOCl}|\text{Cl}_2} = + 1,63 \text{ V}$ ) pode oxidar os íons cloreto em excesso a  $\text{Cl}_2$  ( $E^{\circ}_{\text{Cl}_2|\text{Cl}^-} = + 1,36 \text{ V}$ ), diminuindo a geração de tiocromo ou ocorrendo a oxidação avançada desta espécie. Assim, para estudos posteriores, não se considerou a adição de NaCl ao meio reacional.

### 3.4.6 Avaliação da proporção $n_{\text{HOCl}} / n_{\text{tiamina}}$

Alguns fatores como potencial padrão de redução do agente oxidante e a sua proporção em relação a tiamina podem levar a geração de produtos não fluorescentes, como o dissulfeto de tiamina (um produto de condensação de duas moléculas de tiamina) (RYAN; INGLE, 1980). Assim, avaliou-se a razão de quantidade de substância entre o HOCl e tiamina ( $n_{\text{HOCl}} / n_{\text{tiamina}}$ ). Neste estudo, foram analisadas razões  $n_{\text{HOCl}} / n_{\text{tiamina}}$  no intervalo de 0,25 a 2,5. Incrementos de HOCl levaram ao aumento da fluorescência, contudo, a sensibilidade da curva usando AG diminuiu. Para a seleção das melhores condições, avaliou-se o sinal analítico de referência e a sensibilidade das curvas analíticas em função da variação da concentração de AG. Para estudos posteriores utilizou-se a razão ( $n_{\text{HOCl}} / n_{\text{tiamina}}$ ) 0,5:1 (em balanço de massa), pois esta condição apresentou a melhor relação entre a sensibilidade ( $S$ ) ( $37,7 \pm 3,3 \% \text{ I } \mu\text{mol}^{-1}\text{L (AG)}$ ) e o sinal de referência (354 u.a.F) (Figura 3.7a; Tabela SB3, Apêndice B).

**Figura 3.7 – Avaliação da proporção dos reagentes: a) Avaliação da razão  $n_{\text{HOCl}} / n_{\text{tiamina}}$  e b) avaliação da concentração dos reagentes.** Condições reacionais: tampão fosfato a  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH = 7,4) e tempo de reação = 30 min.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Após a seleção da proporção molar entre HOCl / tiamina foi avaliada a influência da variação da concentração das espécies mantendo-se constante a razão molar igual a 1 (Figura 3.7a; Tabela SB4). Para tanto, foram selecionados múltiplos quanto a concentração final dos compostos avaliados (tiamina = HOCl = 12  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Neste estudo, as soluções de tiamina e HOCl foram preparadas com suas respectivas concentrações multiplicadas por 0,5; 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0, respectivamente (Figura 3.6b; Tabela SB4, Apêndice B). Assim, para os próximos estudos foram mantidas as concentrações em tiamina e HOCl iguais a 12  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , pois nestas concentrações, o método apresentou boa relação entre sensibilidade ( $30,2 \pm 0,6 \text{ \%I } \mu\text{mol}^{-1}\text{L}$  (AG)) e sinal de fluorescência (357 u.a.F) para os parâmetros instrumentais utilizados.

### 3.4.7 Avaliação da metodologia empregando diferentes de tiamina

Com o objetivo de otimizar a metodologia mimetizando as condições fisiológicas, analisou-se o perfil do sistema empregando tiaminas fosforiladas, pois quando combinada a grupos fosfato, a vitamina B1 atua como coenzima do complexo enzimático piruvato-desidrogenase na via metabólica do ciclo do ácido cítrico (LONSDALE, 2006). Assim, comparou-se o desempenho analítico da tiamina, monofosfato de tiamina (TMP) e pirofosfato de tiamina (TPP) como parte da avaliação do método proposto (Figura 3.8).

A influência na alteração estrutural das tiaminas foi avaliada a partir dos sinais de referência, curvas analíticas em função de diferentes concentrações de AG e a variação da fluorescência do meio com excessos de HOCl. O maior sinal de referência foi obtido para a tiamina ( $F_{440\text{nm}} = 433 \pm 35 \text{ u.a.F}$ ), seguida pelo TPP ( $F_{440\text{nm}} = 275 \pm 23 \text{ u.a.F}$ ) e TMP ( $F_{440\text{nm}} = 227 \pm 20 \text{ u.a.F}$ ) (Figuras 3.8a). As curvas analíticas foram obtidas na presença de AG (Figura 3.7b), as quais são descritas pelas seguintes equações:

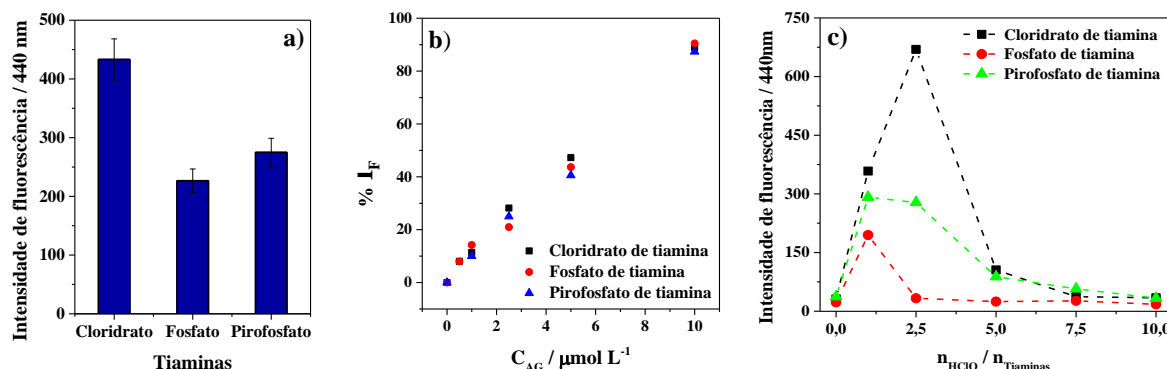
$$\%I_{\text{tiamina}} = 8,7(\pm 0,3) \times C_{\text{GA}} + 3,0(\pm 1,3), r = 0,9979$$

$$\%I_{\text{TMP}} = 8,7(\pm 0,6) \times C_{\text{GA}} + 1,9(\pm 1,6), r = 0,9971$$

$$\%I_{\text{TPP}} = 8,8(\pm 0,5) \times C_{\text{GA}} - 1,4(\pm 2,4), r = 0,9959$$

As sensibilidades das curvas analíticas com incrementos de AG não apresentaram diferenças significativas. A presença de grupos fosfato, não causou alteração nos parâmetros analíticos do método proposto quanto a sensibilidade. Assim, constatou-se que as tiaminas fosforiladas também podem ser empregadas para a análise da capacidade de sequestro de HOCl, contudo, deve-se considerar o elevado custo destas quando comparadas ao cloridrato de tiamina (custo entre 25 e 94 vezes maiores por grama). Logo, cada derivado de tiamina pode ser empregado conforme a condições que apresentar melhor performance.

**Figura 3.8 - Avaliação da metodologia proposta empregando diferentes tiaminas:** a) Sinais de referência dos sistemas; b) Curvas analíticas na presença de ácido gálico (% $I_F$ ); e c) variação do sinal na presença de HOCl.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

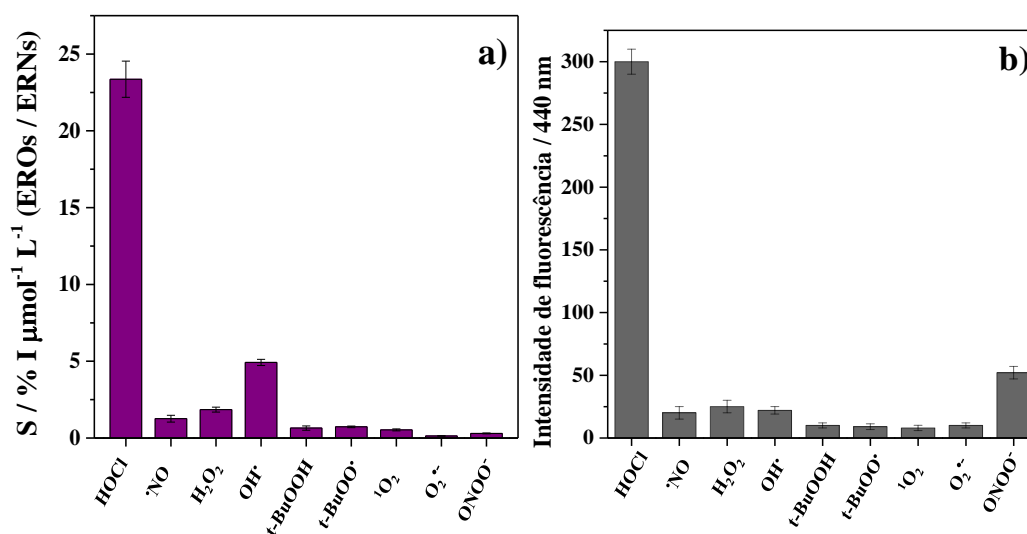
Vale salientar que as sondas apresentaram limitações quanto ao excesso de HOCl no meio. Como pôde ser observado na Figura 3.8c, em condições equimolares ( $n_{\text{HOCl}}/n_{\text{tiaminas}} = 1,0$ ), observou-se a formação de tiocromo em todos os sistemas analisados. No entanto, em excessos maiores que 2,5 vezes, a intensidade de fluorescência do cloridrato de tiamina diminuiu de 690 para 106 u.a.F levando a uma variação de 85%. Para as tiaminas fosforiladas (TMP e TPP) a diminuição brusca da fluorescência já ocorreu quando a quantidade de matéria de HOCl estava em excesso de 1 e 2,5 vezes, respectivamente. Nestes sistemas a intensidade de fluorescência variou de 195 a 33 u.a.F (variação de 83%) para TMP e de 278 a 105 u.a.F (variação de 62%) para TPP. A diminuição do sinal de fluorescência, pode estar associada a degradação da tiamina a partir do excesso do HOCl no meio. Estudos realizados por Jaroensanti e Panijpan (1981), indicam que excesso de  $\text{ClO}^-$  leva a clivagem dos 2 anéis heterocíclicos na ponte de metileno da estrutura da tiamina, devido as reações de oxidação, e a cloração do grupo amina presente na molécula.

### 3.4.8 Avaliação da seletividade do método proposto frente a espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

Com o objetivo de avaliar a aplicabilidade do método proposto em sistemas biológicos, analisou-se a seletividade da oxidação da tiamina a tiocromo na presença de EROS ou ERNs presentes no meio fisiológico. Para este estudo, o sistema foi avaliado a partir da sensibilidade ( $S / \%I \text{ mmol}^{-1} \text{ L}$ ) das curvas analíticas geradas a partir da variação da concentração das diferentes espécies reativas avaliadas em função da intensidade de fluorescência referente a formação do tiocromo (440 nm). As espécies reativas avaliadas foram: ácido hipocloroso

(HOCl), óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ), terc-butil peróxido (*tert*-BuOOH), radical terc-butil peroxila (*tert*-BuOO $\cdot$ ), oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ), ânion radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) e peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (Figura 3.9; Tabela SB5, Apêndice B).

**Figura 3.9 - Avaliação da seletividade do método proposto frente a diferentes EROs e ERNs: a) Sensibilidade das curvas analíticas ( $C_{\text{EROs}} / \mu\text{mol L}^{-1} \times F_{440 \text{ nm}} / \text{uF}$ ); e b) Sinal de fluorescência do sistema na presença de diferentes espécies reativas.** Condições experimentais: tampão fosfato a  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH = 7,4),  $C_{\text{Tiamina}} = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$  e tempo de reação = 30 min.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

As curvas analíticas das diferentes espécies reativas foram construídas a partir dos excessos das espécies analisadas em relação a tiamina ( $n = 3$ ). A faixa linear utilizada neste estudo foi de 1 a 20 vezes de excesso para as ERNs e de 0,5 a 3 vezes para o HOCl. Como pôde ser observado na Figura 3.9a, o método apresentou maior sensibilidade ( $\%I \text{ mmol}^{-1} \text{L}$ ) para HOCl ( $S = 23 \pm 1$ ), seguido por  $\cdot\text{OH}$  ( $S = 4,9 \pm 0,3$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $S = 1,8 \pm 0,2$ ) e  $\cdot\text{NO}$  ( $S = 1,3 \pm 0,2$ ). As demais ERs apresentaram sensibilidade inferior a  $0,70 \pm 0,05 \%I \text{ mmol}^{-1} \text{L}$ .

A seletividade do método foi avaliada em função da capacidade de cada espécie reativa em gerar tiocromo. Assim, comparou-se as intensidades dos sinais de fluorescência gerados pelas maiores concentrações analíticas utilizadas para cada espécie, sendo  $3 \mu\text{molL}^{-1}$  para HOCl e de  $20 \mu\text{molL}^{-1}$  para as demais ERs avaliadas. A intensidade do sinal de fluorescência gerado a partir de HOCl ( $300 \pm 10 \text{ u.a.F}$ ), foi cerca de 12 vezes maior que o sinal observado para as demais espécies analisadas, uma vez que estes variaram de  $8 \pm 2$  ( $^1\text{O}_2$ ) a  $52 \pm 5$  ( $\text{ONOO}^-$ ) u.a.F (Fig. 3.9 b). Assim, de acordo com os resultados obtidos, a sonda utilizada neste trabalho mostrou-se seletiva a HOCl, possibilitando a sua utilização em condições biológicas na

presença de outras espécies reativas, assim como, na avaliação direta da capacidade de sequestro de HOCl frente a moléculas bioativas.

#### 3.4.9 Avaliação da capacidade de sequestro de HOCl frente a compostos antioxidantes, redutores e fármacos pelo método proposto

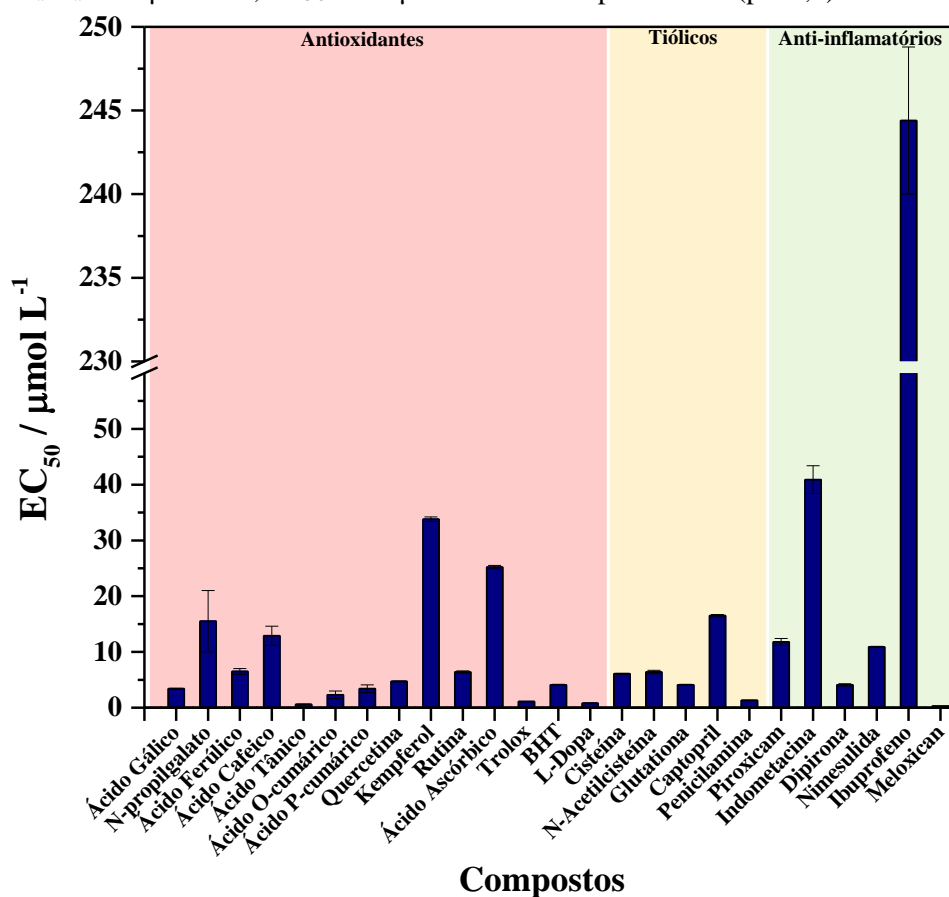
Após a otimização dos parâmetros analíticos da metodologia proposta, esta foi aplicada na determinação da capacidade de sequestro de HOCl frente a diferentes classes de compostos. Neste estudo foram selecionados compostos antioxidantes, tiólicos e anti-inflamatórios não esteroidais de acordo com as suas diferenças estruturais, graus de hidro ou lipofilicidade, solubilidade em água, complexidade estrutural, potencial redox e distribuição destas espécies em amostras de alimentos, bebidas e fármacos. Neste sentido, o método foi aplicado em quatorze compostos fenólicos e antioxidantes, a saber: ácido gálico, ácido ascórbico, ácido ferúlico, ácido tânico, ácido cafeico, ácido *o*-cinâmico, ácido *p*-cinâmico, quercetina, butil-hidroxitolueno (Trolox<sup>®</sup>), butil-hidroxitolueno (BHT), *N*-propilgalato, kaempferol, rutina e L-dopa; cinco compostos tiólicos: cisteína, *N*-acetilcisteína, glutathione, penicilamina e captopril; e seis anti-inflamatórios não esteroides: ibuprofeno, dipirona, nimesulida, piroxicam, indometacina e meloxicam (Figura 3.9).

Os dados obtidos nesta etapa foram analisados a partir de curvas analíticas resultantes da variação da concentração das amostras ( $C_{SC}$ ) em função da inibição do sinal de referência (%I). O  $EC_{50}$  (concentração do composto capaz de inibir 50% do sinal de referência) foi calculado a partir dos parâmetros analíticos das curvas (Figura 3.10; Tabela SA4). Os valores de  $EC_{50}$  variaram de  $0,60 \pm 0,01$  a  $33,8 \pm 0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$  para os compostos fenólicos ácido tânico e kaempferol, respectivamente, de  $1,3 \pm 0,2$  a  $15,5 \pm 0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$  para os compostos tiólicos penicilamina e captopril, respectivamente, e de  $0,010 \pm 0,001$  a  $244 \pm 20 \mu\text{mol L}^{-1}$  para os anti-inflamatórios meloxicam e ibuprofeno, respectivamente. De forma geral, considerando os valores de  $EC_{50}$ , os compostos antioxidantes apresentaram maior eficiência, seguidos pelos compostos tiólicos e os anti-inflamatórios analisados.

A eficiência de uma espécie quanto à capacidade de sequestro frente ao HOCl está associada a diferentes fatores, como a sua capacidade antioxidante e/ou redutora, inibindo a ação da espécie reativa por meio da redução de HOCl a  $\text{Cl}^-$  e a presença de grupos amino passíveis de halogenação (MAINNEMARE et al., 2004). Assim, compostos polifenólicos como o ácido tânico ( $EC_{50} = 0,60 \pm 0,01 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) que apresenta capacidade antioxidante potencializada devido a presença de hidroxilas em carbonos adjacentes no anel aromático e a

L-dopa ( $EC_{50} = 0,80 \pm 0,01 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) que possui em sua estrutura um grupo catecol e uma amina passível de halogenação, são compostos eficientes quanto ao sequestro do HOCl. De forma análoga a L-dopa, os compostos tiólicos empregados neste trabalho, tem a sua capacidade de sequestro potencializada devido a capacidade redutora, bem como a presença de grupos amino (BINDOLI; FUKUTO; FORMAN, 2008). Estudos relatam a boa eficiência classes de compostos frente ao HOCl, diminuindo a sua citotoxicidade e impedindo a cloração de proteínas em meio celular (SIWAK et al., 2013; WANG; HUANG, 2014).

**Figura 3.10 - Avaliação da capacidade de sequestro de HOCl por compostos fenólicos e antioxidantes, tiólicos e anti-inflamatórios.** Condições experimentais: Condições experimentais:  $C_{\text{Tiamina}} = 12 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $C_{\text{HOCl}} = 12 \mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão fosfato (pH 7,4).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

O método proposto pode apresentar limitações quando as propriedades espectrais das sondas usadas, uma vez que moléculas que apresentam  $\lambda_{\text{abs}} \sim 440 \text{ nm}$  podem absorver a radiação emitida pela sonda (efeito de filtro), gerando resultados falso positivos. Além disto, moléculas fluorescentes com propriedades espectroscópicas similares, como a vanilina ( $\lambda_{\text{ex}} = 297 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 329$  e  $432 \text{ nm}$ ), composto fenólico usado como excipiente em fármacos pode



acarretar no aumento do sinal de referência (LAKOWICZ, 2006; GOES et al., 2019; DEVI et al., 2015). Nestes casos, para contornar as interferências espectrais, os espectros das amostras (branco da amostra) devem ser medidos e subtraídos dos sinais correspondentes na presença da sonda

Alguns estudos avaliaram a capacidade de sequestro de compostos antioxidantes e tiólicos que foram analisados neste trabalho. As metodologias aplicadas nestes trabalhos são similares as do trabalho desenvolvido (tampão fosfato, pH 7,4). Os resultados obtidos pelos autores variam em função dos métodos e das técnicas empregadas. Magalhães et al. (2007) utilizaram luminol ( $\lambda_{em} = 425 \text{ nm}$ ) como sonda quimioluminescente para detecção de HOCl. Neste trabalho, os autores determinaram o  $EC_{50}$  de ácido gálico ( $9,1 \pm 0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e cisteína ( $9,7 \pm 0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Firuzi et al. (2004) empregando 2-nitro-5-tiobenzoato como sonda espectrofotométrica ( $\lambda_{m\acute{a}x} = 412 \text{ nm}$ ) na presença de albumina do soro humano (HSA) como alvo do HOCl, determinaram o  $EC_{25}$  de quercetina ( $8,8 \pm 0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e rutina ( $27,7 \pm 3,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Por fim, Yan et al. (2016), empregando albumina do soro bovino (BSA) carbonilada como sonda determinaram a capacidade de sequestro de HOCl ( $EC_{50}$ ), ácido ascórbico ( $104,5 \pm 3,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), cisteína ( $52 \pm 6 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), *N*-acetilcisteína ( $41 \pm 3 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e glutathione ( $38 \pm 4 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).

Como pôde ser observado nos resultados obtidos (Figura 3.10; Tabela SB6, Apêndice B), os anti-inflamatórios mais eficientes no sequestro do HOCl foram o meloxicam ( $0,010 \pm 0,001 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e a dipirona ( $4,1 \pm 0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Os resultados corroboram com os dados apresentados por Magalhães et al. (2007), uma vez que justificam a destacada capacidade de sequestro de HOCl por meloxicam, quando comparada a outros anti-inflamatórios do mesmo grupo como o piroxicam ( $11,8 \pm 0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) também avaliado neste estudo. A presença do anel metiltiazol torna o composto mais eficiente. Nève et al. (2001), empregando 2-nitro-5-tiobenzoato como sonda espectrofotométrica ( $\lambda_{m\acute{a}x} = 412 \text{ nm}$ ) determinaram o  $EC_{50}$  da indometacina ( $95 \pm 17 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e piroxicam ( $42 \pm 2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Os elevados valores de  $EC_{50}$  da indometacina ( $40,9 \pm 2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e ibuprofeno ( $244,4 \pm 10,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) estão de acordo com os trabalhos de Magalhães et al. (2007) e Paino et al. (2005), uma vez que estes autores não observaram atividade sequestradora destes compostos nas concentrações analisadas (100 - 1000 e 12 - 120  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente). Assim, os resultados obtidos utilizando o método aqui desenvolvido mostraram-se comparáveis àqueles reportados na literatura em técnicas usando outras sondas fluorescentes.

#### 3.4.10 Sondas fluorimétricas propostas para determinação de HOCl em sistemas biológicos

Devido aos danos oxidativos causados pelo excesso de HOCl no organismo, diversas sondas e metodologias vem sendo desenvolvidas nesses últimos três anos. Assim, buscou-se na literatura trabalhos que desenvolveram sondas para detecção de HOCl e  $\text{ClO}^-$ , recentemente (Tabela SB7, Apêndice B).

A fluorescência basal das células está na faixa entre 450 e 550 nm (KOPRIVA et al., 2007). Assim, para evitar interferências espectrais, os pesquisadores buscam o desenvolvimento de moléculas que fluorescem em maiores comprimentos de onda. Neste sentido, a maioria das sondas pesquisadas apresentam  $\lambda_{em} \geq 585$  nm. Para aumentar o  $\lambda_{em}$ , as sondas sintetizadas possuem com maior complexidade estrutural e grau de conjugação, diminuindo o rendimento das sínteses, e alterando parâmetros físico-químicos como a solubilidade, exigindo assim, a utilização de solventes orgânicos e ajustes de pH para valores diferentes de 7,4 (condição fisiológica). Contudo, estratégias como a subtração do sinal de fluorescência basal, possibilitam a utilização de sondas que fluorescem na região do azul.

A sensibilidade das sondas analítica é um parâmetro essencial para a detecção de HOCl em condições fisiológicas. Para a detecção desta espécie reativa em macrófagos, por exemplo, o método deve ter limite de detecção de 20 a 400  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de HOCl (concentração de HOCl gerada pelas células em uma hora) (ZHANG; SONG; YUAN, 2018). Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) das moléculas pesquisadas variaram de  $1,7 \times 10^{-5}$  -  $2,08 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $2,5 \times 10^{-5}$  -  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.

Quando comparada as demais sondas pesquisadas, a tiamina mostra-se como uma alternativa promissora para a sua utilização como sonda para detecção/quantificação seletiva de HOCl e a determinação da capacidade de sequestro de HOCl de diferentes substâncias. A tiamina apresentou limites de detecção e quantificação (LOD =  $0,15 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; LOQ  $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) comparáveis aos parâmetros apresentados em outros trabalhos, sendo adequada para a detecção de HOCl em sistemas biológicos. Vale salientar que a tiamina é uma vitamina (logo não é tóxica) presente em sistemas biológicos, podendo a formação do tiocromo atuar como possível marcador de estresse oxidativo na presença de HClO em células.

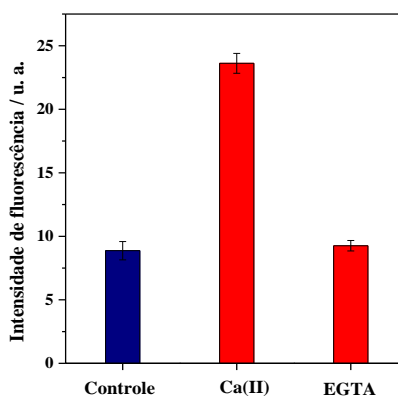
### 3.4.11 Isolamento e aplicação de neutrófilos humanos como modelo para avaliar estresse oxidativo

Em função dos resultados obtidos nos estudos anteriores, buscou-se avaliar a aplicabilidade do método desenvolvido em amostras biológicas. Para isto, foram isolados neutrófilos humanos de três voluntários, essas células foram selecionadas por serem os leucócitos de maior abundância na circulação, e possuírem dentre os mecanismos de ação a produção de HOCl em condições pró-inflamatórias (ULFIG; LEICHERT, 2021). Neste estudo, os neutrófilos isolados foram estimulados com PMA e Ca(II) conforme estudo realizado por Ribeiro et al. (2018). O aumento da concentração de cálcio no meio em conjunto com o PMA desencadeia numa série de mecanismos que estimulam a produção de espécies reativas de oxigênio, dentre elas o HOCl decorrente do estímulo da mieloperoxidase (CHEN et al., 2019; PALMER et al., 2012; BLACKBURN; CHATHAM, 1994).

Diante do exposto, para verificar a atividade das células isoladas na presença e na ausência de Ca(II), para detectar a produção de ERs dos neutrófilos estimulados, mediu-se a produção de ERs totais nas células com o emprego da sonda comercial 2',7'-diclorofluoresceína (DCF,  $\lambda_{ex} = 490 \text{ nm} / \lambda_{em} = 527 \text{ nm}$ ) (AKOPOVA et al., 2017) (Fig. 3.11).

Como pôde ser observado na figura abaixo, as células controle (estimuladas apenas com PMA) apresentaram uma produção de espécies 62% menor quando comparadas aos neutrófilos estimulados por PMA na presença de Ca(II). O efeito do cálcio pôde ser comprovado pela adição do EGTA (ácido 3,12-bis(carboximetil)-6,9-dioxa-3,12-diazatetradecano-1,14-diólico), que diminuiu a concentração de Ca(II) livre e conseqüentemente a produção de ERs. Diante dos resultados apresentados, para estudos posteriores os neutrófilos foram estimulados com Ca(II) e PMA.

**Figura 3.11 – Produção de espécies reativas em neutrófilos humanos estimulados com Ca(II).** Os resultados são expressos em média  $\pm$  SD (n=3). Condições experimentais: suspensão de neutrófilos humanos =  $5 \times 10^6$  células / mL,  $C_{Ca(II)} = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $C_{PMA} = 400 \text{ nmol L}^{-1}$ ,  $C_{EGTA} = 800 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $C_{DCF} = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$  e tempo de reação = 2h



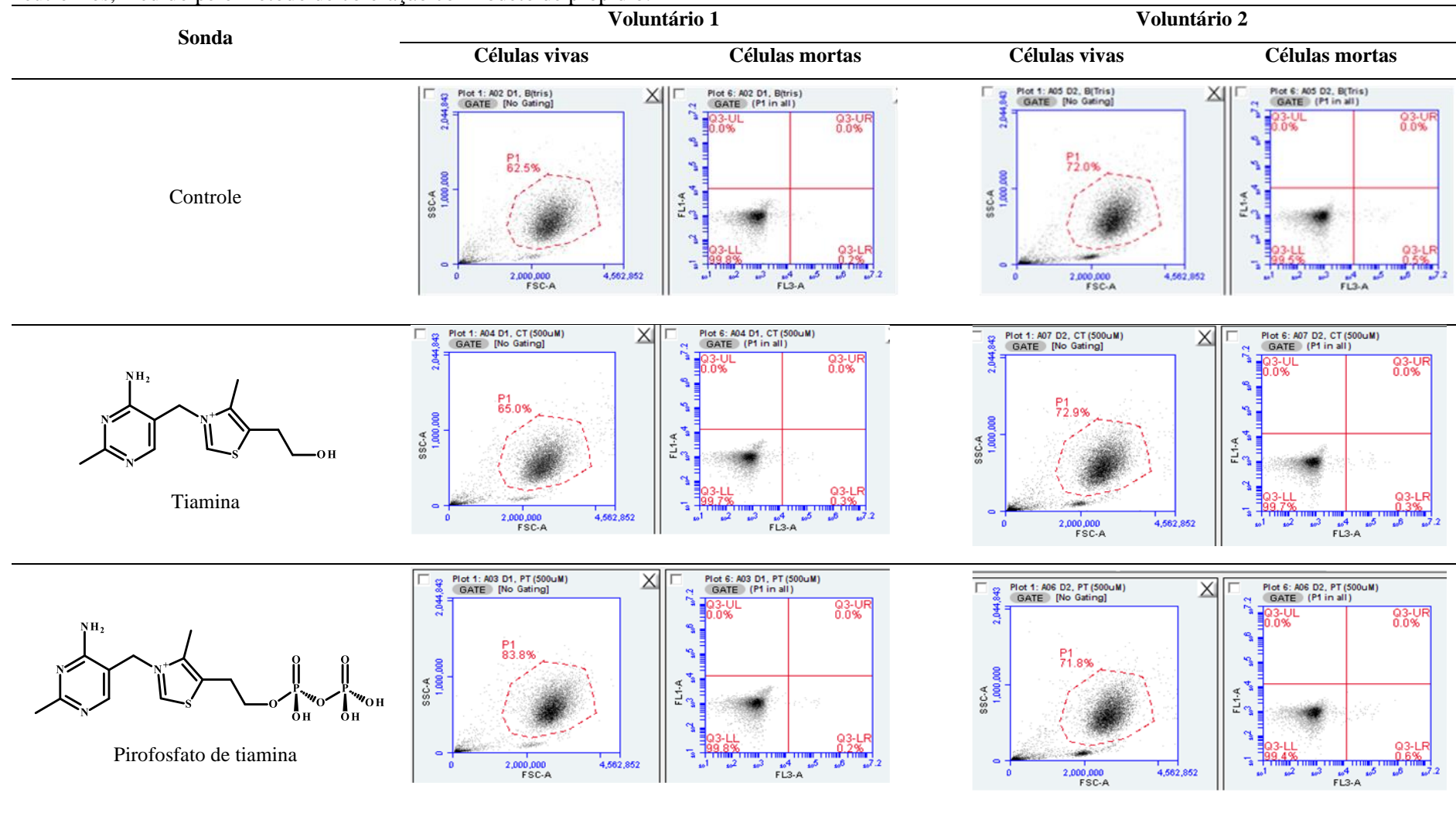
Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

### 3.4.12 Avaliação dos efeitos do pirofosfato de tiamina e do cloridrato de tiamina na viabilidade dos neutrófilos humanos isolados

Inicialmente, determinou-se a viabilidade celular da tiamina e o seu derivado fosforilado biologicamente ativo, pirofosfato de tiamina em neutrófilos humanos (LONSDALE, 2006). Em condições normais, a concentração de tiamina no sangue varia entre 74 e 222 nmol L<sup>-1</sup> (PARROTT et al., 2017), assim, esta etapa teve como objetivo determinar as concentrações máximas das moléculas sondas a serem testadas e garantindo a integridade celular dos neutrófilos. Neste sentido, avaliou-se a viabilidade celular empregando 50, 250 e 500 µmol L<sup>-1</sup> das sondas utilizando iodeto de propídio (PI) como marcador fluorescente nuclear para detectar células necróticas na amostra de sangue e dois voluntários.

A Figura 3.12 mostra os parâmetros de dispersão direta (FSC-A) e dispersão lateral (SSC-A), que medem o tamanho relativo das células (por meio da medição da quantidade de luz do laser que passa ao redor da célula) e a granulocidade de células (medida da quantidade de luz do laser que é refletido pelas partículas dentro da célula), respectivamente. Como pôde-se observar, a maior concentração testada para as duas sondas citadas (500 µmol L<sup>-1</sup>) não influenciou no tamanho e na granulocidade nem no percentual total da população de neutrófilos em comparação com ao controle. Portanto, para estudos posteriores analisou-se a sensibilidade da sonda numa concentração máxima de 500 µmol L<sup>-1</sup>.

Figura 3.12 – Gráficos representativos de citometria de fluxo do efeito do pirofosfato de tiamina e do cloridrato de tiamina ( $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na viabilidade dos neutrófilos, medido pelo método de coloração com iodeto de propídio.

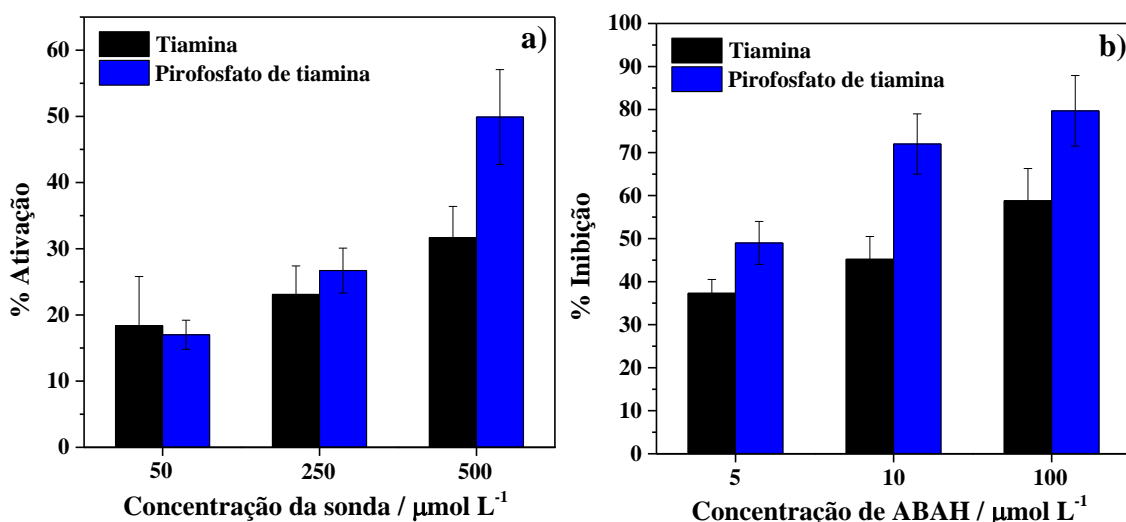


Fonte: Elaborado pelo autor 2021.

### 3.4.13 Aplicação das sondas fluorimétricas propostas para determinação de HOCl em neutrófilos humanos isolados

Após o estudo de viabilidade celular, as sondas foram testadas em neutrófilos humanos isolados ( $5 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) e estimulados com Ca(II) e PMA. Nesta etapa, as células foram encubadas com as duas sondas: tiamina e pirofosfato de tiamina em diferentes concentrações (50 - 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) por 2 h (Fig. 3.13a). Como pode ser observado, com o aumento da concentração das sondas, observou-se de forma mais efetiva o percentual de ativação dos neutrófilos, sendo o pirofosfato de tiamina (TPP) a sonda de maior sensibilidade quando comparada a tiamina (T) isolada. A maior eficiência para tiamina fosforilada pode ter ocorrido em decorrência do maior acesso desta molécula ao meio intracelular, onde há a produção de ERs. Fatores como a carga positiva podem diminuir a probabilidade da tiamina permear a membrana celular fazendo com que essa molécula entre nas células por canais específicos (MANZETTI et al., 2014).

**Figura 3.13 – Detecção de HOCl em neutrófilos humanos empregando tiamina e pirofosfato de tiamina como sonda. Sendo a) detecção de neutrófilos humanos induzidos por PMA (50 - 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e b) efeito inibidor de ABAH (2,5 - 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em neutrófilos humanos estimulados por PMA. Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ ). Condições experimentais: suspensão de neutrófilos humanos =  $5 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ,  $C_{\text{sondas}} = 500 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $C_{\text{Ca(II)}} = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $C_{\text{PMA}} = 400 \text{nmol L}^{-1}$  e tempo de reação = 2 h.**



Fonte: Elaborado pelo autor 2021.

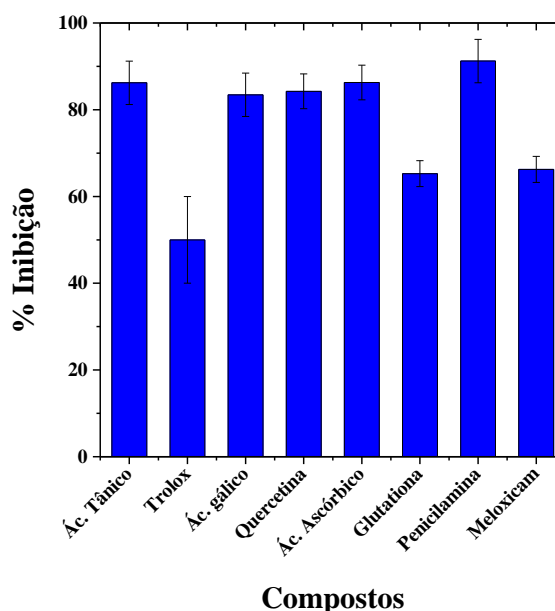
Para verificar a seletividade da sonda em meio celular, os neutrófilos estimulados e encubados com as sondas (500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) foram tratados com ácido 4-aminobenzoico hidrazina (ABAH), um inibidor clássico da enzima mieloperoxidase (MPO) (KIM et al., 2016). Os

resultados obtidos mostraram que na presença do inibidor de MPO, ocorreu diminuição do sinal de fluorescência (Figura 3.13b) proporcional a concentração, sugerindo que ambas as sondas fluorescentes detectaram o HOCl seletivamente em meio celular. Em decorrência da maior sensibilidade do TPP, esta sonda foi utilizada no estudo posterior.

#### 3.4.14 Determinação de HOCl em neutrófilos humanos isolados e avaliação da capacidade antioxidante de substâncias selecionadas para este sistema

Para avaliar a capacidade de sequestro de HOCl em neutrófilos, oito compostos foram selecionados de acordo com as suas classes e resultados de  $EC_{50}$  *in vitro* (tópico 3.4.9, Figura 3.10). Assim, selecionou-se os compostos antioxidantes com base nos resultados prévios: ácido tânico ( $0,60 \pm 0,01 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), Trolox<sup>®</sup> ( $1,1 \pm 0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), ácido gálico ( $3,3 \pm 0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), quercetina ( $4,7 \pm 0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e ácido ascórbico ( $25 \pm 0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Além dos tióis: penicilamina ( $1,30 \pm 0,01 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e glutatona ( $6,1 \pm 0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e o anti-inflamatório mais ativo: meloxicam ( $0,010 \pm 0,001 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) (Fig. 3.14).

**Figura 3.14 – Determinação da capacidade de sequestro de HOCl em neutrófilos humanos empregando tiamina como sonda. Os resultados são expressos em média $\pm$ SD (n=3). Condições experimentais: suspensão de neutrófilos humanos =  $5 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ,  $C_{\text{Ca(II)}}$  =  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ , sonda = Pirofosfato de tiamina,  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$  e tempo de reação = 2 h.**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

De forma geral, a capacidade sequestradora de HOCl dos compostos analisados foi maior *in vivo* quando comparada a condição *in vitro*. Todos os compostos foram testados nas

concentrações correspondentes aos seus  $EC_{50}$ . Contudo, nestas concentrações todas as moléculas avaliadas inibiram aproximadamente 100% do HOCl gerado, com exceção do Trolox<sup>®</sup> que inibiu em apenas 11%. Assim, testou-se o Trolox<sup>®</sup> ( $5,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) a uma concentração cinco vezes maior que a inicial (tópico 3.4.9, Figura 3.10), enquanto os outros compostos foram diluídos cinco vezes. Assim, as inibições de geração de HOCl variaram de 65 e 90%.

As variações observadas em meio celular quando comparadas ao método desenvolvido anteriormente, podem ser justificadas pela menor concentração de HOCl disponível no meio, pois parte do ácido hipocloroso pode ter reagido com a membrana das células, proteínas, ácidos nucleicos e outras espécies reativas (BLOCK; ROWAN, 2020; PIOR et al., 2005).

### 3.5 Conclusões

Nas condições otimizadas, a metodologia desenvolvida possibilitou avaliar de forma rápida, simples e seletiva a capacidade de sequestro de HOCl por antioxidantes, tióis e anti-inflamatórios em condições fisiológicas. Os parâmetros analíticos obtidos são compatíveis as sondas reportadas na literatura para sistemas biológicos, qualificando este método analítico como eficiente para determinação da capacidade sequestradora de HOCl de moléculas biologicamente ativa.

O pirofosfato de tiamina, mostrou-se uma sonda promissora para detecção de HOCl, pois apresentou a maior sensibilidade entre as sondas avaliadas, além de ser a forma bioativa da tiamina. Sendo uma ferramenta interessante para avaliação e seleção de compostos para diferentes aplicações farmacológicas em condições de estresse oxidativo em neutrófilos humanos.

### 3.6 Perspectivas

Abaixo são apresentadas algumas perspectivas para este trabalho:

- i)* Determinar o  $EC_{50}$  de diferentes compostos frente o HOCl em neutrófilos humanos em condições inflamatórias;
- ii)* Avaliar possíveis derivatizações da tiamina que possam aumentar a sua permeabilidade celular e conseqüentemente a sua sensibilidade em ensaios celulares.



## REFERÊNCIAS

AKOPOVA, O. V.; KOLCHINSKAYA, L.; NOSAR, V. The Use of Dichlorofluorescein as a Probe for Monitoring the Effects of Calcium on ROS Production in Mitochondria. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 6, n. 3, 2017.

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143–152, 2013.

BINDOLI, A.; FUKUTO, J. M.; FORMAN, H. J. Thiol Chemistry in Peroxidase Catalysis and Redox Signaling. **Antioxid Redox Signal**, v.10, n. 9, p.1549-1564, 2008.

BLACKBURN JR, W. D.; CHATHAM, W. W. HOCl production by human neutrophils activated by surface-associated IgG: Requirement for influx of extracellular calcium. **Journal of leukocyte biology**, v. 55, 793-798, 1994.

BLOCK, M. S.; ROWAN, B. G. Hypochlorous Acid: A Review. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, n. 78, v. 9, p. 1461-1466, 2020.

BOYUM A. Isolation of Mononuclear Cells and Granulocytes from Human Blood. Isolation of Monuclear Cells by One Centrifugation, and of Granulocytes by Combining Centrifugation and Sedimentation at 1 g. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation Supplementum**, v. 97, p. 77-89, 1968.

CHEN, L. A two-photon ES IPT based fluorescence probe for specific detection of hypochlorite. **Dyes and Pigments**, v. 158, p. 526-532, 2018.

CHEN, M., et al. Propofol specifically reduces PMA-induced neutrophil extracellular trap formation through inhibition of p-ERK and HOCl. **Life Sciences**, v. 221, p. 178-186, 2019.

CHENG, G. et al. A near-infrared fluorescent probe for selective detection of HOCl based on Sensitized aggregation of heptamethine cyanine dye. **Chemical Communications Journal**, v. 50, p. 1018-1020, 2014.

CLEMENS, R. A. et al. STIM1 and STIM2 cooperatively regulate mouse neutrophil store-operated calcium entry and cytokine production. **Blood Journal**, v. 130, n. 13, p. 1565-1577, 2017.

COSTA, N. A. et al. Serum thiamine concentration and oxidative stress as predictors of mortality in patients with septic shock. **Journal of Critical Care**, v. 29, n. 249-252, 2014.

DEVI, S. S. et al. Crystal structure and spectral characterization of di-n-butyltin(IV) compound of vanillin. **Main Group Chemistry**, v. 14, p. 339-348, 2015.

DWIVEDIL, D. K.; Arnold, R. G. Chemistry of Thiamine Degradation in Food Products and Model Systems: A Review. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 21, n. 1, p. 54-60, 1973.

ENGLISH, D.; ANDERSEN, B. R. Single-step Separation of Red Blood Cells, Granulocytes and Mononuclear Leukocytes on Discontinuous Density Gradients of Ficoll-Hypaque. **Journal of Immunological Methods**, v. 5, n. 3, p. 249-52, 1974.

FIRUZI, O. et al. Hypochlorite scavenging activity of flavonoids. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 56, 801–807, 2004.

FREITAS M, PORTO G, LIMA JLFC, FERNANDES E. Isolation and Activation of Human Neutrophils in vitro. The Importance of the Anticoagulant Used During Blood Collection. **Clinical Biochemistry**, v. 41, n. 7, p. 570-575, 2008

FUJIWARA, M.; MATSUI, K. Determination of Thiamine by the Thiochrome Reaction. **Analytical Chemistry**, v. 25, n. 5, p. 810-812, 1953.

GAO, Y. et al. Polyoxometalates as catalysts for fluorescence amplification in rapid and sensitive detection of artemisinin. **Analytica Chimica Acta**, v. 1143, p. 101-108, 2021.

GOES, E. J. A. et al. Validação de método espectrofotométrico de análise para a quantificação de ácidoacetilsalicílico em formulações farmacêuticas: uma proposta de aula experimental para análise instrumental. **Quim. Nova**, 42(1), 99-104, 2019.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. F. C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. **The Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 65, p. 45-80, 2005.

HU, J. J.; YE, S.; YANG, D. Fluorescent Probes for HOCl Imaging. **Israel Journal of Chemistry**, v. 57, p. 251-258, 2017.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

HUANG, Y. et al. A near-infrared ratiometric fluorescent probe with large stokes based on isophorone for rapid detection of  $\text{ClO}^-$  and its bioimaging in cell and mice. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 287, p. 453-458, 2019.

JAROENSANTI, J.; PANIJPAN, B. Effects of hypochlorite on thiamine and its derivatives. **Experientia Birkhüzer Verlag, Basel (Schweiz)**, v. 37, p. 1248-1250, 1981.

JIA, P. et al. A highly specific and ultrasensitive p-aminophenylether-based fluorescent probe for imaging native HOCl in live cells and zebrafish. **Analytica Chimica Acta**, 1052, 131-136, 2019.

JIANG, Y. et al. Ultra-sensitive fluorescent probes for hypochlorite acid detection and exogenous/endogenous imaging of living cells. **Chemical Communications Journal**, v. 54, n. 57, p. 7967-7970, 2018.

KIM, H. et al. Myeloperoxidase Inhibition Increases Neurogenesis after Ischemic Stroke. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 359, n. 2, p. 262-272, 2016.

- KOPRIVA, I. et al. Visualization of basal cell carcinoma by fluorescence diagnosis and independent component analysis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 4, p. 190-196, 2007.
- LAFORGE, M. et al. Tissue damage from neutrophil-induced oxidative stress in COVID-19. **Nature Reviews**, v. 20, p. 515-516, 2020.
- LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3. ed. Baltimore: Springer, 2006.
- LAPENNA, D.; CUCCURULLO, F. Hypochlorous Acid and its Pharmacological Antagonism: An Update Picture. **General Pharmacology**, v. 27, n. 7, p. 1145-1147, 1996.
- LI, Y.; LI, H.; DI, G. Ratiometric fluorescent probe with aggregation-induced emission features for monitoring to HOCl in living cells and zebra fish. **New Journal of Chemistry**, v. 44, p. 14286-14290, 2020.
- LIDDICOAT, C. et al. Thiamin analysis in red wine by fluorescence reverse phase-HPLC. **Food Chemistry**, v. 177, n. 325-329, 2015.
- LIMA, L. F. P.; LEITE, H. P.; TADEI, J. A. A. C. Low blood thiamine concentrations in children upon admission to the intensive care unit: risk factors and prognostic significance. **The American Journal Clinical Nutrition**, v. 93, n. 57-61, 2011.
- LIU, C. et al. A ratiometric fluorescent probe for hypochlorous acid and its biological applications. **Dyes and Pigments**, v. 160, p. 989-994, 2019.
- LIU, C. H. et al. Biomarkers of chronic inflammation in disease development and prevention: challenges and opportunities. **Nature Immunology**, v. 18, n. 11, p. 1175-1180, 2017.
- LIU, Y. et al. Highly sensitive and selective turn-on fluorescent and chromogenic probe for Cu<sup>2+</sup> and ClO<sup>-</sup> based on a N-picolinyl rhodamine B-hydrazide derivative. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 9, p. 432-437, 2011.
- LONSDALE, D. A Review of the Biochemistry, Metabolism and Clinical Benefits of Thiamin(e) and Its Derivatives. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, n.1, p. 49-59, 2006.
- MA, Z. et al. A sensitive and selective fluorescence probe for detection of hypochlorite (OCl<sup>-</sup>) and its bioimaging in live cells. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 213, p. 370-374, 2019.
- MAGALHÃES, L. M. et al. Automatic in Vitro Determination of Hypochlorous Acid Scavenging Capacity Exploiting Multisyringe Flow Injection Analysis and Chemiluminescence. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 3933-3939, 2007.
- MAINNEMARE et al. Hypochlorous Acid and Taurine-N-Monochloramine in Periodontal Diseases. **Journal of Dental Research**, v.83, n. 11, p. 823-831, 2004.
- MANZETTI, S.; ZHANG, J.; SPOEL, D. V. D. Thiamin Function, Metabolism, Uptake, and Transport. **Biochemistry**, v. 53, n. 5, p. 821-835, 2014.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 5 ed. England: Pearson, 2005.

NABOKIKHIN, S. M.; SUBRAMANIAN, S. V.; SAID, H. M. The human colonic thiamine pyrophosphate transporter (hTPPT) is a glycoprotein and N-linked glycosylation is important for its function. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v.1858, n. 4, p. 866-871, 2016.

NEJDL, L. et al. Spectrometric and Chromatographic Study of Reactive Oxidants Hypochlorous and Hypobromous Acids and Their Interactions with Taurine, **Chromatographia**, v. 76, p. 363-373, 2013.

NÈVE, J.; PARIJ, N.; MOGUILVSKY, N. Inhibition of the myeloperoxidase chlorinating activity by non-steroidal anti-inflammatory drugs investigated with a human recombinant enzyme. **European Journal of Pharmacology**, v. 417, p. 37-43, 2001.

NI, P. et al. Highly sensitive fluorescent detection of glutathione and histidine based on the Cu(II)-thiamine system. *Analyst*, v. 143, p. 4442-4447, 2018.

NI, P. et al. Light-responsive Au nanoclusters with oxidase-like activity for fluorescent detection of total antioxidant capacity. **Journal of Hazardous Materials**, v. 411, p. 1-7, 2021.

Nutritional Guidelines for the Surgical Weight Loss Patient 2016 Update: Micronutrients. **Surgery for Obesity and related Diseases**, v. 13, 727-741, 2017.

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, W. S.; SANTOS, J. C. C. Determination of Total Antioxidant Capacity Using Thiamine as a Natural Fluorescent Probe. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 12, p. 2479-2490, 2020.

ORDEIG, O. et al. Continuous Detection of Hypochlorous Acid/Hypochlorite for Water Quality Monitoring and Control, *Electroanalysis*, v. 17, p. 1641-1648, 2005.

PAINO, I. M. M. et al. Effect of therapeutic plasma concentrations of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the production of reactive oxygen species by activated rat neutrophils. **Brazilian Journal of medical and biological research**, v. 38, n. 543-551, 2005.

PALMER, L. J., et al. Hypochlorous acid regulates neutrophil extracellular trap release in humans. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 167, p. 261-268, 2012.

PARROTT et al. American Society for Metabolic and Bariatric Surgery Integrated Health Nutritional Guidelines for the Surgical Weight Loss Patient 2016 Update: Micronutrients. **Surgery for Obesity and Related Diseases**, v. 13, n. 5, p.727-741, 2017.

PEREIRA, A. V. et al. Determinação de compostos fenólicos em amostras comerciais de chás verde e preto – *Camellia sinensis* (L.) Kuntze. **Theaceae. Acta Scientiarum Health Sciences**, v. 31, n. 2, p.119-124, 2009.

- PREEDY, V. R. B Vitamins and folate: chemistry, analysis, function and effects. **Neurochemistry International**, v. 40, p. 493-504, 2001. Food and Nutritional Components in Focus n. 4, The Royal Society of Chemistry, 2013. Promote neurodegeneration.
- PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.
- PRUTZ, W. A. Interactions of Hypochlorous Acid with Pyrimidine Nucleotides, and Secondary Reactions of Chlorinated Pyrimidines with GSH, NADH, and Other Substrates. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 349, n. 1, p. 183-191, 1998
- RIBEIRO, D. et al. Calcium Pathways in Human Neutrophils – The Extended Effects of Thapsigargin and ML-9. *Cells*, v. 7, n. 214, p. 1-13, 2018.
- RYAN, M. A.; INGLE J. D. fluorometric reaction rate method for the determination of thiamine. **Analytical Chemistry**, v. 52, n. 13, p. 2177-2184, 1980.
- SEBRELL, W. H.; Harris, R. S. **The vitamins: chemistry, physiology, pathology, methods**. 2.nd. ed. London: Academic Press, 1972. v. 5.
- SHEN, S-L. et al. A novel ratiometric fluorescent probe for the detection of HOCl based on FRET strategy. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 254, p. 736-741, 2018.
- SHEN, S-L. et al. A ratiometric fluorescent probe for lysosomal hypochlorous acid based on through-bond energy transfer strategy. **Analytica Chimica Acta**, v.1052, p.124-130, 2019.
- SHEN, S-L. et al. A rhodamine B-based probe for the detection of HOCl in lysosomes. **Analytica Chimica Acta**, v. 1046, p. 185-191, 2019.
- SHEN, S-L. et al. Ratiometric fluorescent probe for the detection of HOCl in lysosomes based on FRET strategy. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 263, p. 252-257, 2018.
- SIWAK, J. et al. Protection of flavonoids against hypochlorite-induced protein modifications. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1227-1241, 2013.
- SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo: Thomson, 2006.
- SOARES, T.; RIBEIRO, D.; PROENÇA, C.; CHISTÉ, R. C.; FERNANDES, E.; FREITAS, M. Size-dependent Cytotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Neutrophils Assessed by Multiple Analytical Approaches. **Life Sciences**, v. 145, p. 247-54, 2016.
- SOLDATKIN, A. P. et al. New enzyme potentiometric sensor for hypochlorite species detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 43, p. 99-104, 1997.
- SONG, G.-J. et al. A new ratiometric fluorescent probe for sensing HOCl based on TBET in real time. **Dyes and Pigments**, v. 148, p. 206-211, 2018.
- SONG, X. et al. Microflow-injection chemiluminescence of luminol and hypochlorite enhanced by phloxine B. **Luminescence**, v. 28, p. 16-22, 2013.

STECKEL, A.; SCHLOSSER, G. An Organic Chemist's Guide to Electrospray Mass Spectrometric Structure Elucidation. **Molecules**, v. 24, p. 1-11, 2019

TABRIZI, A. B. A cloud point extraction-spectrofluorimetric method for determination of thiamine in urine. **Bull. Korean Chemistry Society**, v. 27, n. 10, p. 1604-1608, 2006.

TAN, H. et al. A sensitive fluorescent assay for thiamine based on metal-organic frameworks with intrinsic peroxidase-like activity. **Analytica Chimica Acta**, v. 856, p. 90-95, 2015.

ULFIG, A.; LEICHERT, L. I. The effects of neutrophil-generated hypochlorous acid and other hypohalous acids on host and pathogens. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, p. 385-414, 2021.

WANG, H.; HUANG, D. Dietary organosulfur compounds from garlic and cruciferous vegetables as potent hypochlorite scavengers. **Journal of Functional Foods Part B**, v. 18, p. 986-993, 2015.

WEI, P. et al. Deformylation reaction-based probe for in vivo imaging of HOCl. **Chemical Science**, 9, 495-591, 2018.

WO, Y. et al. Study of crystal formation and nitric oxide (NO) release mechanism from S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP)-doped CarboSil polymer composites for potential antimicrobial applications. **Composites Part B: Engineering**, v. 121, p. 23-33, 2017.

YAN, L.-J. et al. Efficacy of Hypochlorous Acid Scavengers in the Prevention of Protein Carbonyl Formation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 327, n. 2, p. 330-334, 1996

YANG, X. et al. A Smartphone-based Portable Analytical System for On-site Quantification of Hypochlorite and Its Scavenging Capacity of Antioxidants. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 283, p. 524-531, 2019.

YAO, Z. et al. Fluorimetric determination of histidine by exploiting its inhibitory effect on the oxidation of thiamine by cobalt-containing Prussian Blue nanocubes. **Microchimica Acta**, v. 187, n. 93, p. 1-7, 2020.

ZANG, H. et al. Mono- or di-naphthalimides as fluorophore to detect hypochlorous acid (HOCl) by ratiometric fluorescent signal and their biological application. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 269, p. 180-188, 2018.

ZHAO, H.; LIU, L.; MA, C. Sensitive Fluorescence Assay for the Detection of Alkaline Phosphatase Based on a Cu<sup>2+</sup>-Thiamine System. **Sensors**, v. 21, n. 674, p. 1-7, 2021.

ZHANG, R.; SONG, B.; YUAN, J. Bioanalytical methods for hypochlorous acid detection: Recent advances and challenges. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 99, p. 1-33, 2018.

ZHU, B. et al. A fast-response, highly specific fluorescent probe for the detection of picomolar hypochlorous acid and its bioimaging applications. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 263, p. 103-108, 2018.

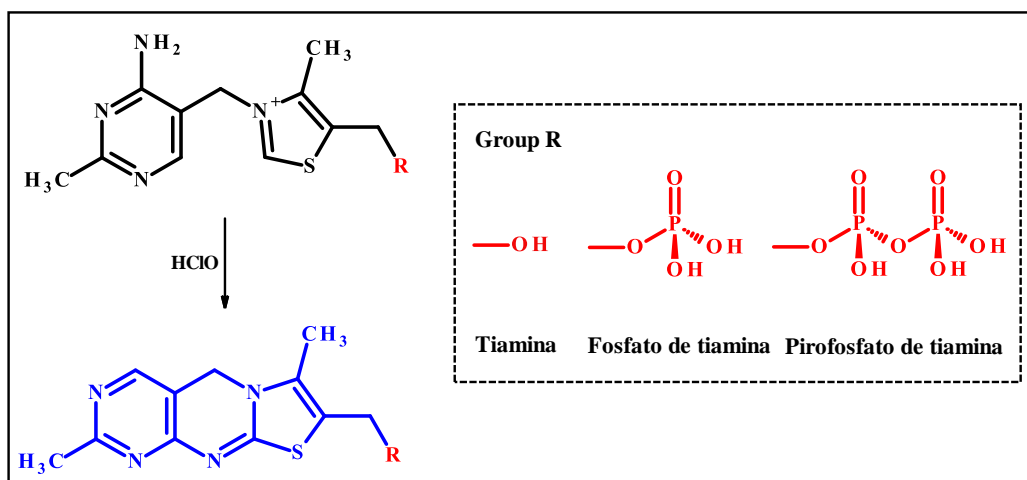
ZHU, B. et al. A highly specific and ultrasensitive fluorescent probe for monitoring hypochlorous acid and its applications in live cells. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 267, p. 589-596, 2018.

ZHU, J. et al. Enhanced spectrofluorimetric determination of hypochlorite based on the catalytic oxidation of thiamine to thiochrome in the presence of trace ferrocyanide. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 4, p. 5990–5994, 2014.

**APÊNDICE B**



Figura SB1 - Estrutura das tiaminas avaliadas para a otimização do método proposto



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Tabela SB1 – Parâmetros das curvas analíticas da avaliação da concentração final do tampão fosfato. Condições experimentais: Condições experimentais:  $C_{\text{Tiamina}} = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $C_{\text{HOCl}} = 15 \mu\text{mol L}^{-1}$ , ordem de adição: HOCl + AG + tiamina.

$C_{\text{Tampão}}$ $\text{mmol L}^{-1}$	Referência (uF)	Faixa Linear, $\mu\text{mol L}^{-1}$	$\%I_F = aC_{AG}(\mu\text{mol L}^{-1}) + b$		
			$a$	$B$	$r$
5	476	0,5 – 5	16,0 ( $\pm 0,7$ )	6,9 ( $\pm 2,0$ )	0,9924
10	429	0,5 – 5	15,8 ( $\pm 0,6$ )	1,9 ( $\pm 1,7$ )	0,9942
20	436	0,5 – 5	15,9 ( $\pm 0,8$ )	2,5 ( $\pm 2,0$ )	0,9914
30	389	0,5 – 5	17,7 ( $\pm 0,7$ )	0,15 ( $\pm 2,0$ )	0,9964
40	362	0,5 – 5	17,8 ( $\pm 0,6$ )	-2,5 ( $\pm 1,8$ )	0,9977

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Tabela SB2 – Avaliação da força iônica. Condições experimentais: Condições experimentais: Condições experimentais:  $C_{\text{Tiamina}} = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $C_{\text{HOCl}} = 15 \mu\text{mol L}^{-1}$ , ordem de adição: HOCl + AG + tiamina.

$C_{\text{final}}$ , $\text{mmol L}^{-1}$	Referência (uF)	Faixa linear, $\mu\text{mol L}^{-1}$	$\%I_F = aC_{AG}(\mu\text{mol L}^{-1}) + b$		
			$a$	$B$	$r$
0	361	0,5 – 4,0	16,3 ( $\pm 0,5$ )	-0,97 ( $\pm 1,2$ )	0,9986
100	214	0,5 – 3,0	11,6 ( $\pm 0,8$ )	2,6 ( $\pm 1,5$ )	0,9905
150	183	0,5 – 2,5	9,8 ( $\pm 0,8$ )	-0,63 ( $\pm 1,2$ )	0,9903
200	157	0,5 – 2,5	4,90 ( $\pm 0,3$ )	0,13 ( $\pm 0,4$ )	0,9966

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

**Tabela SB3 – Proporções dos reagentes.** Condições reacionais: tampão fosfato a 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH = 7,4) e tempo de reação = 30 min.

HOCl/T	Referência (uF)	Faixa linear, μmol L <sup>-1</sup>	%I <sub>F</sub> = aC <sub>AG</sub> (μmol L <sup>-1</sup> ) + b		
			a	b	r
0,25	88	0,5 – 1	53,1 (± 19,6)	5,6 (± 12,6)	0,9385
0,5	354	0,5 – 2	37,7 (± 3,3)	2,6 (± 3,8)	0,9925
1,0	419	0,5 – 4	20,8 (± 0,9)	0,32 (± 2,4)	0,9982
2,5	557	0,5 – 10	9,9 (± 0,7)	-4,0 (± 4,0)	0,9932

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

**Tabela SB4 – Múltiplos da proporção dos reagentes.** Condições reacionais: tampão fosfato a 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH = 7,4) e tempo de reação = 30 min.

Múltiplos	Referência (uF)	Faixa linear, μmol L <sup>-1</sup>	%I <sub>F</sub> = aC <sub>AG</sub> (μmol L <sup>-1</sup> ) + b		
			a	b	r
0,5	167	0,5 – 2,0	35,5 (± 1,8)	2,2 (± 2,2)	0,9976
1	357	0,5 – 3,0	30,2 (± 0,6)	0,14 (± 1,0)	0,9979
2	458	0,5 – 8,0	12,4 (± 0,7)	-1,2 (± 3,0)	0,9969
3	642	0,5 – 10,0	9,5 (± 0,4)	-1,0 (± 2,4)	0,9942
4	830	0,5 – 10,0	8,0 (± 0,4)	-1,3 (± 1,9)	0,9950

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

**Tabela SB5 – Parâmetros analíticos da avaliação da seletividade do método proposto frente a diferentes espécies reativas.** Condições reacionais C<sub>Tiamina</sub> = 12 μmol L<sup>-1</sup>, tampão fosfato a 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH = 7,4) e tempo de reação = 30 min.

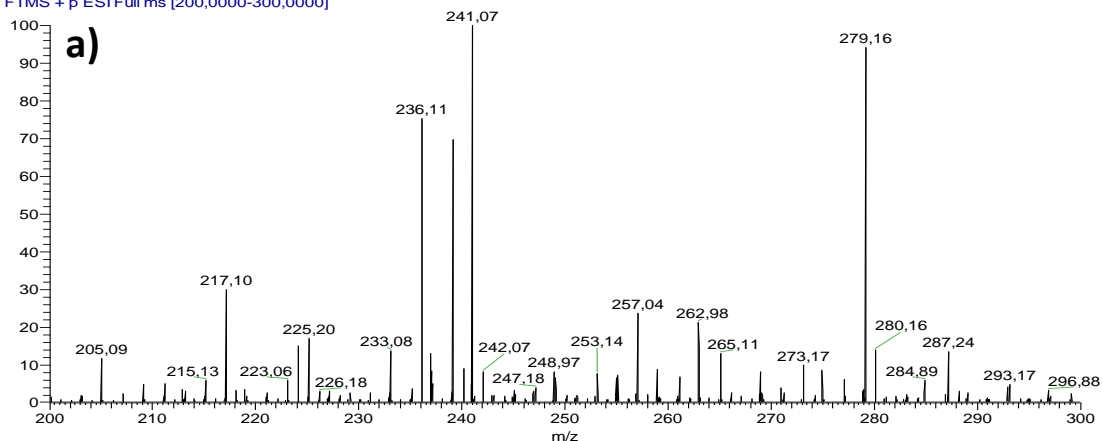
Espécie Reativa	Faixa Linear, μmol L <sup>-1</sup>	%I <sub>F</sub> = aC <sub>ER</sub> (μmol L <sup>-1</sup> ) + b		
		A	b	r
HOCl	0,5 – 3,0	23,4 (± 1,2)	30,3 (± 6,0)	0,9961
•NO	0,5 – 10,0	1,3 (± 0,2)	17,8 (± 0,6)	0,9711
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,5 – 20,0	1,8 (± 0,2)	16,0 (± 0,2)	0,9953
•OH	0,5 – 10,0	4,9 (± 0,2)	21,2 (± 0,2)	0,9983
t-BuOOH	0,5 – 10,0	0,6 (± 0,1)	16,8 (± 0,7)	0,9873
t-BuOO•	0,5 – 10,0	0,7 (± 0,05)	15,3 (± 0,3)	0,9918
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	0,5 – 20,0	0,5 (± 0,06)	15,2 (± 0,8)	0,9924
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	0,5 – 20,0	0,1 (± 0,05)	16,3 (± 0,1)	0,9958
ONOO <sup>-</sup>	0,5 – 20,0	0,3 (± 0,03)	21,0 (± 0,6)	0,9971

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

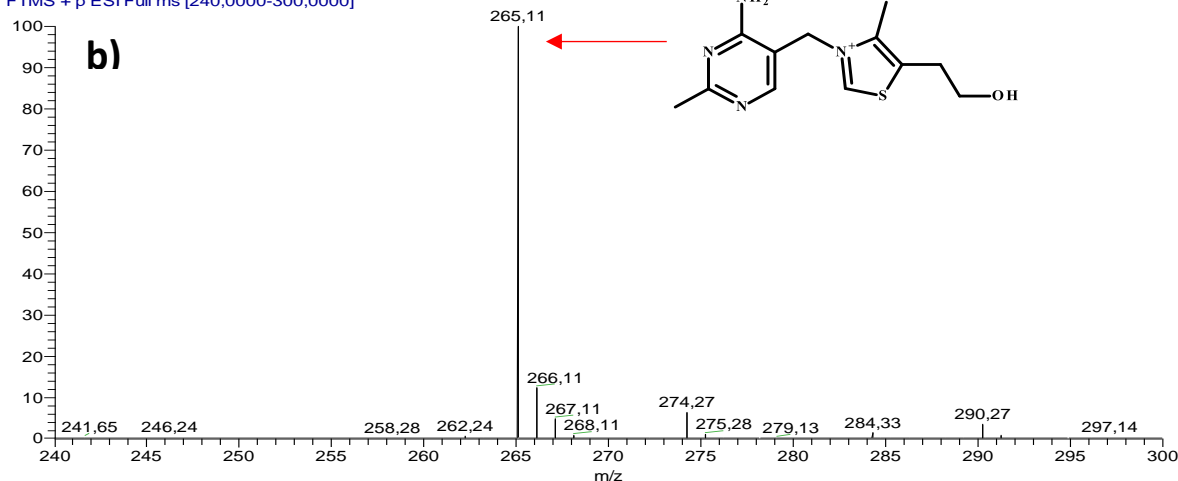
**Figura SB2 – Estudo do mecanismo de reação oxidação da tiamina com HOCl por espectrometria de massas (ESI+). Sendo: a) Referência; b) Tiamina; c) Fragmentação tiamina e d) Tiocromo.**  
 Condições experimentais:  $C_{\text{tiamina}} = 30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $C_{\text{HOCl}} = 30 \mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão fosfato (pH = 7,4)

(Continua...)

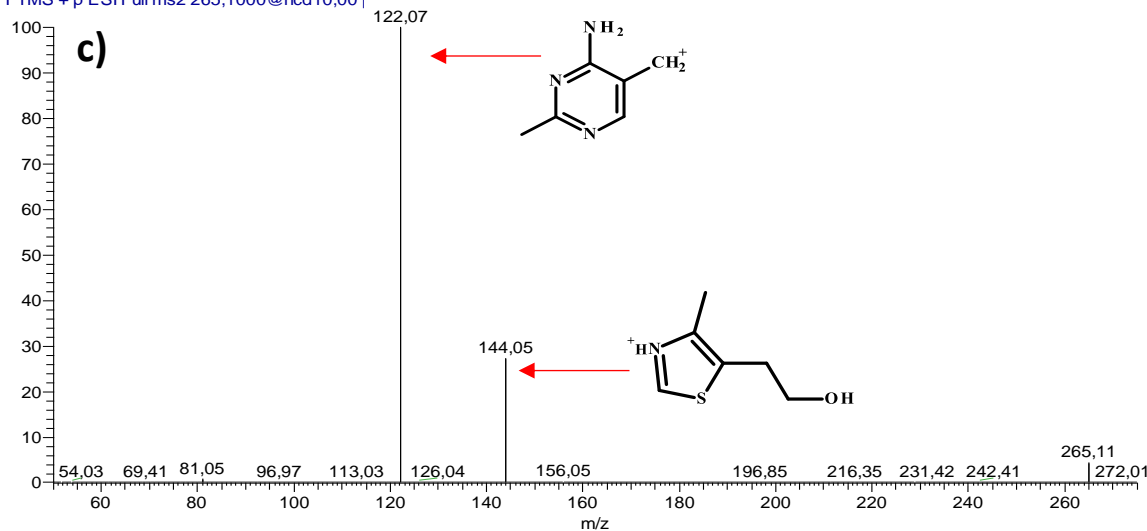
branco\_Agua\_pos\_200a300\_#1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 1,30E5  
 T: FTMS + p ESI Full ms [200,0000-300,0000]



Tiamina.HCl\_pos\_240a300\_#1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 5,95E8  
 T: FTMS + p ESI Full ms [240,0000-300,0000]



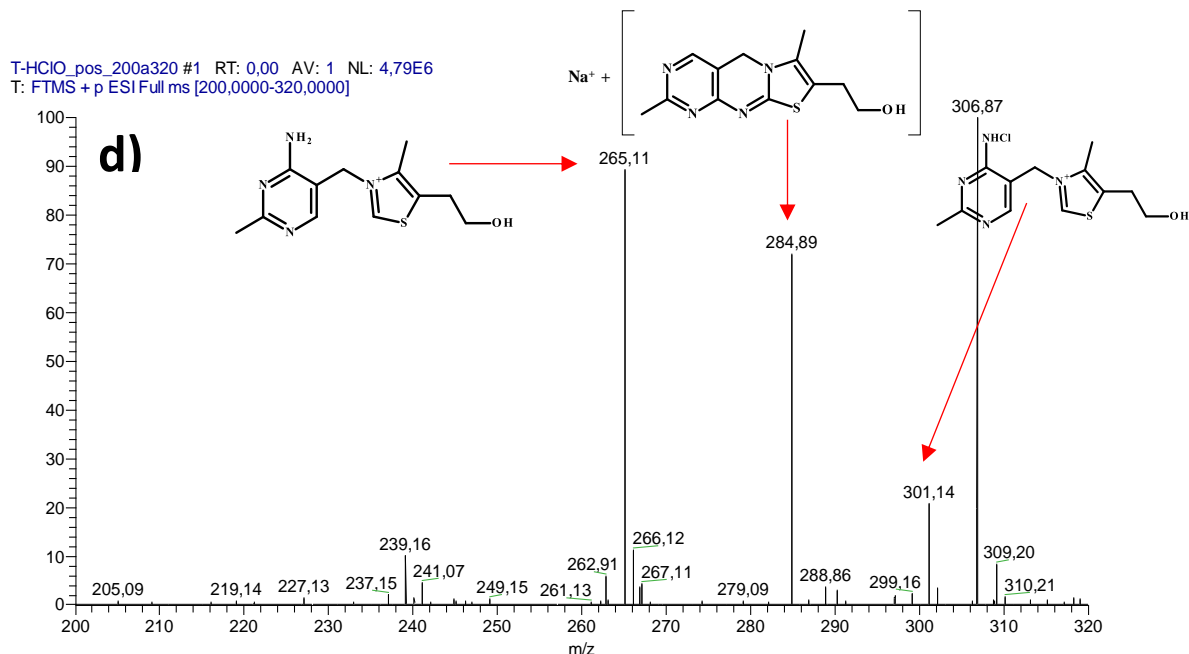
Fragmentacao\_tiamina\_pos\_265.111\_#1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 6,05E8  
 T: FTMS + p ESI Full ms2 265,1000@hcd10,00]



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

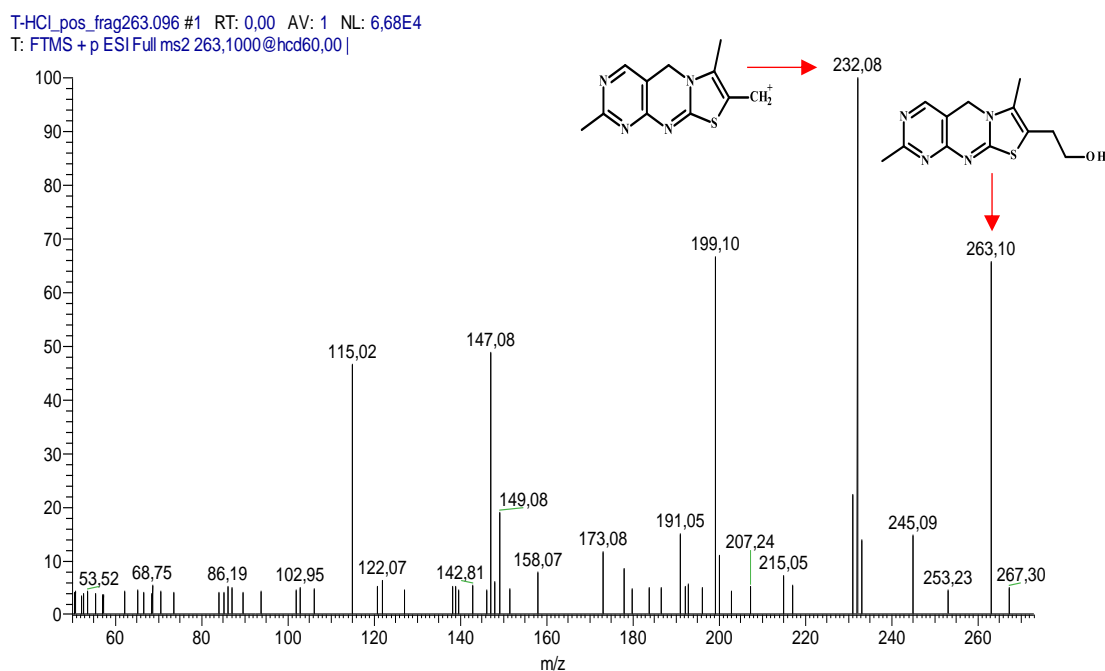
**Figura SB2 – Estudo do mecanismo de reação oxidação da tiamina com HOCl por espectrometria de massas (ESI+). Sendo: a) Referência; b) Tiamina; c) Fragmentação tiamina e d) Tiocromo.** Condições experimentais:  $C_{\text{tiamina}} = 30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $C_{\text{HOCl}} = 30 \mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão fosfato (pH = 7,4)

.....(Conclusão...)



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

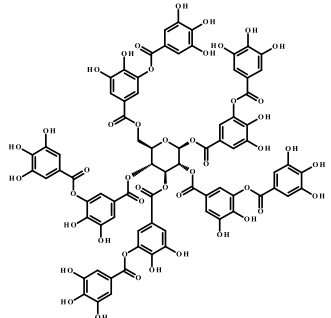
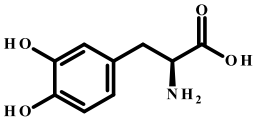
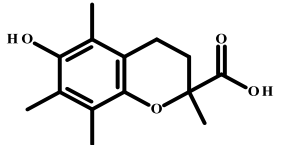
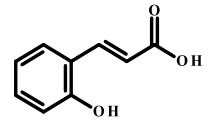
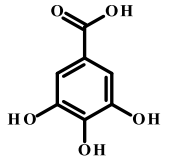
**Figura SB3 – Estudo da reação de referência: reação oxidação da tiamina com  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  por espectrometria de massas (ESI+).** Condições experimentais:  $C_{\text{tiamina}} = 5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $C_{\text{HOCl}} = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão carbonato (pH = 8,0)



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Tabela SB6 - Avaliação da capacidade de sequestro de HOCl de compostos antioxidantes, tiólicos e anti-inflamatórios pelo método proposto.

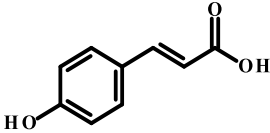
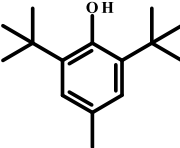
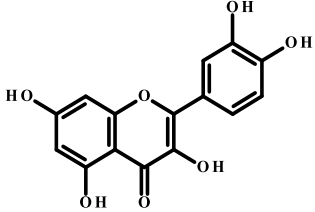
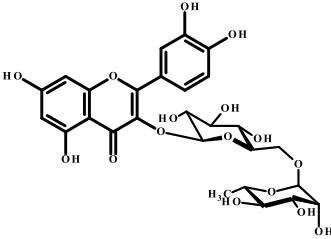
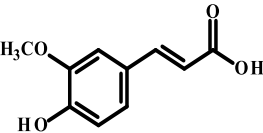
(Continua...)

Classe	Ordem/ Classe	Composto	Estrutura	Faixa Linear, $\mu\text{mol L}^{-1}$	Curva analítica $\%I = aC_{SC} + b$	r	EC <sub>50</sub> , $\mu\text{mol L}^{-1}$
Compostos fenólicos e antioxidantes	1	Ácido tânico		0,05 – 1,0	$\%I = 75,8 (\pm 4,9)C_{SC} - 1,2(\pm 3,3)$	0,9958	0,6 ( $\pm 0,01$ )
	2	L-Dopa		0,1 – 1,0	$\%I = 54,4 (\pm 3,9)C_{SC} + 1,5(\pm 2,4)$	0,9920	0,8 ( $\pm 0,01$ )
	3	Trolox®		0,05 – 1,0	$\%I = 45,5 (\pm 4,6)C_{SC} + 0,7(\pm 3,3)$	9,9948	1,1 ( $\pm 0,1$ )
	4	Ácido <i>o</i> -cumárico		0,5 – 2,5	$\%I = 18,7 (\pm 4,8)C_{SC} + 4,8(\pm 7,3)$	0,9908	2,3 ( $\pm 0,7$ )
	5	Ácido gálico		0,5 – 7,5	$\%I = 16,0 (\pm 0,8)C_{SC} - 3,0 (\pm 0,8)$	0,9988	3,3 ( $\pm 0,09$ )

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Tabela SB6 - Avaliação da capacidade de sequestro de HOCl de compostos antioxidantes, tiólicos e anti-inflamatórios pelo método proposto.

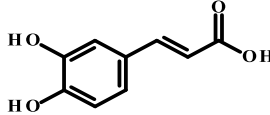
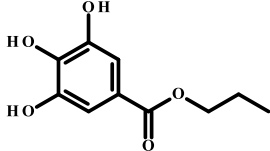
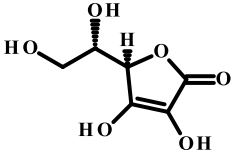
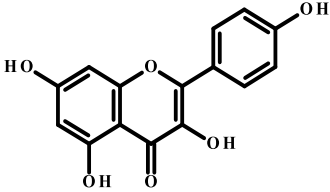
.....(Continuação...)

Classe	Ordem/ Classe	Composto	Estrutura	Faixa Linear, $\mu\text{mol L}^{-1}$	Curva analítica $\%I = aC_{\text{SC}} + b$	r	EC <sub>50</sub> , $\mu\text{mol L}^{-1}$
Compostos fenólicos e antioxidantes	6	Ácido <i>p</i> -cumárico		1,0 – 5,0	$\%I = 13,6 (\pm 1,6)C_{\text{SC}} + 2,3(\pm 5,2)$	0,9931	3,5 ( $\pm 0,7$ )
	7	BHT		0,1 – 5,0	$\%I = 11,2 (\pm 2,2)C_{\text{SC}} + 3,2(\pm 7,1)$	0,9813	4,1 ( $\pm 0,05$ )
	8	Quercetina		0,5 – 10	$\%I = 9,5(\pm 0,5)C_{\text{SC}} + 4,8 (\pm 1,8)$	0,9951	4,7 ( $\pm 0,07$ )
	9	Rutina		0,5 – 10	$\%I = 8,1(\pm 0,9)C_{\text{SC}} - 1,6(\pm 6,4)$	0,9964	6,4 ( $\pm 0,2$ )
	10	Ácido Ferílico		1 – 7,5	$\%I = 7,8 (\pm 0,7)C_{\text{SC}} + 1,9(\pm 3,2)$	0,9925	6,5 ( $\pm 0,5$ )

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Tabela SB6 - Avaliação da capacidade de sequestro de HOCl de compostos antioxidantes, tiólicos e anti-inflamatórios pelo método proposto.

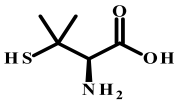
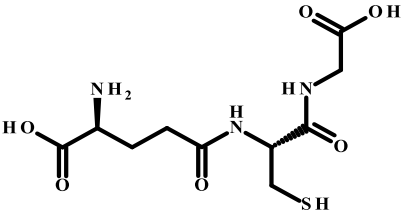
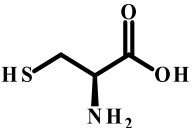
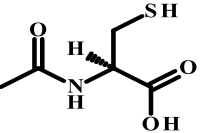
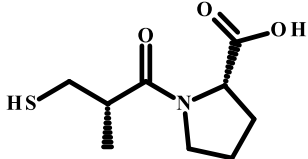
.....(Continuação...)

Classe	Ordem/ Classe	Composto	Estrutura	Faixa Linear, $\mu\text{mol L}^{-1}$	Curva analítica $\%I = aC_{\text{AO}} + b$	r	EC <sub>50</sub> , $\mu\text{mol L}^{-1}$
Compostos fenólicos e antioxidantes	11	Ácido cafeico		1 – 10	$\%I = 3,7 (\pm 0,3)C_{\text{SC}} + 0,2(\pm 2,4)$	0,9912	12,9 ( $\pm 0,9$ )
	12	N-propilgalato		0,5 – 30	$\%I = 3,3(\pm 0,3)C_{\text{SC}} - 2,1(\pm 5,5)$	0,9843	15,5 ( $\pm 5,5$ )
	13	Ácido ascórbico		0,5 – 20	$\%I = 1,8(\pm 0,1)C_{\text{SC}} + 3 (\pm 1,5)$	0,9906	25,2 ( $\pm 0,3$ )
	14	Kaempferol		10 – 50	$\%I = 1,4 (\pm 0,1)C_{\text{SC}} + 1,7(\pm 3,7)$	0,9958	33,8 ( $\pm 0,4$ )

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Tabela SB6 - Avaliação da capacidade de sequestro de HOCl de compostos antioxidantes, tiólicos e anti-inflamatórios pelo método proposto.

.....(Continuação...)

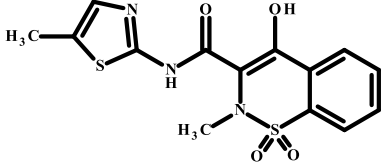
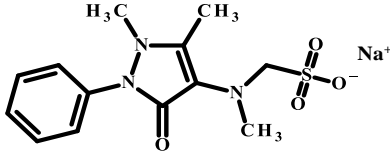
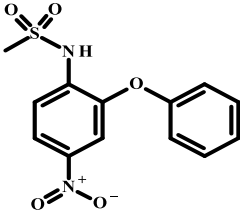
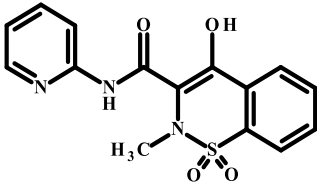
Classe	Ordem/ Classe	Composto	Estrutura	Faixa Linear, $\mu\text{mol L}^{-1}$	Curva analítica $\%I = aC_{SC} + b$	r	EC <sub>50</sub> , $\mu\text{mol L}^{-1}$
Compostos tiólicos	1	Penicilamina		0,05 – 2,5	$\%I = 37,2 (\pm 1,4)C_{SC} + 1,6(\pm 1,5)$	0,9970	1,3 ( $\pm 0,01$ )
	2	Glutationa		0,5 – 7,5	$\%I = 11,6 (\pm 0,2)C_{SC} + 1,3(\pm 0,9)$	0,9994	4,1 ( $\pm 0,07$ )
	3	Cisteína		1 – 10	$\%I = 8,1 (\pm 0,3)C_{SC} + 0,5(\pm 1,8)$	0,9968	6,1 ( $\pm 0,07$ )
	4	N-Acetilcisteína		1 – 10	$\%I = 7,9(\pm 0,4)C_{SC} + 0,61(\pm 2,5)$	0,9986	6,4 ( $\pm 0,3$ )
	5	Captopril		0,5 – 30	$\%I = 3,1 (\pm 0,1)C_{SC} - 1,2(\pm 1,4)$	0,9984	16,5 ( $\pm 0,2$ )

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.



Tabela SB6 - Avaliação da capacidade de sequestro de HOCl de compostos antioxidantes, tiólicos e anti-inflamatórios pelo método proposto.

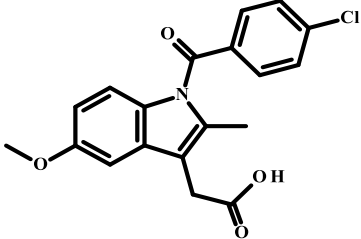
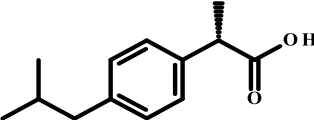
.....(Continuação...)

Classe	Ordem/ Classe	Composto	Estrutura	Faixa Linear, $\mu\text{mol L}^{-1}$	Curva analítica $\%I = aC_{SC} + b$	r	EC <sub>50</sub> , $\mu\text{mol L}^{-1}$
Anti-inflamatório	1	Meloxicam		0,005 – 0,02	$\%I = 3583(\pm 1252)C_{SC} + 7,2(\pm 16)$	0,9828	0,01 ( $\pm 0,001$ )
	2	Dipirona		0,5 – 5,0	$\%I = 12,3(\pm 1,6)C_{SC} - 0,25(\pm 4,5)$	0,9863	4,1 ( $\pm 0,2$ )
	3	Nimesulida		0,5 – 7,5	$\%I = 4,8(\pm 0,4)C_{SC} + 2,4(\pm 1,5)$	0,9915	10,9 ( $\pm 0,1$ )
	4	Piroxicam		1 – 20	$\%I = 3,9(\pm 0,09)C_{SC} + 1,0(\pm 1,0)$	0,9994	11,8 ( $\pm 0,6$ )

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Tabela SB6 - Avaliação da capacidade de sequestro de HOCl de compostos antioxidantes, tiólicos e anti-inflamatórios pelo método proposto.

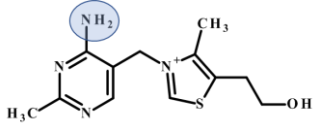
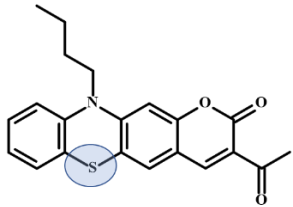
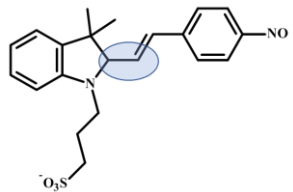
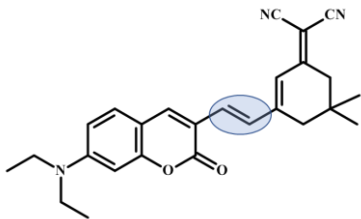
.....(Conclusão...)

Classe	Ordem/ Classe	Composto	Estrutura	Faixa Linear, $\mu\text{mol L}^{-1}$	Curva analítica $\%I = Ac_{SC} + b$	r	EC <sub>50</sub> , $\mu\text{mol L}^{-1}$
Anti-inflamatório	5	Indometacina		1 - 20	$\%I = 1,3(\pm 0,06)C_{SC} - 2,8(\pm 1,2)$	0,9987	40,9 ( $\pm 2,5$ )
	6	Ibuprofeno		1,0 - 100	$\%I = 0,2(\pm 0,01)C_{SC} + 0,8(\pm 0,6)$	0,9928	244,4 ( $\pm 20,4$ )

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Tabela SB 7 – Parâmetros químicos e analíticos das sondas seletivas a HOCl desenvolvidas nos últimos três anos.

(Continua...)

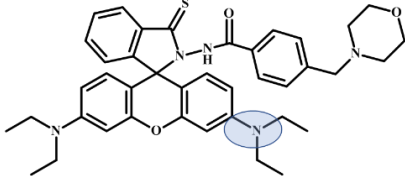
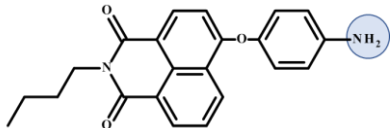
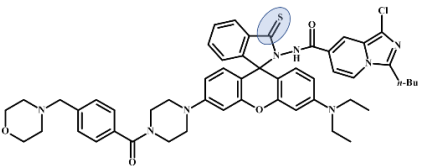
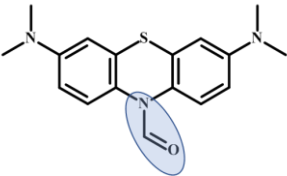
Sondas (regiões reativas a HOCl)	Dados espectroscópicos	Parâmetros experimentais	Aplicação / Observações	LD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	LQ* ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Faixa linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	EROs seletiva	Referência
	Sonda fluorescente tipo OFF-ON, $\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$	Tampão fosfato pH 7,4	Capacidade de sequestro de HOCl	0,15	0,5	0,5 – 3,0	HOCl	Este trabalho
	Sonda fluorescente raciométrica OFF- ON; $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em1}} = 535 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em2}} = 670 \text{ nm}$	Tampão fosfato pH 7,4	*Imageamento em cultura de células (HeLa) e em Zebra Fish	0,025	100	100 – 275	HOCl	LI et al., 2020
	Sonda fluorescente tipo ON-OFF, $\lambda_{\text{ex}} = 520 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 567 \text{ nm}$	Tampão fosfato / etanol (1:1 v/v) pH 7,4	Imageamento em cultura celular (Eca109)	0,11	1,0	1,0 – 5,0	$\text{ClO}^-$	MA et al., 2019
	Sonda fluorescente raciométrica OFF- ON; $\lambda_{\text{ex1}} = 420 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{ex2}} = 530 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em1}} = 585 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em2}}$ $= 685 \text{ nm}$	Tampão fosfato / DMSO (1:1 v/v) pH 7,4	*Imageamento em cultura de células (HpG-2) e em camundongos vivos. * Sonda colorimétrica e fluorimétrica para detecção de $\text{ClO}^-$ ;	0,17	2,0	2,0 – 14,0	$\text{ClO}^-$	HUANG et al., 2019

\*LD extrapolado a partir dos dados das curvas analíticas apresentadas nos trabalhos

Fonte: Elaborado pelo autor 2021.

Tabela SB 7 – Parâmetros químicos e analíticos das sondas seletivas a HOCl desenvolvidas nos últimos três anos.

.....(Continuação...)

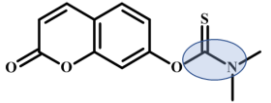
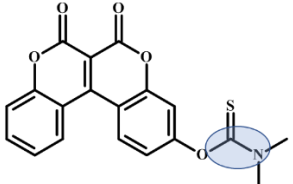
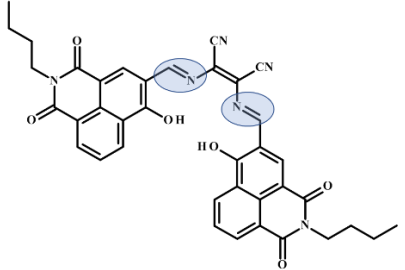
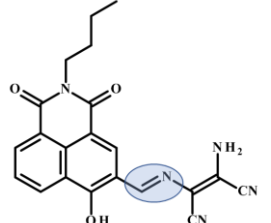
Sondas (regiões reativas a HOCl)	Dados espectroscópicos	Parâmetros experimentais	Aplicação / Observações	LD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	LQ* ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Faixa linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	EROs seletiva	Referência
	Sonda fluorescente tipo OFF-ON, $\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 592 \text{ nm}$	Fosfato / Etanol (1:99 v/v) pH 5,0	* Imageamento em cultura celular (RL1) * Sonda colorimétrica e fluorimétrica para detecção de HOCl	0,003	0,05	0,05-2,0	HOCl	SHEN et al., 2019
	Sonda fluorescente tipo OFF-ON, $\lambda_{\text{ex}} = 468 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 557 \text{ nm}$	Fosfato pH 7,4	Imageamento em cultura celular (RAW264.7) e em Zebrafish.	0,001	0,05	0,05 – 1,0	HOCl	JIA et al., 2019
	Sonda fluorescente raciométrica (OFF-ON) $\lambda_{\text{ex}1} = 370 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}1} = 462 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}2} = 589 \text{ nm}$	Fosfato / Etanol (7:3 v/v) pH 6,0	Imageamento em cultura celular (RAW264.7)	0,01	0,25	0,25 – 3,0	HOCl	SHEN et al., 2019
	Sonda fluorescente tipo OFF-ON, $\lambda_{\text{ex}} = 620 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 686 \text{ nm}$	Fosfato pH 7,2	* Imageamento em cultura celular (RAW 264.7); * Imageamento de modelos ratos de artrite	0,003	0,2	0,2 – 1,0	HOCl	WEI et al., 2018

\*LD extrapolado a partir dos dados das curvas analíticas apresentadas nos trabalhos

Fonte: Elaborado pelo autor 2021.

Tabela SB 7 – Parâmetros químicos e analíticos das sondas seletivas a HOCl desenvolvidas nos últimos três anos.

.....(Continuação...)

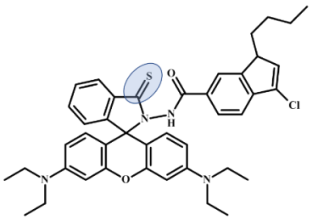
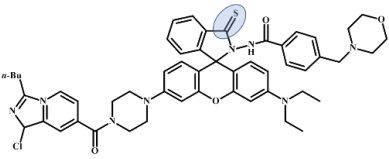
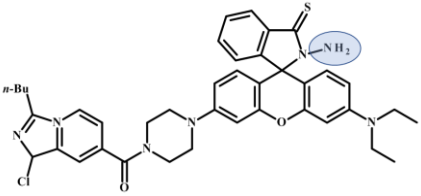
Sondas (regiões reativas a HOCl)	Dados espectroscópicos	Parâmetros experimentais	Aplicação / Observações	LD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	LQ* ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Faixa linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	EROs seletiva	Referência
	Sonda fluorescente tipo OFF-ON, $\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 455 \text{ nm}$	Fosfato pH 7,4	Imageamento em cultura celular (RAW 264.7)	$1,7 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5} -$ $17,5 \cdot 10^{-5}$	HOCl	ZHU et al., 2018
	Sonda fluorescente tipo OFF-ON, $\lambda_{\text{ex}} = 460 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 540 \text{ nm}$	Fosfato pH 7,4	Imageamento em cultura celular (RAW 264.7)	$2,7 \cdot 10^{-5}$	$5,0 \cdot 10^{-4}$	$5,0 \cdot 10^{-4} -$ $3,0 \cdot 10^{-3}$	HOCl	ZHU et al., 2018
	Sonda fluorescente raciométrica $\lambda_{\text{ex}1} = 415 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}1} = 445 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{ex}2} = 585 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}2} = 640 \text{ nm}$	Fosfato / Acetonitrila (1:1 v/v) pH 7,4	Imageamento em cultura celular (HepG2)	0,026	25,0	25 – 104	$\text{ClO}^-$	ZANG et al, 2018
	Sonda fluorescente tipo OFF-ON, $\lambda_{\text{ex}} = 415 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$	Fosfato / Acetonitrila (1:1 v/v) pH 7,4	Imageamento em cultura celular (HepG2)	0,12	10,0	10,0 – 35,0	$\text{ClO}^-$	

\*LD extrapolado a partir dos dados das curvas analíticas apresentadas nos trabalhos

Fonte: Elaborado pelo autor 2021.

Tabela SB 7 – Parâmetros químicos e analíticos das sondas seletivas a HOCl desenvolvidas nos últimos três anos.

.....(Continuação...)

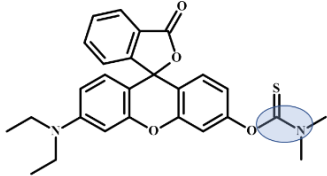
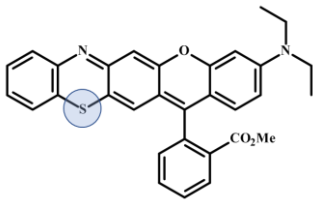
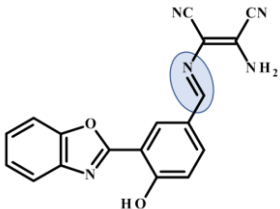
Sondas (regiões reativas a HOCl)	Dados espectroscópicos	Parâmetros experimentais	Aplicação / Observações	LD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	LQ* ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Faixa linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	EROs seletiva	Referência
	Sonda fluorescente raciométrica (OFF- ON) $\lambda_{\text{ex1}} = 400 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em1}} = 462 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em2}} = 587 \text{ nm}$	Fosfato / Acetonitrila (1:1 v/v) pH 7,4	Imageamento em cultura celular (RAW264.7)	2,08	1,0	1,0 – 10,0	HOCl	SONG et al., 2018
	Sonda fluorescente raciométrica (OFF- ON/OFF-ON) (FRET intramolecular) $\lambda_{\text{ex1}} = 370 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em1}} = 463 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{ex2}} = 463 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em2}} = 588 \text{ nm}$	Fosfato / Etanol (7:3 v/v) pH 5,0	Imageamento em cultura celular (RAW264.7)	0,027	0,5	0,5 – 3,0	HOCl	SHEN et al., 2018
	Sonda fluorescente raciométrica (OFF- ON/OFF-ON) (FRET intramolecular) $\lambda_{\text{ex1}} = 370 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em1}} = 465 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{ex2}} = 465 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em2}} = 585 \text{ nm}$	Fosfato / Etanol (7:3 v/v) pH 6,0	Imageamento em cultura celular (RAW264.7)	0,024	0,5	0,5 – 4,0	HOCl	SHEN et al., 2018

\*LD extrapolado a partir dos dados das curvas analíticas apresentadas nos trabalhos

Fonte: Elaborado pelo autor 2021.

Tabela SB 7 – Parâmetros químicos e analíticos das sondas seletivas a HOCl desenvolvidas nos últimos três anos.

.....(Conclusão)

Sondas (regiões reativas a HOCl)	Dados espectroscópicos	Parâmetros experimentais	Aplicação / Observações	LD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	LQ* ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Faixa linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	EROs seletiva	Referência
	Sonda fluorescente tipo OFF-ON, $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 550 \text{ nm}$	Fosfato pH 7,4	Imageamento em cultura celular (RAW 264.7)	0,3	1,0	1,0 – 10,0	HOCl	ZHU et al., 2018
	Sonda fluorescente raciométrica (ON- OFF/OFF-ON) intramolecular) $\lambda_{\text{ex1}} = 600 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em1}} = 730 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{ex2}} = 500 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em2}} = 594 \text{ nm}$	Água / Etanol (1:1 v/v)	Imageamento em cultura celular (L929; RAW264,7)	0,002	–	–	HOCl	LIU et al., 2019
	Sonda fluorescente tipo OFF-ON, $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 435 \text{ nm}$	Fosfato / Dimetilformamida (8:2 v/v) pH 7,4	Imageamento em cultura celular (RAW264.7)	0,08	0,5	0,5 – 14,0	HOCl	CHEN et al., 2018

\*LD extrapolado a partir dos dados das curvas analíticas apresentadas nos trabalhos.

Fonte: Elaborado pelo autor 2021.

#### 4 CONCLUSÃO GERAL

Considerando as principais questões levantadas neste trabalho, pode-se inferir que:

*Trabalho 1: “Os compostos fenólicos extraídos durante o processo de maturação das bebidas agregam a cachaça características antioxidantes? Há uma proporcionalidade entre o tempo de maturação e a capacidade antioxidante de cachaças envelhecidas? A reutilização dos barris para o envelhecimento de novas bebidas produz perdas significativas quanto ao perfil antioxidante? Qual a influência do tempo e da madeira neste processo quanto as propriedades antioxidantes da cachaça?”*

De forma geral, a capacidade antioxidante das cachaças maturadas foi proporcional ao tempo de envelhecimento. Todas as correlações entre os resultados foram positivas. Neste processo, o perfil antioxidante das cachaças variou de acordo com o tipo de madeira utilizada.

A reutilização dos barris causou uma diminuição média de 50% da capacidade antioxidante das cachaças envelhecidas. Contudo, as bebidas envelhecidas com menor capacidade antioxidante mantiveram as suas propriedades entre os ciclos de utilização dos barris. A natureza dos compostos antioxidantes extraídos mostrou-se como um parâmetro importante. Quando avaliadas em concentrações equivalentes de compostos fenólicos, bebidas que até então não foram eficientes entre os métodos empregados passaram a se destacar. Diante disto, pode-se observar a importância da avaliação da capacidade antioxidante como parâmetro de qualidade da cachaça envelhecida, permitindo o aperfeiçoamento da bebida e a elaboração de uma maior variedade de produtos.



Trabalho 2: “A inibição da oxidação da tiamina a tiocromo pode ser utilizado princípio de um método para avaliação da capacidade sequestradora de HOCl frente a compostos antioxidantes, tiólicos e anti-inflamatórios em condições fisiológicas simuladas? A tiamina irá apresentar seletividade ao HOCl comparada a espécies reativas de oxigênio e nitrogênio? A tiamina pode ser utilizada como uma sonda fluorimétrica para determinação do HOCl em meio celular?”

De acordo com os resultados obtidos, a tiamina mostrou-se uma sonda sensível e seletiva a ácido hipocloroso em condições fisiológicas simuladas e celulares. Assim, possibilitou o desenvolvimento de um método espectrofluorimétrico simples, rápido, e sensível para determinação da capacidade de sequestro ( $C_{sc}$ ) de HOCl *in vitro*. Nas condições otimizadas a metodologia permitiu a análise competitiva entre a sonda e os compostos analisados. Neste estudo, foram analisados 25 compostos de diferentes classes.

Por fim, a tiamina mostrou-se promissora como sonda para avaliação da capacidade sequestrado de HOCl em neutrófilos humanos, sendo seletiva a espécie reativa em meio celular, sendo possível avaliar oito substâncias e compará-las com os resultados obtidos pelo método otimizado *in vitro* na condição não celular. No entanto, o tempo (2h) e a concentração do estimulante celular (PMA,  $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) para detecção de HOCl são limitantes para aplicação da metodologia desenvolvida.