

UFAL

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

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM AMOSTRAS DE BEBIDAS E
PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS

WOODLAND DE SOUZA OLIVEIRA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins

57072-970 - Maceió - AL

WOODLAND DE SOUZA OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
PARA AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM
AMOSTRAS DE BEBIDAS E PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS**

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de pós-graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas
Santos

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

O48d Oliveira, Woodland de Souza.
Desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos para avaliação da capacidade antioxidante em amostras de bebidas e própolis vermelha de Alagoas / Oliveira, Woodland de Souza Oliveira. – 2016.
119 f.: il.

Orientador

: José Carinhonha Caldas Santos.

Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Própolis vermelha – Capacidade antioxidante. 2. Estresse oxidativo. 3. Tiamina. 4. Bebidas – Capacidade antioxidante. I. Título.

CDU: 543.645.9



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



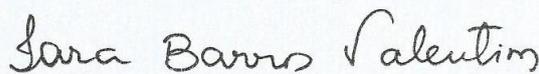
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone/Fax: (82) 3214-1144
email: ppgqb.ufal@gmail.com

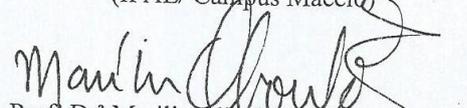
FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da comissão julgadora da defesa de dissertação de mestrado de Woodland de Souza Oliveira, intitulada: “Desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos para avaliação da capacidade antioxidante em amostras de bebidas e própolis vermelha de Alagoas”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 18 de março de 2016, às 14h, na Sala de reuniões do IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA


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


Iara Barros Valentin
(IFAL/ Campus Maceió)


Prof. Drª Marília Oliveira Fonseca Goulart
(PPGQB/IQB/UFAL)

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.

À minha linda esposa, Tamires Oliveira de Melo, por todo o amor, apoio, incentivo, companheirismo e compreensão. À ela também agradeço por ter me dado os maiores presentes da minha vida, os meus filhos Lavínia e Vinícius.

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

Aos meus filhos que me trazem tanta felicidade e me ensinaram o verdadeiro valor da vida.

Aos meus amigos da Universidade e do LINQA, pelo apoio, pelas experiências, pelas trocas de conhecimento e companheirismo no decorrer dos anos de curso.

Ao professor Josué Carinhanha 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.

A professora Êurica Adélia Nogueira Ribeiro e ao mestrando José Clementino Neto pela colaboração no trabalho de avaliação da capacidade antioxidante da própolis vermelha de Alagoas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas – FAPEAL 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 determinação da capacidade antioxidante (C_{AO}) é uma demanda atual em áreas estratégicas como qualidade de alimentos, planejamento de fármacos e avaliação de substâncias biologicamente ativas. Desta forma, este trabalho tem como objetivos o desenvolvimento de um método para determinação da C_{AO} em amostras de bebidas baseado na inibição da formação do tiocromo ($\lambda_{exc} = 370 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 440 \text{ nm}$), produto da oxidação da tiamina pelo $K_3Fe(CN)_6$ (HCF), e avaliar o perfil antioxidante do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha de Alagoas (EHAPV). Para o desenvolvimento do método da tiamina empregou-se o ácido gálico (AG) como referência e o percentual de inibição ($\%I_F$) como resposta analítica. O primeiro parâmetro avaliado foi a ordem de adição dos reagentes. Quando a ordem avaliada foi: AG + HCF + tiamina ocorreu redução linear do sinal em função da concentração de AG. O estudo cinético mostrou que a reação se estabilizava a partir de 10 min. O pH do meio foi otimizado a partir de cinco sistemas tampão: fosfato (pH 6,5 a 8,0), Tris (pH 7,0 a 8,5), borato (8,0 a 10), carbonato (8,0 a 11) e Britton-Robinson (9,0 a 12). Os melhores resultados foram obtidos com tampão carbonato (TC) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 8,0 e fosfato (TF) 10 mmol L^{-1} . Avaliou-se a influência da força iônica em TF, obtendo os melhores resultados com a adição de NaCl a 100 mmol L^{-1} . A razão $[HCF]/[tiamina]$ foi avaliada e verificou-se que o valor ótimo da relação foi de 15 vezes. Nas condições otimizadas em TC o método apresentou LOD (3σ) = $0,008 \text{ mg L}^{-1}$ e LOQ (10σ) = $0,025 \text{ mg L}^{-1}$, RSD $\leq 3,4\%$ correspondente a curva $\%I_F = 218,4 (\pm 6,2)C_{AO} + 2,06 (\pm 0,96)$ ($r = 0,9984$); em TF obteve-se LOD (3σ) = $0,002 \text{ mg L}^{-1}$ e LOQ (10σ) = $0,006 \text{ mg L}^{-1}$, RSD $\leq 7,1\%$ correspondente a curva $\%I_F = 1435 (\pm 95)C_{AO} + 1,60 (\pm 1,35)$ ($r = 0,9894$). O método proposto, em TC, foi aplicado à determinação da C_{AO} em diferentes amostras, como: chás e infusões ($n = 7$), vinhos tintos ($n = 3$) e brancos ($n = 3$). Os resultados obtidos foram comparados com os métodos de Folin-Ciocalteu (FC), ABTS e DPPH. As correlações entre os resultados obtidos para os diferentes métodos indicam maior coerência para FC e ABTS com o método proposto. Aplicando ANOVA não foi observada diferença significativa entre os resultados obtidos para os métodos com 95% de confiança. O método proposto mostrou-se rápido, sensível e simples para determinação da C_{AO} em bebidas, e os resultados foram concordantes com métodos já estabelecidos. Posteriormente avaliou-se a C_{AO} do EHAPV empregando os métodos FC, ABTS, DPPH, capacidade de sequestrar $\bullet NO$, capacidade de complexar Fe(II) e FRAP. Estudos preliminares feitos em HPLC identificaram 14 compostos fenólicos no EHAPV. Com base neste resultado foram selecionados a quercetina (Q) e ácido cafeico (AC), além do trolox (TR) como padrões. Para FC foram obtidos os seguintes resultados: 110,6 (QU), 63,1 (AC), 494,4 (TR) em mg g^{-1} EHAPV. De acordo com os resultados do ABTS observou-se que o EC_{50} : $QC < AC < TR < EHAPV$ e para o DPPH EC_{50} : $QC < AC < EHAPV < TR$. O EHAPV apresentou redução de $\sim 74\%$ do $\bullet NO$ gerado no meio. O extrato foi capaz de reduzir Fe(III), no entanto, em menor proporção que os padrões. O EHAPV não complexou Fe(II) eficientemente. Os resultados indicam o EHAPV tem uma elevada C_{AO} , podendo ser aplicado na prevenção de doenças decorrentes do estresse oxidativo.

Palavras-chave: Capacidade antioxidante. Tiamina. Própolis vermelha. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

The determination of antioxidant capacity (C_{AO}) is a recent demand in strategic areas such as food quality control, drug development and evaluation of biologically active substances. In this way, this work aims to develop an analytical method for C_{AO} determination in drinks samples based on the inhibition of the thiochrome ($\lambda_{exc} = 370 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 440 \text{ nm}$), the product of thiamine oxidation by $K_3Fe(CN)_6$ (HCF), and the evaluation of the antioxidant profile of the hydroalcoholic extract of red propolis from Alagoas (HAERP). For the thiamine method development, gallic acid (GA) was employed as the reference and the inhibition percentage ($\%I_F$) as an analytical response. The first parameter evaluated was the order of reagent addition. When the GA+HCF+ thiamine order was evaluated, there was a linear reduction of the signal dependent on the GA concentration. Kinetic assay showed that the reaction was stable at 10 min. Medium pH was optimized by the evaluation of five buffer solutions: phosphate (pH 6.5-8.0), Tris (pH7.0-8.5), Carbonate (pH 8.0-11.0), borate (8.0-10) and Britton-Robinson (pH 9.0-12.0). Better results were obtained with carbonate buffer (CB) 0.1 mol L^{-1} at pH 8 and phosphate buffer (PB) 0.01 mol L^{-1} at pH 7.4. The ionic strength influence was evaluated in PB, with better results with NaCl at 0.1 mol L^{-1} . The [HCF/thiamine] ratio was investigated and the best ratio was determined as 15. For the optimized conditions employing CB, the method showed LOD (3σ) = 0.008 mg L^{-1} , RSD $\leq 3.4\%$ correspondent to the curve $\%I_F = 218(\pm 6)C_{AO} + 2.06 (\pm 0.96)$ ($r = 0.9984$); PB showed LOD (3σ) = 0.002 mg L^{-1} , RSD $\leq 7.1\%$ correspondent to the curve $\%I_F = 1435(\pm 95)C_{AO} + 1.60(\pm 1,35)$ ($r = 0.9894$). The proposed method, using CB, was employed for C_{AO} determination in different samples: teas and infusions ($n=7$) and wines ($n=6$). The obtained results were compared with the Folin-Ciocalteu (FC), ABTS $^{\bullet+}$ and DPPH $^{\bullet}$ methods. The correlation among the results for different methods indicates a greater consistence for FC and ABTS $^{\bullet+}$ with the proposed method. Applying ANOVA, it was not observed significant difference among the obtained results for the methods at 95% confidence interval. The proposed method can be described as a fast, sensible and simple method for determination of C_{AO} in beverages, and the results agreed with the established methods. Then, the HAERP C_{AO} was evaluated utilizing FC, ABTS $^{\bullet+}$ and DPPH $^{\bullet}$ methods, $^{\bullet}NO$ sequestration capacity, Fe(II) complexation capacity and FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). Preliminary studies such as liquid chromatography identified 14 phenolic compounds in the HAERP. Based on this result, quercetin (QC), caffeic acid (CA) and Trolox (TR) were selected as references. For FC, the following results were obtained: 110.6 (QC), 63.1 (CA), 494.4(TR) in mg g^{-1} HAERP. According to the ABTS $^{\bullet+}$ results, it was observed that EC_{50} (mg mL^{-1}): $QC < CA < TR < HAERP$ and for DPPH $^{\bullet}$ EC_{50} (mg mL^{-1}): $QC < CA < HAERP < TR$. The HAERP showed reduction of $\sim 74\%$ of $^{\bullet}NO$ generated in the medium. The extract was able to reduce Fe(III), however, in a minor proportion than the references. The HAERP was not able to complex Fe(II) efficiently. Results indicate that HAERP has a great C_{AO} , and may be applied in the prevention of oxidative stress related diseases.

Keywords: Antioxidant capacity. Thiamine. Red propolis. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|--------------------|---|----|
| Figura 1.1 | – Esquema geral da peroxidação lipídica..... | 21 |
| Figura 1.2 | – Perfil do número de trabalhos e citações em relação as palavras chave empregadas na pesquisa na base de dados do Web of Science..... | 25 |
| Figura 1.3 | – Princípios das metodologias analíticas para determinação da capacidade antioxidante..... | 27 |
| Figura 1.4 | – Reação entre o radical DPPH• e o composto antioxidante genérico..... | 28 |
| Figura 1.5 | – Reação geral para o ensaio FRAP..... | 30 |
| Figura 1.6 | – Reação genérica e forma oxidada e reduzida do ABTS..... | 31 |
| Figura 1.7 | – Princípio da metodologia empregada para determinar a capacidade de sequestro do NO•..... | 33 |
| Figura 3.1 | – Reação de oxidação da tiamina a tiocromo..... | 51 |
| Figura 3.2 | – Princípio da metodologia proposta para determinação da capacidade antioxidante de amostras de bebida a partir da oxidação da tiamina a tiocromo pelo hexacianoferrato(III)..... | 55 |
| Figura 3.3 | – Espectros de emissão relativos à avaliação da influência da proporção do oxidante na inibição da oxidação de tiamina pelo $K_3Fe(CN)_6$ | 56 |
| Figura 3.4 | – Avaliação da ordem de adição dos reagentes..... | 57 |
| Figura 3.5 | – Avaliação da cinética reacional empregando AG como composto antioxidante modelo..... | 58 |
| Figura 3.6 | – Avaliação da relação entre o sinal analítico e concentração de AG como composto antioxidante..... | 59 |
| Figura 3.7 | – Avaliação da influência do pH e do sistema tampão..... | 61 |
| Figura 3.8 | – Mecanismo proposto para interação entre a tiamina e o ácido bórico..... | 62 |
| Figura 3.9 | – Avaliação da proporção molar $K_3Fe(CN)_6$ / tiamina..... | 65 |
| Figura 3.10 | – Gráfico box plot para os resultados obtidos pelos diferentes métodos..... | 73 |
| Figura 3.11 | – Análise de correlação (para um intervalo de 95% de confiança) entre o método proposto nas condições ótimas e os métodos avaliados..... | 74 |
| Figura 3.12 | – Avaliação da capacidade de formação do tiocromo a partir de diferentes complexos de Fe(III)..... | 76 |
| Figura 3.13 | – Estruturas das tiaminas e respectivo tiocromo dos derivados da tiamina avaliadas..... | 77 |
| Figura 3.14 | – Avaliação da metodologia proposta empregando diferentes tiaminas..... | 78 |

| | |
|---|----|
| Figura 4.1 – Abelha da espécie <i>Apis melífera</i> coletando o exsudato do caule da espécie <i>Dalbergia ecastophyllum</i> (L) Taud. (Leguminosae)..... | 86 |
| Figura 4.2 – Cromatograma do EHAPV a 1 mg mL^{-1} | 89 |
| Figura 4.3 – Curvas analíticas dos padrões para determinação de fenólicos totais..... | 91 |
| Figura 4.4 – Percentual de inibição do $\bullet\text{NO}$ pelos padrões e do EHAPV a $400 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ | 94 |
| Figura 4.5 – Curvas analíticas dos padrões e do extrato para determinação da capacidade de redução de íons Fe(III) | 95 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1.1 – Espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) e suas características..... | 20 |
| Tabela 3.1 – Parâmetros das curvas analíticas em AG em função variação da concentração do tampão carbonato e fosfato..... | 63 |
| Tabela 3.2 – Avaliação dos múltiplos da proporção $K_3Fe(CN)_6$ / tiamina. Condições reacionais: tampão carbonato 0,1 mol L ⁻¹ (pH = 8,0)..... | 65 |
| Tabela 3.3 – Parâmetros das curvas analíticas em função variação da concentração de NaCl..... | 66 |
| Tabela 3.4 – Curvas analíticas em AG nas condições otimizadas do método proposto..... | 67 |
| Tabela 3.5 – Reatividade e parâmetros analíticos de diferentes compostos antioxidantes e redutores frente ao método proposto..... | 69 |
| Tabela 3.6 – Determinação da capacidade antioxidante (expressos em mg L ⁻¹ de ácido gálico) em bebidas empregando o método proposto, DPPH, ABTS e de Folin-Ciocalteu..... | 73 |
| Tabela 4.1 – Curvas analíticas dos padrões e do extrato para determinação da capacidade de sequestro de ABTS ^{•+} e DPPH [•] | 93 |
| Tabela 4.2 – Curvas analíticas dos padrões e do extrato para determinação da capacidade de complexação de íons Fe(II)..... | 97 |
| Tabela 4.3 – Perfil fitoquímico e avaliação da capacidade antioxidante de EHAPV de Alagoas..... | 99 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|---|
| AA | Ácido ascórbico |
| A _B | Sinal de absorvância do branco da amostra |
| ABTS | Ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) |
| AC | Ácido cafeico |
| AG | Ácido gálico |
| AIDS | Síndrome da imunodeficiência adquirida |
| ANOVA | Análise de Variância |
| A _{ref} | Sinal de absorvância do branco |
| α -T | α -Tocoferol |
| AT | Ácido tânico |
| BHA | Hidroxianisol de butila |
| BHT | Hidroxitolueno de butila |
| C | Concentração |
| C _{AO} | Concentração do composto com capacidade antioxidante |
| C _{AG} | Concentração de ácido gálico |
| CUPRAC | Poder antioxidante da redução do cobre |
| DMPD | <i>N,N</i> -dimetil- <i>p</i> -fenilenodiamina |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picril-hidrazil |
| EC ₅₀ | Concentração mínima necessária para inibição de 50% do radical ou da sonda em solução |
| EHAPV | Extrato hidroalcolico da própolis vermelha de Alagoas |
| Eq. | Equivalentes |
| ERN | Espécies reativas de nitrogênio |
| ERO | Espécies reativas de oxigênio |
| FC | Folin-Ciocalteau |
| FRAP | Poder antioxidante da redução do ferro |
| FT | Fenólicos totais |
| HCA | Composto antioxidante genérico |
| HAB | Ácido bórico |
| HCF | Hexacianoferrato(III) |
| HIV | Vírus da imunodeficiência humana |

| | |
|------------------------|--|
| HPP | Composto polifenólico |
| IAM | Infarto agudo do miocárdio |
| %I | Percentual de inibição |
| %I _F | Percentual de inibição de fluorescência |
| λ_{max} | Comprimento de onda de máxima absorção |
| λ_{em} | Comprimento de onda de máxima emissão |
| λ_{ex} | Comprimento de excitação |
| LOD | Limite de detecção |
| LOQ | Limite de quantificação |
| •NO | Óxido nítrico |
| ORAC | Capacidade de absorção de radicais de oxigênio |
| PG | Propilgalato |
| Q | Quercetina |
| RO• | Radical alcoxila |
| ROO• | Radical peroxila |
| T | Tiamina |
| TBHQ | Terc-butil-hidroquinona |
| TC | Solução tampão carbonato |
| TF | Solução tampão fosfato |
| TPTZ | 2,4,6-tripiridil-s-triazina |
| TR | Trolox |
| TRAP | Parâmetro antioxidante para a captura total de radical |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO GERAL | 18 |
| 1.1 | Reações de formação de espécies reativas | 19 |
| 1.2 | Atividade antioxidante | 22 |
| 1.3 | Métodos analíticos para a determinação da capacidade antioxidante | 24 |
| 1.3.1 | Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH [•])..... | 27 |
| 1.3.2 | Fenólicos totais pelo reagente de Folin-Ciocalteu (FC)..... | 28 |
| 1.3.3 | Ensaio de poder antioxidante por redução do ferro (FRAP) | 29 |
| 1.3.4 | Ensaio do azul da Prússia..... | 30 |
| 1.3.5 | Ensaio de capacidade antioxidante equivalentes ao Trolox (TEAC ou ABTS ^{•+})..... | 31 |
| 1.3.6 | Sequestro do radical óxido nítrico ([•] NO)..... | 32 |
| 1.4 | Justificativa e objetivo geral do estudo proposto | 33 |
| | REFERÊNCIAS | 35 |
| 2 | EXPERIMENTAL | 39 |
| 2.1 | Preparo das soluções | 39 |
| 2.1.1 | Padrões utilizados..... | 39 |
| 2.1.2 | Amostras..... | 39 |
| 2.1.3 | Desenvolvimento e otimização do método da tiamina (Seção 3)..... | 40 |
| 2.1.4 | Métodos empregados para avaliação da capacidade antioxidantes..... | 41 |
| 2.2 | Equipamentos utilizados | 42 |
| 2.3 | Procedimentos | 43 |
| 2.3.1 | Método da tiamina (Seção 3)..... | 43 |
| 2.3.2 | Avaliação da capacidade antioxidante das amostras analisadas..... | 43 |

| | | |
|----------|---|----|
| 2.3.2.1 | Método de Folin–Ciocalteu (compostos fenólicos totais)..... | 43 |
| 2.3.2.2 | Ensaio do sequestro do radical DPPH* | 44 |
| 2.3.2.3 | Ensaio do sequestro do radical ABTS*+ | 44 |
| 2.3.2.4 | Ensaio do sequestro do radical *NO..... | 44 |
| 2.3.2.5 | Ensaio de redução de Fe(III) | 45 |
| 2.3.2.6 | Ensaio de capacidade de complexação de Fe(II) | 45 |
| 2.3.3 | Preparo das amostras analisadas..... | 45 |
| 2.3.3.1 | Amostras de vinhos, chás e infusões (Seção 3)..... | 45 |
| 2.3.3.2 | Amostra da própolis vermelha do estado de Alagoas (Seção 4)..... | 46 |
| 2.4 | Tratamento estatístico dos dados | 46 |
| 2.4.1 | Validação do método da tiamina (Seção 3)..... | 46 |
| 2.4.2 | Capacidade antioxidante do extrato da própolis vermelha de Alagoas..... | 47 |
| | REFERÊNCIAS | 48 |
| 3 | DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM AMOSTRAS DE BEBIDAS EMPREGANDO TIOCROMO COMO SONDA FLUOROGÊNICA EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS | 49 |
| 3.1 | Introdução | 49 |
| 3.2 | Objetivos específicos | 52 |
| 3.3 | Resultado e discussão | 53 |
| 3.3.1 | Avaliação da ordem de adição dos reagentes..... | 57 |
| 3.3.2 | Avaliação da cinética reacional e linearidade do método..... | 58 |
| 3.3.3 | Avaliação do pH e do sistema tampão do meio reacional..... | 60 |
| 3.3.4 | Avaliação da concentração final da solução tampão..... | 62 |
| 3.3.5 | Avaliação da proporção $K_3Fe(CN)_6$ / tiamina..... | 64 |
| 3.3.6 | Avaliação da influência da força iônica no meio reacional..... | 66 |
| 3.3.7 | Figuras de mérito do método proposto..... | 67 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 3.3.8 | Avaliação do método frente a outros compostos antioxidantes e redutores..... | 68 |
| 3.3.9 | Determinação da capacidade antioxidante em bebidas..... | 70 |
| 3.3.10 | Avaliação da capacidade de formação do tiocromo a partir de complexos de Fe(III) | 75 |
| 3.3.11 | Avaliação da metodologia proposta empregando diferentes tipos de tiamina..... | 77 |
| 3.4 | Conclusões | 79 |
| 3.5 | Perspectivas | 80 |
| | REFERÊNCIAS | 81 |
| 4 | AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS | 85 |
| 4.1 | Introdução | 85 |
| 4.2 | Objetivos específicos | 88 |
| 4.3 | Resultados e discussão | 89 |
| 4.3.1 | Seleção dos padrões antioxidantes: aspectos preliminares..... | 89 |
| 4.3.2 | Avaliação da capacidade antioxidante do EHAPV..... | 90 |
| 4.3.2.1 | Fenólicos totais..... | 90 |
| 4.3.2.2 | Capacidade de sequestro dos radicais ABTS ^{•+} e DPPH [•] | 92 |
| 4.3.2.3 | Capacidade de sequestro do radical óxido nítrico ([•] NO)..... | 94 |
| 4.3.2.4 | Capacidade de redução de íons Fe(III) | 95 |
| 4.3.2.5 | Capacidade de complexação de íons Fe(II)..... | 96 |
| 4.4 | Correlação entre os resultados obtidos e os apresentados na literatura | 97 |
| 4.5 | Conclusão | 102 |
| 4.6 | Perspectivas | 102 |
| | REFERÊNCIAS | 104 |

| | | |
|---|--------------------------------|-----|
| 5 | CONCLUSÃO GERAL..... | 108 |
| | REFERÊNCIAS GERAIS..... | 109 |

1 INTRODUÇÃO GERAL

A transferência de elétrons através das reações de óxido-redução é essencial para os organismos vivos, pois a partir deste processo as células obtêm energia para desenvolver as suas funções biológicas (NELSON; COX, 2011). O transporte de elétrons contribui para a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) que possuem uma grande importância biológica, como no processo de fagocitose, no qual estas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor (VASCONCELOS et al., 2007). Fatores exógenos como a poluição, o hábito de fumar ou ingerir álcool e a nutrição inadequada contribuem para o aumento da concentração de radicais no organismo (NÚNEZ-SELLES, 2005). Em excesso, essas espécies causam danos oxidativos às células, gerando produtos de glicação avançada, inativando proteínas (e enzimas) e atacando lipídios de membrana, carboidratos e o DNA (BIANCHI; ANTUNES, 1999; HUSAIN; CILLARD; CILLARD, 1987; GLISZCZYNSKA-SWIGŁO, 2006).

Para evitar os danos causados pelos radicais, o organismo produz compostos antioxidantes. Porém, estes, não são normalmente suficientes para combatê-los, tendo em vista fatores externos, como: más condições ambientais (poluição do ar, da água e do solo) e hábitos de vida inadequados, os quais têm sido determinantes para o aumento da incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, que ocorre quando os mecanismos de defesa antioxidante e a concentração de espécies reativas se encontram em desequilíbrio (OLIVEIRA, et al., 2009; NÚNEZ-SELLES, 2005). O estresse oxidativo tem sido relacionado ao envelhecimento e a uma série de processos patológicos como a indução do câncer e a propagação da AIDS em pacientes soropositivos (HIV+), bem como, na fisiopatologia de muitas doenças crônicas, entre elas, doenças auto-imunes, cardiopatias e doenças do pulmão (BARREIROS et al., 2006; VASCONCELOS et al, 2007).

Em função do desequilíbrio redox causado pelo excesso de radicais em decorrência dos fatores apresentados, faz-se necessária a ingestão de substâncias capazes de controlar a concentração das espécies reativas no organismo. Os alimentos são as principais fontes de compostos antioxidantes. Estudos mostram a relação inversa entre o consumo de alimentos ricos em antioxidantes como as vitaminas C, E e A, carotenóides e compostos fenólicos e incidência de danos relacionados ao estresse oxidativo como o envelhecimento, as doenças cardiovasculares, câncer, e inflamações (HUANG et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2009; PEREIRA et al., 2009).

Devido a todos os benefícios apresentados, há a necessidade da identificação e da classificação de alimentos, bebidas e fármacos que tenham atividade antioxidante para o suprimento nutricional adequado, evitando assim, as doenças ligadas aos danos oxidativos. A composição dos alimentos é bastante complexa, separar cada composto antioxidante é caro e impreciso, por isso, se faz necessária à disposição de métodos de quantificação de capacidade antioxidante total. No entanto, ainda não existe um método padronizado e confiável para medir a capacidade antioxidante de alimentos e amostras biológicas (HUANG et al., 2005).

1.1 Reações de formação de espécies reativas

Radicais são átomos ou moléculas que contém elétrons desemparelhados em sua camada de valência. Essas espécies são altamente reativas, assim possuem um tempo de meia vida muito curto. A sua alta reatividade deve-se ao desemparelhamento de elétrons em sua última camada, fazendo com que o radical reaja rapidamente, oxidando ou reduzindo outras espécies (HALLIWELL et al., 1995). Em sistemas biológicos, os radicais de maior incidência são: ERRO, ERN, radicais derivados de tióis (RS^{\bullet}), espécies reativas de cloro, espécies reativas de carbono e complexos de metais de transição (principalmente Fe, Cu, Mn e Cr) (OLIVEIRA et al., 2009).

As mitocôndrias são as principais fontes de espécies reativas em organismos aeróbios por serem responsáveis pela respiração celular (fosforilação oxidativa). Estudos têm mostrado que mutações ocorridas no genoma mitocondrial alteram o metabolismo nas mitocôndrias reduzindo a produção de ATP (trifosfato de adenosina) predispondo as células ao envelhecimento e a doenças (SILVA; FERRARI, 2011). Segundo Shami e Moreira (2004), além das mitocôndrias, os radicais também são gerados no citoplasma e na membrana mitocondrial, sendo seu alvo celular relacionado ao sítio de formação.

Em baixas concentrações, os radicais são fundamentais para a produção de energia, para a fagocitose, a regulação do crescimento celular, a sinalização intercelular e a síntese de substâncias biológicas importantes (BARREIROS et al., 2006). A Tabela 1.1, mostra as principais ERO e ERN.

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

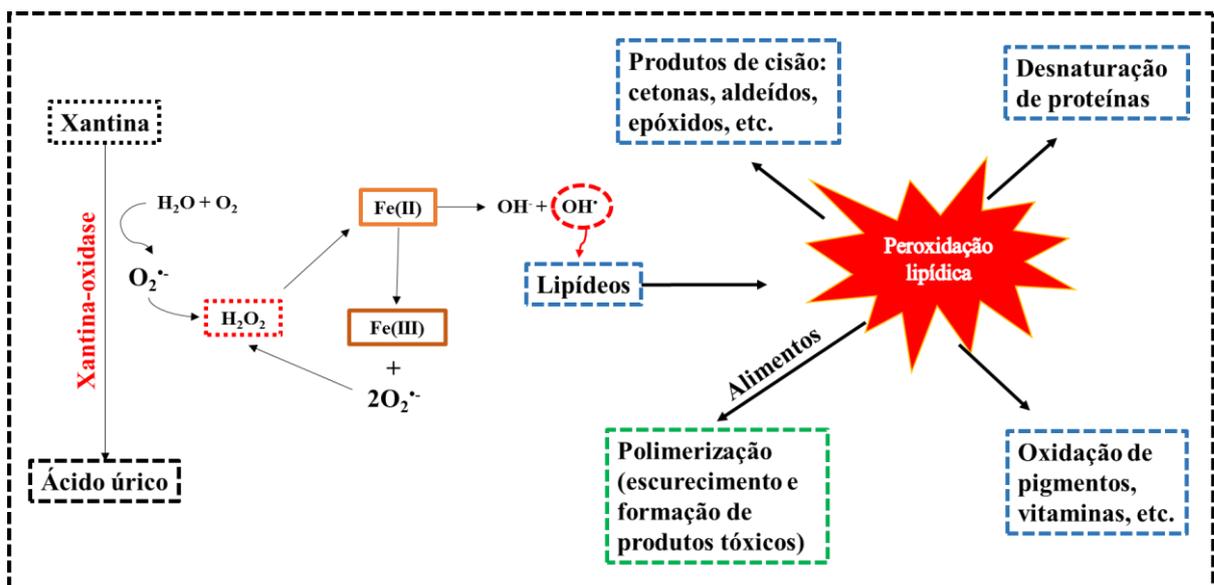
| Espécie reativa | Formação | Tempo de meia vida | Comentários |
|---|--|--|---|
| Radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) | Enzimática a partir da xantina/ NADPH oxidase e, adicionalmente, pela redução monoelétrica do O_2 molecular. | $\sim 5 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$ (pH 7,0) | Em fagócitos, é um dos microbicidas mais importantes, capaz de inativar proteínas ferro-sulfurosas das bactérias. |
| Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) | Via enzimas como peróxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase e peroxidases ligadas a tioredoxina. | 10^{-9} 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} . |
| Radical hidroxila (HO^{\bullet}) | Gerado a partir do $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 na presença de metais (ferro e cobre). Também pode ser gerado pela reação entre $O_2^{\bullet-}$, $^{\bullet}NO$ e $HClO$, nesta ordem. | 10^{-9} s | Radical mais deletério para as células, tendo como consequência dano ou morte celular, quando gerado no meio biológico. |
| Radical alcoxila (RO^{\bullet}) | Gerado como intermediário da peroxidação lipídica. | 10^{-6} s | Possui efeitos nocivos a saúde e está associado à deterioração de alimentos. |
| Radical peroxila (ROO^{\bullet}) | Formado a partir de hidroperóxidos gerados a em função da peroxidação lipídica. | 7 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. |
| Oxigênio singlete (1O_2) | Não possui sítio metabólico definido. | 4 - 6 μs | Gerado em processos de terapia fotodinâmica. |
| Ácido hipocloroso ($HClO$) | O $HClO$ é formado a partir da reação do H_2O_2 com o Cl^- 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. |
| Oxido nítrico ($^{\bullet}NO$) | Gerado pela ação das enzimas óxido nítrico sintases (<i>NOS</i>), 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. |

Fonte: Elaborado pelo autor (2016) – Adaptado de BABIOR, 2000; BARREIROS, et al., 2006; HALLIWELL, CROSS, 1994; HALLIWELL, et al., 2000; HUANG, et al., 2012; MAGALHÃES, et al., 2008 RIBEIRO et al., 2005; RONSEIN, et al., 2006; VASCONCELOS, et al., 2007; FRANÇA, et al., 2013; GARCIA, 2010.

Quando em excesso, causam danos às células, atacando (macro)moléculas tais como açúcares $(\text{CHOH})_n$, ácidos nucleicos, lipídios e proteínas. Os danos celulares causados pelas espécies reativas são diretamente relacionados a doenças degenerativas, tais como as cardiopatias, aterosclerose e problemas pulmonares. Além disso, existem danos causados ao DNA, que são determinantes nos processos de mutagênese e carcinogênese (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

O efeito nocivo dos radicais sobre as células tem sido relacionado a vários tipos de doenças, agindo como agente causador e/ou agravador. Esses efeitos também afetam as plantas e alimentos através da peroxidação lipídica de compostos graxos. Outras espécies, como íons metálicos bivalentes $(\text{Cu(II)}, \text{Fe(II)}, \text{Pb(II)} \text{ e } \text{Cd(II)})$ e trivalentes $(\text{Bi(III)}, \text{Al(III)} \text{ e } \text{Fe(III)})$ que se ligam fortemente aos grupos fosfato dos fosfolipídios aumentam o grau de peroxidabilidade em sistemas biológicos e em alimentos (OLIVEIRA et al., 2009).

Figura 1.1 – Esquema geral da peroxidação lipídica.



Fonte: Elaborado pelo autor (2016) – Adaptado de SILVA et al., 1999; RIBEIRO et al.2005.

As reações químicas resultantes da ação das espécies reativas de oxigênio (EROs) afetam os alimentos tornando-os impróprios para o consumo devido à alteração de sabores e o desenvolvimento de odores indesejáveis através da peroxidação lipídica. A Figura 1.1 apresenta as principais etapas associadas à formação e ação de EROs. A cascata de reações (bio)químicas causada pelas espécies reativas afeta não somente a qualidade nutricional dos alimentos, através da degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, mas também, a segurança do consumidor devido à formação de produtos potencialmente tóxicos (RAMALHO,

JORGE, 2005). Este fato tem impulsionado a pesquisa de novos métodos de avaliação da atividade antioxidante de diversos compostos, que inibem os danos oxidativos causados pelos radicais em sistemas biológicos e na conservação de alimentos (DAVID et al., 2010).

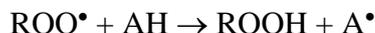
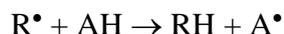
1.2 Atividade Antioxidante

O estresse oxidativo causado pelos radicais no organismo tem despertado grande interesse na comunidade científica. O excesso de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) é combatido por antioxidantes naturais do corpo ou absorvidos na alimentação (BARREIROS et al., 2006). Os antioxidantes produzidos pelo corpo possuem majoritariamente natureza enzimática. Enzimas como a glutationaperoxidase, catalase e superóxido dismutase são exemplos de enzimas com atividade antioxidante. Outras espécies que atuam como cofatores de enzimas antioxidantes, enzimas oxidativas e agentes quelantes atuam como inibidores oxidativos. Compostos de selênio, por exemplo, agem como cofatores da glutationaperoxidase, atuando indiretamente na potencialização da capacidade antioxidante do corpo (BARREIROS et al., 2006; HUANG et al., 2005).

Segundo Halliwell e colaboradores (1995) os 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*. No organismo, quanto maior for a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) maior é a necessidade de produção de compostos antioxidantes e/ou ingestão de alimentos com potencial antioxidante. Os antioxidantes atuam de forma específica nas células, visto que espécies que inibem a oxidação de biomoléculas em um determinado meio podem perder a capacidade antioxidante em outro, ou até agravar os danos oxidativos (HALLIWELL et al., 1995).

De acordo com Jorge e Luzia (2010), os compostos antioxidantes podem ser classificados como primários e secundários. Os antioxidantes primários atuam por meio da doação de elétrons e/ou átomos de hidrogênio às espécies radicalares, convertendo-os em espécies termodinamicamente estáveis, ou reagir com $R\cdot$ e $ROO\cdot$ formando complexo lipídio-antioxidante que posteriormente reagem com outro radical formando espécies inativas para a reação em cadeia e um radical relativamente estável ($A\cdot$) procedente do antioxidante (AH).

Estas etapas são ilustradas a seguir:



Os antioxidantes secundários retardam a autooxidação através da complexação de metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos (para formar espécie não radical), absorção da luz UV e desativação de oxigênio singlete (LUZIA; JORGE, 2010).

Os compostos com atividade antioxidante podem ter origem natural ou sintética. Os antioxidantes sintéticos mais importantes utilizados em alimentos são: butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propilgalato (PG), todos compostos fenólicos (RAMALHO; JORGE, 2006). Os alimentos são as principais fontes de compostos antioxidantes naturais. Entre os compostos antioxidantes naturais destacam-se os compostos fenólicos (destacando-se flavonoides e ácidos fenólicos), carotenóides e as vitaminas A, C e D contidos em frutas, verduras e hortaliças (OLIVEIRA et al., 2009; PEREIRA et al., 2009).

Os flavonoides atuam como agentes quelantes de íons metálicos e sequestrantes de radicais. A quercetina, por exemplo, inibe a formação de ERO nas etapas de iniciação, na formação de radicais hidroxila e na peroxidação lipídica. Isso ocorre devido à interação dessa espécie com os íons superóxidos ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radicais hidroxila (OH^{\bullet}) (inibindo a formação por quelar íons de ferro) e radicais peroxil dos lipídios (BEHLING et al., 2004).

Segundo Behling e colaboradores (2004) a quercetina é o principal flavonoide presente na dieta humana. Essas classes de compostos fenólicos possuem alto potencial antioxidante, anticarcinogênico, proteção aos sistemas renal e cardiovascular. As principais fontes de flavonoides são provenientes do cacau, chá preto, cerveja e vinho, dentre outros.

Os ácidos fenólicos têm sido amplamente pesquisados devido à sua influência na qualidade dos alimentos e às suas propriedades fitoquímicas (BORGES et al., 2010). Os compostos fenólicos podem ser encontrados como moléculas simples ou com alto grau de polimerização. Nos vegetais, encontram-se ligados a açúcares e proteínas, ou como moléculas livres (SOARES et al., 2002).

A presença de ácidos fenólicos está relacionada de forma direta e indireta na qualidade de bebidas. A cor, corpo e adstringência do vinho são atribuídos à presença dessas espécies. Os ácidos fenólicos nas uvas encontram-se na forma de ésteres. No processo de fabricação e

conservação do vinho hidrolisam-se lentamente, desta forma, no vinho encontram-se esses compostos livres ou combinados (CABRITA et al., 2003). O ácido tânico (AT) é um tanino hidrossolúvel encontrado em vinhos tintos e também em lentilhas, uvas, chocolate, cerveja, café, chá preto e verde, dentre outros. Pesquisas têm demonstrado a atuação do AT como antioxidante, anticarcinogênico, agente antimicrobiano e antimutagênico. *In vivo*, o ácido tânico pode quelar íons de Cu e Fe agindo como agente inibidor da formação de H₂O₂ e do radical hidroxil (MATTOS, 2009).

O ácido 3,4,5-triidroxibenzóico, mais conhecido como ácido gálico (AG) é um dos compostos fenólicos mais pesquisados devido ao seu potencial na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica, servindo como fonte para o desenvolvimento de corantes e tintas. Naturalmente, ele é encontrado em frutas, chás, vinhos vermelhos e plantas medicinais, tendo propriedades anticancerígenas, antimutagênicas, antifúngicas, antibacterianas, antivirais e antiinflamatórias (EGER, 2010).

O AG tem sido empregado como padrão no desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação da concentração de fenólicos totais e de capacidade antioxidante em bebidas e alimentos. A utilização do ácido gálico em métodos analíticos deve-se ao fato dele ser uma unidade formadora de galotaninos encontrados em alimentos e bebidas e por suas características de cinética reacional (apresenta rápida velocidade de reação, em geral).

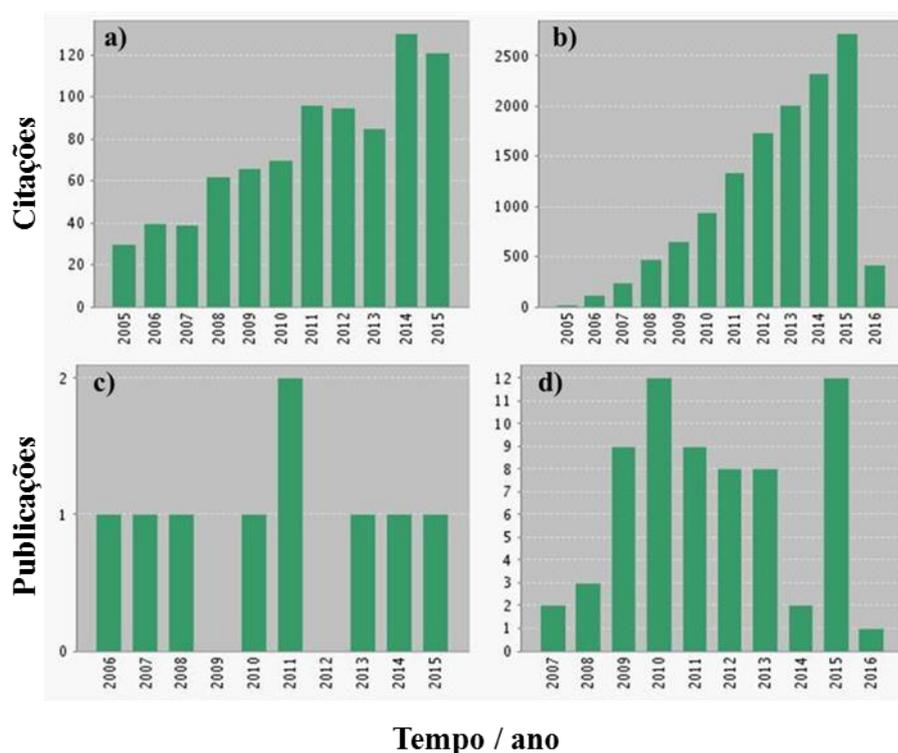
1.3 Métodos analíticos para a determinação da capacidade antioxidante

A correlação entre o consumo de antioxidantes e a prevenção de doenças decorrentes do estresse oxidativo tem despertado o interesse do público em geral (HUANG et al., 2005). Neste sentido, foi realizado um levantamento dos trabalhos que têm como foco o estudo de métodos para determinação da capacidade antioxidante (do inglês: *methods for determination of antioxidant capacity*) (Fig. 1.2a e 1.2b) e o desenvolvimento de novas metodologias (Fig. 1.2c e 1.2d) nos últimos dez anos no *Web of Science*. Para esta última pesquisa, levou-se em consideração a quantidade de trabalhos que possuíam em seus títulos a palavra-chave “novo método” (do inglês: *new method*) aplicados para determinação de C_{AO} (do inglês: *antioxidant capacity*).

Os dados apresentados na Figura 1.2 refletem o elevado interesse da comunidade científica em torno da aplicação de metodologias para a avaliação da capacidade antioxidante em diversos tipos de amostra. Neste sentido, nos últimos dez anos pode-se observar que o número de publicações, e citações têm aumentando gradativamente, chegando a 834

publicações e 12.994 citações (Fig. 1.2a e 1.2b, respectivamente). No entanto, o número de trabalhos publicados buscando o desenvolvimento de novas metodologias, é muito pequeno, em média um trabalho por ano (Fig. 1.2c). O número de citações destes trabalhos não segue um padrão definido (Fig. 1.2d).

Figura 1.2 – Perfil do número de trabalhos em relação às palavras chave pesquisadas na base de dados do Web of Science. Sendo: a) e c) número publicações e b) e d) de citações.



Fonte: Web of Science, 2016.

Existem vários métodos para a avaliação da capacidade antioxidante de compostos químicos sintéticos e naturais. No entanto, a diversidade de espécies reativas e as diferentes formas de atuação das mesmas no organismo têm dificultado o desenvolvimento e a determinação de um método padronizado que possa quantificar a atividade antioxidante nos diversos sistemas de interesse (DAVID et al., 2010).

Metodologias e diretrizes têm sido desenvolvidas com o objetivo de minimizar as divergências dos resultados obtidos por diferentes ensaios de avaliação da capacidade antioxidante das substâncias. Isso poderá ser minimizado pelo aperfeiçoamento de métodos mais seletivos capazes de definir quais condições e quais os produtos formados e inibidos pelos antioxidantes (DAVID et al., 2010). Devido à complexidade da composição de bebidas e alimentos, há uma grande dificuldade para quantificar individualmente os compostos

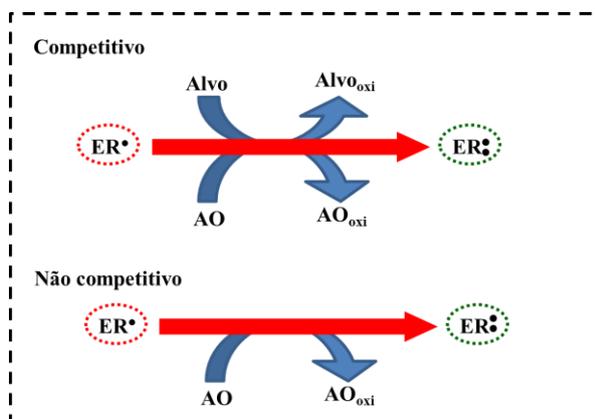
antioxidantes, com isso, grande parte dos métodos determina a capacidade antioxidante total (HUANG et al., 2005).

Prior e colaboradores (2005) propuseram diretrizes para padronização de métodos destinados a determinação da capacidade antioxidante *in vitro*. Para estes autores um método destinado à determinação da capacidade antioxidante deve conter os seguintes requisitos: (i) medidas químicas que conduzam a uma aplicação potencial, (ii) utilização de espécies (radicalares ou não) de relevância biológica, (iii) simplicidade, (iv) mecanismo de ação e ponto final definido, (v) instrumentação prontamente disponível, (vi) boa reprodutibilidade, (vii) adaptável para antioxidantes de caráter hidrofílico e lipofílico, e (viii) apresente alta frequência analítica visando análises de rotina e controle de qualidade. Adicionalmente, devem ser considerados aspectos relativos à faixa analítica de trabalho, efeito de matriz, repetitividade e reconhecimento de possíveis interferentes.

Estes critérios foram reportados pela dificuldade de comparação dos resultados obtidos em função de uma não padronização dos ensaios empregados. Uma das questões mais críticas é o composto empregado como padrão de calibração. Isto varia de acordo com o método, grupo de pesquisa e natureza da amostra. Os compostos mais empregados são trolox, ácido gálico, quercetina, ácido cafeico, ácido ascórbico, dentre outros. Adicionalmente, a depender do tipo de composto (natureza e estrutura) selecionado para calibração, assim como, do tipo de amostra a ser analisada o ponto final da reação é variável, e em alguns casos, difícil de se determinar, além dos aspectos cinéticos associados.

Os métodos analíticos para a determinação da capacidade antioxidante *in vitro* baseiam-se em dois princípios: (i) **O princípio competitivo**, onde o alvo – representado por uma biomolécula que deveria ser atacada *in vivo* – e os compostos antioxidantes competem pela espécie reativa (radical ou não radical). Nesse sistema, a capacidade antioxidante é verificada a partir de uma sonda analítica que permite a quantificação das espécies reativas restantes ou moléculas 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). Os mecanismos são ilustrados na Figura 1.3.

Figura 1.3 – Princípios das metodologias analíticas para determinação da capacidade antioxidante.



Fonte: Elaborado pelo autor (2016) – Adaptado de Magalhães et al., 2008.

Ainda não há um consenso quanto aos aspectos reacionais existentes nos métodos de medição da capacidade antioxidante. Os mecanismos reacionais baseiam-se na transferência de elétrons e átomos de hidrogênio e em alguns casos, ocorrem de forma simultânea.

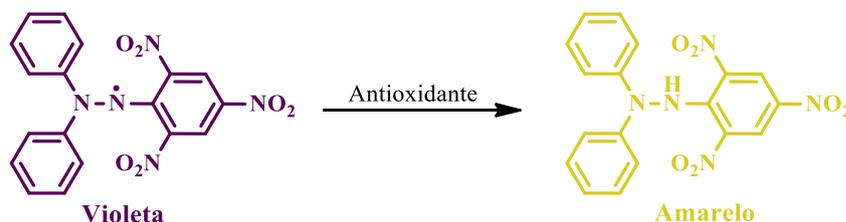
Dentre os ensaios baseados onde pode ocorrer a transferência de átomos de hidrogênio destacam-se: (i) absorção de radicais de oxigênio ORAC (do inglês “*oxygen radical absorbance capacity*”), (ii) parâmetro antioxidante para a captura total de radical (TRAP) e (iii) o sequestro de radicais DPPH•. Os métodos baseados na transferência de elétrons mais utilizados são Folin-Ciocalteu (geralmente utilizado para determinar a concentração de compostos fenólicos totais), ensaio de poder antioxidante por redução férrica (FRAP), ensaio para a capacidade antioxidante total utilizando Cu(II) como oxidante (CUPRAC), sequestro dos radicais ABTS^{•+} e DMPD•. A seguir, são apresentados os métodos utilizados para realização deste trabalho.

1.3.1 Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•)

O DPPH• é um radical estável devido à deslocalização de um elétron desemparelhado por toda a molécula. Essa característica lhe confere uma cor violeta (em etanol) por absorção na região do visível apresentando $\lambda_{\text{máx}} = 520 \text{ nm}$. A capacidade antioxidante de uma substância é medida pela redução da molécula radicalar DPPH•, e a cinética da formação da hidrazina correspondente, em função da doação de átomos de hidrogênio (radical). A hidrazina resultante possui uma coloração amarelo pálido, resultando no decréscimo da absorvância em relação ao sinal do branco analítico (na ausência do composto antioxidante) (DAVID et al., 2010). A

Figura 1.4 apresenta a reação geral entre o radical DPPH• e um composto antioxidante genérico (HCA).

Figura 1.4 – Reação entre o radical DPPH• e o composto antioxidante genérico (HCA).



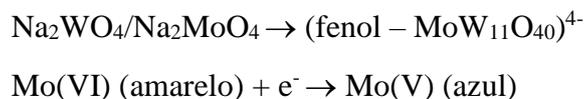
Fonte: Elaborado pelo autor (2016) – Adaptado de DAVID et al., 2010.

Este método não tem um mecanismo preferencialmente definido, ele pode ocorrer através da transferência de átomos de hidrogênio ou de elétrons, dependendo das condições reacionais do meio e da natureza e estrutura do composto antioxidante. Todavia, na maioria dos casos em meio etanólico existe uma maior tendência à transferência de átomos de hidrogênio em detrimento a transferência de elétrons. Nesta linha, estudos têm sido realizados para verificar a relação entre as estruturas dos antioxidantes e o mecanismo prevalente. Muitos antioxidantes reagem rapidamente com DPPH•, existindo uma tendência por moléculas mais hidrofóbicas do que hidrofílicas. Contudo, antioxidantes volumosos reagem lentamente, ou sequer reagem com o radical, devido ao impedimento estérico da molécula do radical. Essa condição compromete os resultados do ensaio para a determinação da capacidade antioxidante de amostras mais complexas (KARADAG et al., 2009; PRIOR et al., 2005).

1.3.2 Fenólicos totais pelo reagente de Folin-Ciocalteu (FC)

O método de Folin-Ciocalteu (FC) é um dos ensaios mais conhecidos e antigos para a determinação da concentração total de compostos fenólicos. O teste é realizado com a mistura de molibdato e tungstato de sódio (solução amarela) em meio básico (5 a 10% (m/v) em Na_2CO_3). A alcalinidade do meio proporciona desprotonação dos compostos fenólicos ($\text{pK}_a \sim 10$), sendo o íon fenolato um redutor mais eficiente (facilidade para transferência de elétrons) que a sua forma associada. Os íons fenolato, por sua vez, reagem com o molibdato reduzindo-o a molibdato (MoO_4^{2-}) de coloração azul com absorvância máxima em 750 nm (ROGINSKY; LISSI, 2004). A avaliação quantitativa deste método pode ser realizada por espectrofotometria.

A reação inicialmente associada ao método está apresentada a seguir:



A seletividade do método é baixa. Desta forma, para melhorar este parâmetro analítico atualmente, o método é aplicado utilizando reagentes à base do heteropoliânion fósforo molibdicotunstato, $3\text{H}_2\text{O} - \text{P}_2\text{O}_5 - 13\text{WO}_3 - 5\text{MoO}_3 - 10\text{H}_2\text{O}$ e $3\text{H}_2\text{O} - \text{P}_2\text{O}_5 - 14\text{WO}_3 - 4\text{MoO}_3 - 10\text{H}_2\text{O}$. O princípio da reação continua o mesmo, redução do Mo(VI) para Mo(V).

O ácido gálico geralmente é usado como padrão e a concentração total de compostos fenólicos é calculada em equivalentes de ácido gálico (mg L^{-1}). O método permite a utilização de outras substâncias como padrão de calibração para construção da curva analítica. Ácidos fenólicos como: tânico, clorogênico, cafeico, protocatequínico, vanílico e ferulico têm sido empregados como padrão. Contudo, essa variedade de compostos pode levar a várias ordens de grandeza de fenóis quantificados, o que compromete a comparação de resultados com outros trabalhos reportados na literatura (KARADAG et al., 2009).

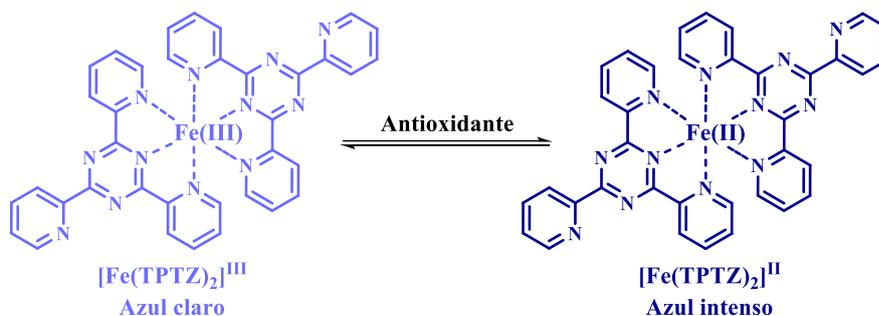
O método caracteriza-se por ser simples, rápido, sensível e preciso. No entanto, em meio ácido a reação é lenta. Vários interferentes como açúcares, compostos nitrogenados, compostos de enxofre, dióxido de carbono, ácido ascórbico, ácidos orgânicos, Fe(II) e outros redutores podem comprometer o resultado do ensaio dando uma falsa concentração de compostos fenólicos totais (PRIOR et al., 2005).

1.3.3 Ensaio de poder antioxidante por redução do ferro (FRAP)

O ensaio analítico do FRAP baseia-se na redução do complexo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), de $[\text{Fe}(\text{TPZT})_2]^{3+}$ para $[\text{Fe}(\text{TPZT})_2]^{2+}$ o qual apresenta uma coloração azul intensa ($\lambda_{\text{máx}} = 593 \text{ nm}$) em $\text{pH} \sim 3,6$ (Figura 3). Esta reação ocorre na presença de compostos que apresentam potenciais menores que 0,70 V. Desta forma, seria esperado que os resultados deste método tivessem uma boa correlação com o ABTS (0,68 V). Contudo, as condições reacionais podem levar a desvios. O meio ácido do método está relacionado à manutenção da solubilidade dos íons férricos. Além disto, reações em menores valores de pH diminuem o grau de ionização das espécies responsáveis pela transferência de elétrons e aumentam o potencial redox, causando alteração no mecanismo dominante da reação. Desta forma, existe uma baixa relação dos resultados do FRAP com outros métodos, como o ABTS. A faixa linear de

absorvância é geralmente medida na faixa de 0 a 4 min e a variação ($A_{4\text{min}} - A_{0\text{min}}$) é relacionada à concentração do complexo de ferro(II) formado (HUANG et al., 2005; PRIOR et al., 2005). A Figura 1.5 apresenta a reação geral para este método.

Figura 1.5 – Reação geral para o ensaio FRAP.

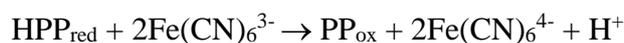


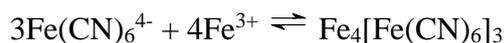
Fonte: Elaborado pelo autor (2016) – Adaptado de HUANG et al., 2005.

Este método foi desenvolvido para determinar o potencial de redução do plasma. Em seguida, foi adaptado para a determinação da capacidade antioxidante em extratos vegetais e amostras de alimentos. Adaptações foram feitas para avaliar a capacidade de complexação de compostos antioxidantes e amostras. Contudo, a avaliação quantitativa de amostras compostas é comprometida pela diminuição da cinética do FRAP empregado com moléculas complexas (HUANG et al., 2005; RUFINO et al., 2006). Mesmo assim, se comparado a outros ensaios de capacidade antioxidante total, o FRAP pode ser classificado como simples, rápido, robusto e barato. Além disso, pode ser utilizado em sistemas automatizados ou manuais (PRIOR et al., 2005).

1.3.4 Ensaio do azul da Prússia

O método do azul de Prússia é baseado na reação entre íons de hexacionoferrato(III) e Fe(III) em meio ácido formando um produto de coloração azul intensa de absorvância máxima em 700 nm. Inicialmente o composto polifenólico na forma reduzida (HPP_{red}) é oxidado pelo $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ sendo formado o composto polifenólico na forma oxidada (PP_{ox}), e o cianocomplexo de ferro divalente ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$). Este reage com os íons férricos em meio ácido para formação do complexo de cor azul intensa denominado de azul da Prússia (GRAHAM, 1992). As etapas gerais desta reação são apresentadas abaixo:





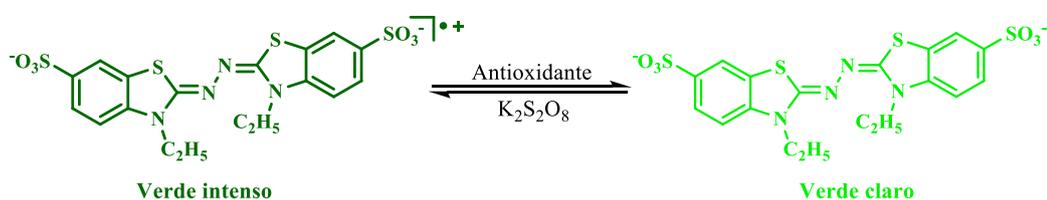
A curva analítica pode ser feita com vários compostos antioxidantes. Resultados mostram uma boa correlação linear de acordo com a variação da concentração de compostos como quercetina, ácido gálico, tânico, cafeico e vanilina. Os valores obtidos são expressos em equivalentes (mg L^{-1}) da substância utilizada como referência. Os resultados obtidos são comparáveis aos do método de Folin-Ciocalteau (BUDINNI et al., 1980; GAHAM, 1992). Gülçin e colaboradores (2010) empregaram essa metodologia para estudar a capacidade de redução de Fe(III) em amostras de alimentos. Para isto, avaliam a variação do sinal analítico em função da concentração do composto antioxidante.

O ensaio empregando a formação do azul de Prússia é rápido, simples e de baixo custo, no entanto, há variação da coloração com o passar do tempo (apresenta problemas de estabilização para algumas amostras) e também pode ocorrer a formação de precipitados (GAHAM, 1992).

1.3.5 Ensaio de capacidade antioxidante equivalentes ao Trolox (TEAC ou ABTS^{•+})

No ensaio TEAC, a capacidade antioxidante é mensurada pela redução do radical ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfonato)) de coloração verde intensa e $\lambda_{\text{máx}} = 734 \text{ nm}$ a ABTS (Figura 1.6). O aumento da concentração do antioxidante acarreta na diminuição da intensidade da cor e a avaliação quantitativa se dá por espectrofotometria (MAGALHÃES et al., 2009). Uma das limitações do método é que a geração do radical ABTS^{•+} pode levar até 16 h, bem como a escolha e natureza do oxidante para este procedimento.

Figura 1.6 – Reação genérica e forma oxidada e reduzida do ABTS.



Fonte: Elaborado pelo autor (2016) – Adaptado de HUANG et al., 2005.

Esse método pode ser aplicado a antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis. A inibição é estabelecida em função da concentração e do tempo, sendo a medida relativa a concentrações

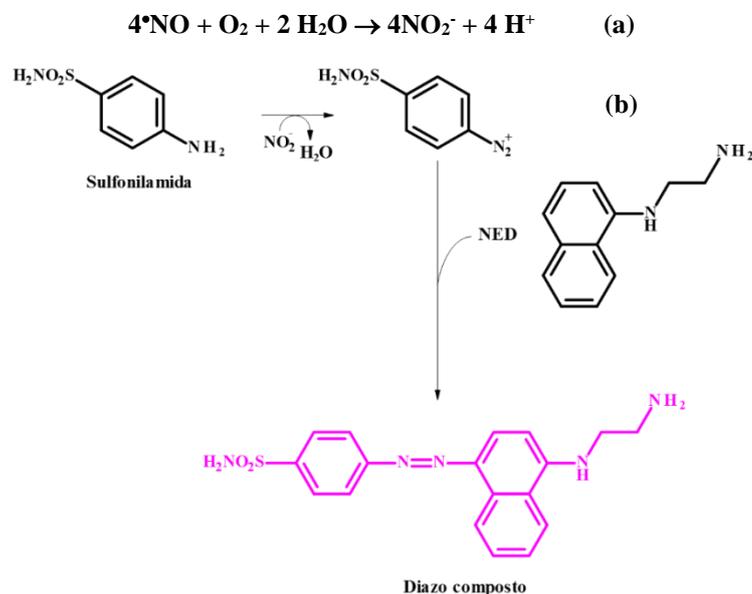
conhecidas de Trolox sob as mesmas condições da amostra avaliada. Os resultados do ensaio são expressos em equivalentes de Trolox (mmol L^{-1} ou mg L^{-1}) (VASCONCELOS et al., 2007).

Este ensaio tem sido utilizado para a determinação da capacidade antioxidante em alimentos, mas as avaliações têm mostrado que a reação pode demorar um longo período de tempo para chegar ao seu ponto final, fazendo-se necessária a utilização de um tempo mais curto, antes da reação ser concluída (KARADAG et al., 2009). Isto resulta em valores de TEAC reduzidos, comprometendo a avaliação da capacidade antioxidante da amostra. O mecanismo referente ao método é atribuído à transferência de elétrons (0,68 V), no entanto, estudos têm mostrado que o ensaio pode ocorrer com a transferência de átomos de hidrogênio a depender da estrutura dos antioxidantes e das condições reacionais (PRIOR et al., 2005).

1.3.6 Sequestro do radical óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$)

Existem diversos ensaios voltados para avaliar a capacidade de sequestro de óxido de nitrogênio. De maneira geral, a avaliação da capacidade antioxidante das amostras frente ao radical $\bullet\text{NO}$ é realizada de forma indireta, através da formação de produtos gerados a partir da reação entre o radical ou derivados e a sonda analítica. O método mais utilizado envolve geralmente envolve a reação de Griess, o qual o nitrito gerado em meio aquoso (Figura 1.7a) reage com a sulfanilamida em meio ácido. O diazo composto formado reage com o cloridrato de *N*-(1-naftil)etilenodiamina (NED), gerando um composto de coloração rosa ($\lambda_{\text{máx}} = 546 \text{ nm}$) (Figura 1.7b). A presença de compostos antioxidantes diminui a concentração de nitrito no meio. A reação é controlada pelo tempo, e o produto determinado em intervalos de 30 min até 150 min após a mistura dos reagentes. Os resultados são expressos em %I ou concentração de nitrito remanescente em função do tempo. Para este último, os resultados são convertidos a partir de uma curva de calibração construída a partir da concentração de nitrito em função do sinal de absorvância (MAIA et al. 2010; YEN et al., 2001).

Figura 1.7 – Princípio da metodologia empregada para determinar a capacidade de sequestro do NO•. Sendo: (a) Reação de formação do nitrito em meio aquoso e (b) a formação do diazocomposto a partir da reação de Griess.



Fonte: Elaborado pelo autor (2016) – Adaptado de MAIA et al., 2010.

Esta metodologia emprega o nitroprussiato de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]$) como fonte do radical $\cdot\text{NO}$. Desta forma, para este método geralmente utilizam-se elevadas concentrações dos compostos antioxidantes, visto que, além da espécie reativa, o Fe(III) do complexo também pode oxidar as espécies antioxidantes, incorrendo em erro experimental. Outra limitação deste método é que só permite a análise semi-quantitativa das amostras e dos padrões. Contudo, apresenta um baixo custo e é muito útil para avaliação comparativa entre o potencial antioxidante de amostras diversas (MAGALHÃES et al., 2008).

1.4 Justificativa e objetivo geral do estudo proposto

Diante do que foi exposto quanto à importância dos compostos antioxidantes na prevenção dos danos causados pelo estresse oxidativo e a necessidade do desenvolvimento de metodologias analíticas simples, rápidas e sensíveis que mimetizem as condições fisiológicas.

O objetivo geral deste trabalho foi: (i) o desenvolvimento e otimização de metodologia analítica para determinação da capacidade antioxidante em amostras de bebidas que fosse: simples, rápida, sensível e de baixo custo utilizando uma molécula biologicamente ativa como

sonda analítica; e (ii) determinar a capacidade antioxidante do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha de Alagoas (EHAPV) através de métodos já estabelecidos na literatura.

REFERÊNCIAS

- BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **The American Journal of 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.
- BEHLING, E.B. et al. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição, Araraquara**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- BORGES, L. R. et al. Conteúdo de fenóis totais presentes na semente de linhaça (*linum usitatissimum*). In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 19.; ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 12.; MOSTRA CIENTÍFICA, 2., 2010, Pelotas. **Resumos...** Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2010.
- CABRITA, J. M.; SILVA, J. R.; LAUREANO, O. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE VITIVINICULTURA. 1. 2003, Ensenada. **Anais...** Ensenada, México. 2003.
- 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.
- EGER, I. **Potencial quimioterapêutico de diferentes derivados do ácido gálico para o tratamento da infecção pelo Trypanosoma Cruzi: avaliação *in vitro* e *in vivo***. 2011. 127 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2010.
- FRANÇA, B. K. et al. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **Jornal Português de Gastroenterologia**, v. 20, n. 5, p. 199-206, 2013.
- FRANÇA, L.M. **Desenvolvimento de Sistema de Análise por Injeção Sequencial para Determinação Espectrofotométrica da Capacidade Antioxidante em Bebidas Empregando o Radical Derivado do N-fenil-1,4-fenilenodiamino**. 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.
- GARCIA, V. S. G. **Efeito de flavonoides na captação de HOCl produzidos por neutrófilos ativados e modulação do factor de transcrição NF-KB em células THP-1: análise da relação estrutura atividade**. 2010. 214 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Química e Bioquímica, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010.

- GLISZCZYNSKA-SWIGŁO, A. Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays, **Food Chemistry**, v. 96, p. 131–136, 2006.
- GRAHAM, H. D. Stabilization of the Prussian Blue Color in the Determination of Polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 801-805, 1992.
- 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.
- HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **The Lancet**. v. 355, p. 1179, 2000.
- HALLIWELL, B. et al. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**. v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.
- HALLIWELL, B.; CROSS, E. C. Oxygen-derived Species: Their relation to human disease and environmental stress. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, Suplemento 10, p. 5-12, 1994.
- 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. DENG, J. S.; CHEN, H. 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, 2012.
- HUSAIN, S. R.; CILLARD, J; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**. v. 26, n. 9, p. 2489-2491, 1987.
- JORGE, N.; LUZIA, D. M. M. Potencial antioxidante de extratos de sementes de limão (*Citruslimon*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 489-493, 2010.
- KARADAG, A., OZEELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, p. 41-60, 2009.
- 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.
- MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; LIMA, J. L. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, p. 1-19, 2008.
- MAGALHÃES, L. M. et al. Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity. **Talanta**, v. 77, p. 1559-1566, 2009.
- MATTOS, T. C. G. **Mecanismos da ação antioxidante dos ácidos caféico e tânico em sistemas contendo íons ferro**. 206 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5.ed. São Paulo: Sarvier, 2011.

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

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

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**, Maringá, v. 31, n. 2, p. 119-124, 2009.

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.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

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

ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 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.

RUFINO, M. S. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). In: EMBRAPA. **Comunicado técnico Embrapa Agroindústria Tropical**, 2006. p. 1-4. (Comunicado Técnico on line 125).

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, 1999.

SILVA, W. J. M.; FERRARI, C. K. B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 14, n. 3, p. 441-451, 2011.

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

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.

YEN, G.; LAI, H.; CHOU, H. Nitric oxide-scavenging and antioxidante effects of uraria crinita root. **Food Chemistry**, v. 74, p. 471-478, 2001.

2 EXPERIMENTAL

2.1 Preparo das soluções

Os reagentes utilizados nos ensaios são de grau analítico de pureza. No preparo das soluções aquosas utilizou-se água ultrapura (condutividade $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$) obtidas a partir de purificador Millipore Millipak Gamma Gold (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.1.1 Padrões utilizados

As soluções estoque (100 mg L^{-1}) de ácido gálico (Sigma), cisteína (Vetec), glicose (Sigma) e ácido ascórbico (Carlos Erba) foram preparadas solubilizando 5,0 mg dos compostos em 50 mL de água deionizada. A solução estoque (100 mg L^{-1}) de quercetina (Sigma) e Trolox (Sigma) foram preparada em meio aquoetanólico 50% (v/v), após a dissolução de 5,0 mg do composto para um volume final de 50 mL. A solução estoque (100 mg L^{-1}) de BHT (Sigma) foi preparada em meio aquometanólica 50% (v/v), após dissolver 5,0 mg do composto para um volume final de 50 mL.

2.1.2 Amostras

As amostras de vinhos (brancos e tintos) e chás e infusões analisadas foram adquiridas no comércio local. As amostras de chás e infusões foram preparadas como descritas em suas embalagens. Após abertas (vinhos) ou preparadas (chá e infusões), as amostras foram acondicionadas em refrigerador a 4°C por um período máximo de 96 h.

A própolis vermelha utilizada neste estudo (81,25 g) foi coletada em abril de 2013 no apiário Ilha do Porto, localizado na cidade de Marechal Deodoro–Alagoas. Os acesso e transporte da própolis vermelha foram autorizados pela coordenação do sistema de autorização de acesso ao patrimônio genético (COAPG). Estes procedimentos e a obtenção do extrato hidroalcolólico da própolis vermelha de Alagoas (EHAPV) foram realizados em colaboração com o Laboratório Análises Farmacêuticas e Alimentícias (LAFA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

2.1.3 Desenvolvimento e otimização do método da tiamina (Seção 3)

Para o preparo da solução de tiamina ($3,33 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi pesado 0,014 g de tiamina cloridrato (Vetec) e solubilizado em água deionizada. Em seguida, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL completando-se o volume com água deionizada. Posteriormente, uma alíquota de 100 μL da solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL avolumando a solução com água deionizada.

Para o preparo da solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi pesado 0,019 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Vetec) e solubilizado em água deionizada. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com água. Da solução resultante foram coletados 1,2 mL e transferido para um balão volumétrico de 50 mL, sendo adicionado 10 mL da solução tampão ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 8,0. A solução resultante foi avolumada com água deionizada.

Para o preparo da solução tampão ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ com pH ajustado para $8,0 \pm 0,1$ empregou-se 2,9 g de Na_2CO_3 (Reagen Quimibrás) e 2,1 g de NaHCO_3 (Merck) para um volume de 50 mL e solução de HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ para ajuste final do pH desejado.

A solução tampão Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, foi preparada através da mistura de soluções de H_3BO_3 (Synth), H_3PO_4 (Dinâmica) e ácido acético (Dinâmica) a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sendo o pH ajustado com solução de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. No preparo da solução tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, utilizou-se 1,5 g de ácido bórico (Merck) para o volume final de 50 mL. O pH foi ajustado empregando uma solução de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução tampão fosfato (10 mM, pH = 7,40) foi preparada pesando-se uma massa igual a 0,3549 g de Na_2HPO_4 (Dinâmica) e solubilizou-se em água ultrapura. Se ajustou o pH para $7,4 \pm 0,1$ com uma solução de HCl. Para o ajuste da força iônica adicionou-se 2,5 mL de NaCl $2,0 \text{ mol L}^{-1}$. O sistema resultante foi transferido para um balão volumétrico de 250 mL avolumando-se com água ultrapura.

As soluções estoque de cloreto de monofosfato de tiamina ($\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{ClN}_4\text{O}_4\text{PS} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma) e pirofosfato de tiamina ($\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{ClN}_4\text{O}_7\text{P}_2\text{S}$, Sigma) foram preparadas pesando-se 0,015 e 0,013 g, respectivamente. Após solubilização com água deionizada, as soluções foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL sendo avolumadas com água ultrapura.

Os complexos de ferro avaliados foram gerados a partir da mistura entre a solução de FeCl_3 e as soluções dos ligantes em diferentes concentrações proporcionais a 50 e 100 vezes de excesso, em relação aos íons Fe(III). Após o preparo as soluções, a concentração final do complexo eram $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ em meio tamponado. Desta forma, as soluções dos ligantes foram

preparadas da seguinte forma: pesou-se 0,208 g de citrato de sódio (Synth), 0,264 g de tritriplex III (EDTA dissódico) (Vetec) e 0,104 g de ácido glutâmico (Sigma). Após a solubilização dos reagentes em água ultrapura, as soluções resultantes foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL tendo o volume ajustado com água deionizada.

2.1.4 Métodos empregados para avaliação da capacidade antioxidantes

O reagente de Folin–Ciocalteu foi obtido comercialmente (Vetec). O mesmo antes do uso foi diluído em água deionizada na proporção de 1:10 (v/v) (VARGAS et al., 2008). Para o preparo da solução de carbonato de sódio (75 g L^{-1}) foram pesados 7,5 g de Na_2CO_3 (Reagen Quimibrás) e solubilizado em água. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água. Em seguida, a mesma foi armazenada em um recipiente de polietileno.

Para o preparo da solução do radical DPPH• (Sigma) foi pesado 0,012 g e solubilizado em metanol (Dinâmica). A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com álcool metílico. A concentração final da solução foi de $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ (SHARMA, BHAT, 2009).

A solução estoque do radical derivado do ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS^{•+}) 5 mmol L^{-1} foi preparada pela dissolução de 26 mg de ABTS (Sigma) e 4 mg de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Merck) em 10 mL de água. Após 16 h de incubação ao abrigo da luz, a solução foi diluída para 25 mL com tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ com pH ajustado para $7,4 \pm 0,1$ (ARTS et. al., 2004).

Para o preparo do reagente de Griess, pesou-se 1,0 g de sulfonilamida (Vetec) que foi solubilizada com a adição de 5,0 mL de ácido fosfórico (Vetec) e água. Em seguida, 0,1 g cloridrato de naftiletenodiamino (Sigma) solubilizado em água deionizada foi adicionada a solução anterior. O volume foi ajustado para 100 mL.

A solução de nitroprussiato de sódio (NPS, Merck) foi preparada a partir da diluição de 0,7448 g de NPS em água. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume ajustado com água deionizada. Para o preparo da solução de cloreto férrico (FeCl_3 , Sigma) foi pesado 0,1 g e solubilizado em uma solução de ácido clorídrico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com HCl ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$).

A solução estoque de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (Vetec) foi preparada a partir da diluição de 0,1 g do reagente em água deionizada. O volume final da solução foi ajustado para 100 mL em um

balão volumétrico. Para o preparo da solução de ácido tricloroacético (Merck) foram coletados 10 mL do ácido concentrado e diluído em água. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e avolumada com água.

Para o preparo da solução de sulfato ferroso pesou-se 0,0278 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Reagen Quimibrás), em seguida, adicionou-se água deionizada para solubilizá-lo. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e avolumado com água. Em seguida, coletou-se 7,50 mL da solução resultante e transferindo para um balão volumétrico de 25 mL que foi avolumado com água deionizada.

O estoque de ferrozina (2,4,6-tripiridil-triazina, Sigma) foi preparada pesando-se 0,078 g do reagente. A solução gerada a partir da dissolução do composto 2,4,6-tripiridil-triazina em metanol (Dinâmica) foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL tendo o volume completado com o mesmo solvente orgânico. Para o preparo da solução estoque do EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Merck) pesou-se 0,012 g do reagente e solubilizou-se em água ultrapura. Em seguida, a solução resultante transferiu-se para um balão volumétrico de 25 mL e avolumada com água deionizada.

2.2 Equipamentos utilizados

Para as medidas espectrofluorimétricas foi empregado um espectrofluorímetro Shimadzu RF (Modelo 5301PC, Japão) utilizando cubetas polimetil metacrilato, (transparência de 220-900 nm) com capacidade de 1,5 mL e 10 mm de caminho óptico.

As medidas espectrofotométricas foram feitas em dois modelos de espectrofotômetro Femto (Brasil), nomeadamente Femto 600 e Femto 600S e cada equipamento foi utilizado de acordo com a disponibilidade. O espectrofotômetro foi equipado com cubetas de vidro com 1,0 cm de caminho óptico.

Para as medidas de pH utilizou-se um medidor de pH Marte (Modelo MB10, 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 Bel com precisão de 0,1 mg para medidas ≥ 10 mg e (ii) balança analítica Mettler Toledo-AG245 com precisão de 0,01 mg (para massas < 10 mg).

Para os ensaios para determinação da capacidade de redução de íons Fe(III) , as soluções foram aquecidas utilizando-se um banho com sistema de aquecimento modelo SP12/200ED (SPlabor, Brasil). Nos ensaios para a avaliação da capacidade de complexação do Fe(II) utilizou-se uma mesa agitadora modelo AJX-SK180 (Micronal, Brasil).

2.3 Procedimentos

2.3.1 Método da tiamina (Seção 3)

Em um tubo tipo falcon graduado de 15 mL foi adicionado 1,50 mL da solução padrão do composto antioxidante ou da amostra; 1,0 mL da solução de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em tampão carbonato $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 8,0 \pm 0,1$) e 1,0 mL da solução $3,33 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cloridrato de tiamina, nesta ordem. Em seguida, com água, o volume final foi ajustado para 5,0 mL. Aguardou-se pelo menos 5 min para que a reação se processasse e as medidas espectrofluorimétricas fossem realizadas. O branco (sinal analítico de referência) foi obtido a partir de uma solução semelhante à anterior, onde volume da amostra foi substituído por água deionizada. Um volume de 1,5 mL foi transferido para uma cubeta para medidas fluorimétricas. A inibição do sinal analítico (%I) pela presença de compostos com capacidade antioxidante foi calculada a partir da seguinte equação normalizada: $\%I = (1 - F_{\text{amostra}}/F_{\text{referência}}) \times 100$, onde F_{amostra} corresponde à fluorescência após a adição da amostra ou padrão analítico, e $F_{\text{referência}}$ a fluorescência relativa ao branco analítico (sem adição do composto antioxidante).

Visando garantir melhor sensibilidade e menor interferência espectral as medidas espectrofluorimétricas foram realizadas nas seguintes condições: $\lambda_{\text{exc}} = 370 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$, abertura da fenda de excitação e emissão em 5,0 nm, velocidade de varredura de 400 nm min^{-1} . Após a aquisição dos dados, estes foram tratados empregando Origin 9.0 e a partir da curva analítica, calculou-se a capacidade antioxidante nas amostras em equivalentes (mg L^{-1}) de ácido gálico.

2.3.2 Avaliação da capacidade antioxidante das amostras analisadas

2.3.2.1 Método de Folin–Ciocalteu (compostos fenólicos totais)

Em um balão volumétrico de 5,0 mL foram inseridos, 500 μL do reagente de Folin–Ciocalteu previamente diluído (1:10), 500 μL da solução de Na_2CO_3 (75 g L^{-1}) e 2,0 mL da amostra ou solução de referência. O volume final de 5,0 mL foi completado com água deionizada e aguardou-se 30 min. As medidas espectrofotométricas foram realizadas em 770 nm com cubetas de vidro com 1,0 cm de caminho óptico (VÁZQUEZ et al., 2015). O branco (sinal analítico de referência) foi obtido a partir de uma solução semelhante à anterior, onde o volume da amostra foi substituído por água deionizada. Neste ensaio o ácido gálico (AG) foi utilizado como referência para obtenção da curva analítica. A partir dos dados obtidos pela

equação da curva analítica, calculou-se a concentração total de compostos fenólicos na amostra em equivalentes (mg L^{-1}) de AG.

2.3.2.2 Ensaio do sequestro do radical DPPH•

Em um tubo falcon de 15 mL foram adicionados 0,20 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 solução aquometanólica 30% (v/v), nesta ordem, totalizando um volume final de 4,0 mL (HOSU et al., 2014). Foi aguardado 30 min e realizou-se a medida espectrofotométrica em 527 nm com cubetas de vidro de 1,0 cm de caminho óptico. O sinal de referência foi obtido a partir de uma solução semelhante a anterior, no entanto, a amostra foi substituída por solução aquometanólica 30% (v/v). O AG foi usado como referência e os resultados expressos em equivalentes (mg L^{-1}) do mesmo.

2.3.2.3 Ensaio do sequestro do radical ABTS•⁺

Para a realização do ensaio procedeu-se de forma similar ao DPPH•. Em um tubo falcon de 15 mL adicionou-se 0,22 mL da solução estoque do radical ABTS•⁺; 1,0 mL da solução padrão ou da amostra previamente diluída e aferiu-se com água (GÜLÇİN et al., 2010). Aguardou-se 15 min após a mistura dos reagentes e procedeu-se a medida espectrofotométrica em 734 nm empregando-se cubetas de vidro com 1,0 cm de caminho óptico. O sinal de referência foi obtido a partir de uma solução semelhante a anterior, no entanto, a amostra foi substituída por água. A curva analítica para o procedimento empregando ABTS•⁺ foi construída empregando-se ácido gálico como padrão de calibração. O ácido gálico foi usado como referência e os resultados da capacidade antioxidante foram expressos em equivalentes (mg L^{-1}) do mesmo.

2.3.2.4 Ensaio do sequestro do radical •NO

Para avaliação do sequestro do radical •NO adicionou-se 0,5 mL da solução de nitroprussiato de sódio $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ diluída em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0) e 2,5 mL das amostras ou padrões empregados. O volume final foi ajustado para 5,0 mL com água ultrapura e 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 a partir da reação de diazonização da sulfanilamida com nitrito de sódio em meio ácido, seguido acoplamento com o naftiletilenodiamino foi medido por espectrofotometria a 546 nm.

2.3.2.5 Ensaio de redução de Fe(III)

A avaliação da capacidade de redução de Fe(III) foi realizada a partir da adição de 0,75 mL das soluções das amostras ou dos padrões, 1,25 mL da solução $K_3[Fe(CN)_6]$ 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 em banho-maria a 50 °C. Em seguida, adicionou-se 1,25 mL de ácido tricloacético 10% (m/v) e 0,5 mL de $FeCl_3$ 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.

2.3.2.6 Ensaio de capacidade de complexação de Fe(II)

A capacidade de complexação de Fe(II) foi medida através da inibição da formação do complexo entre os íons Fe(II) e a ferrozina (2,4,6-tripiridil-triazina). Para esta avaliação 0,8 mL das soluções das amostras ou dos padrões foram misturados a 0,2 mL de sulfato ferroso. As soluções resultantes foram agitadas vigorosamente com o auxílio de uma mesa agitadora por 10 min a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 0,2 mL de ferrozina. O volume final foi ajustado para 2,0 mL com etanol (GÜLÇİN et al., 2010). As medidas espectrofotométricas foram realizadas em 562 nm e a solução de referência foi preparada substituindo o padrão ou amostra por água ultrapura.

2.3.3 Preparo das amostras analisadas

2.3.3.1 Amostras de vinhos, chás e infusões (Seção 3)

As amostras de vinhos antes de analisadas foram somente diluídas em água deionizada (2 – 3000 vezes). As amostras de ervas foram preparadas a partir da extração dos compostos por infusão, como se segue: cada sache de um determinado tipo de chá ou infusão foi transferido para um béquer de 250 mL e em seguida adicionou-se 100 mL de água aquecida (~ 90 °C). O sistema foi deixado em repouso por 10 min. Após o tempo de extração, retirava-se o sache de

chá da solução e aguardava-se a solução (chá ou infusão) esfriar a temperatura ambiente. Assim, realizou-se o preparo da infusão da amostra de modo a reproduzir o método de preparo determinado em suas respectivas embalagens. Por fim, as amostras eram diluídas e, em seguida, analisadas pelo método proposto e os de comparação.

2.3.3.2 Amostra da própolis vermelha do estado de Alagoas (Seção 4)

A própolis vermelha foi submetida a um processo de maceração utilizando uma mistura hidroalcoólica na proporção de 80% de etanol mais 20% de água destilada. O extrato obtido foi seco sob pressão reduzida em rotavapor e após este processo foram obtidos 65 g de EHAPV, com rendimento de 80% (CLEMENTINO-NETO, 2015). Para as avaliações foram preparadas soluções estoque a 500 mg L^{-1} do extrato em etanol 50 % (v/v).

2.4 Tratamento estatístico dos dados

2.4.1 Validação do método da tiamina (Seção 3)

Para otimização de alguns parâmetros analíticos foi empregado como parâmetro de sensibilidade à curva analítica a partir do valor de coeficiente angular da respectiva curva em uma dada condição de estudo. A curva analítica avaliada foi construída com no mínimo cinco pontos de acordo com a relação: $\%I = aC_{AO} + b$, sendo $\%I$ o percentual de inibição, C_{AO} a concentração do composto antioxidante, 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 a tendência linear. Procedimento semelhante foi realizado para o método proposto e os métodos de comparação visando à quantificação da capacidade antioxidante em diferentes amostras por interpolação dos dados.

Os cálculos relativos aos limites de detecção (3σ) e de quantificação (10σ) foram realizados de acordo com as seguintes equações, $LOD = 3s_b/a_c$ e $LOQ = 10s_b/a_c$, onde, s_b equivale ao desvio padrão do branco analítico ($n = 10$), enquanto a_c corresponde ao coeficiente angular da curva analítica empregada. O desvio padrão relativo (RSD) foi calculado de acordo com a equação: $RSD = (sp/xp) \times 100$, onde sp equivale ao desvio padrão referente a um determinado padrão dentro da faixa linear e xp corresponde ao valor médio encontrado para este padrão ($n = 10$) (MILLER; MILLER, 2005).

A avaliação dos resultados dos diferentes métodos empregados foi realizada a partir do teste t pareado de Student, ANOVA (Análise de Variância) e por procedimentos de

correlação linear entre os resultados obtidos. Para todos os procedimentos foi considerada uma distribuição normal dos dados (erro aleatório) e um intervalo de confiança igual a 95%.

2.4.2 Capacidade antioxidante do extrato da própolis vermelha de Alagoas

Os ensaios da capacidade antioxidante do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha de Alagoas frente aos radicais $ABTS^{*+}$ e $DPPH^*$ foram avaliadas a partir de curvas analíticas construídas resultantes da variação do percentual de inibição em função da concentração dos padrões antioxidantes e do extrato ($\%I = aC_{AO} + b$). O %I foi calculado a partir da equação $\%I = (1 - (A_{AO}/A_{ref})) \times 100$; onde A_{AO} corresponde ao sinal na presença do composto antioxidante e A_{ref} ao sinal do branco.

De forma similar, a capacidade de sequestro do $\bullet NO$ foi medida em função do %I, contudo a concentração dos padrões e do extrato manteve-se em $200 \mu g mL^{-1}$. Neste ensaio, foi necessária a medida do branco da amostra, desta forma, o percentual de inibição foi medido a partir da equação $\%I = ((1 - A_{AO} - A_B) / A_{ref}) \times 100$; onde A_{AO} é sinal medido na presença do antioxidante, A_B sinal do branco da amostra e A_{ref} o sinal do branco.

Para os ensaios de Folin-Ciocalteu e da capacidade de complexação de Fe(II) os resultados foram avaliados a partir das curvas analíticas resultantes do sinal de absorvância em função da concentração dos compostos antioxidante.

REFERÊNCIAS

BUDINI, R.; TONELLI, D.; GIROTTI, S. Analysis of total phenols using the prussian blue method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 1236-1238, 1980.

CLEMENTINO-NETO, J. **Investigação do efeito cardioprotetor do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha em ratos infartados por modelo simpatomimético**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2015.

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.

HOSU, A.; CRISTEA, V.; CIMPOIU, C. Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: Prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks. **Food Chemistry**, v. 150, p. 113-118, 2014.

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.

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

VÁZQUEZ, C. V. et al. Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin–Ciocalteu method. **Food Chemistry**, v. 176, p. 480–486, 2015.

3 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM AMOSTRAS DE BEBIDAS EMPREGANDO TIOCROMO COMO SONDA FLUOROGÊNICA EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS

3.1 Introdução

Os benefícios associados ao consumo de antioxidantes, como prevenção do envelhecimento precoce e doenças decorrentes do estresse oxidativo, tem despertado o interesse do público em geral. Muitas metodologias têm sido desenvolvidas com o intuito de avaliar a capacidade antioxidante de amostras, e compostos naturais e sintéticos. No entanto, a diversidade de espécies reativas (radicais ou não) e as diferentes formas de ação destas no organismo tem dificultado a obtenção de uma metodologia padronizada para quantificar a capacidade antioxidante em sistemas de interesse. Desta forma, quando possível, procura-se o desenvolvimento de métodos que mimetizem as condições fisiológicas e empreguem moléculas biologicamente ativas como sondas (ALVES, et al., 2010; HUANG et al., 2005).

A tiamina (vitamina B1) é uma substância indispensável no metabolismo de açúcares e na produção de trifosfato de adenosina (ATP) nas mitocôndrias, pois funciona como cofator de várias enzimas como a transcetolase, piruvato desidrogenase e alfa-cetoglutarato desidrogenase (NABOKIKHIN et al., 2016). As enzimas são importantes para a biossíntese de importantes componentes celulares, dentre eles, os neurotransmissores, ácidos nucleicos, e espécies redutoras constituintes das defesas antioxidantes endógenas (BETTENDORFF; WINS, 2009). Por não ser sintetizada pelo organismo, o baixo suprimento da vitamina B1, está associado a doenças como diabetes mellitus, doenças inflamatórias do intestino, Alzheimer e cardiopatias (ALAEI-SHAHMIRI, 2015; NABOKIKHIN et al., 2016).

De forma geral, a vitamina B1 é catabolizada em meio vegetal, tendo como principais fontes os grãos e cereais destacando-se o feijão e a ervilha que possuem concentrações equivalentes a $\sim 680 \mu\text{g g}^{-1}$. A carne suína também se destaca quanto a concentração de tiamina possuindo equivalentes entre $560- 800 \mu\text{g g}^{-1}$. Diversos fatores levam a degradação da tiamina em alimentos como a temperatura, pH, tempo de aquecimento, processamento e armazenamento (COELHO et al., 2008; DWIVEDIL; ARNOLD, 1973; SEBRELL; HARRIS, 1972).

No organismo humano a concentração de tiamina é mais elevada nos rins ($2,4 - 5,8 \text{ mg g}^{-1}$), no fígado ($2,0 - 7,6 \text{ mg g}^{-1}$) e no cérebro ($1,4 - 4,4 \text{ mg g}^{-1}$). No plasma a concentração pode

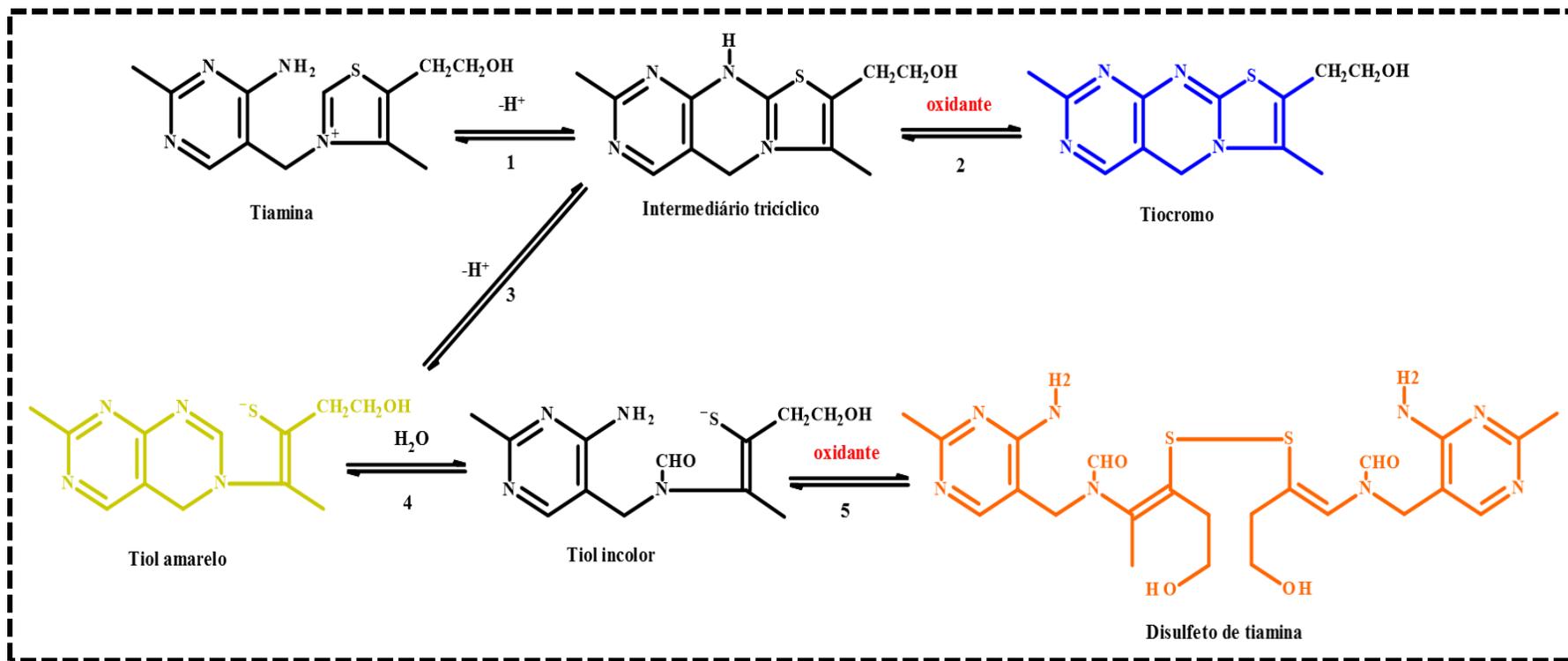
variar entre 16 e 48 nmol L⁻¹ (COSTA et al., 2014; SEBRELL; HARRIS, 1972; LIMA et al., 2011).

Durante a biossíntese da tiamina há a formação de produtos de oxidação que podem ser gerados através da atuação de enzimas, ou através do ataque de espécies reativas. Dentre os produtos gerados pela oxidação da tiamina destaca-se o tiocromo, que tem sido aplicado como sonda para quantificação da vitamina B1 em amostras de interesse biológico após sua oxidação (PREEDY, 2013; TAN, et al., 2015; XU et al., 1999).

O tiocromo, diferente da tiamina, apresenta rigidez estrutural, planaridade e conjugação com anel aromático, desta forma, este composto apresenta fluorescência ($\phi = 0,28$) quando excitado com radiação eletromagnética na região do UV ($\lambda = 370$ nm) (FUJIWARA; MATSUI, 1953; LIDDICOAT et al., 2015).

Ryan e Ingle (1980) propuseram o mecanismo de formação do tiocromo a partir da oxidação da tiamina em meio básico através de um agente oxidante. Este estudo foi realizado partir da avaliação espectrofotométrica da reação. A oxidação da tiamina a tiocromo *in vitro* é sempre acompanhada da formação do dissulfeto de tiamina (produto não fluorescente), um produto de condensação de duas moléculas de tiamina. A proporção dos produtos gerados é afetada pelo solvente, pH do meio e pelo agente oxidante empregado. Como pode ser observado na Figura 3.1, a tiamina em meio básico forma um intermediário tricíclico (etapa 1). Este intermediário pode ser oxidado a tiocromo (etapa 2) e/ou convertido a um tiol amarelo ((Z)-3-(2-metil-5H-pirimido[4,5-d]pirimidina-6-il)but-2-eno-2-tiolato) (etapa 3), o qual é oxidado para dissulfeto de tiamina (etapas 4 e 5). Na ausência de agente oxidante há a formação do ((Z)-3-[(4-aminopirimidina-5-il)metil-formil-amino]but-2-eno-2-tiolato) (tiol incolor) através do partir da reação de hidratação do (Z)-3-(2-metil-5H-pirimido[4,5-d]pirimidina-6-il)but-2-eno-2-tiolato (etapa 4) (RYAN; INGLE, 1980).

Figura 3.1 – Reação de oxidação da tiamina em meio básico in vitro.



Fonte: Elaborado pelo autor (2016) – Adaptado de Ryan e Ingle, 1980.

Estudos evidenciaram que a enzima horseradish peroxidase é capaz de catalisar oxidação da tiamina a tiocromo *in vivo*, na presença de peróxido de hidrogênio e ácido oleico. Desta forma, esta macromolécula tem sido aplicada para o desenvolvimento de metodologias para a quantificação de vitamina B1 em amostras de alimentos, urina e fármacos (PREEDY, 2013; TAN, et al., 2015). Esta enzima, é amplamente estudada e tem como centro catalítico o grupamento heme (LOPES et al., 2014; TAN, et al., 2015).

Outros agentes oxidantes como peróxido de hidrogênio, Hg(II), Cu(II), Au(III), $K_3Fe(CN)_6$, têm sido utilizados na reação de oxidação da tiamina a tiocromo. Segundo Tabrizi (2006), dentre os oxidantes citados anteriormente a maior intensidade de fluorescência observada foi com utilização Hg(II) seguido do $K_3Fe(CN)_6$ nas mesmas condições reacionais (TABRIZI, 2006; YU, Y. et al., 2015). Zhu e colaboradores (2014) desenvolveram um método espectrofluorimétrico para determinação da concentração de ácido hipocloroso em amostras de água, através da oxidação catalítica da tiamina a tiocromo na presença de $K_4Fe(CN)_6$. Nesta metodologia o HClO oxida o Fe(II) do complexo a ferro(III) e o produto da oxidação é reduzido pela tiamina gerando tiocromo.

Considerando os aspectos apresentados anteriormente buscou-se o desenvolvimento de uma metodologia analítica que empregasse uma sonda que fosse biologicamente disponível no organismo e em alimentos, além de um método bem estabelecido para realizar a determinação desta como analito. Desta forma, selecionou-se como sonda a tiamina (vitamina B₁) a qual está presente no corpo humano e em uma grande variedade de alimentos para o desenvolvimento deste trabalho.

3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar as condições reacionais para geração e inibição do tiocromo como sonda espectrofluorimétrica visando à medida da capacidade antioxidante em amostras de bebidas;
- b) Otimizar o método desenvolvido de forma univariada 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 ($K_3Fe(CN)_6$ e tiamina);
- c) Avaliar a capacidade de inibição da formação do tiocromo frente a diferentes substâncias com atividade antioxidante (ácido gálico, ácido ascórbico, quercetina, trolox, cisteína, BHT e glicose);
- d) Analisar diferentes amostras de vinhos (tinto e branco), chás e infusões para determinar a capacidade antioxidante através da metodologia proposta.

- e) Comparar estatisticamente os resultados obtidos pelo método proposto com aqueles oriundos de métodos amplamente empregados na literatura, nomeadamente Folin–Ciocalteu, DPPH e ABTS para as amostras de vinhos, chás e infusões avaliadas.
- f) Avaliar o comportamento do sistema otimizado com tiaminas fosforiladas (monofosfato e pirofosfato de tiamina);
- g) Avaliação da capacidade de formação do tiocromo a partir de complexos de Fe(III) com moléculas biologicamente ativas (citrato e ácido glutâmico) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) comparando os resultados com o $K_3Fe(CN)_6$.

3.3 Resultado e discussão

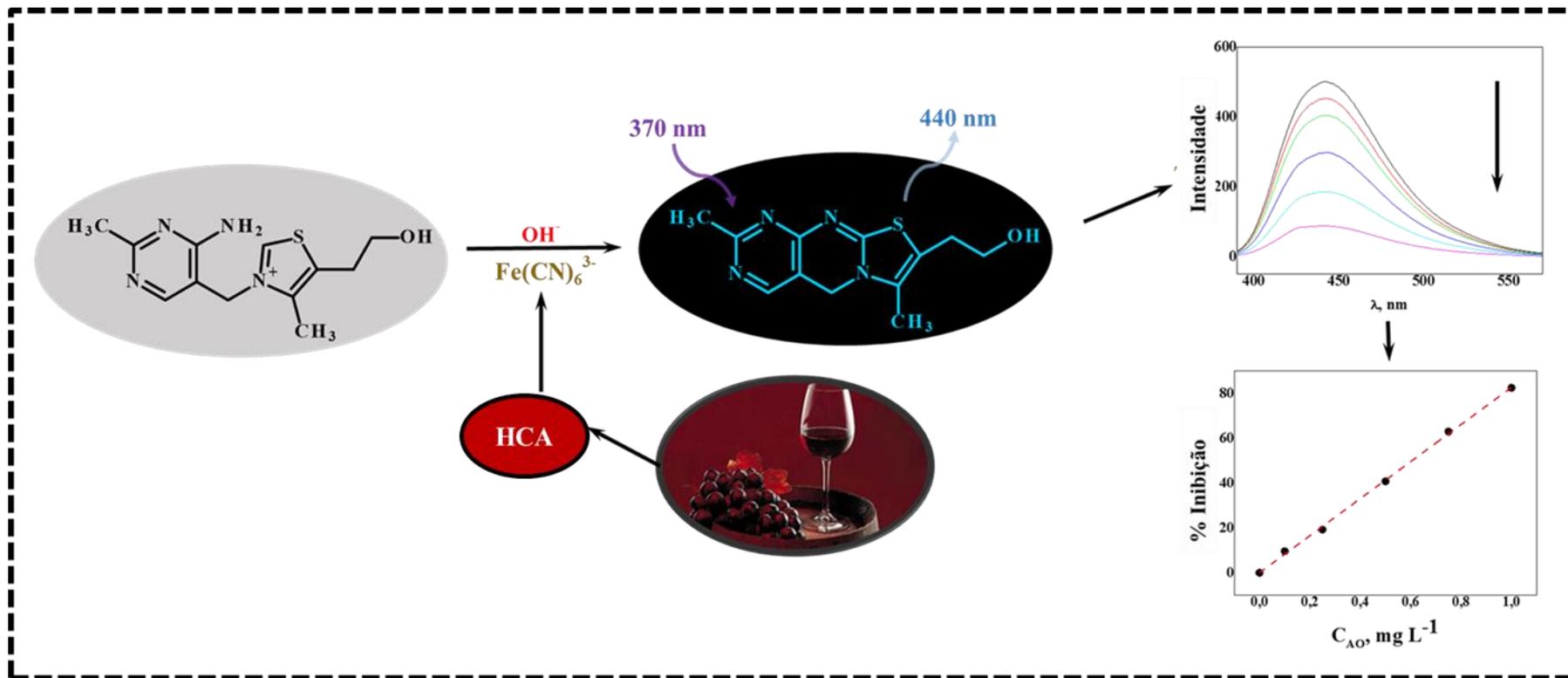
Considerando a geração do tiocromo a partir da oxidação da tiamina verificou-se que presença de compostos antioxidantes (HCA) no meio poderia inibir a formação do tiocromo, uma vez que o agente oxidante seria consumido (Figura 3.2). Assim, este trabalho pautou-se nesta estratégia, considerando a variação do sinal de emissão do tiocromo gerado na presença e ausência de HCA, para desenvolver um método visando a determinação da capacidade antioxidante de diferentes amostras de bebidas.

De acordo com o princípio do ensaio e o procedimento experimental empregado, pode-se classificar como competitivo o mecanismo de ação do método proposto. A tiamina (alvo biológico) pode reagir com um oxidante (no caso o $K_3Fe(CN)_6$, mas poderiam ser outras espécies, como radicais OH^\bullet , por exemplo), assim os compostos antioxidantes competem pela espécie reativa (oxidante) e a capacidade antioxidante é verificada pela formação do tiocromo, que funciona como sonda analítica oriunda da oxidação do alvo biológico (tiamina) (Figura 3.2).

Dentre os oxidantes citados na introdução desta seção (item 3.1), selecionou-se o hexacianoferrato(III). Apesar deste composto não participar de nenhum processo biológico, ele apresenta algumas vantagens: *i*) apresenta baixa toxicidade comparada a outros oxidantes, inclusive o $Hg^{(II)}$; *ii*) trata-se de um complexo de Fe(III), os quais são amplamente presentes em processos bioquímicos; *iii*) este complexo apresenta uma elevada constante de formação ($\log \beta_6 = 44$), sendo estável em uma ampla faixa de pH; *iv*) apresentar potencial redox de 0,36 V ($Fe(CN)_6^{4-} | Fe(CN)_6^{3-}$); o que o torna um oxidante seletivo, visto que a maior parte dos compostos antioxidantes presentes em alimentos está na faixa de 0,10 a 0,60 V de potencial redox; *v*) é disponível comercialmente com elevada pureza e baixo custo; *vi*) não apresenta fluorescência; *vii*) em geral, reage rapidamente com diferentes compostos redutores e *viii*) possui

estrutura similar ao complexo nitroprussiato ($[\text{Fe}(\text{CN})_6(\text{NO})]$), que foi empregado como fármaco no tratamento de emergências hipertensivas (CÉSAR et al. 2001); *viii*) já é empregado em outros métodos como: capacidade de redução de Fe(III) através da formação do complexo hexacianioferrato férrico (Azul da Prússia) e a determinação de composto polifenólicos em vinhos, através da reação com 4-AAP explorando um sistema por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica e atuando como agente oxidante (GÜLÇİN et al., 2010; SCHOONEN, et al., 2002).

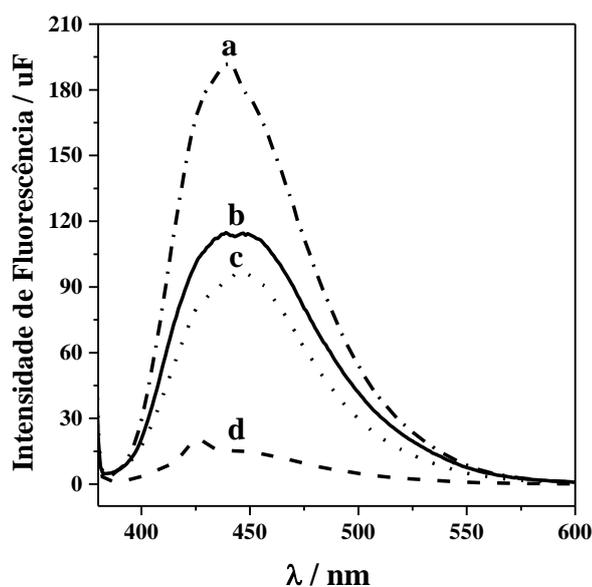
Figura 3.2 – Princípio da metodologia proposta para determinação da capacidade antioxidante de amostras de bebida a partir da oxidação da tiamina a tiocromo pelo hexacianoferrato(III).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

Ensaio preliminares foram realizados visando uma condição experimental inicial, onde na presença de um composto com capacidade antioxidante, ocorreria diminuição da fluorescência quando comparada com uma solução de referência na ausência deste composto. Quando se recorre aos protocolos experimentais para determinação de tiamina o agente oxidante sempre está em grande excesso (KHAN et al., 2008). Considerando aspectos relacionados ao equilíbrio químico esta estratégia está adequada, visto que o excesso de um determinado reagente tende a deslocar o equilíbrio para favorecer a formação do produto da reação (Princípio de Le Chatelier), neste caso o tiocromo. Desta forma, procurou-se avaliar como a variação da concentração de $K_3Fe(CN)_6$ poderia influenciar na resposta analítica do método proposto. Para tanto, se avaliou a variação do sinal de fluorescência frente a duas concentrações distintas de $K_3Fe(CN)_6$ na presença e ausência de um composto antioxidante, neste caso o ácido gálico (AG), que foi empregado como padrão analítico para a otimização de todas as etapas do método proposto. A Figura 3.3 apresenta os espectros de emissão de fluorescência em função das diferentes condições avaliadas.

Figura 3.3 – Espectros de emissão relativos à avaliação da influência da proporção do oxidante na inibição da oxidação de tiamina pelo $K_3Fe(CN)_6$. Sendo: a) Branco com $K_3Fe(CN)_6$ ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$), b) AG e $K_3Fe(CN)_6$ ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$), c) Branco com $K_3Fe(CN)_6$ ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e d) AG e $K_3Fe(CN)_6$ ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$). Condições reacionais: AG $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ($5,9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), tiamina $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ ($2,6 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) e tampão carbonato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 10).



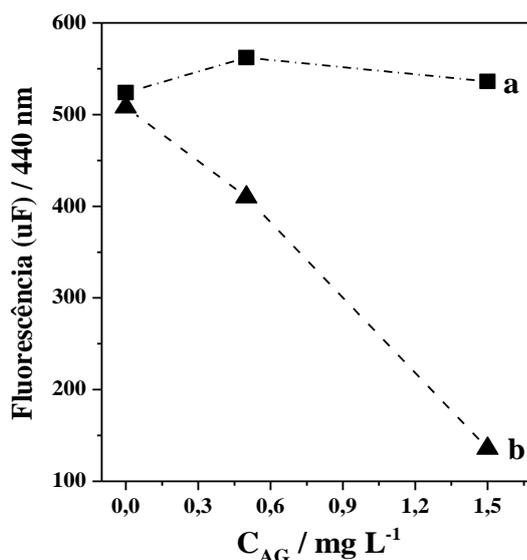
Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

De acordo com os espectros apresentados na Figura acima se observa que ao se comparar os sinais das soluções de referência (espectros *a* e *c*) obteve-se um comportamento diferente de esperado, pois o aumento da concentração do $K_3Fe(CN)_6$ conduziu a diminuição do sinal de fluorescência. Também pode-se verificar que o sinal da solução de referência (branco) onde o $K_3Fe(CN)_6$ está em sua maior concentração (espectro *c*) é menor que o sinal da mesma solução na presença do AG (espectro *b*). O oposto pode ser observado comparando-se os espectros *a* e *d* onde a concentração de $K_3Fe(CN)_6$ é 10 vezes menor que nos espectros *b* e *c*. Este fato pode ser explicado pela oxidação/degradação do tiocromo (formando espécies não fluorescentes) em função do elevado excesso (*ca.* 38 vezes) do oxidante em relação à tiamina (RYAN; INGLE, 1980). Desta forma, ficou evidente que a relação de excesso oxidante/tiamina não pode ser muito elevada, sendo este um parâmetro importante do método a ser otimizado.

3.3.1 Avaliação da ordem de adição dos reagentes

Esta avaliação foi realizada a fim de verificar se a ordem de adição dos reagentes poderia influenciar para no sinal analítico medido (fluorescência). Para tanto foram avaliadas duas ordens distintas quanto à adição dos reagentes: tiamina + $K_3Fe(CN)_6$ + AG (*ordem a*) e AG + $K_3Fe(CN)_6$ + tiamina (*ordem b*) em diferentes concentrações de ácido gálico (0; 0,5 e 1,5 $mg L^{-1}$). A Figura 3.4 ilustra os resultados obtidos para este estudo.

Figura 3.4 – Avaliação da ordem de adição dos reagentes. Sendo: a) tiamina + $K_3Fe(CN)_6$ + AG e b) AG + $K_3Fe(CN)_6$ + tiamina. Condições reacionais: $K_3Fe(CN)_6$ ($50 \mu mol L^{-1}$), tiamina ($3,33 \mu mol L^{-1}$), tampão carbonato ($0,1 mol L^{-1}$, pH 10).



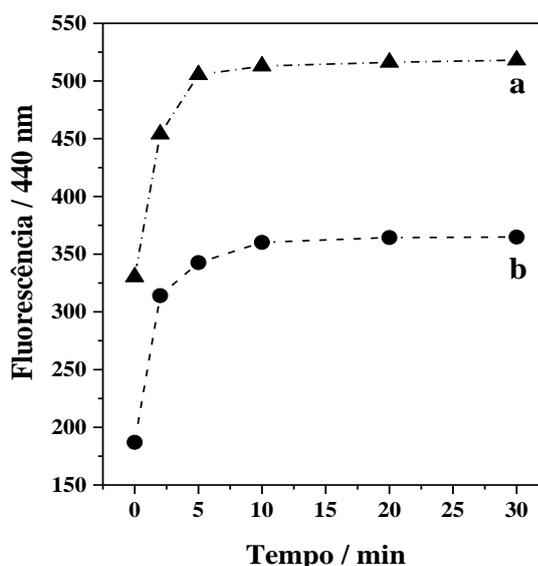
Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

Quando a ordem de adição foi tiamina + $K_3Fe(CN)_6$ + AG (*ordem a*) não foi observado decaimento do sinal de fluorescência, o mesmo permaneceu praticamente constante, mesmo com aumento da concentração de AG (Figura 3.4a). Isto pode ser atribuído ao fato da reação entre tiamina e o oxidante ter se processado antes da adição do AG. Logo, a reação com o $K_3Fe(CN)_6$ remanescente não conduziu a redução do sinal analítico visto que já teria ocorrido a formação do tiocromo. Contudo, quando se avaliou a ordem de adição: AG + $K_3Fe(CN)_6$ + tiamina (*ordem b*) o decaimento da fluorescência seguiu uma tendência linear. Isto se deu em virtude da reação prévia entre AG e $K_3Fe(CN)_6$, desta forma, a concentração do oxidante foi diminuída no meio reacional, logo a formação do tiocromo decresceu, diminuindo o sinal analítico. Assim, para os experimentos futuros esta ordem de adição foi mantida.

3.3.2 Avaliação da cinética reacional e linearidade do método

Após o estabelecimento da ordem de adição dos reagentes foi avaliado o tempo de mínimo para que estabilizasse (estudo cinético) a reação entre a tiamina e $K_3Fe(CN)_6$ na ausência e presença de um composto antioxidante (AG $0,5 \text{ mg L}^{-1}$). A concentração de AG foi selecionada em função de se encontrar na faixa central da curva analítica. Os resultados relativos ao estudo cinético são apresentados na Figura 3.5.

Figura 3.5 – Avaliação da cinética reacional empregando AG como composto antioxidante modelo. Sendo: a) $K_3Fe(CN)_6$ + tiamina e b) $K_3Fe(CN)_6$ + AG ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) + tiamina. Condições reacionais: tiamina ($3,33 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), $K_3Fe(CN)_6$ ($50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) e tampão carbonato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0).

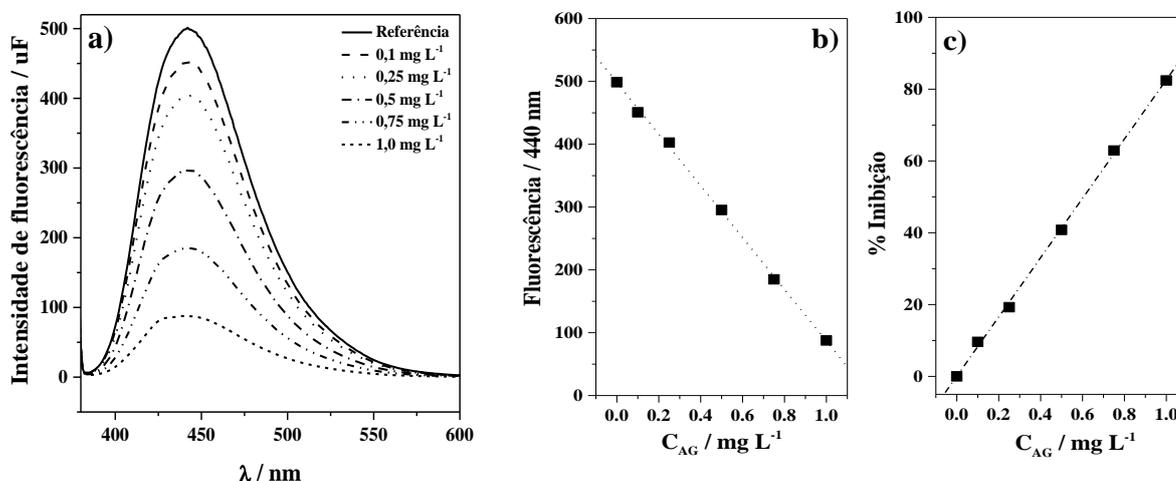


Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

A partir dos resultados acima (Figura 3.5) ficou evidente que a reação se processou de forma rápida (como evidenciado no estudo quanto à ordem de adição dos reagentes) e que a ausência ou presença de um composto antioxidante (no caso AG) não alterou o perfil cinético, somente a magnitude do sinal analítico. Desta forma, o tempo mínimo de 10 min após adição dos reagentes foi selecionado para os experimentos futuros.

A constatação que a presença de um composto com capacidade antioxidante poderia levar a redução do sinal de fluorescência foi verificada nos experimentos anteriores. Conduto, era necessário avaliar a relação entre a variação de concentração do AG e o sinal analítico. Para tanto foram construídas curvas analíticas a partir da adição de concentrações crescentes de AG, verificando que o decaimento da fluorescência obedecia a uma relação linear conforme observado na Figura 3.6.

Figura 3.6 – Avaliação da relação entre o sinal analítico e concentração de AG como composto antioxidante. Sendo: a) Espectros de emissão molecular referente à adição de diferentes concentrações de AG; b) Curva analítica em função do sinal de decaimento da fluorescência ($F_{440\text{ nm}}$) e c) Curva analítica em função da inibição do sinal de fluorescência (% I_F). Condições reacionais: tiamina ($3,33\ \mu\text{mol L}^{-1}$), $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ($50\ \mu\text{mol L}^{-1}$), tempo de reação = 5 min e tampão carbonato ($0,1\ \text{mol L}^{-1}$, pH 10).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

Conforme os resultados apresentados acima (Figura 3.6) foi verificada relação linear conforme as seguintes equações: $F_{440\text{ nm}} = -412 (\pm 6)C_{AG} + 498 (\pm 4)$, $r = 0,9995$ relativo à curva do gráfico 3.5b e $\%I = 83 (\pm 1)C_{AG} + 0,05 (\pm 0,71)$, $r = 0,9995$ para a curva relativa ao gráfico 3.6c, correspondente a uma faixa de concentração 0,1 a $1,0\ \text{mg L}^{-1}$ em AG. Desta forma, com a otimização de outros parâmetros pretende-se tornar o método mais sensível e diminuir a faixa linear de concentração de AG. Assim, para otimização das condições experimentais do

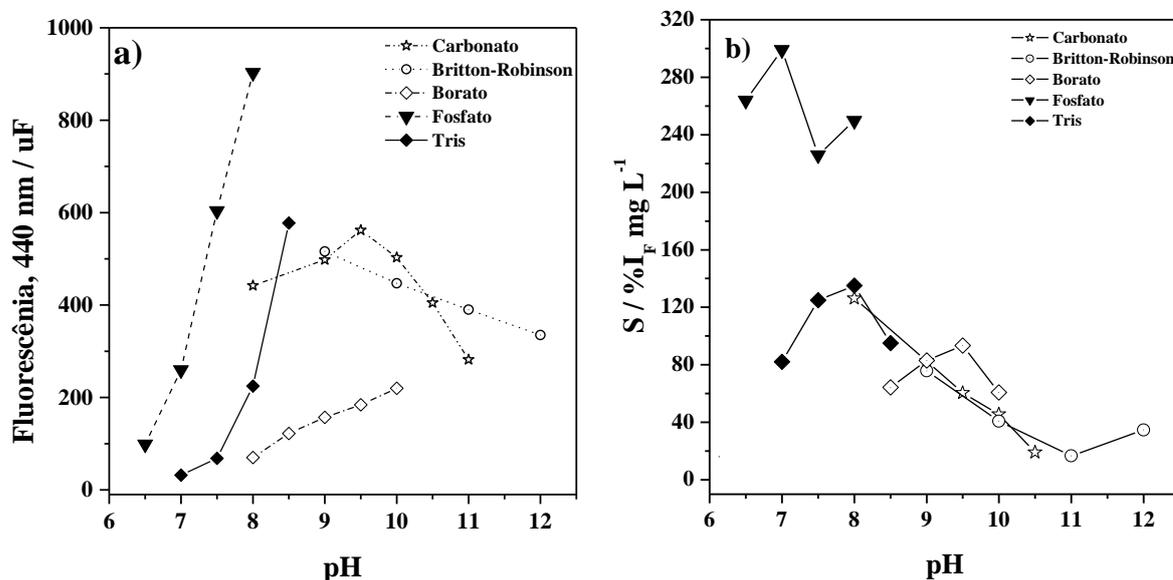
método foi considerado o coeficiente angular da curva analítica como parâmetro analítico. Visto que, o uso do coeficiente angular (sensibilidade analítica, S) leva em conta uma faixa de concentração do analito, sendo mais robusto que estratégias de otimização que empregam somente um valor fixo de concentração.

3.3.3 Avaliação do pH e do sistema tampão do meio reacional

A reação para formação do tiocromo ocorre preferencialmente em meio alcalino. Quando o objetivo do estudo é a maior conversão de tiamina a tiocromo normalmente se utilizam bases fortes (NaOH ou KOH) para promover as condições necessárias para reação (ZHU et al., 2014). Nesta etapa da otimização avaliou-se o pH do meio, assim como, o sistema tampão responsável pela manutenção do mesmo. Foram avaliados cinco sistemas tampão em diferentes faixas de pH, sendo: fosfato (pH 6,5 a 8,0), Tris (pH 7,0 a 8,5), borato (pH 8,0 a 10), carbonato (pH 8,0 a 11) e Britton-Robinson (pH 9,0 a 12).

O primeiro parâmetro avaliado foi à formação do tiocromo nestas diferentes condições (branco – sinal de referência) de pH. Percebeu-se que a formação do tiocromo foi favorecida na faixa de pH de 8,0 a 9,0 para as soluções tampão avaliadas (Figura 3.7a). A formação do tiocromo com tampão borato não foi eficiente em relação aos outros sistemas. Em valores de pH maiores que 10 observou-se a redução do sinal de fluorescência, o que está diretamente associado a menor formação da sonda fluorescente (tiocromo). Isto pode estar relacionado à formação de espécies intermediárias (não fluorescentes) que impedem a formação do tiocromo em função da composição do sistema químico (VIÑAS et al., 2000). O comportamento diferenciado do tampão borato em relação aos outros pode estar associado à força relativa da base conjugada, visto que H_2CO_3 ($\text{pK}_{a1} = 6,37$ e $\text{pK}_{a2} = 10,32$) e H_3PO_4 ($\text{pK}_{a1} = 2,15$; $\text{pK}_{a2} = 7,21$ e $\text{pK}_{a3} = 12,67$), Tris ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_3\text{-NH}_3^+$, $\text{pK}_a = 8,10$) e $\text{H}_3\text{BO}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ ($\text{pK}_a = 9,24$) apresentam bases mais fortes (considerando CO_3^{2-} , PO_4^{3-} e $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_3\text{-NH}_2$ (Tris neutro) comparado ao $\text{B}(\text{OH})_4^-$).

Figura 3.7 – Avaliação da influência do pH e do sistema tampão. Sendo: a) fluorescência do branco e b) na sensibilidade analítica do método. Condições reacionais: tiamina (3,33 $\mu\text{mol L}^{-1}$), $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$), tempo de reação = 10 min. Todas as soluções tampão neste estudo foram fixadas à concentração de 0,1 mol L^{-1} .



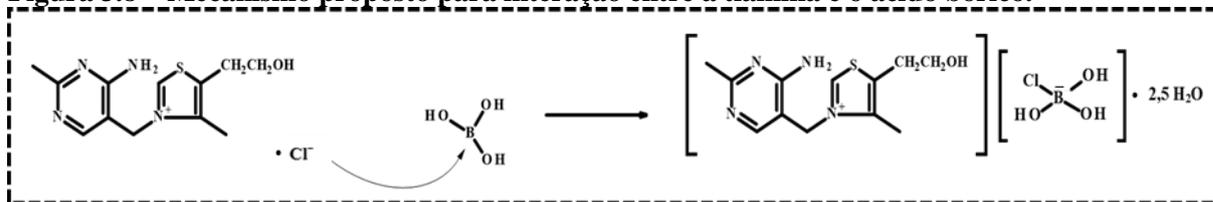
Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

O comportamento quanto à inibição da formação do tiocromo também foi avaliado. Apesar do ligante cianeto ser derivado de uma ácido fraco (HCN , $\text{pK}_a = 9,21$) a influência do pH é pequena em virtude do alto valor da constante de formação do complexo com $\text{Fe}(\text{III})$ ($\log\beta_6 = 44$), desta forma, a variação de pH terá pouca influência na constante de formação condicional ($K_f' = K_f \times \alpha_{\text{CN}^-}$), e por consequência, no valor do potencial redox deste oxidante. Contudo, o valor do pH em alguns casos pode ser determinante no grau de dissociação dos compostos antioxidantes, alterando seu potencial e comportamento químico. No caso de compostos fenólicos o aumento do pH facilita a abstração de próton(s), e por consequência a oxidação destas espécies (CARVALHO et al.,2004). A Figura 3.7b apresenta a avaliação do pH e do sistema tampão na sensibilidade analítica do método.

O sistema mostrou-se pouco eficiente para o tampão borato e Britton-Robinson (BR). O aumento da concentração do tampão BR foi inversamente proporcional a formação do tiocromo. A sensibilidade da curva de calibração seguiu a mesma tendência. Quando comparado aos demais sistemas, o tampão $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{H}_2\text{BO}_3^-$ foi o menos eficiente tanto para a geração do produto fluorescente quanto para a sensibilidade da curva analítica. Isto pode ter ocorrido em função da interação entre a tiamina (T) e o ácido bórico (HAB) presente nos dois sistemas. Para confirmar esta hipótese, cita-se o trabalho realizado por Köse e colaboradores (2014) que avaliaram a interação entre a tiamina e ácido bórico. Neste trabalho verificou-se a

formação de um par iônico gerado através da interação entre a T^+ e o ânion gerado a partir da reação entre o HAB e íons cloreto em solução (Fig. 3.8).

Figura 3.8 – Mecanismo proposto para interação entre a tiamina e o ácido bórico.



Fonte: Elaborado pelo autor – Adaptado de Köse et al., 2014.

Pôde ser observado que em pH 7,0 empregando o tampão fosfato, se obteve a maior sensibilidade, seguido pelos tampões Tris e carbonato, em pH 8,0. De forma geral, com o aumento do pH foi percebida diminuição da sensibilidade, o que pode estar associado ao aumento da concentração da fração dissociada da base e, desta forma, maior interação eletrostática com a tiamina (que apresenta uma carga positiva de um nitrogênio com quatro ligações) impedindo a ação do oxidante no meio reacional. Outro fator associado ao aumento do pH seria o favorecimento a oxidação dos compostos antioxidantes, especialmente compostos fenólicos com aumento da concentração de íons hidroxila no meio (ROGINSKY; LISSI, 2005). Nesta linha, o tampão fosfato (pH 7,4) e carbonato (pH = 8,0) foram selecionados, considerando os seguintes critérios: *i)* apresentaram boa sensibilidade; *ii)* ambos já são empregados em métodos de determinação da capacidade antioxidante (ABDERRAHIMA et al., 2016; KARAÇELIKA et al., 2015); *iii)* a faixa de pH selecionada e os constituintes dos tampões selecionados são comuns e próximos à condição do pH fisiológico. Assim, para os estudos subsequentes estas condições de pH e das soluções tampão foram avaliadas.

3.3.4 Avaliação da concentração final da solução tampão

Após a seleção do sistema tampão e seu respectivo valor de pH, foi avaliado o efeito da concentração desta solução quanto à inibição da formação do tiocromo frente ao AG. Ressalta-se que a concentração da solução tampão otimizada refere-se à concentração após a diluição da solução de $K_3Fe(CN)_6$, que no caso foi de 1:4. A Tabela 3.1 apresenta os resultados relativos a esta avaliação.

Tabela 3.1 – Parâmetros das curvas analíticas em AG em função variação da concentração do tampão carbonato e fosfato. Condições: tiamina (3,33 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Sendo $n \geq 5$.

| Tampão | C_{final} , mmol L^{-1} | Sinal do branco (uF) | Faixa linear, mg L^{-1} | $\%I_F = aC_{AG}(\text{mg L}^{-1}) + b$ | | |
|-----------------------|--|-------------------------|-------------------------------------|---|--------------------|--------|
| | | | | a | b | R |
| Carbonato (pH 8,0) | 25 | 388 | 0,025 – 0,3 | 197 (\pm 32) | 10,5 (\pm 5,1) | 0,9935 |
| | 50 | 482 | 0,025 – 0,3 | 200 (\pm 34) | 9,5 (\pm 4,7) | 0,9867 |
| | 100 | 583 | 0,025 – 0,3 | 126 (\pm 14) | 12 (\pm 4) | 0,9993 |
| | 150 | 658 | 0,05 – 0,4 | 128 (\pm 13) | 12 (\pm 6) | 0,9946 |
| | 200 | 720 | 0,05 – 0,4 | 137 (\pm 8) | -2,7 (\pm 1,9) | 0,9989 |
| Fosfato (pH 7,4) | 5,0 | 42 | 0,01– 0,05 | 1617 (\pm 227) | 25 (\pm 4) | 0,9946 |
| | 10 | 75 | 0,005 – 0,03 | 894 (\pm 54) | 0,30 (\pm 0,01) | 0,9982 |
| | 50 | 225 | 0,01 – 0,075 | 611 (\pm 23) | 13 (\pm 1) | 0,9978 |
| | 100 | 300 | 0,02 – 0,1 | 405 (\pm 33) | 7,30 (\pm 3,0) | 0,9943 |
| | 200 | 608 | 0,02 – 0,2 | 264 (\pm 10) | 16 (\pm 1) | 0,9971 |

Fonte: elaborado pelo autor, 2016.

De forma geral, para as soluções tampão avaliadas, observou-se que o sinal de referência (branco) variou de forma diretamente proporcional a concentração. Isso ocorreu pois o aumento da concentração das espécies eleva a capacidade tamponante da solução empregada. Vale ressaltar que, em tampão fosfato a variação global do sinal do branco foi de 14,5 vezes, enquanto que para carbonato de apenas 1,8. Nos sistemas avaliados, as espécies derivadas do ácido fosfórico ($\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$, $\text{pK}_{a2} = 7,2$) e carbônico ($\text{H}_2\text{CO}_3 / \text{HCO}_3^-$, $\text{pK}_{a1} = 6,4$) podem influenciar como bases na formação do tiocromo. Desta forma, como se tratam de bases fracas quanto maior a concentração, ocorre incremento na formação da sonda fluorescente.

De acordo com os dados, a concentração do tampão carbonato que levaria a maior sensibilidade seria igual a 50 mmol L^{-1} . Contudo, visando garantir uma maior eficiência do sistema tampão, selecionou-se a concentração de 100 mmol L^{-1} , mesmo com uma redução de *ca.* 20% em sensibilidade analítica, mas mantendo-se a mesma faixa linear de trabalho. Para maiores valores de concentração percebeu-se aumento da faixa linear, apesar da sensibilidade similar a condição selecionada. Além disso, nesta condição (100 mmol L^{-1}) se obteve melhor linearidade, expressa pelo coeficiente de correlação linear (r), quando comparado com as outras condições. Desta forma, a concentração final da solução tampão foi fixada em 100 mmol L^{-1} para os estudos posteriores.

Para todos os sistemas avaliados, observou-se que os sinais de referência em tampão fosfato foram sistematicamente menores quando comparadas ao carbonato. A carga das espécies em solução pode influenciar na eficiência da reação de formação do tiocromo. A tiamina possui carga positiva (nitrogênio quaternário na sua estrutura), logo os íons negativos (HPO_4^{2-} e HCO_3^-) podem no processo de interação eletrostático associado ao efeito de massa

(estão em maior concentração) reduzir a probabilidade de choques efetivos entre a molécula de tiamina e o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Assim, por ser mais negativa (carga 2-), para o tampão fosfato foi observada uma menor geração do fluoróforo.

Os resultados apresentados para as diferentes concentrações do tampão fosfato mostram que a concentração que levaria a uma maior sensibilidade seria a de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$. De forma geral, o aumento da concentração do tampão levou a diminuição da sensibilidade, em função do excesso de tiocromo produzido. Para o tampão fosfato estabeleceu-se a concentração de 10 mmol L^{-1} para os estudos subsequentes, visto que nesta concentração a faixa linear é maior do que na concentração de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e com melhor correção linear.

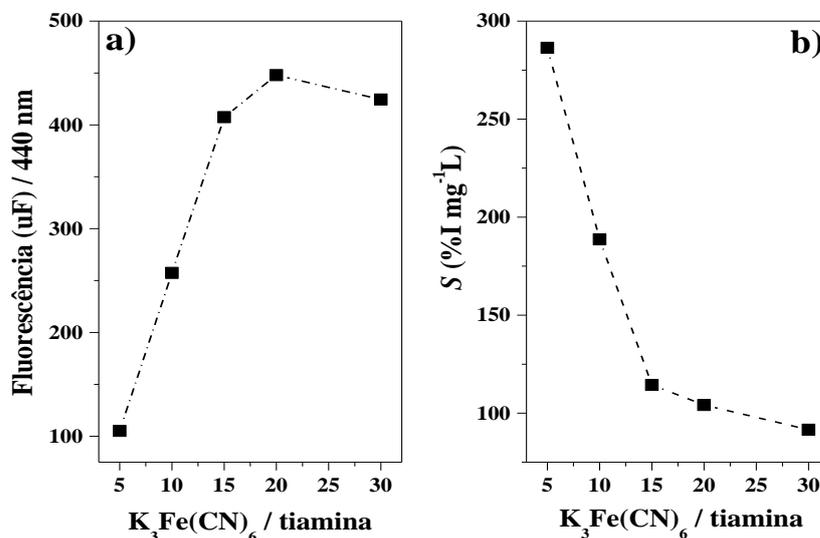
3.3.5 Avaliação da proporção $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ / tiamina

Em experimentos anteriores foi verificado que o excesso do oxidante podia levar a oxidação/degradação do tiocromo (RYAN; INGLE, 1980). Assim, optou-se por avaliar a razão da concentração de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e tiamina e não a concentração de cada composto separadamente. Como o volume adicionado no procedimento experimental era o mesmo, assim como a diluição, a razão da concentração na realidade era uma relação direta quanto à quantidade de matéria no sistema químico. Neste experimento as proporções avaliadas variaram de 5 a 30 vezes o excesso de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em relação à tiamina. A Figura 3.9 apresenta os resultados desta avaliação.

Como observado na Figura 3.9a, a reação de formação do composto fluorescente teve o seu rendimento aumentado até quando a razão molar $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ / tiamina atingiu o excesso de 15 vezes, chegando a um patamar. Ou seja, para a concentração de tiamina fixada ($3,33 \mu\text{mol L}^{-1}$) um excesso de 15 vezes do oxidante levou a máximo de produção do tiocromo nas condições reacionais do sistema químico avaliado.

Em outra avaliação foi observado à influência da proporção $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ / tiamina na sensibilidade analítica do método (Figura 3.9b). Quanto menor a proporção $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ / tiamina maior foi a sensibilidade (S) do método proposto. Isto está relacionado à menor concentração do $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ no meio reacional, apresentando um menor excesso após a reação com o AG, logo se tinha um %I maior. Mas a partir do excesso de 15 vezes foi observado uma menor variação na sensibilidade analítica, já em função de um maior excesso do oxidante. Desta forma, a razão selecionada quanto a $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ / tiamina foi 15 vezes. Visto que nesta condição ocorreu a maior conversão de tiamina a tiocromo, e apresentou mais robustez em função da menor variação da sensibilidade (*ca.* 9%) com o aumento do excesso de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$.

Figura 3.9 – Avaliação da proporção molar $K_3Fe(CN)_6$ / tiamina, sendo: a) variação do sinal de fluorescência do branco (440 nm) e b) avaliação da sensibilidade analítica (S , %I $mg^{-1} L$). Condições reacionais: $K_3Fe(CN)_6$ ($50 \mu mol L^{-1}$), tampão carbonato $0,1 mol L^{-1}$ ($pH = 8,0$).



Fonte: elaborado pelo autor, 2016.

Após a seleção da proporção molar entre $K_3Fe(CN)_6$ / tiamina foi avaliada a influência da variação da concentração das espécies mantendo-se constante a razão molar igual a 15. Para tanto, foram selecionados múltiplos quanto a concentração inicial dos compostos avaliados (tiamina $3,33 \mu mol L^{-1}$ e $K_3Fe(CN)_6$ $50 \mu mol L^{-1}$). Nesta avaliação, as soluções de tiamina e $K_3Fe(CN)_6$ foram preparadas com suas respectivas concentrações multiplicadas por 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 7,5 vezes, respectivamente. Os resultados obtidos para esta avaliação são apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Avaliação dos múltiplos da proporção $K_3Fe(CN)_6$ / tiamina. Condições reacionais: tampão carbonato $0,1 mol L^{-1}$ ($pH = 8,0$). O número de pontos (n) foi sempre $n \geq 5$.

| Múltiplos | Sinal do branco (uF) | Faixa linear, $mg L^{-1}$ | $\%I_F = aC_{AG}(mg L^{-1}) + b$ | | |
|-----------|----------------------|---------------------------|----------------------------------|----------------|--------|
| | | | A | b | R |
| 0,5 | 146 | 0,025 – 0,3 | 185 (± 12) | 26 (± 4) | 0,9899 |
| 1,0 | 360 | 0,025 – 0,3 | 145 (± 9) | 17 (± 2) | 0,9986 |
| 2,5 | 772 | 0,125 – 1,0 | 56 (± 3) | 21 (± 2) | 0,9872 |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

A partir do aumento de 2,5 vezes do valor da concentração de tiamina e $K_3Fe(CN)_6$ a fluorescência apresentada pelo branco (sinal de referência) ultrapassou a escala de medição do fluorímetro (1000 uF), impossibilitando a avaliação dos múltiplos 5,0 e 7,5 vezes. Para os demais resultados, os dados obtidos condizem com o esperado. Com o aumento da concentração

dos reagentes ocorreu maior formação do tiocromo (verificado pelo sinal do branco) e, por consequência a sensibilidade analítica (coeficiente angular) diminuiu.

Com base nos resultados obtidos se estabeleceu que as soluções seriam preparadas nas mesmas concentrações em que se iniciou o trabalho ($[K_3Fe(CN)_6] = 50 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $[\text{tiamina}] = 3,33 \mu\text{mol L}^{-1}$). Um valor de referência interessante é a concentração máxima (de saturação) da tiamina no organismo humano, sendo um valor da ordem de $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (COZZOLINO, 2012), próximo ao que está sendo empregando. Considerando que está se empregando uma sonda fluorimétrica presente no meio biológico. Por fim, apesar da faixa linear dessa condição ser menor do que no múltiplo de 2,5 vezes, o sinal do branco apresentou um valor intermediário quanto à escala do equipamento, a sensibilidade foi maior (mais que o dobro) e por fim, esta condição apresentou a melhor linearidade.

3.3.6 Avaliação da influência da força iônica no meio reacional

Esta avaliação foi realizada com o objetivo de observar como a variação da força iônica poderia influenciar no meio reacional, vislumbrando a possibilidade de otimizar o sistema mimetizando as condições fisiológicas. Desta forma, este estudo foi realizado somente com tampão fosfato, o qual apresentou maior interação com o a tiamina. Assim, se avaliou diferentes concentração de cloreto de sódio (NaCl) no meio. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Parâmetros das curvas analíticas em função variação da concentração de NaCl. Condições: tiamina ($3,33 \mu\text{mol L}^{-1}$), $K_3Fe(CN)_6$ ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$) e tampão fosfato (10mmol L^{-1} a pH 7,4). Sendo $n \geq 5$.

| C_{NaCl} , mmol L^{-1} | Referência (branco) | Faixa linear AG, mg L^{-1} | $\%I_F = aC_{AG}(\text{mg L}^{-1}) + b$ | | |
|--------------------------------------|------------------------|--|---|----------------------|--------|
| | | | A | b | R |
| 0 | 204 | 0,005 – 0,025 | 1139 (± 79) | -1,60 ($\pm 1,30$) | 0,9929 |
| 50 | 286 | 0,010 – 0,03 | 1690 (± 67) | -0,20 ($\pm 1,30$) | 0,9968 |
| 100 | 320 | 0,005 – 0,03 | 1793 (± 22) | 0,40 ($\pm 0,43$) | 0,9998 |
| 150 | 365 | 0,005 – 0,03 | 1682 (± 81) | 0,20 ($\pm 1,40$) | 0,9965 |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

Conforme os resultados apresentados na tabela acima, constatou-se que o sinal de referência (sem a presença de ácido gálico) e a sensibilidade da curva analítica era proporcional ao aumento da concentração de NaCl. Por ter carga positiva, a tiamina interage eletrostaticamente com as moléculas do tampão fosfato, como mencionado. Assim, tomou-se como hipótese para este perfil que com o aumento da concentração de cloreto de sódio, os íons

cloreto deslocam os íons fosfato através do efeito de massa (maior concentração) e do tamanho, o menor raio dos íons cloreto facilita a interação com a tiamina. Esta condição facilita a formação do tiocromo e não dificulta o processo de reação com o AG.

De forma geral, a faixa linear das curvas manteve-se sem variação. Para estudos posteriores ficou estabelecido o ajuste da força iônica com a adição de cloreto de sódio a 100 mmol L⁻¹. Esta condição apresentou maior sensibilidade e melhor coeficiente de correlação linear (r), além disso, esta concentração de NaCl já é utilizada em diversos tipos modelos utilizados na avaliação da interação entre moléculas pequenas e biomoléculas (proteínas e DNA, especialmente) em sistemas que simulam condições fisiológicas (ÇIFTÇIA et al., 2016; SHAHABADI et al., 2013).

3.3.7 Figuras de mérito do método proposto

Após a otimização das variáveis do método espectrofluorimétrico proposto para determinação da capacidade antioxidante foram estabelecidas as Figuras de mérito. A curva analítica para o método nas condições ótimas está apresentada na Tabela 3.4. O desvio padrão relativo (RSD) foi calculado para valores de concentração nos extremos da curva de calibração, visto que são as regiões com maior erro instrumental (MILLER; MILLER, 2005).

Tabela 3.4 – Curvas analíticas em AG nas condições otimizadas do método proposto (n = 3). Sendo: a) em tampão carbonato 0,1 mol L⁻¹ (pH 8,0) e b) em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 7,4).

| Tampão | Faixa linear, mg L ⁻¹ | %I _F = aC _{AG} (mg L ⁻¹) + b | | | LD, mg L ⁻¹ | LQ, mg L ⁻¹ | RSD, % |
|--------------------|----------------------------------|--|--------------|--------|------------------------|------------------------|--------|
| | | a | B | r | | | |
| Carbonato (pH 8,0) | 0,025 – 0,30 | 218 (±6) | 2,06 (±0,96) | 0,9984 | 0,008 | 0,025 | ≤ 3,4 |
| Fosfato (pH 7,4) | 0,005 – 0,025 | 1435 (±95) | 1,60 (±1,35) | 0,9894 | 0,002 | 0,006 | ≤ 7,1 |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

Apesar de apresentar uma sensibilidade analítica ~6,6 vezes maior, as curvas realizadas em tampão fosfato possuíam uma faixa linear 12 vezes menor, tendo máxima inibição em ca. 35%. As diferenças observadas nos sistemas otimizados (faixa linear e sensibilidade) ocorreram em virtude da maior concentração de tiocromo gerado em tampão carbonato, evidenciado pelo sinal de referência (branco). Em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 7,4) o sinal foi de ~ 320 uF, enquanto que, para tampão carbonato 0,1 mol L⁻¹ (pH 8,0) foi de aproximadamente 500 uF. Logo, menores concentrações de AG levaram a um efeito mais pronunciado em relação as Figuras de mérito. De forma geral, os resultados indicam que a metodologia proposta

apresentou boa precisão nos dois sistemas, pois em ambas as condições foram obtidas curvas analíticas com boa correlação linear ($r \geq 0,9894$), além disso, o desvio padrão no limite superior das curvas foi menor que 3,4 e 7,1% para tampão carbonato e fosfato, respectivamente.

Para as etapas posteriores, utilizou-se o sistema otimizado em tampão carbonato 0,1 mol L⁻¹ (pH 8,0) visto que nesta condição, as curvas analíticas exibiram uma maior faixa linear, onde o máximo percentual de inibição foi de *ca.* 80% permitindo assim, a quantificação da concentração necessária para inibir 50% do sinal de referência (IC₅₀) do composto utilizado para a otimização do método proposto (AG). Além disto, leva a um menor grau de diluição das amostras, e por consequência a redução de erros neste procedimento.

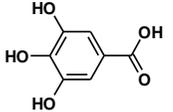
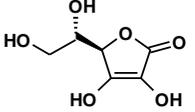
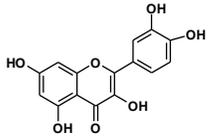
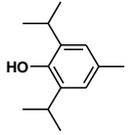
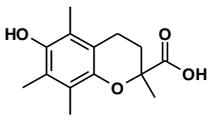
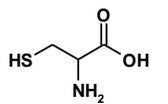
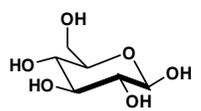
3.3.8 Avaliação do método frente a outros compostos antioxidantes e redutores

Para avaliar o método proposto frente a outras espécies com capacidade antioxidante e redutora foram selecionados sete compostos de diferentes classes: fenólicos, tiólico e açúcar redutor. Em função da diferença estrutural alguns aspectos/propriedades são diferentes, como: grau de hidro ou lipofilicidade, solubilidade em água, complexidade estrutural, potencial redox e distribuição destas espécies nas amostras reais analisadas. Nesta avaliação foram empregados os seguintes compostos: ácido gálico, ácido ascórbico, quercetina, butil-hidroxitolueno (BHT), ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), cisteína e glicose. Os resultados para este ensaio são apresentados na Tabela 3.5.

O parâmetro de comparação dos diferentes compostos neste estudo foi o EC₅₀, ou seja, a concentração do composto capaz de inibir 50% do sinal de referência (branco). Quanto menor a concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$) mais eficiente é o composto frente ao oxidante avaliado. Outros parâmetros analíticos também foram calculados, visto que a depender do tipo de amostra pode-se empregar outro padrão de calibração.

De acordo com os resultados observados na Tabela 3.5, verificou-se que o ácido gálico foi o composto que inibiu com mais eficiência a formação do tiocromo, seguido da quercetina, ácido ascórbico, cisteína, trolox, BHT e glicose. A glicose não inibiu de forma eficiente a formação do composto fluorescente. Ao ser avaliada uma amostra com até 100 mg L⁻¹ em glicose, houve %I_F ~10%. Portanto, a concentração de glicose não deve interferir nos resultados obtidos pelo método proposto em função do processo de diluição. Além disto, a reação de oxidação de açúcares redutores é mais efetiva em maiores valores de pH empregando bases fortes, o que permite um descolamento do equilíbrio da forma cíclica para acíclica da molécula do açúcar, facilitando a oxidação (ALVES et al., 2005).

Tabela 3.5 – Reatividade e parâmetros analíticos de diferentes compostos antioxidantes e redutores frente ao método proposto. Condições reacionais: tiamina (3,33 $\mu\text{mol L}^{-1}$), $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$), tampão carbonato 0,1 mol L^{-1} (pH = 8,0) e tempo de reação = 5 min.

| Substância | Estrutura | Faixa linear, mg L^{-1} | Curva analítica $\%I = aC_{\text{AO}} + b$ | R | EC_{50} , mg L^{-1} | EC_{50} , $\mu\text{mol L}^{-1}$ |
|-----------------|---|----------------------------------|--|--------|---------------------------------------|---|
| Ácido gálico |  | 0,025 – 0,30 | $\%I = 218(\pm 7)C_{\text{AO}} + 1,2 (\pm 1,2)$ | 0,9978 | 0,2 | 1,0 |
| Ácido ascórbico |  | 0,5 – 2,0 | $\%I = 36(\pm 3)C_{\text{AO}} + 3,4 (\pm 2,6)$ | 0,9953 | 1,2 | 7,1 |
| Quercetina |  | 0,1 – 0,75 | $\%I = 98(\pm 8)C_{\text{AO}} + 4,9 (\pm 3,3)$ | 0,9936 | 0,4 | 1,3 |
| BHT |  | 0,5 – 8,0 | $\%I = 10,2(\pm 0,3)C_{\text{AO}} + 0,5 (\pm 1,2)$ | 0,9985 | 5,0 | 22,7 |
| Trolox |  | 0,5 – 4,0 | $\%I = 21,5(\pm 0,5)C_{\text{AO}} - 3,2(\pm 1,0)$ | 0,9988 | 2,4 | 9,7 |
| Cisteína |  | 0,5 – 8,0 | $\%I = 10,2(\pm 1,3)C_{\text{AO}} + 0,5(\pm 1,4)$ | 0,9985 | 5,0 | 41,3 |
| D-glicose |  | 10,0 – 100,0 | $\%I = 0,09(\pm 0,01)C_{\text{AO}} + 0,07(\pm 0,10)$ | 0,9986 | 500 | 1315* |

*Valor extrapolado a partir da curva analítica.

Fonte: elaborado pelo autor, 2016.

A partir dos resultados da Tabela 3.4 pôde-se inferir que o ácido gálico e a quercetina são os antioxidantes mais efetivos, como já é preconizado na literatura às propriedades redutoras e antioxidantes destes compostos (ABE et al., 2007). Vale salientar que os compostos mais eficientes são polifenólicos. A presença de hidroxilas em carbonos adjacentes no anel aromático confere a estas espécies uma maior estabilidade à forma radicalar, potencializando assim o potencial antioxidante destas moléculas. Os pKas das moléculas também exercem influência nos resultados obtidos, pois a desprotonação dos compostos facilita a transferência de elétrons. Nas condições otimizadas (tampão carbonato, pH=8,0), os compostos antioxidantes que apresentam valores de pK_a menores ou próximos ao pH do meio foram os mais eficientes (ácido gálico: pK_{a1} = 8,7, pK_{a2} = 11,4 e pK_{a3} = 13 – para as hidroxilas fenólicas, quercetina: pK_{a1} = 5,87 e pK_{a2} = 8,48 e ácido ascórbico: pK_{a1} = 4,17 e pK_{a2} = 11,60). Os compostos onde o pK_a > 8,0, foram menos eficientes (trolox: pK_a = 12,1 e BHT: pK_a = 12,23) (BUSBEE; OBARE; MURPHY, 2003; RAJ; DANIEL, 2014; WARREN; MAYER, 2009). Outros aspectos como a lipo ou hidrofobicidade podem influenciar nos resultados, assim como, o potencial redox de cada composto e número de elétrons transferidos, como esperado, visto trata-se de um método baseado na transferência de elétrons.

3.3.9 Determinação da capacidade antioxidante em bebidas

O ensaio para determinação da capacidade antioxidante em bebidas pelo método proposto foi comparado com os resultados pelos métodos DPPH (antioxidante), ABTS (antioxidante) e Folin-Ciocalteu (fenólicos totais). Os resultados obtidos para análise das amostras de vinho (branco e tinto), chá e infusões encontram-se discriminados na Tabela 3.6.

De acordo com os resultados obtidos ficou evidente que as amostras de vinho tinto e chá (branco e verde) foram as amostras que apresentaram maior capacidade antioxidante. Este resultado já era esperado uma vez que a concentração de compostos fenólicos é alta neste tipo de amostra. Em linhas gerais os resultados obtidos são concordantes (semelhantes) a outros trabalhos da literatura em termos de concentração e compostos fenólicos (KARADAG et al., 2009; TORCHIO et al., 2016; VERLOOP et al., 2016). Os resultados obtidos pelo método proposto foram comparados estatisticamente com os métodos de Folin-Ciocalteu, DPPH e ABTS. A primeira comparação foi através do cálculo do teste *t* pareado de Student para um intervalo de confiança de 95%. A partir deste teste se obteve os seguintes valores de *t* experimental: *t*_{exp} = 1,58 (proposto vs FC); *t* = 3,49 (proposto vs DPPH) e *t* = 2,64 (proposto vs

ABTS), sendo $t_{\text{crítico}} = 2,18$ ($v = 12$, bicaudal). Por esta avaliação o método proposto seria estatisticamente similar somente ao método de Folin–Ciocalteu ($t_{\text{experimental}} < t_{\text{crítico}}$).

Para uma segunda avaliação estatística foi aplicada análise de variância simples (*one way ANOVA*) aos dados para um intervalo de 95% de confiança ($F_{\text{exp}} = 2,13 < F_{\text{crítico}} = 2,61$). Para este teste foi verificado que não existe diferença significativa entre os grupos de dados para um mesmo fator (no caso, capacidade antioxidante expresso em concentração de AG) em função das amostras. Com exceção dos resultados pelo método do DPPH, os outros apresentaram valores mais próximos. Contudo, este método estatístico emprega média e a variância total do grupo para realizar esta comparação. Assim, quando se toma como base os valores de todas as amostras pelo gráfico de *box plot* (Figura 3.10) verifica-se que mesmos os resultados pelo método do DPPH serem sistematicamente menores, a média geral (sem os valores considerados *outliers*) com os valores máximos e mínimos, estariam inseridos nas demais distribuições de dados.

Contudo, as comparações realizadas acima apresentam sérias limitações visto que apesar de todos os métodos avaliados serem calibrados com o mesmo compostos (AG) não se pode garantir que dentro do universo de amostras complexas (como vinho, por exemplo), que cada sonda reaja da mesma forma (ou similar) com os diferentes compostos que compõem estas amostras, em função do princípio e características inerentes a cada método.

Tabela 3.6 – Determinação da capacidade antioxidante (expressos em mg L⁻¹ de ácido gálico) em bebidas empregando o método proposto, DPPH, ABTS e de Folin-Ciocalteu (n = 3).

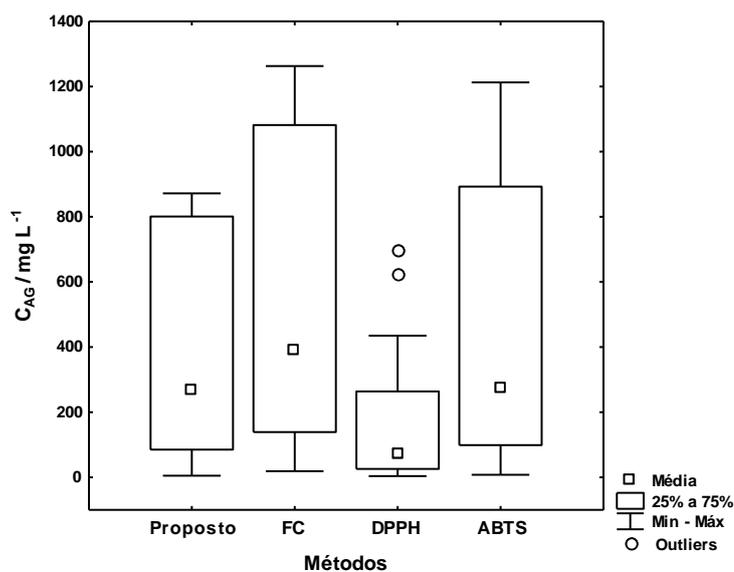
| Amostra | Bebida | Tipo | Diluição | | | | Concentração, mg L ⁻¹ de AG | | | |
|---------|---------|------------------------|----------|------|------|------|--|------------|------------|----------------------|
| | | | I | II | III | IV | Folin-Ciocalteu (I) | DPPH* (II) | ABTS (III) | Método proposto (IV) |
| 1 | Vinho | Branco | 15 | 80 | 250 | 800 | 295 ± 1 | 70 ± 6 | 232 ± 3 | 265 ± 1 |
| 2 | Vinho | Branco | 20 | 80 | 250 | 800 | 330 ± 1 | 43 ± 2 | 244 ± 3 | 228 ± 2 |
| 3 | Vinho | Branco | 20 | 80 | 250 | 800 | 387 ± 1 | 63 ± 1 | 273 ± 3 | 322 ± 1 |
| 4 | Vinho | Tinto | 100 | 600 | 1000 | 3000 | 1227 ± 1 | 435 ± 20 | 976 ± 25 | 801 ± 1 |
| 5 | Vinho | Tinto | 100 | 600 | 1000 | 3000 | 1082 ± 6 | 264 ± 1 | 777 ± 12 | 605 ± 2 |
| 6 | Vinho | Tinto | 100 | 600 | 1000 | 3000 | 1263 ± 6 | 181 ± 1 | 893 ± 12 | 816 ± 1 |
| 7 | Infusão | Carqueja ^a | 15 | 80 | 150 | 400 | 139 ± 1 | 26,0 ± 0,1 | 99 ± 2 | 85 ± 1 |
| 8 | Chá | Branco ^b | 80 | 1500 | 900 | 2000 | 1067 ± 3 | 625 ± 16 | 1140 ± 2 | 836 ± 1 |
| 9 | Chá | Preto ^b | 25 | 500 | 300 | 1000 | 432 ± 2 | 231 ± 16 | 324 ± 6 | 190 ± 15 |
| 10 | Infusão | Erva doce ^c | 5 | 25 | 40 | 100 | 73 ± 1 | 15,0 ± 0,5 | 46 ± 1 | 25 ± 1 |
| 11 | Infusão | Cidreira ^d | 2 | 5 | 10 | 20 | 19,0 ± 0,1 | 4,0 ± 0,1 | 8,0 ± 0,1 | 5,0 ± 0,2 |
| 12 | Chá | Verde ^b | 80 | 1500 | 900 | 2000 | 1117 ± 1 | 694 ± 16 | 1213 ± 13 | 872 ± 1 |
| 13 | Infusão | Camomila ^e | 5 | 30 | 40 | 100 | 87 ± 1 | 18,0 ± 0,1 | 33 ± 1 | 13 ± 1 |

^a*Baccharis trimera* (Less.) DC; ^b*Camellia sinensis* (L) Kuntze; ^c*Pimpinella anisum*; ^d*Melissa officinalis*; ^e*Matricaria chamomilla* L.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

Além disto, existem mecanismos de ação diferente entre alguns métodos, e ainda pode ocorrer competição entre o(s) tipo(s) de mecanismo(s) para um mesmo método (como no caso do DPPH). Assim, os resultados obtidos por estas avaliações estatísticas estão sujeitas a variações a depender do tipo de amostra e método que se compare.

Figura 3.10 – Gráfico box plot para os resultados obtidos pelos diferentes métodos (n = 13).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

Para tentar ter uma relação entre os resultados obtidos pelos diferentes métodos optou-se por realizar análise de correlação para um intervalo de 95% de confiança. Os resultados para esta avaliação são apresentados na Figura 3.11. Para estas relações se obtiveram as seguintes equações:

$$C_{FC} = 1,38(\pm 0,09)C_{\text{proposto}} + 39(\pm 47), r = 0,9768$$

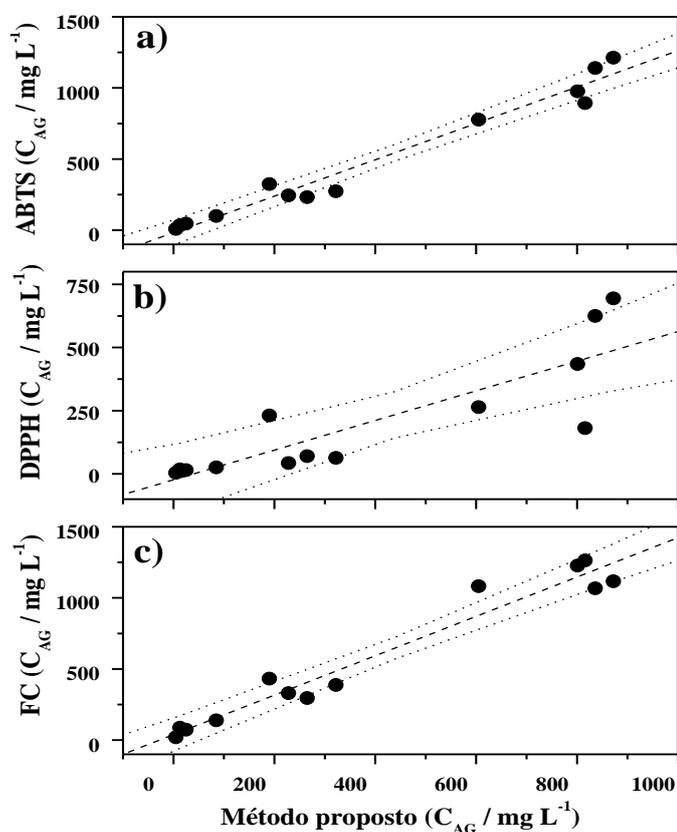
$$C_{DPPH} = 0,59(\pm 0,11)C_{\text{proposto}} + 23(\pm 56), r = 0,8502$$

$$C_{ABTS} = 1,28(\pm 0,07)C_{\text{proposto}} + 17(\pm 35), r = 0,9842$$

Quando o coeficiente angular tende à unidade e o linear próximo a um valor nulo (considerando o intervalo de valores empregados) a correlação é tida como perfeita (MILLER; MILLER, 2005). Com base nas equações obtidas acima e pela Tabela 3.6 se percebeu que os resultados pelo método proposto são sistematicamente inferiores aos métodos de Folin–Ciocalteu e ABTS. Contudo, estes métodos apresentam uma tendência semelhante na distribuição dos resultados, indicando que há uma boa correlação. Isto pode estar associado ao mecanismo de transferência de elétrons que é dominante nos dois métodos, porém ambos

apresentam potencial redox maior que o método proposto, sendo FC (1,23 V) e ABTS (0,68 V). Assim, podem oxidar espécies que esteja fora da janela de potencial do $K_3Fe(CN)_6$ (0,36 V), corroborando com os resultados, em geral, maiores que o método proposto. Mas isto não inviabiliza a aplicação do deste método, visto que neste tipo de metodologia o que se espera é que os ensaios apresentem uma mesma tendência e correlação, como foi observado. Além disto, o método proposto torna-se mais seletivo, em função de um menor potencial.

Figura 3.11 – Análise de correlação (para um intervalo de 95% de confiança) entre o método proposto nas condições ótimas e os métodos avaliados, sendo: a) ABTS; b) DPPH e c) Folin–Ciocalteu (n = 13). As linhas laterais (pontilhadas) indicam o intervalo de 95% de confiança e a linha central a tendência de distribuição linear dos resultados.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

Para o DPPH os resultados obtidos foram sistematicamente superiores em relação ao método proposto, assim como, com FC e ABTS. Isto pode estar associado ao fato do radical DPPH• ter como mecanismo preferencial de ação a transferência de átomos de hidrogênio, e não a transferência de elétrons. Este radical reage preferencialmente com compostos lipofílicos, os quais devem estar em baixa concentração nos tipos de amostras analisadas. Além disto, a

presença de compostos antioxidantes volumosos também influencia nos resultados obtidos, pois estas espécies reagem lentamente, ou não reagem com o radical. Desta forma, observou-se uma baixa correlação dos resultados com o método proposto (Figura 3.11) e um desvio acentuado na distribuição dos dados para este método a partir do gráfico de *box plot* (Figura 3.10).

Assim, em função das avaliações efetuadas o método proposto apresenta viabilidade para aplicação em amostras de alimentos, especialmente de vinhos, chás e infusões.

3.3.10 Avaliação da capacidade de formação do tiocromo a partir de complexos de Fe(III)

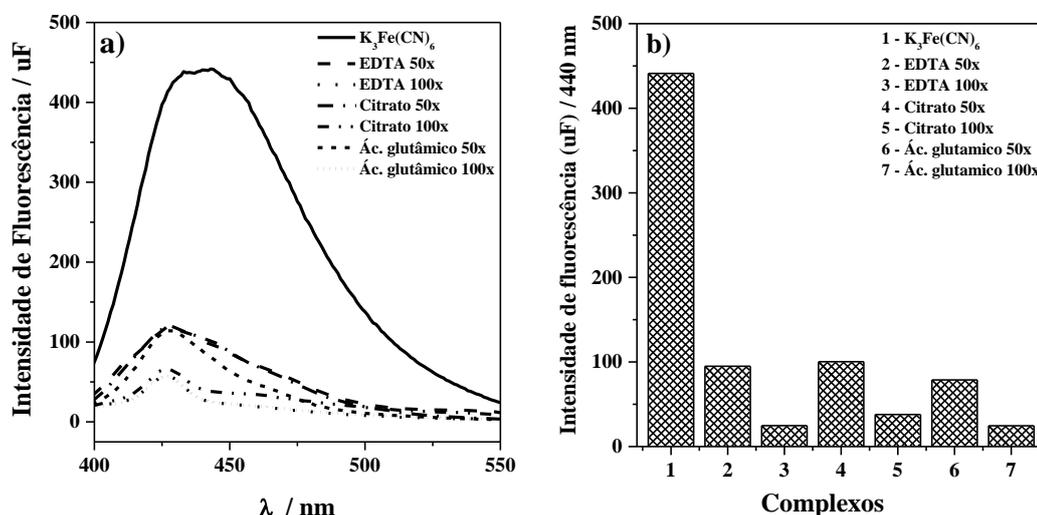
Buscando avaliar a metodologia em condições similares à biológica, nesta etapa do trabalho foi estudada a influência de diferentes complexos de Fe(III) com quatro ligantes diferentes: citrato ($E^0 = 0,60$ V) e ácido glutâmico¹ ($E^0 = 0,74$ V) (compostos ¹biologicamente ativos), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, Y^{4-}) ($E^0 = 0,12$ V), e cianeto ($E^0 = 0,36$ V) (FONTECAVE, 1999; HARRIS, 2001; MARTELL; SMITH, 1982; PIERRE; SKOOG et al., 2006).

Os complexos foram gerados *in situ* empregando excessos de 50 e 100 vezes dos ligantes, exceto para o $K_3Fe(CN)_6$ que foi adquirido comercialmente. A concentração do oxidante foi calculada em função da quantidade de ferro(III). Os resultados obtidos são apresentados na Figura abaixo.

A partir dos resultados apresentados na Figura 3.12, observou-se que o hexacianoferrato(III) foi o complexo que mostrou a maior capacidade de gerar tiocromo em relação aos demais. De forma geral, os sinais de fluorescência em 440 nm gerados a partir da oxidação da tiamina pelos complexos gerados (FeY^- , $Fe(citrato)_3^{3-}$ e $Fe(glutamato)_2$) foram de aproximadamente 100 uF quando os ligantes se encontravam em 50 vezes de excesso. Para os complexos produzidos empregando-se 100 vezes de excesso dos ligantes, verificou-se uma diminuição significativa da banda de emissão, bem como o seu deslocamento hipsocrômico (deslocamento comprimento de onda de máxima emissão para a região de maior energia). O baixo sinal de fluorescência apresentado para estes complexos com o maior excesso de ligante, aumenta a influência do espalhamento da radiação incidida no sistema (efeito Raman) no espectro de emissão, visto que a banda de emissão do efeito Raman apenas da solução tampão ($\lambda_{exc} = 370$ nm) é de aproximadamente 416 nm, interferindo diretamente no espectro observado (LAKOWICZ, 2006).

¹ Potencial teórico calculado a partir da constante de complexação.

Figura 3.12 – Avaliação da capacidade de formação do tiocromo a partir de diferentes complexos de Fe(III). Sendo: a) Espectros de emissão relativos ao tiocromo gerado a partir complexos de Fe(III) avaliados e b) Intensidade do sinal de emissão em 440 nm. Condições reacionais: tiamina (3,33 $\mu\text{mol L}^{-1}$), complexos de Fe(III) (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e tampão carbonato (0,1 mol L^{-1} , pH 8,0).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

O potencial de redução do complexo pode variar em função do equilíbrio químico existente entre espécies nas formas complexadas e não complexadas (livre). O equilíbrio é influenciado por diversos fatores como a concentração das espécies no meio, pH, força iônica, valores das constantes de formação, dentre outros. O aumento da concentração do ligante favorece a formação do complexo. Desta forma, a menor disponibilidade do Fe(III) no meio, diminui o potencial de redução, e, por consequência, a efetividade do complexo quanto a oxidação da tiamina a tiocromo.

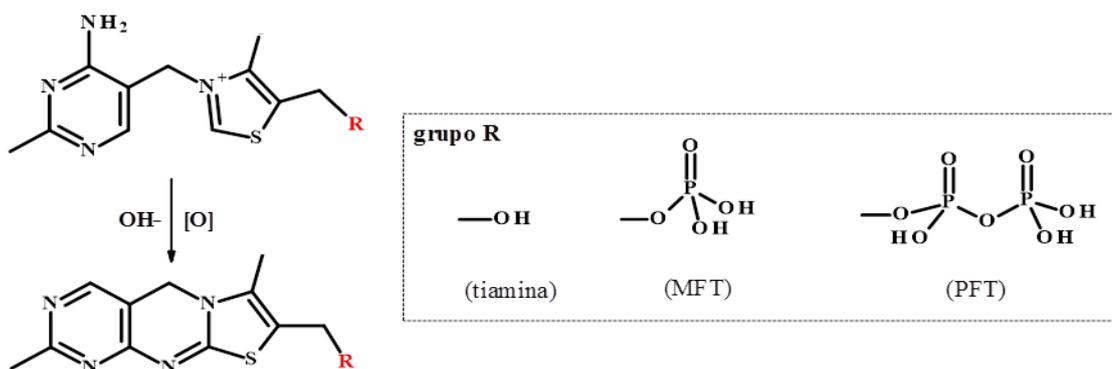
Diversos fatores contribuíram para o baixo rendimento dos complexos testados. A elevada capacidade de oxidação do complexo Fe-citrato, quando comparado aos demais (pelo menos cinco vezes maior), pode ter influenciado na concentração de tiocromo gerado neste sistema, pois oxidantes com elevados potenciais de redução padrão podem levar a geração de produtos de oxidação não fluorescentes pela oxidação da tiamina (RYAN; INGLE, 1980). O inverso ocorreu com o complexo Fe-EDTA que, por ter um baixo potencial de redução não foi capaz de oxidar a tiamina.

Por fim, além dos aspectos abordados anteriormente a carga e o volume dos complexos também influenciaram nos resultados. Os complexos FeY^- , $\text{Fe}(\text{citrato})_3^{3-}$ e $\text{Fe}(\text{glutamato})_2$ são mais volumosos quando comparados ao hexacianoferrato(III) dificultando o acesso do Fe(III) a tiamina.

3.3.11 Avaliação da metodologia proposta empregando diferentes tipos de tiamina

A tiamina combinada a grupos fosfato age como coenzima no complexo enzimático piruvato-desidrogenase necessário à descarboxilação oxidativa do piruvato, para formar acetato ativo (acetil-CoA) que é o componente principal da via metabólica do ciclo do ácido cítrico (GIBSON; ZANG, 2001). Com isso, buscou-se avaliar a metodologia frente a outras tiaminas contendo grupo fosfato na sua estrutura e que participam de importantes eventos metabólicos. Assim, comparou-se o desempenho analítico da tiamina, monofosfato de tiamina (MFT) e pirofosfato de tiamina (PFT) como parte da avaliação da metodologia. As estruturas das tiaminas utilizadas nestes estudos são apresentadas na Figura 3.13.

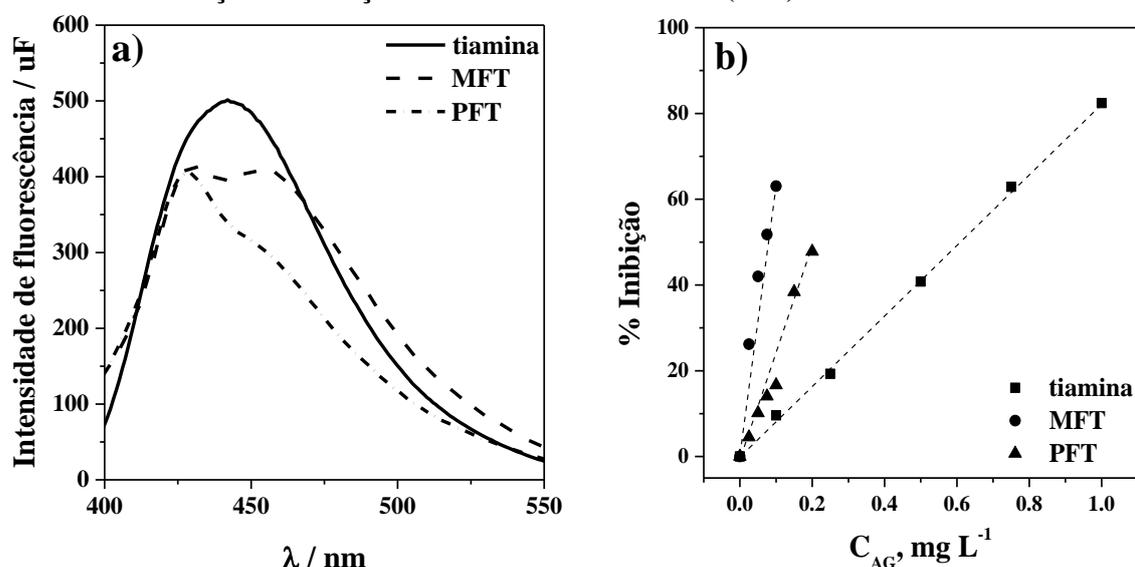
Figura 3.13 – Estruturas das tiaminas e respectivo tiocromo dos derivados da tiamina avaliadas.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

O perfil espectral em função da formação do tiocromo gerados após a reação de oxidação foi avaliado para verificar possíveis diferenças, como observado na Figura 3.14a. O espectro do tiocromo gerado a partir da oxidação da tiamina apresentou uma banda com emissão máxima em 440 nm. Contudo, quando se emprego MFT e PFT se observou bandas com máximos em 430 e 455 nm, respectivamente. Desta forma, observou-se que a intensidade dos sinais de fluorescência seguiu a seguinte ordem: tiamina > MFT > PFT.

Figura 3.14 – Avaliação da metodologia proposta empregando diferentes tiaminas. Sendo: a) Espectros de emissão dos respectivos tiocromo formados e b) Curvas analíticas em função da inibição do sinal de fluorescência (%I_F).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

Foram construídas curvas analíticas com as espécies avaliadas empregando como parâmetro a inibição (%I_F) do sinal de fluorescência (uF) em função da concentração de ácido gálico no meio (Figura 3.14b). Para estas curvas foram obtidas as seguintes equações:

$$\%I_{\text{tiamina}} = 82(\pm 1)C_{\text{AG}} + 0,52 (\pm 0,70), r = 0,9995$$

$$\%I_{\text{MFT}} = 607 (\pm 75)C_{\text{AG}} + 6,3 (\pm 4,6), r = 0,9777$$

$$\%I_{\text{PFT}} = 248 (\pm 20)C_{\text{AG}} + 2,4 (\pm 2,1), r = 0,9847$$

Para a escolha da tiamina a ser utilizada nas próximas etapas considerou-se os seguintes parâmetros: *i*) sensibilidade; *ii*) faixa linear; *iii*) coeficiente de correlação linear e *iv*) custo. A sensibilidade (coeficiente angular) é um parâmetro diretamente relacionado a faixa linear da curva analítica, pois um elevado coeficiente angular, em geral, corresponde a uma menor faixa de trabalho. Outro parâmetro que pode ser afetado é a correlação linear, visto que o erro aleatório associado as maiores diluições corroboram para a diminuição da precisão. Para as próximas avaliações foi estabelecida a utilização da tiamina, pois apesar de apresentar a menor sensibilidade, a curva realizada com este composto obteve a maior faixa linear, fornecendo uma maior faixa de trabalho para a aplicação da metodologia, e desta forma, evitando elevadas diluições das amostras. Além disso, a tiamina é o que possui o menor custo, visto que o preço por 1 g seria da ordem de R\$ 2,70 (tiamina); R\$ 27 (MFT) e R\$ 40 (PFT) (SIGMA ALDRICH,

2016), facilitando a aplicação da metodologia para a avaliação da qualidade de alimentos e bebidas.

3.4 Conclusões

O método proposto possibilitou a determinação espectrofluorimétrica da capacidade antioxidante em amostras de bebidas, empregando a inibição da formação do tiocromo, derivado da oxidação da tiamina (vitamina B₁) por K₃Fe(CN)₆.

O método mostrou-se rápido, simples, instrumentação disponível, empregou-se moléculas biológicas, o ponto final da reação foi bem estabelecido, e realizado em condições próximas a fisiológica corroborando com os requisitos apontados por Prior e colaboradores (2005).

A capacidade de inibição do sinal relativo à formação do tiocromo foi avaliada frente a sete substâncias, onde foi observado que o menor EC₅₀ foi para ácido gálico, quercetina, ácido ascórbico, cisteína, Trolox, BHT e glicose, nesta ordem.

A aplicação do método proposto para determinação da capacidade antioxidante de amostras de vinhos (tinto e branco), chás e infusões, a metodologia apresentou boa correlação com os resultados obtidos pelos métodos de Folin–Ciocalteu e ABTS, e baixa correlação com os resultados do método do DPPH.

Vale salientar que os aditivos e conservantes utilizados nas amostras analisadas podem interferir nos resultados obtidos. Dentre eles, destacam-se os agentes sulfitantes que atuam como conservante diversos tipos de alimentos e bebidas, atuando inclusive, como antioxidante (MACHADO, 2007; GARAGUSO; NARDINI, 2015). No Brasil, a concentração máxima de sulfito em amostras vinho é de 360 mg L⁻¹ (CNS, 1988), já na Europa as concentrações variam entre 100 e 200 mg L⁻¹ a depender do tipo do vinho (EUROPEAN UNION, 2009). Nesse sentido, a sensibilidade da metodologia aplicada para avaliação das amostras pode minimizar o efeito dos interferentes no meio, pois o fator de diluição da amostra é proporcional a sensibilidade da curva analítica. Assim, a metodologia proposta destaca-se em comparação aos métodos avaliados (Folin-Ciocalteu, ABTS e DPPH). Como pode se observar, o fator de diluição do método proposto > ABTS > DPPH > FC.

A glicose não foi eficiente frente a metodologia proposta, desta forma, não há interferência significativa deste carboidrato na análise da C_{AO} em amostras de bebidas.

Nas condições otimizadas em tampão carbonato (pH 8,0) o método apresentou faixa linear de trabalho de 0,025 a 0,3 mg L⁻¹ em equivalente de AG, LOD (3σ) de 0,008 mg L⁻¹,

LOQ (10σ) de $0,025 \text{ mg L}^{-1}$ com $\text{RSD} \leq 3,4 \%$, enquanto que para o tampão fosfato (pH 7,4) a faixa linear foi de $0,005$ a $0,025 \text{ mg L}^{-1}$, LOD (3σ) de $0,002 \text{ mg L}^{-1}$, LOQ (10σ) de $0,006 \text{ mg L}^{-1}$ com $\text{RSD} \leq 7,1 \%$. Para os dois sistemas observou-se uma boa precisão analítica. Desta forma, a depender da aplicação ambos os sistemas podem ser empregados para determinação da capacidade antioxidante de amostras e/ou sistemas de interesse.

3.5 Perspectivas

Abaixo são apresentadas algumas perspectivas futuras para este trabalho:

- i)* aumentar o número de compostos avaliados no ensaio de reatividade de substâncias antioxidantes no sistema em tampão carbonato. Para tanto, devem ser incluídos compostos como rutina, ácido tânico, glutathiona, sulfito de sódio, entre outros.
- ii)* realizar ensaios de reatividade de compostos antioxidantes para o método otimizado em tampão fosfato;
- iii)* aplicar/aumentar o número e a variedade de amostras analisadas. Expandir o universo de amostras tais como: cervejas, café, extratos de própolis, fármacos, entre outras.
- iv)* Avaliar e otimizar as condições reacionais explorando a (bio)sonda derivada da tiamina e seus derivados fosforilados frente a diferentes sistemas oxidantes como complexos ferro(II) com H_2O_2 e peroxinitrito (ONOO^-).
- v)* avaliar a interação entre os radicais e oxidantes mais promissores com antioxidantes (naturais e sintéticos) e fármacos (anti-inflamatórios, por exemplo).
- vi)* Avaliar a influência de diferentes solventes orgânicos, bem como o teor destes nos sistemas otimizados.

REFERÊNCIAS

- ABDERRAHIMA, M.; ARRIBASB, S. M.; CONDEZO-HOYOS, L. A novel high-throughput image based rapid Folin-Ciocalteu assay for assessment of reducing capacity in foods. **Talanta**, v. 152, p. 82-89, 2016.
- ALAEI-SHAHMIRI, F. et al. The impact of thiamine supplementation on blood pressure, sérum lipids and C-reactive protein in individuals with hyperglycemia: a randomised, double-blind cross-over trial. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 9, p. 213–217, 2015.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p.2202-2210, 2010.
- ALVES, E. R. et al. **Determinação de açúcares redutores totais empregando sistemas de análises por injeção em fluxo: aplicação a amostras de relevância suco-alcooleira.** Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2005.
- BETTENDORFF, L.; WINS, P. Thiamin diphosphate in biological chemistry: new aspects of thiamin metabolism, especially triphosphate derivatives acting other than as cofactors. **FEBS Journal**, v. 276, p. 2917–2925, 2009.
- CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE (CNS). Resolução nº 4, de 24 de novembro de 1988. Aprova a revisão das Tabelas I, III, IV e V referente a Aditivos Intencionais, bem como os Anexos I, II, III e VII, todas do Decreto n.º 55.871, de 26 de março de 1965. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 de dezembro, 1988. Disponível em: <<https://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelink.php?numlink=1-185-34-1988-11-24-4>>. Acesso em: 29 ago. 2015.
- BUBESHKO, N. N.; STSIAPURA, V. I.; STEPURO I. I. Fluorescent properties of thiochrome in solvents of different polarity. **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 78, p. 337, 2011.
- BUSBEE, B. D.; OBARE, S. O.; MURPHY, C. J. An Improved Synthesis of High-Aspect-Ratio Gold Nanorods. **Advanced Materials**, v. 15, n.5, p. 414–416, 2003.
- CARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, p. 41–60, 2009.
- CARVALHO, J. C. V.; GOSMANN, G.; SHENKEL, E. P. **Compostos Fenólicos Simples e Heterosídicos. Farmacognosia da planta ao medicamento.** 5. ed. Porto Alegre: Editora UFSC/ Editora UFRSG, 2004.
- CÉSAR, D. S. et al. Fenoldopam: Novo Antihipertensivo Parenteral; Alternativa ao Nitroprussiato?. **Revista Brasileira Anestesiologia**, v. 51, n. 6, p. 528-536, 2001.

- ÇİFTÇİA, G. Y. et al. First paraben substituted cyclotetraphosphazene compounds and DNA interaction analysis with a new automated biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 80, p. 331–338, 2016.
- COELHO, L. S. et al. Deficiência de tiamina como causa de cor pulmonale reversível. **Sociedade Brasileira de Cardiologia, Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 91, n. 1, São Paulo, 2008.
- 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, p. 249-252, 2014.
- COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 4. ed. São Paulo: Manole, 2012.
- 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.
- EUROPEAN UNION. European Commission Regulations, Ruling n. 606 of July 10, 2009. laying down certain detailed rules for implementing Council Regulation (EC) No 479/2008 as regards the categories of grapevine products, oenological practices and the applicable restrictions. **Official Journal of the European Communities L**, v. 193, p. 26-31, 2009.
- FUJIWARA, M.; MATSUI, K. Determination of Thiamine by the Thiochrome Reaction. **Analytical Chemistry**, v. 25, n. 5, p. 810-812, 1953.
- GARAGUSO, I; NARDINI, M. Polyphenols content, phenolics profile and antioxidant activity of organic red wines produced without sulfur dioxide/sulfites addition in comparison to conventional red wines. **Food Chemistry**, v. 179, p. 336–342, 2015.
- GIBSON, G. E.; ZHANG, H. Interactions of oxidative stress with thiamine homeostasis. **Neurochemistry International**, v. 40, n. 6, p. 493–504, 2002.
- 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.
- HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2001.
- 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.
- KARAÇELİKA, A. et al. Antioxidant components of *Viburnum opulus* L. determined by on-line HPLC–UV–ABTS radical scavenging and LC–UV–ESI–MS methods. **Food Chemistry**, v. 175, p.106-114, 2015.
- KÖSE, D. A.; ZUMREOĞLU-KARAN, B.; SAHİN, O.; BÜYÜKGÜNGÖR, O. Boric acid complexes with thiamine (vitamin B1) and pyridoxine (vitamin B6). **Inorganica Chimica Acta** v. 413, p.77–83, 2014.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3. ed. Baltimore: Springer, 2006.

LIDDICOAT, C. et al. Thiamin analysis in red wine by fluorescence reverse phase-HPLC. **Food Chemistry**, v. 177, p. 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, p. 57-61, 2011.

LOPES, R. L.; PINTO, D. C. A.; SILVA, M. S. Horseradish peroxidase (HRP) as a tool in green chemistry. **Royal Society of Chemistry Advances**. v. 4, p. 37244-37265, 2014.

MARTELL, A. E.; SMITH, R. M. **Critical stability constants**. v. 5, first suppl. New York: Plenum Press, 1982.

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.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5.ed. São Paulo: Sarvier, 2011.

PIERRE, J. L.; FONTECAVE, M. Iron and activated oxygen species in biology: The basic chemistry. **BioMetals**, v. 12, p.195–199, 1999.

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.

RAJ, A. G.; DANIEL, G. S. Static quenching of ruthenium(II)-polypyridyl complexes by gallic acid and quercetin in aqueous and micellar media. **International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy**, v. 32, p. 21–31, 2014.

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.

SCHOONEN, J. W.; SALES, M. G. F. Determination of polyphenols in wines by reaction with 4-aminoantipyrine and photometric flow-injection analysis. **Anal Bioanal Chem**, v. 372, p. 822–828, 2002.

SEBRELL, W. H.; HARRIS, R. S. **The vitamins: chemistry, physiology, pathology, methods**. 2.nd. ed. London: Academic Press, 1972. v. 5.

SHAHABADI, N.; KHORSHIDI, A.; MOGHADAM, N. H. Study on the interaction of the epilepsy drug, zonisamide with human serum albumin (HSA) by spectroscopic and molecular

docking techniques. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 114, p. 627–632, 2013.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo: Thomson, 2006.

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.

TOLEDO, M. C. F. **Determinação dos níveis de sulfitos em vinhos e em sucos de frutas e estimativa de sua ingestão**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

TORCHIO, F. et al. Influence of different withering conditions on phenolic composition of Avanà, Chatus and Nebbiolo grapes for the production of ‘Reinforced’ wines. **Food chemistry**, v. 194, p. 247-256, 2016.

VERLOOP, A. J. W. et al. Altering the phenolics profile of a green tea leaves extract using exogenous oxidases. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1197-1206, 2016.

VIÑAS, P. et al. Flow-Injection Fluorimetric Determination of Thiamine in Pharmaceutical Preparations. **Mikrochim. Acta**, v. 134, p. 83-87, 2000.

WARREN, J. J.; MAYER, J. M. Predicting organic hydrogen atom transfer rate constants using the Marcus cross relation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 12, 5282–5287, 2009.

YU, Y.; CHING Y. J.; TAN Y.N. A Simple and Fast Fluorimetric Method for Thiamine (Vitamin B1) Detection by Au³⁺-Mediated Formation of Thiochrome. **Austin Journal of Biosensors & Bioelectronics**, v. 1, n. 1, p. 1004-1008, 2015.

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.

4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS

4.1 Introdução

Os produtos naturais constituem uma importante fonte de compostos ativos, com diversidade estrutural e propriedades biológicas, sendo fundamentais para o desenvolvimento de novos fármacos aplicáveis a uma grande variedade de doenças humanas, incluindo as cardiovasculares como o infarto agudo do miocárdio (IAM) (LI et al., 2014). Estima-se que 64% de todos os medicamentos possuem em sua composição algum produto natural não modificado ou sintetizado a partir destes (VALLI et al., 2013).

A própolis é uma substância natural resinosa produzida pelas abelhas *Apis mellífera* com a finalidade de selar os buracos da colmeia protegendo-a contra a entrada de eventuais predadores. Ela é obtida a partir de diferentes fontes vegetais como brotos, botões florais e exsudatos resinosos (BANKOVA, 2005). Por ser derivada de material vegetal coletado pelas abelhas, a resina é constituída pela cera de abelha e outros componentes como açúcares, aminoácidos e pólen (SALATINO et al., 2005).

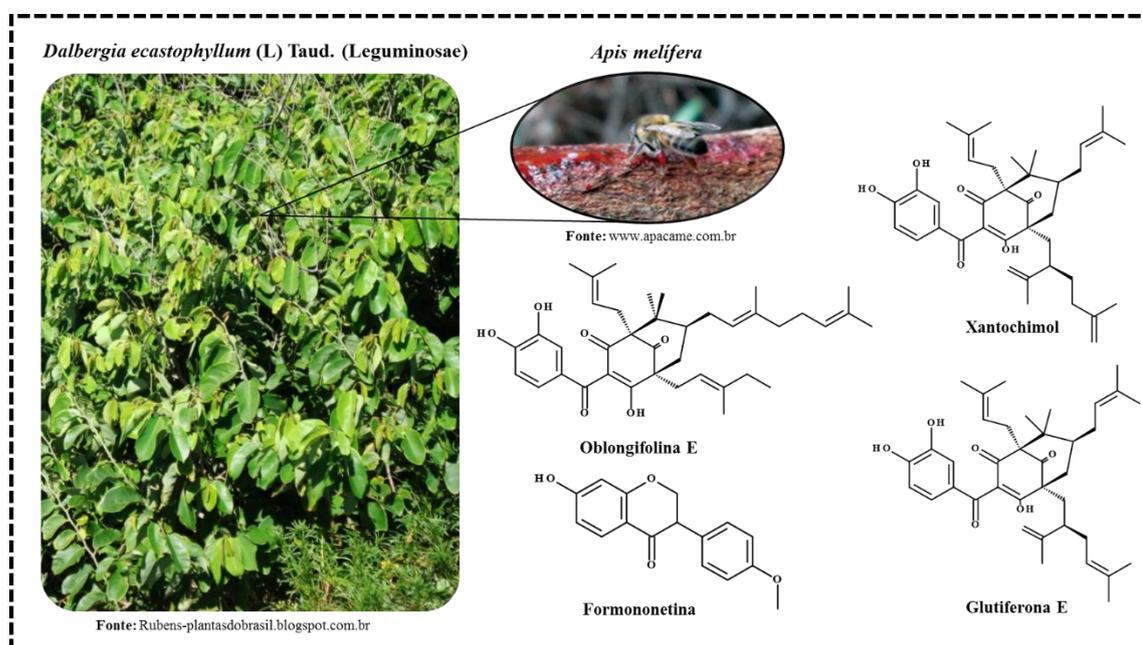
Frequentemente também são encontrados compostos voláteis e fenólicos em sua composição. Assim, o perfil químico da própolis depende da vegetação localizada no entorno das colmeias (SALATINO et al., 2005). Esta substância, tem sido utilizada em muitos países na medicina popular e como fonte de alimento. A sua composição complexa com uma ampla variedade de compostos biologicamente ativos tem sido reportada na literatura.

No Brasil são encontrados 13 tipos de própolis que são classificados conforme a sua origem geográfica, composição química e origem vegetal. A própolis vermelha pertence ao 13º grupo sendo apresentada nos manguezais do nordeste brasileiro (PARK et al., 2002). Este tipo de própolis é produzido a partir do exsudato do caule da espécie *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taud. (Leguminosae) (Figura 4.1).

A sua coloração característica deve-se a presença de dois pigmentos retusapurpurinas A e B (PICCINELLI et al., 2011; SILVA, 2008). À própolis vermelha foi atribuída a presença de compostos bioativos nunca antes encontrados em outros tipos de própolis estudados (ALENCAR et al., 2007). A sua composição química tem como característica a presença de flavonoides (flavonas, flavanonas, flavanois, isoflavonoides e chalconas) e ácidos fenólicos (FROZZA et al., 2013). De forma geral, a formononetina é um dos compostos mais abundantes neste tipo específico de própolis. Estudos identificaram a presença dos compostos gutiferona

E, oblongifolina A e xantochimol em amostras de própolis vermelha de Alagoas (Figura 4.1). Estes compostos nunca antes encontrados em amostras de própolis vermelha foram caracterizados como novos marcadores químicos (LOPÉZ et al., 2014; PICCINELLI et al., 2011; TRUSHEVA et al., 2006). Assim, devido as suas características únicas, a própolis vermelha de Alagoas foi identificada geograficamente pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) sendo a única própolis com certificação de origem no Brasil (LÓPEZ et al., 2014; SEBRAE, 2012).

Figura 4.1 – Abelha da espécie *Apis mellifera* coletando o exsudato do caule da espécie *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taud. (Leguminosae) e estruturas dos marcadores químicos da própolis vermelha de Alagoas.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

Estudos vêm atribuindo à própolis vermelha de Alagoas e do nordeste brasileiro uma grande variedade de atividades biológicas, como antimicrobiana (CUSHNIE; LAMB, 2005), antiparasitária (DA SILVA et al., 2008), antiviral (ALVES, 2006), cardioprotetora (GELEIJNSE; HOLLMAN, 2008), hipoglicemiante (CAZAROLLI, 2008), antibacteriana (CABRAL et al., 2009; LUSTOSA et al., 2008), antifúngica (YANG et al., 2011), anti-herpes, antiviral, anti-HIV, cicatrizante, anti-inflamatória, antitumoral, antioxidante, dentre outras (DIAZ-CARBALLO et al., 2008; NAITO et al., 2007; TORETI et al., 2013). Estas atividades biológicas são diretamente relacionadas à sua composição química complexa, rica em compostos antioxidantes que podem agir em sinergismo, inibindo os danos causados pelo estresse oxidativo.

O estresse oxidativo tem sido relacionado a uma variedade de patologias, dentre elas, as doenças cardiovasculares, apontadas como uma das maiores causadoras de morte no mundo. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que cerca de 7,4 milhões de pessoas morreram em decorrência do infarto agudo do miocárdio (IAM) em 2012 (WHO, 2014). No Brasil, o IAM é a principal causa de morte, sendo responsável por 100 mil mortes no ano de 2014 (DATASUS, 2014).

Inúmeros fatores contribuem para a ocorrência do IAM, estes podem ser divididos em três categorias: (i) fatores de risco não modificáveis como idade, sexo e histórico familiar; (ii) fatores modificáveis como inatividade física, alcoolismo, tabagismo, má alimentação, hipertensão, diabetes, dislipidemias e síndrome metabólica; e (iii) fatores de risco emergentes, dentre eles, calcificação arterial coronariana (CAC), fibrogênio, lipoproteína de baixa densidade (LDL), dentre outros (BOATENG; SANBORN, 2013).

O IAM ocorre devido a um processo de isquemia prolongada (diminuição ou suspensão da irrigação sanguínea causada por obstrução arterial ou por vasoconstrição) causando necrose do miocárdio (LI et al., 2012). Esta patologia geralmente ocorre através de trombose e/ou vasoespasmos em decorrência da presença de uma placa aterosclerótica que é gerada pelo ataque de espécies reativas, especialmente de nitrogênio (derivadas do $\bullet\text{NO}$) causando a disfunção endotelial (PINHO et al., 2009). Esse processo causa o desequilíbrio da concentração de oxigênio demandada e ofertada ao coração (DAVIES, 2000; SBC, 2009).

O desequilíbrio do suprimento de oxigênio e de nutrientes no sistema cardiovascular, aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), como H_2O_2 e ONOO^- , sobrecarregando as defesas antioxidantes endógenas. Este desbalanço redox pode causar danos irreversíveis devido ao ataque de proteínas, carboidratos, fosfolipídios de membrana e DNA pelas espécies reativas (QIN; YAP; WOODMAN, 2009).

Alguns marcadores bioquímicos retratam a incidência do infarto agudo do miocárdio e são utilizados para diagnosticá-lo. Dentre os (bio)marcadores destacam-se as enzimas creatinoquinase em sua fração total (CK-NAC) e, em sua fração MB (CK-MB). O aumento da concentração plasmática dessas enzimas é um indicativo da ocorrência de lesão cardíaca. Contudo, a diminuição dos níveis dessas enzimas pode indicar o efeito cardioprotetor (THOMES et al, 2010).

Com base nas informações apresentadas quanto a composição química e atividades biológicas associadas à própolis vermelha de Alagoas, CLEMENTINO-NETO (2015) decidiu

avaliar a capacidade cardioprotetora do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha de Alagoas (EHAPV) em ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) induzidos ao infarto com isoproterenol.

Neste estudo, os animais avaliados foram separados em cinco grupos: controle (tratados com solução salina via oral por 30 dias); grupo ISO (infartados com isoproterenol) e os grupos dos animais tratados com soluções de EHAPV a 50, 75 e 150 mg kg⁻¹ por 30 dias e em seguida eutanasiados. Ao final do tratamento, os grupos foram submetidos a testes *post mortem*, dentre eles, foram avaliadas as taxas séricas das enzimas CK-NAC e CK-MB dos animais tratados com o EHAPV confrontando os resultados com os grupos controle. Nos grupos tratados com as diferentes doses do extrato, observou-se diminuição significativa e dose-dependente dos níveis séricos de CK-NAC e CK-MB, quando comparados ao grupo dos animais induzidos ao infarto, sugerindo desta forma que o EHAPV nas três doses, interferiu no processo de degeneração celular, protegendo os cardiomiócitos. A avaliação de outros biomarcadores do IAM, a análise morfométrica e morfológica dos corações dos animais corroboraram com o resultado descrito (CLEMENTINO-NETO, 2015).

Com base nos resultados apresentados acima, buscou-se uma avaliação mais detalhada do extrato utilizado no estudo, para isto, firmou-se uma parceria entre o Laboratório de Farmacologia Cardiovascular (LFC), Laboratório de Análises Farmacêuticas e Alimentícias (LAFA) e o Laboratório de Desenvolvimento e Instrumentação em Química Analítica (LINQA) da Universidade Federal de Alagoas, onde investigou-se o perfil fitoquímico e a capacidade antioxidante do EHAPV a fim de tentar relacionar a capacidade cardioprotetora em função de parâmetros antioxidantes.

4.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a concentração de compostos fenólicos totais do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha de Alagoas (EHAPV) empregando o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu;
- b) Avaliar a capacidade antioxidante do EHAPV frente a espécies reativas de nitrogênio em meio hidro e lipofílico através dos métodos do ABTS^{•+} e DPPH[•] comparando-o com diferentes padrões antioxidantes;
- c) Comparar a capacidade de sequestro do radical óxido nítrico ([•]NO) do extrato avaliado com substâncias antioxidantes;
- d) Avaliar a capacidade de redução de íons Fe(III) do extrato e dos padrões empregando o método do azul da Prússia;

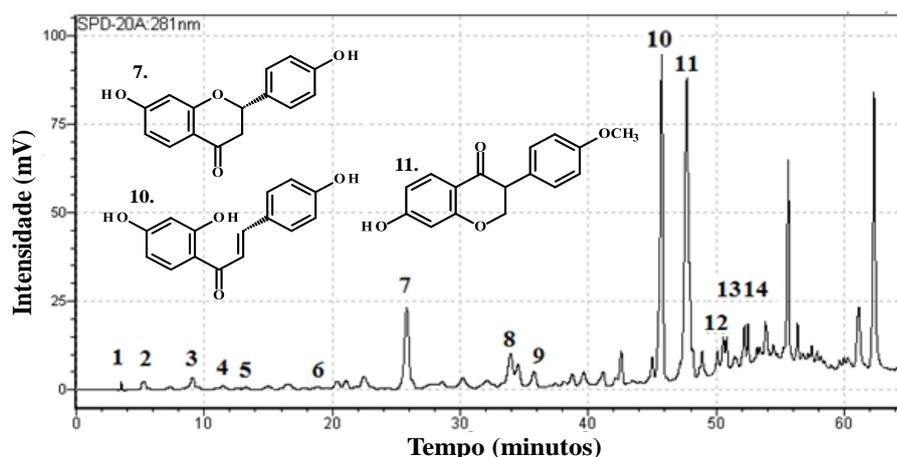
- e) Determinar a capacidade de complexação de íons Fe(II) do extrato, comparando-o com padrões antioxidantes e ácido etilenodiaminatetracético (EDTA);
- f) Correlacionar os resultados obtidos com a capacidade cardioprotetora apresentada em ratos tratados com o EHAPV induzidos ao infarto com isoproterenol.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Seleção dos padrões antioxidantes: aspectos preliminares

O grupo coordenado pelo Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento (LAF/UFAL), investigou o perfil fitoquímico do EHAPV por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) onde identificou-se a presença de 14 substâncias diferentes (Figura 4.2), dentre elas, flavonoides, como a catequina, epicatequina, rutina e quercetina, luteolina, crisina, formononetina, biochanina A, liquiritigenina, pinocembrina e a isoliquiritigenina, além de alguns ácidos fenólicos como os ácido cafeico, ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico. Os flavonoides em geral, são mais presentes que os ácidos fenólicos. Os constituintes majoritários identificados foram: isoliquiritigenina, formononetina e liquiritigenina. A Figura 4.2 apresenta os resultados obtidos neste estudo.

Figura 4.2 – Cromatograma do EHAPV a 1 mg mL⁻¹, sendo: 1. catequina (3 min), 2. epicatequina (4 min), 3. ácido cafeico (9 min), 4. ácido *p*-cumárico (11 min), 5. ácido ferúlico (13 min), 6. rutina (18 min), 7. liquiritigenina (26 min), 8. quercetina (34 min), 9. luteolina (35 min), 10. isoliquiritigenina (48 min), 11. formononetina (47 min), 12. pinocembrina (50 min), 13. biochanina A (51 min) e 14. crisina (52 min).



Fonte: Adaptado de CLEMENTINO-NETO, 2015.

A composição rica em flavonoides e ácidos fenólicos é um forte indício de que a atividade cardioprotetora associada ao extrato estudada por CLEMENTINO-NETO (2015) poderia estar associada ao mecanismo por uma via antioxidante.

Estudos mostram que a presença de compostos como a epicatequina e os ácidos fenólicos *p*-cumárico e ferúlico potencializam o efeito cardioprotetor, pois inibem a ação dos radicais no meio intracelular (PRINCE, 2013; PRINCE; ROY, 2013; YOGEEETA et al., 2006). A quercetina atua na cardioproteção diminuindo a concentração de produtos decorrentes da peroxidação lipídica e dos biomarcadores enzimáticos do infarto agudo do miocárdio (MADHESH; VAIYAPURI, 2013; PRINCE; SATHYA, 2012). O ácido cafeico apresenta atividade antiarrítmica, inibindo a entrada de íons cálcio e sódio na célula cardíaca (CHANG et al., 2013). A formononetina, um dos constituintes majoritários do EHAPV, previne alterações eletrocardiográficas, reduz os níveis dos biomarcadores do infarto e inibe apoptose celular (ZHANG et al., 2011).

Com base no que foi exposto, avaliou-se a capacidade antioxidante do extrato hidroalcolico da própolis vermelha de Alagoas empregando diversos métodos já estabelecidos na literatura. Os métodos foram selecionados com a finalidade de avaliar: (i) a concentração de fenólicos totais, (ii) sua capacidade de sequestrar (*scavenger*) espécies reativas de nitrogênio e (iii) capacidade de reduzir e complexar com íons férricos e ferrosos, respectivamente, os quais podem atuar como catalizadores na geração de espécies reativas meio celular.

Para esta avaliação foram escolhidos três compostos como padrões de referência antioxidante de diferentes classes e grau de hidrofobicidade. Desta forma, dois padrões foram selecionados em função de suas características cardioprotetoras já descritas na literatura e presentes na amostra analisada, que foram o ácido cafeico (AC) (ácido fenólico) e a quercetina (QC) (flavonoide). Buscando um composto de hidrofobicidade intermediária optou-se pelo Trolox (TR), que é um mimético da vitamina E, tradicionalmente utilizado para determinação da capacidade antioxidante.

4.3.2 Avaliação da capacidade antioxidante do EHAPV

4.3.2.1 Fenólicos totais

A determinação de fenólicos (FT) totais do extrato foi obtida a partir do método de Folin-Ciocalteu, e os resultados expressos em equivalentes dos padrões (mg g⁻¹ de EHAPV) utilizados. Somente nesta etapa do estudo, o ácido gálico (AG) foi incluído como padrão por se

amplamente empregado para determinação de FT, possibilitando a devida comparação com os resultados já apresentados na literatura.

Para a avaliação, foram construídas curvas de analíticas através da variação da concentração dos padrões aplicados em função do sinal de absorvância. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.3. A partir das curvas apresentadas se obteve as seguintes equações:

$$A_{770 \text{ nm}} = 0,041 (\pm 0,001)C_{\text{QC}} + 0,01(\pm 0,01), r = 0,9982$$

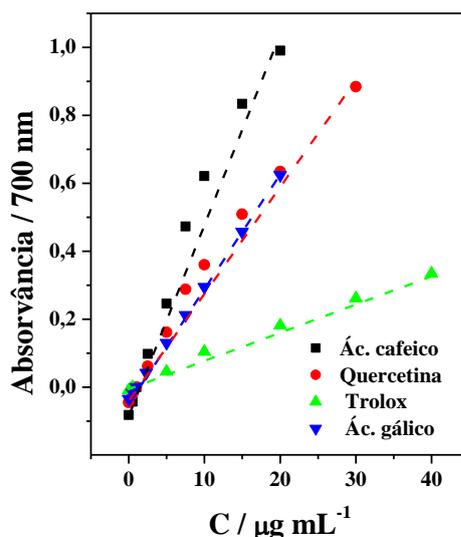
$$A_{770 \text{ nm}} = 0,072 (\pm 0,002)C_{\text{AC}} + 0,01(\pm 0,01), r = 0,9984$$

$$A_{770 \text{ nm}} = 0,009 (\pm 0,001)C_{\text{TR}} + 0,01(\pm 0,01), r = 0,9970$$

$$A_{770 \text{ nm}} = 0,033 (\pm 0,001)C_{\text{AG}} + 0,009(\pm 0,001), r = 0,9998$$

onde $A_{770 \text{ nm}}$, corresponde a absorvância em 770 nm e C a concentração do respectivo compostos fenólicos utilizado.

Figura 4.3 – Curvas analíticas dos padrões para determinação de fenólicos totais.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

Os resultados obtidos em equivalentes dos padrões para o extrato de própolis analisado (mg g^{-1} EHAPV) foram: 110,6 (QU); 63,1 (AC); 494,4 (TR) e 134,5 (AG). As diferenças observadas entre os padrões devem-se a eficiência e características químicas apresentada por eles quanto a redução do reagente de Folin-Ciocalteu no processo de transferência de elétrons. A sensibilidade (S , $\mu\text{A mg}^{-1} \text{L}$) da curva de analítica foi diretamente proporcional à efetividade do composto empregado frente ao método empregado. Desta forma, a eficiência dos padrões empregados obedeceu a seguinte ordem: TR ($S = 0,009$) < AG ($S = 0,033$) < AC ($S = 0,041$) < QC ($S = 0,072$).

De forma geral, os resultados relativos a concentração de fenólicos totais obtidos a partir de diferentes trabalhos variam consideravelmente. Isto ocorre devido às variadas condições climáticas e geográficas que influenciam diretamente na vegetação que serve como fonte de matéria prima para produção da própolis pelas abelhas (SALATINO et al., 2005). Além, do protocolo experimental empregado para aplicações do método analítico.

4.3.2.2 Capacidade de sequestro dos radicais ABTS^{•+} e DPPH[•]

Para avaliar o potencial do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha de Alagoas frente a espécies reativas de nitrogênio, foram empregados os métodos do ABTS^{•+} e DPPH[•] que avaliam o potencial antioxidante da amostra em meio hidrofílico e lipofílico, respectivamente. Para esses ensaios foram empregados somente quercetina, Trolox e ácido cafeico como padrões e os resultados foram expressos como EC₅₀ (concentração necessária para sequestrar 50% do radical empregado ou gerado) a partir das equações obtidas pelas curvas analíticas. Para analisar a eficiência do extrato em relação aos padrões, foram avaliadas as razões entre as sensibilidades das curvas de calibração dos padrões e do extrato ($R = S_{\text{padrão}} / S_{\text{EHAPV}}$) e os valores de EC₅₀ (Tabela 4.1).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 4.1 pôde-se constatar que o EHAPV apresentou uma boa capacidade antioxidante frente ao radical ABTS^{•+}, sendo um pouco mais eficiente que o Trolox (~9%). Este resultado é muito promissor visto que por trata-se de um extrato, a concentração dos compostos é menor em relação ao padrão, o que se levar em conta a hipótese de sinergismos entre os mesmos. Comparando os valores de sensibilidade e de EC₅₀ obtidos observou-se que a quercetina foi o composto de maior capacidade antioxidante (sequestro do radical) sendo ~5 vezes mais eficiente que o EHAPV. Quando comparado ao ácido cafeico, o extrato foi de cerca de 2 vezes menos efetivo que o padrão.

Os resultados obtidos para o ensaio de capacidade de sequestro do radical DPPH[•] mostraram que a capacidade antioxidante dos padrões seguiu a mesma tendência apresentada para o ensaio do ABTS^{•+}, no entanto, o extrato não foi tão eficiente frente a segunda ERN avaliada. Para esta metodologia a capacidade antioxidante das espécies avaliadas obedeceu a seguinte sequência de EC₅₀: QC < AC < TR < EHAPV.

Tabela 4.1 – Curvas analíticas dos padrões e do extrato para determinação da capacidade de sequestro de ABTS^{•+} e DPPH[•].

| Padrões e Amostra | ABTS ^{•+} | | | | DPPH [•] | | | |
|-------------------|---|--------|------|---|--|--------|------|---|
| | Curva analítica $%I = aC_{AO} + b$ | r | R | EC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Curva analítica $%I = aC_{AO} + b$ | r | R | EC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) |
| QC | $%I = 28,46 (\pm 1,20)C_{QC} + 1,2 (\pm 0,21)$ | 0,9971 | 5,04 | 1,71 | $%I = 18,69 (\pm 1,07)C_{QC} + 1,94 (\pm 1,56)$ | 0,9918 | 10,0 | 2,57 |
| AC | $%I = 12,24 (\pm 0,24)C_{AC} + 2,45 (\pm 0,78)$ | 0,9980 | 2,17 | 3,88 | $%I = 12,86 (\pm 0,33)C_{AC} + 0,43 (\pm 0,74)$ | 0,9980 | 6,91 | 3,85 |
| TR | $%I = 5,26 (\pm 0,13)C_{TR} - 0,48 (\pm 0,53)$ | 0,9977 | 0,93 | 9,60 | $%I = 7,80 (\pm 0,15)C_{TR} - 1,14 (\pm 0,61)$ | 0,9989 | 4,19 | 6,56 |
| EHAPV | $%I = 5,65 (\pm 0,13)C_{EHAPV} + 0,35 (\pm 1,11)$ | 0,9989 | - | 8,79 | $%I = 1,86 (\pm 0,087)C_{EHAPV} + 3,36 (\pm 1,37)$ | 0,9956 | - | 25,07 |

C_{AO} = concentração composto ou extrato antioxidante // $R = S_{\text{padrão}} / S_{\text{EHAPV}}$

Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

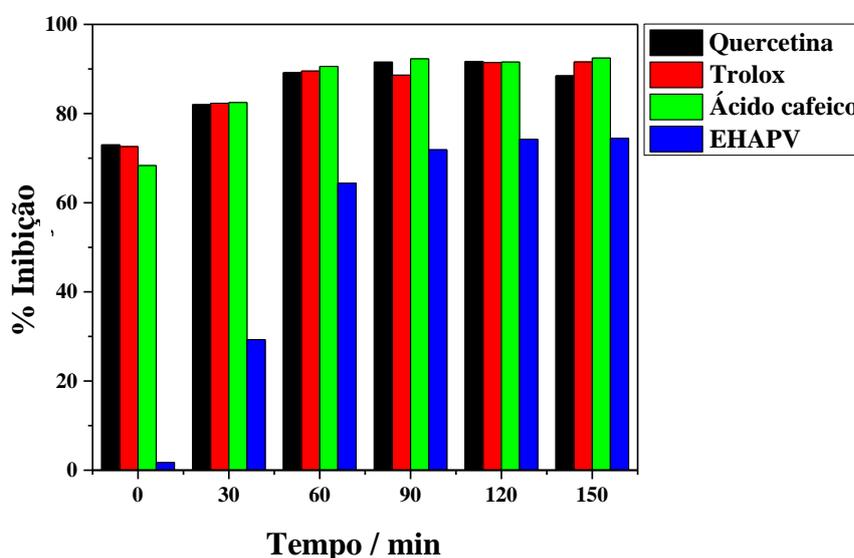
A capacidade antioxidante do EHAPV foi aproximadamente três vezes maior para o método do ABTS^{•+} em relação ao DPPH[•]. Desta forma, pode-se sugerir que a amostra avaliada continha uma maior abundância de compostos antioxidantes hidrofílicos (MAGALHÃES et al., 2008).

4.3.2.3 Capacidade de sequestro do radical óxido nítrico ([•]NO)

A capacidade de sequestro do radical [•]NO foi avaliada a partir da variação da inibição do radical gerado em função do tempo. Para este ensaio, foram empregados os mesmos padrões dos métodos dos radicais ABTS^{•+} e DPPH[•].

Como pode ser observado na Figura 4.4, a capacidade antioxidante dos compostos de referências seguiu o mesmo padrão, inibindo inicialmente ~70% do radical gerado e atingindo patamar de aproximadamente 90% de inibição a partir de 60 min de ensaio. A capacidade sequestrante do EHAPV aumentou significativamente nos 60 min iniciais, apresentando máxima inibição a partir de 90 min.

Figura 4.4 – Percentual de inibição do radical [•]NO pelos padrões e do EHAPV a 400 µg mL⁻¹.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

Apesar de apresentar um percentual de inibição máximo aproximadamente 20% menor em relação aos padrões analisados, o EHAPV mostrou-se eficiente frente ao [•]NO sendo capaz de inibir ~70% do radical gerado a partir de 90 min, sendo um indicativo da eficiência dos compostos que compõem a amostra analisada. Adicionalmente, não foram encontrados reportes

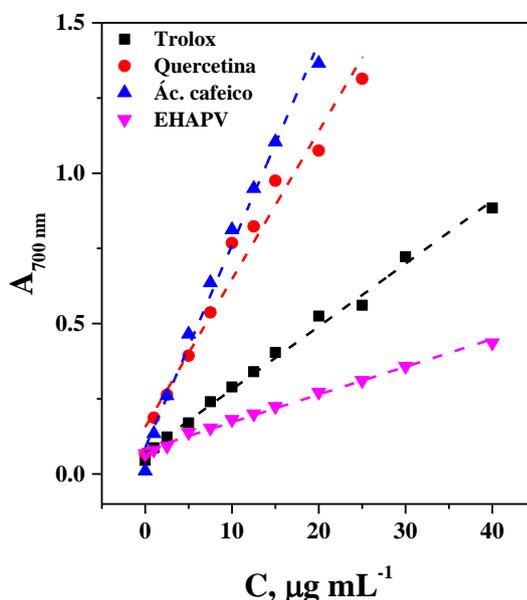
na literatura em relação a resultados deste ensaio com a própolis vermelha de Alagoas, a fim de se estabelecer uma comparação dos resultados.

A boa atividade antioxidante do extrato analisado frente ao óxido nítrico nas condições avaliadas (pH 7,4 e a 25 °C) pode estar associada ao efeito observado por CLEMENTINO-NETO (2015), pois o radical $\cdot\text{NO}$ gerado nas células danificadas pelo desequilíbrio da concentração de oxigênio pode se combinar com outras espécies e gerar produtos ainda mais danosos ao sistema cardiovascular dos animais submetidos ao tratamento. Logo, espécies capazes de sequestrar este radical podem atuar como cardioprotetoras.

4.3.2.4 Capacidade de redução de íons Fe(III)

A capacidade de redução de Fe(III) foi avaliada seguindo os mesmos critérios já mencionados nos métodos anteriores. No entanto, para este ensaio a sensibilidade das curvas analíticas foram empregadas para determinar a capacidade antioxidante dos padrões e do extrato. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.5.

Figura 4.5 – Curvas analíticas dos padrões e do extrato para determinação da capacidade de redução de íons Fe(III).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

A partir dos dados apresentados na Figura 4.6 foram obtidas as seguintes equações:

$$A_{700\text{nm}} = 0,050(\pm 0,002)C_{\text{Fe}(\text{red})} + 0,10(\pm 0,02), r = 0,9946 \quad (\text{QC})$$

$$A_{700\text{nm}} = 0,070(\pm 0,002)C_{\text{Fe}(\text{red})} + 0,09(\pm 0,03), r = 0,9947 \quad (\text{AC})$$

$$A_{700\text{nm}} = 0,020(\pm 0,001)C_{\text{Fe}(\text{red})} + 0,070(\pm 0,009), r = 0,9976 \quad (\text{TR})$$

$$A_{700\text{nm}} = 0,009(\pm 0,001)C_{\text{Fe}(\text{red})} + 0,080(\pm 0,004), r = 0,9970 \quad (\text{EHAPV})$$

onde $A_{700\text{ nm}}$, corresponde a absorvância em 700 nm e $C_{\text{Fe}(\text{red})}$ a concentração de ferro(III) reduzido a ferro(II). Neste estudo, pôde-se observar que o ácido cafeico foi o composto mais eficiente, seguido pela quercetina que apresentou uma sensibilidade 1,4 vezes menor, Trolox e por último, o extrato avaliado, que em relação ao padrão antecessor mostrou sensibilidade 55% menor.

A menor eficiência do EHAPV no ensaio deve-se a complexidade da amostra. Apenas os compostos com potencial de redução inferior a 0,36 V nas condições experimentais (pH = 6,6) reduziram o Fe(III). Este resultado é relevante no sentido da prevenção do efeito pró-oxidativo do extrato, visto que Fe(II) na presença de peróxido catalisa a geração do radical hidroxil, que é extremamente reativo e danoso às células (FIGUEIRA, et al., 2013).

4.3.2.5 Capacidade de complexação de íons Fe(II)

Para avaliação da capacidade de complexação de Fe(II) foram utilizados os mesmos padrões de antioxidantes empregados nos ensaios anteriores, com exceção do EDTA, que foi adicionado neste estudo como padrão de agente complexante. Os resultados obtidos através das curvas analíticas dos padrões e do extrato foram expressos através do EC_{50} (Tabela 4.2).

O ácido cafeico, a quercetina e o trolox não apresentaram atividade complexante significativa na faixa entre 2,5 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em concentrações muito elevadas, os compostos poderiam inibir a formação do complexo Fe(II)-TPZ em função do deslocamento de massa, acarretando em erro experimental. Desta forma, resultados com concentração muito elevadas dos antioxidantes não seriam relevantes, visto que, estes compostos devem ser ativos em baixas concentrações, em relação os parâmetros avaliados. Assim, o extrato foi comparado somente ao EDTA, como padrão.

Como pode ser observado na Tabela 4.2, o EHAPV apresentou capacidade de complexação de íons Fe(II). Contudo, o EC_{50} do extrato foi aproximadamente 61 vezes menor em relação ao EDTA.

Tabela 4.2 – Curvas analíticas dos padrões e do extrato para determinação da capacidade de complexação de íons Fe(II).

| Padrão e extrato | Faixa linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Curva analítica $\%I = aC_{\text{ligante}} + b$ | R | EC₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) |
|-------------------------|--|---|----------|---|
| EDTA | 2,5 – 17,5 | $\%I = 5,56(\pm 0,27)C_{\text{EDTA}} + 2,10(\pm 0,21)$ | 0,9943 | 7,3 |
| EHAPV | 2,5 – 500 | $\%I = 0,11(\pm 0,01)C_{\text{EHAPV}} + 4,07(\pm 2,03)$ | 0,9919 | 443,2 |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

A elevada diferença entre os resultados obtidos entre o extrato e o EDTA deve-se a complexidade da amostra onde os compostos capazes de complexar íons Fe(II) podem estar em baixas concentrações e ainda podem sofrer o efeito sinérgico. A presença de espécies complexantes na amostra, mesmo que em baixas concentrações, pode contribuir na inibição da geração de espécies reativas, pois reduz a concentração de Fe(II) disponível para catalisar a geração de radicais hidroxil através da reação de Fenton (FREIRES et al., 2016).

4.4 Correlação entre os resultados obtidos e os apresentados na literatura

De forma geral, os trabalhos encontrados na literatura que avaliam extratos hidroalcoólicos da própolis vermelha de Alagoas, retratam a capacidade antioxidante avaliando a concentração de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu e analisam a capacidade sequestradora do extrato frente à ERN através do método do DPPH[•]. O método do DPPH[•] é amplamente empregado neste tipo de amostra por ser realizado em meio orgânico, minimizando os problemas relativos a solubilidade e por ter boa sensibilidade e fácil execução, visto que o radical é disponível comercialmente (MAGALHÃES et al., 2008; PRIOR et al., 2005).

Diversos fatores influenciam na composição química da própolis, dentre eles, destacam-se os fatores externos, como o clima e a geografia do local onde há a produção da própolis analisada (SALATINO et al., 2005). Além dos aspectos apresentados anteriormente, as diferenças observadas podem ocorrer em função da variedade de procedimentos, equipamentos e adequações como: (i) preparo da amostra (ii) concentração dos reagentes, (iii) sequência e tempo de adição dos reagentes, (iv) tempo e temperatura de incubação, (v) volume final da mistura, (vi) conservação da amostra de própolis, (vii) forma e tempo de amostragem, dentre outros. Por estas razões, há uma grande variedade de dados apresentados em diferentes estudos, o que dificulta a sua comparação. Desta forma, para avaliação comparativa dos resultados obtidos, foi feita uma pesquisa de trabalhos publicados na literatura que determinaram a

capacidade antioxidante de extratos hidroalcoólicos da própolis vermelha de Alagoas e caracterizaram a amostra analisada empregando técnicas cromatográficas e de espectrometria de massas (Tabela 4.3).

Os perfis fitoquímicos dos extratos analisados nos trabalhos pesquisados variam consideravelmente. A liquiritigenina e a formononetina (considerada marcadora da própolis vermelha de Alagoas) foram identificadas na maioria dos trabalhos apresentados na Tabela 4.3.

A concentração de compostos fenólicos totais variou de 0,1585 a 416,31 mg g⁻¹ em equivalentes de ácido gálico. Além dos fatores apresentados anteriormente, a presença outras espécies como açúcares, por exemplo, interferem nos resultados obtidos, pois são capazes de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu impedindo a comparação direta entre os resultados obtidos neste trabalho e os dados apresentados na literatura.

Os extratos avaliados por Lopez (2014) e Mendonça e colaboradores (2015) apresentaram em sua composição a presença de quatro compostos em comum, glutiferona E, formononetina, diadzeína e o xantochimol. Pode-se destacar que dentre os demais compostos encontrados nestas amostras, vários são derivados destes. A similaridade entre essas amostras pode ser constatada nos resultados da capacidade antioxidante dos extratos frente ao radical DPPH• onde a diferença foi pequena nos valores de EC₅₀ encontrado em relação a este trabalho. O resultado encontrado por Hatano e colaboradores (2012) também foi similar, entretanto, o extrato utilizado não foi caracterizado.

O resultado da capacidade antioxidante da amostra analisada neste trabalho frente ao radical DPPH• apresentou maior similaridade com os resultados obtidos por Righi e colaboradores (2011). Esta similaridade pode estar relacionada à composição e à abundância dos compostos presentes nos extratos analisados. Comparando-se o perfil fitoquímico dos extratos avaliados nestes trabalhos, observa-se a presença de três compostos em comum, ácido cafeico, liquiritigenina e a isoliquiritigenina.

De forma geral, a composição química dos extratos analisados nos trabalhos apresentados possui uma grande variedade de compostos antioxidantes, principalmente flavonoides e ácidos fenólicos. Apesar de apresentar uma composição rica em compostos da mesma classe, as características destas espécies são bastante variadas. Assim, a avaliação da capacidade antioxidante e da atividade biológica de amostras complexas como a própolis vermelha, varia em função da composição da amostra avaliada.

Tabela 4.3 – Perfil fitoquímico e avaliação da capacidade antioxidante de EHAPV de Alagoas.

(Continua...)

| Composição solvente extrator | Extração (tipo) | Perfil fitoquímico | Técnica | Capacidade antioxidante | | | | Ref. |
|------------------------------|-----------------|---|--------------|-------------------------|-----------------------------|--------------|---|----------------------|
| | | | | Fenólicos totais | | DPPH | | |
| | | | | Padrão | Conc. (mg g ⁻¹) | Padrão | EC ₅₀ (µg mL ⁻¹) | |
| Etanol/água 80% (v/v) | Sólido/liquido | Éster dimetílico do ác. butanodióico; Ác. hidroxibutanodióico, <i>m</i> -guaiacol; metileugenol; metilo <i>o</i> -orselinato; metil <i>o</i> -orselinato; 1,2,3-trimetoxi-5-(2-propenil)-benzeno; Metoxieugenol; Ác. palmítico; Éster metílico do ácido 10-octadecenoico; Metil abietato; Ác. benzóico; Homopterocarpina; Medicarpina; 2,4,6-Trimetilfenol; 4',7-Dimetoxi-2'-isoflavonol; 7,4'-dihidroxiisoflavona; 2 <i>H</i> -1-Benzopirano-7-ol; 2,2,6-Beta-trimetilbiciclo(4,3,0)non-9(1)-en-7, alfa.-ol; 1,1,2-Trimetil-3,5-bis(1-metilethenil)-, (2.alfa., 3.alfa., 5.beta.)-ciclohexano. | GC-MS | AG | 232 | α-T e BHT | 78,9* | Alencar et al., 2007 |
| Etanol | Sólido/liquido | Oblongifolina A; Xantochimol; Gutiferona E; Formononetina; Biochanina; Daidzeína. | UHPLC-ESI-MS | AG | 9,30-10,8 | – | 5,56 -11,5 | López, 2014. |
| Etanol | Sólido/liquido | – | – | – | – | Vit. E e BHT | 10,2* | Hatano et al., 2012. |
| Etanol/água 70% (v/v) | Sólido/liquido | – | – | – | – | Vit. E e BHT | 173,1* | Oudoni et al., 2011. |

Tabela 4.3 – Perfil fitoquímico e avaliação da capacidade antioxidante de EHAPV de Alagoas.

.....(continuação...)

| Extrato | | Capacidade antioxidante | | | | | | Ref. |
|------------------------------|-----------------|--|------------------|------------------|-----------------------------|-----------|---|-----------------------|
| Composição solvente extrator | Extração (tipo) | Perfil fitoquímico | Técnica | Fenólicos totais | | DPPH | | |
| | | | | Padrão | Conc. (mg g ⁻¹) | Padrão | EC ₅₀ (µg mL ⁻¹) | |
| Etanol/água 80% (v/v) | Sólido/liquido | Ácido ferúlico; Daidzeína; Quercetina e Formononetina. | HPLC | AG | 2,57 | α-T e BHT | 89,1* | Cabral et al, 2009 |
| Etanol/água 80% (v/v) | Sólido/liquido | Ác. cafeico; Ác. ferúlico; Ác. umbelico; Ác. p-cumárico; 7-O-beta-glucopiranosil-4'-hidroxi-5-metoxiisoflavona; 6-Metoxiluteolina-7-ramnosideo; Genisteína; Kaempferol; Catequina; Dalbergioidina; Epicatequina; Daidzeína; Liquiritigenina; 2'-Hidroxi-formononetina; Ác. evernico; Naringenina; Pinobanksina; Calicosina; Isoliquiritigenina; Formononetina; Isoformononetina; 4,4'-dihidroxi-2-metoxichalcona; (7S)-dalbergifenol; Vestitol; Pinostrobina; Medicarpina; 2',6'-dihidroxi-4'-etoxidihidrochalcona; Thevetiaflavona; 3',4'-di-O-benzil-7-O-(2-hidroxietil)-3-O-metilquercetina; (3S)-7-O-metilvestitol; 7,3'-Dihidroxi-4'-metoxi-8-metilflavona; Cicloartenol; α-amirina; β-amirina; Gutiferona E; Gutiferona F; Xantochimol; Gutiferona C e Gutiferona D. | LC-Orbitrap-FTMS | AG | 0,1585 | TR | 8,01 | Mendonça et al., 2015 |

Tabela 4.3 – Perfil fitoquímico e avaliação da capacidade antioxidante de EHAPV de Alagoas.

.....(conclusão)

| Extrato | | | | Capacidade antioxidante | | | | Ref. |
|------------------------------|-----------------|---|------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------|---|-------------------|
| Composição solvente extrator | Extração (tipo) | Perfil fitoquímico | Técnica | Fenólicos totais | | DPPH | | |
| | | | | Padrão | Conc. (mg g ⁻¹) | Padrão | EC ₅₀ (µg mL ⁻¹) | |
| Metanol | Soxhlet | Ác. cafeico; Naringenina-C-hexosídeo; Liquiritigenina; Isoliquiritigenina; 3,4,2',3'-Tetrahidroxichalcona; (3S)-Vestitol; Volkensiflavona; (3S)-7-O-Metilvestitol e Gliricidina. | HPLC/DAD /ESI/MS | AG | 416,31 | – | 31,9* | Righi et al, 2011 |
| Etanol/água 80% (v/v) | Sólido/liquido | Catequina; Epicatequina; Ác. cafeico; Ác. p-cumárico; Ác. ferúlico; Rutina; Liquiritigenina; Quercetina; Luteolina; Isoliquiritigenina; Formononetina; Pinocembrina; Biochanina A e Crisina | HPLC | AG | 134,5 | AC, QC e TR | 25,07 | Autor, 2016. |
| | | | | QU | 110,6 | | | |
| | | | | AC | 63,1 | | | |
| | | | | TR | 494,4 | | | |

BHT: di-terc-butil metil fenol; **α-T:** α-Tocoferol; *Valores normalizados com base nos dados apresentados pelos autores citados.

Fonte: elaborado pelo autor, 2016.

4.5 Conclusão

A concentração de compostos fenólicos totais do extrato em equivalentes dos padrões foram (mg g^{-1}) de 63,1 (AC) a 494,4 (TR). De forma geral, o EHAPV apresentou uma elevada concentração de fenólicos totais em equivalentes dos padrões empregados, estes resultados corroboraram com os obtidos nos ensaios de atividade antioxidante frente a espécies reativas.

O extrato avaliado mostrou boa capacidade antioxidante frente aos radicais $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e DPPH^{\bullet} . A capacidade antioxidante do EHAPV é aproximadamente três vezes maior para o método do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ quando comparado a DPPH^{\bullet} estando associada a características como o tamanho e ao grau de lipoficidade dos compostos constituintes da amostra. O EHAPV mostrou-se eficiente frente ao $\bullet\text{NO}$ sendo capaz de inibir $\sim 70\%$ do radical gerado a partir de 90 min, apresentando inibição apenas 20% menor que os padrões avaliados.

O EHAPV mostrou capacidade de redução de íons Fe(III) , contudo, pouco eficiente quando comparado aos padrões. O resultado pode estar associado a complexidade da amostra analisada, onde somente os compostos com potenciais de redução menores que 0,36 V poderiam reduzir o ferro(III). A baixa capacidade de redução de Fe(III) a Fe(II) em condições fisiológicas pode ser um bom indicativo, pois há menor probabilidade de que o extrato possa apresentar efeito pró-oxidativo, visto que o íon ferroso catalisa a geração de espécies reativas. O EHAPV apresentou $\text{EC}_{50} \sim 61$ vezes menor que o EDTA para o ensaio de capacidade de complexação de Fe(II) .

Os resultados obtidos indicam que a capacidade cardioprotetora do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha de Alagoas pode ter como um dos mecanismos majoritários a via antioxidante através do sequestro e/ou inativação das espécies reativas, geradas pelo desequilíbrio da concentração de oxigênio no organismo.

4.6 Perspectivas

Abaixo são apresentadas algumas perspectivas futuras para este trabalho:

- i)* Determinar o perfil fitoquímico do extrato analisado nesse estudo o empregando cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (LC-MS) para obter informações mais detalhadas quanto à composição química da amostra.
- ii)* Avaliar a capacidade antioxidante do EHAPV frente a espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HClO), radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (HO^{\bullet}), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$),

peroxinitrito (ONOO^-). Além disto, avaliar o potencial da própolis vermelha de Alagoas em inibir a peroxidação lipídica e realizar ensaio para estudar o potencial do extrato quanto a inibição ao dano oxidativo em eritrócitos humanos em termos de oxidação de hemoglobina, depleção de glutatona e inibição da hemólise.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, S. M. et al. Chemical and biological activity of a new type of brazilian própolis: red própolis. **Journal of ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.
- ALVES, T.R. **Parâmetros químicos, atividades antimicrobiana e antioxidante de uma amostra de própolis de Alagoas**. São Paulo, SP: 2006. Originalmente apresentado como dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, 2006.
- BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2, p. 29-32, 2005.
- BOATENG, D.O.S.; SANBORN, M.D.T. Acute myocardial infarction. **Disease a month**, v. 59, p. 83-96, 2013.
- BUENO-SILVA, B. et al. Anti-Inflammatory and Antimicrobial Evaluation of Neovestitol and Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, p. 4546-4550, 2013.
- CABRAL, I.S.R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, p. 1523-1527, 2009.
- CAZAROLLI, L.H. et al. Flavonoids: Cellular and molecular mechanism of action in glucose homeostasis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 10, p. 1032-1038, 2008.
- CHANG, G.J. et al. Electrophysiological and mechanical effects of caffeic acid phenethyl ester, a novel cardioprotective agent with antiarrhythmic activity, in guinea-pig heart. **European journal of pharmacology**, v. 702, p. 194-207, 2013.
- CLEMENTINO-NETO, J. **Investigação do efeito cardioprotetor do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha em ratos infartados por modelo simpatomimético**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2015.
- CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.
- DA SILVA, V.C. et al. Anthelmintic activity of flavonoids isolated from roots of *Andira anthelmia* (leguminosae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 573-576, 2008.
- DAVIES, M. J. The pathophysiology of acute coronary syndromes. **Heart**, v. 83, p. 361-366, 2000.

Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde do Brasil (DATASUS). Infarto agudo do miocárdio é primeira causa de mortes no País, revela dados do DATASUS. Disponível em <<http://datasus.saude.gov.br/noticias/atualizacoes/559-infarto-agudo-do-miocardio-e-primeira-causa-de-mortes-no-pais-revela-dados-do-datasus>> Acesso em Acesso em 01 de fevereiro de 2016.

DIAZ-CARBALLO, D. et al. The contribution of plukenetione A to the anti-tumoral activity of Cuban propolis. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 9635-9643, 2008.

FIGUEIRA, T. R. et al. Mitochondria as a Source of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: From Molecular Mechanisms to Human Health. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n; 16, 2013.

FREIRES, I. R.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 110, p. 267-279, 2016.

FROZZA, C.O.D. et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137-142, 2013.

GELEIJNSE, J.M.; HOLLMAN, P.C.H. Flavonoids and cardiovascular health: which compounds, what mechanisms?. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 88, p. 12-13, 2008.

HATANO, A. et al. Antioxidant Activity and Phenolic Constituents of Red Propolis from Shandong, China. **Food Science Technology Research**, v. 18, n. 4, p. 577- 584, 2012.

LI, H. et al. Cardioprotective effect of Paeonol and Danshensu combination on isoproterenol-Induced myocardial injury in rats. **Plos one**, v. 7, p. 1-10, 2012.

LI, P. et al. Systems pharmacology strategies for drug discovery and combination with applications to cardiovascular diseases. **Journal of ethnopharmacology**, v. 151, p. 93-107, 2014.

LOPEZ, B. G.; **Análise da composição de amostras de própolis vermelha do brasil por espectrometria de massas com ionização por eletrospray e cromatografia líquida de ultra-eficiência (uhplc-esi-ms) e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana.** 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

LUSTOSA, S.R. et al. Propolis: Updates on chemistry and pharmacology. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 447-454, 2008.

MADHESH, M.; VAIYAPURI, M. Luteolin a dietary flavonoid attenuates isoproterenol-induced myocardial oxidative stress in rat myocardium: An *in vivo* study. **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v. 3, p.159-164, 2013.

MAGALHÃES, L.M. et al. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, p. 1-19, 2008.

MENDONÇA et al. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 357, 2015.

NAITO, Y. et al. Antiinflammatory effect of topically applied propolis extract in carrageenan-induced rat hind paw edema. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 452-456, 2007.

OLDONI, T. L. C. et al. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, v. 77, p. 208-213, 2011.

PARK, K.Y.; ALENCAR, S.M., AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2502-2506, 2002.

PICCINELLI, A.L. et al. Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 6484-6491, 2011.

PINHO, R. A. et al. Doença Arterial Coronariana, Exercício Físico e Estresse Oxidativo. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 94, n.4, p. 549-55, 2009.

PRINCE, P.S.M. (-) Epicatechin attenuates mitochondrial damage by enhancing mitochondrial multi-marker enzymes, Adenosine triphosphate and lowering calcium in isoproterenol induced myocardial infarcted rats. **Food and chemical toxicology**, v. 53, p. 409-416, 2013.

PRINCE, P.S.M.; ROY, A.J. p-Coumaric acid attenuates apoptosis in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats by inhibiting oxidative stress. **International journal of cardiology**, v. 168, p. 3259-3266, 2013.

PRINCE, P.S.M.; SATHYA, B. Protective effects of quercetin on mitochondrial oxidative stress in isoproterenol induced myocardial infarcted in rats: *in vivo* and *in vitro* study. **Phytotherapy research**, v. 49, n. 1, p. 233-241, 2012.

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.

QIN, C.; YAP, S.; WOODMAN, O.L. Antioxidants in the prevention of myocardial ischemia/reperfusion injury. **Expert review of clinical pharmacology**, v. 2, p. 673-695, 2009.

RIGHI, A. A. et al. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 2363-70, 2011.

SALATINO, A. et al. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2, p. 33-38, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (SBC). **IV Diretriz sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio com supradesnivelamento ST. Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. – v. 93, São Paulo, 2009.

SERVIÇO DE APOIO AS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS (SEBRAE). Origem garantida: empreender. **Globo Rural**, v. 323, p. 1-3, 2012.

SILVA, B.B. et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis. **eCAM**, v. 5, n. 3, p. 313-316, 2008.

THOMES, P. et al. Cardioprotective activity of *Cladosiphon okamuranus* fucoidan against isoproterenol induced myocardial infarction in rats. **Phytomedicine**, v. 18, n. 1, p.52-57, 2010.

TORETI, V.C. et al. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-13, 2013.

TRUSHEVA, B. et al..Bioactive constituents of Brazilian red propolis. Evid Based Complement. **Alternative Medicine**, v. 3, n. 2, p. 249-254, 2006.

VALLI, M et al. Development of a Natural Products Database from the Biodiversity of Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 439–444, 2013.

WARREN, J. J.; MAYER, J. M. Predicting organic hydrogen atom transfer rate constants using the Marcus cross relation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 12, 5282–5287, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The top 10 causes of death**. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>> Acesso em 01 de fevereiro de 2016.

YANG, S.Z. et al. Bioassay-guided isolation and identification of antifungal components from propolis against *Penicillium italicum*. **Food chemistry**, v. 127, p.210-215, 2011.

YAO, L. H. et al. Flavonoids in Food and Their Health Benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 59, p. 113–122, 2004.

YOGETA, S.K. et al. Synergistic interactions of Ferulic acid with Ascorbic acid: Its cardioprotective role during isoproterenol induced myocardial infarction in rats. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 283, p. 139-146, 2006.

ZHANG, S. et al. Cardioprotective Effect of Sulphonated Formononetin on Acute Myocardial Infarction in Rats. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 108, p. 390-395, 2011.

5 CONCLUSÃO GERAL

A metodologia analítica empregando a inibição da formação do tiocromo, derivado da oxidação da tiamina (vitamina B₁) por K₃Fe(CN)₆ em condições próximas a fisiológica possibilitou a avaliação da capacidade antioxidante de amostras de vinhos (tinto e branco), chás e infusões, obtendo resultados concordantes com métodos já estabelecidos na literatura (Folin-Ciocalteu e ABTS). Além disso, o método mostrou-se rápido e sensível minimizando os erros associados a possíveis interferentes capazes de reduzir o K₃Fe(CN)₆. Desta forma, o método desenvolvido poderá ser aplicado a outras amostras como cervejas, café, extratos de própolis, fármacos, entre outras.

O estudo da capacidade antioxidante do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha de Alagoas empregando pelos métodos de Folin-Ciocalteu, capacidade de sequestro dos radicais ABTS^{•+} e DPPH[•] e [•]NO, a capacidade de redução de Fe(III) e complexação de Fe(II) permitiu a avaliação do perfil antioxidante da amostra correlacionando os resultados obtidos com o perfil fitoquímico do extrato, bem como, da sua atividade biológica. Os resultados indicaram que o extrato analisado possuía uma elevada concentração de compostos fenólicos totais tendo uma maior abundância de compostos antioxidantes hidrofílicos sendo eficazes no sequestro dos radicais ABTS^{•+} e [•]NO.

REFERÊNCIAS GERAIS

- ABDERRAHIMA, M.; ARRIBASB, S. M.; CONDEZO-HOYOS, L. A novel high-throughput image based rapid Folin-Ciocalteu assay for assessment of reducing capacity in foods. **Talanta**, v. 152, p. 82-89, 2016.
- ALAEI-SHAHMIRI, F. et al. The impact of thiamine supplementation on blood pressure, sérum lipids and C-reactive protein in individuals with hyperglycemia: a randomised, double-blind cross-over trial. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 9, p. 213–217, 2015.
- ALENCAR, S. M. et al. Chemical and biological activity of a new type of brazilian própolis: red própolis. **Journal of ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p.2202-2210, 2010.
- ALVES, E. R. et al. **Determinação de açúcares redutores totais empregando sistemas de análises por injeção em fluxo**: aplicação a amostras de relevância sucro-alcooleira. São Paulo: Centro de Energia Nuclear na Agricultura; Universidade de São Paulo, 2005.
- ALVES, T.R. **Parâmetros químicos, atividades antimicrobiana e antioxidante de uma amostra de própolis de Alagoas**. São Paulo, SP: 2006. Originalmente apresentado como dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, 2006.
- BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **The American Journal of Medicine**, v. 109, p. 33-44, 2000.
- BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2, p. 29-32, 2005.
- 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.
- BEHLING, E. B. et al. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição, Araraquara**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.
- BETTENDORFF, L.; WINS, P. Thiamin diphosphate in biological chemistry: new aspects of thiamin metabolism, especially triphosphate derivatives acting other than as cofactors. **FEBS Journal**, v. 276, p. 2917-2925, 2009.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- BOATENG, D. O. S.; SANBORN, M. D. T. Acute myocardial infarction. **Disease a Month**, v. 59, p. 83-96, 2013.

- BORGES, L. R. et al. Conteúdo de fenóis totais presentes na semente de linhaça (*linum usitatissimum*). In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 19.; ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 12.; MOSTRA CIENTÍFICA, 2., 2010, Pelotas. **Resumos...** Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2010.
- BUBESHKO, N. N.; STSIAPURA, V. I.; STEPURO I. I. Fluorescent properties of thiochrome in solvents of different polarity. **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 78, p. 337, 2011.
- BUDINI, R.; TONELLI, D.; GIROTTI, S. Analysis of total phenols using the prussian blue method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 1236-1238, 1980.
- BUENO-SILVA, B. et al. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from brazilian red propolis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, p. 4546-4550, 2013.
- BUSBEE, B. D.; OBARE, S. O.; MURPHY, C. J. An improved synthesis of high-aspect-ratio gold nanorods. **Advanced Materials**, v. 15, n.5, p. 414-416, 2003.
- CABRAL, I.S.R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, p. 1523-1527, 2009.
- CABRITA, J. M.; SILVA, J. R.; LAUREANO, O. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE VITIVINICULTURA. 1. 2003, Ensenada. **Anais...** Ensenada, México. 2003.
- CARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, p. 41-60, 2009.
- CARVALHO, J. C. V.; GOSMANN, G.; SHENKEL, E. P. **Compostos fenólicos simples e heterosídicos: farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Editora UFRSG; Florianópolis: Editora UFSC, 2004.
- CAZAROLLI, L. H. et al. Flavonoids: Cellular and molecular mechanism of action in glucose homeostasis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 10, p. 1032-1038, 2008.
- CÉSAR, D. S. et al. Fenoldopam: Novo Antihipertensivo Parenteral; Alternativa ao Nitroprussiato?. **Revista Brasileira Anestesiologia**, v. 51, n. 6, p. 528-536, 2001.
- CHANG, G. J. et al. Electrophysiological and mechanical effects of caffeic acid phenethyl ester, a novel cardioprotective agent with antiarrhythmic activity, in guinea-pig heart. **European Journal of Pharmacology**, v. 702, p. 194-207, 2013.
- ÇIFTÇIA, G. Y. et al. First paraben substituted cyclotetraphosphazene compounds and DNA interaction analysis with a new automated biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 80, p. 331-338, 2016.
- CLEMENTINO-NETO, J. **Investigação do efeito cardioprotetor do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha em ratos infartados por modelo simpatomimético**. 2015.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2015.

COELHO, L. S. et al. Deficiência de tiamina como causa de cor pulmonale reversível. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, São Paulo: Sociedade Brasileira de Cardiologia, v. 91, n. 1, p. e7-e8, 2008.

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE (CNS). Resolução nº 4, de 24 de novembro de 1988. Aprova a revisão das Tabelas I, III, IV e V referente a Aditivos Intencionais, bem como os Anexos I, II, III e VII, todas do Decreto n.º 55.871, de 26 de março de 1965. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 de dezembro, 1988. Disponível em: <<https://www.diario das leis.com.br/busca/exibelink.php?numlink=1-185-34-1988-11-24-4>>. Acesso em: 29 ago. 2015.

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, p. 249-252, 2014.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 4. ed. São Paulo: Manole, 2012.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.

DA SILVA, V.C. et al. Anthelmintic activity of flavonoids isolated from roots of *Andira anthelmia* (leguminosae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 573-576, 2008.

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.

DAVIES, M.J. The pathophysiology of acute coronary syndromes. **Heart**, v. 83, p. 361-366, 2000.

DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE DO BRASIL (DATASUS). **Infarto agudo do miocárdio é primeira causa de mortes no País, revela dados do DATASUS**. Disponível em: <<http://datasus.saude.gov.br/noticias/atualizacoes/559-infarto-agudo-do-miocardio-e-primeira-caoa-de-mortes-no-pais-revela-dados-do-datasus>>. Acesso em: 1 fev. 2016.

DIAZ-CARBALLO, D. et al. The contribution of plukenetione A to the anti-tumoral activity of Cuban propolis. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 9635-9643, 2008.

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.

- EGER, I. **Potencial quimioterapêutico de diferentes derivados do ácido gálico para o tratamento da infecção pelo Trypanosoma Cruzi: avaliação *in vitro* e *in vivo***. 2011. 127 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 2010.
- EUROPEAN UNION. European Commission Regulations, Ruling n. 606 of July 10, 2009. laying **down certain detailed rules for implementing Council Regulation (EC) No 479/2008 as regards the categories of grapevine products, oenological practices and the applicable restrictions**. **Official Journal of the European Communities L**, v. 193, p. 26-31, 2009.
- FIGUEIRA, T. R. et al. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 16, 2013.
- FRANÇA, B. K. et al. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **Jornal Português de Gastrenterologia**, v. 20, n. 5, p. 199-206, 2013.
- FRANÇA, L.M. **Desenvolvimento de sistema de análise por injeção sequencial para determinação espectrofotométrica da capacidade antioxidante em bebidas empregando o radical derivado do N-fenil-1,4-fenilenodiamino**. 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.
- FREIRES, I. R.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 110, p. 267-279, 2016.
- FROZZA, C. O. D. et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137-142, 2013.
- FUJIWARA, M.; MATSUI, K. Determination of Thiamine by the Thiochrome Reaction. **Analytical Chemistry**, v. 25, n. 5, p. 810-812, 1953.
- GARAGUSO, I.; NARDINI, M. Polyphenols content, phenolics profile and antioxidant activity of organic red wines produced without sulfur dioxide/sulfites addition in comparison to conventional red wines. **Food Chemistry**, v. 179, p. 336–342, 2015.
- GARCIA, V. S. G. **Efeito de flavonoides na captação de HOCl produzidos por neutrófilos ativados e modulação do factor de transcrição NF-KB em células THP-1: análise da relação estrutura atividade**. 2010. 214 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Química e Bioquímica, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010.
- GELEIJNSE, J.M.; HOLLMAN, P.C.H. Flavonoids and cardiovascular health: which compounds, what mechanisms? **American Journal Clinical Nutrition**, v. 88, p. 12-13, 2008.
- GIBSON, G. E.; ZHANG, H. Interactions of oxidative stress with thiamine homeostasis. **Neurochemistry International**, v. 40, n. 6, p. 493–504, 2002.

- GLISZCZYNSKA-SWIGŁO, A. Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays. **Food Chemistry**, v. 96, p. 131-136, 2006.
- GRAHAM, H. D. Stabilization of the Prussian Blue Color in the Determination of Polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 801-805, 1992.
- 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.
- HALLIWELL, B. et al. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.
- HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **The Lancet**. v. 355, p. 1179, 2000.
- HALLIWELL, B.; CROSS, E. C. Oxygen-derived Species: Their Relation to Human Disease and Environmental Stress. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, Suplemento 10, p. 5-12, 1994.
- HARRIS, D.C. **Análise química quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001.
- HATANO, A. et al. Antioxidant activity and phenolic constituents of red propolis from shandong, China. **Food Science Technology Research**, v. 18, n. 4, p. 577- 584, 2012.
- HOSU, A.; CRISTEA, V.; CIMPOIU, C. Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: Prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks. **Food Chemistry**, v. 150, p. 113-118, 2014.
- 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, 2012.
- HUSAIN, S. R.; CILLARD, J; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**. v. 26, n. 9, p. 2489-2491, 1987.
- JORGE, N.; LUZIA, D.M.M. Potencial antioxidante de extratos de sementes de limão (*Citruslimon*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 489-493, 2010.
- KARAÇELİKA, A. A. et al. Antioxidant components of *Viburnum opulus* L. determined by on-line HPLC–UV–ABTS radical scavenging and LC–UV–ESI-MS methods. **Food Chemistry**, v. 175, p.106-114, 2015.
- KARADAG, A.; OZEELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, p. 41-60, 2009.

KÖSE, D. A. et al. Boric acid complexes with thiamine (vitamin B1) and pyridoxine (vitamin B6). **Inorganica Chimica Acta**, v. 413, p.77-83, 2014.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3.ed. Baltimore: Springer, 2006.

LI, H. et al. Cardioprotective effect of paeonol and danshensu combination on isoproterenol-induced myocardial injury in rats. **Plos One**, v. 7, p. 1-10, 2012.

LI, P. et al. Systems pharmacology strategies for drug discovery and combination with applications to cardiovascular diseases. **Journal of ethnopharmacology**, v. 151, p. 93-107, 2014.

LIDDICOAT, C. et al. Thiamin analysis in red wine by fluorescence reverse phase-HPLC. **Food Chemistry**, v. 177, p. 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, p.57-61, 2011.

LOPES, R. L.; PINTO, D. C. A.; SILVA, M. S. Horseradish peroxidase (HRP) as a tool in green chemistry. **Royal Society of Chemistry Advances**. v. 4, p. 37244-37265, 2014.

LOPEZ, B. G.; **Análise da composição de amostras de própolis vermelha do Brasil por espectrometria de massas com ionização por eletrospray e cromatografia líquida de ultra-eficiência (UHPLC-ESI-MS) e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

LUSTOSA, S. R. et al. Propolis: Updates on chemistry and pharmacology. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 447-454, 2008.

MADHESH, M.; VAIYAPURI, M. Luteolin a dietary flavonoid attenuates isoproterenol-induced myocardial oxidative stress in rat myocardium: An *in vivo* study. **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v. 3, p.159-164, 2013.

MAGALHÃES, L. M. et al. Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity. **Talanta**, v. 77, p. 1559-1566, 2009.

MAGALHÃES, L.M. et al. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, p. 1-19, 2008.

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.

MARTELL, A. E.; SMITH, R. M. **Critical stability constants**. New York: Plenum Press, 1982. v. 5, first suppl.

MATTOS, T.C.G. **Mecanismos da ação antioxidante dos ácidos caféico e tânico em sistemas contendo íons ferro**. 2009. 206 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

MENDONÇA et al. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 357, 2015.

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.

NAITO, Y. et al. Antiinflammatory effect of topically applied propolis extract in carrageenan-induced rat hind paw edema. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 452-456, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. São Paulo: Sarvier, 2011.

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

OLDONI, T. L. C. et al. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian própolis. **Separation and Purification Technology**, v. 77, p. 208–213, 2011.

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

PARK, K. Y.; ALENCAR, S. M., AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2502-2506, 2002.

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**, Maringá, v. 31, n. 2, p. 119 - 124, 2009.

PICCINELLI, A. L. et al. Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 6484–6491, 2011.

PIERRE, J.L.; FONTECAVE, M. Iron and activated oxygen species in biology: The basic chemistry. **BioMetals**, v. 12, p.195–199, 1999.

PINHO, R. A. et al. Doença arterial coronariana, exercício físico e estresse oxidativo. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 94, n.4, p. 549-55, 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.

PRINCE, P. S. M. (-) Epicatechin attenuates mitochondrial damage by enhancing mitochondrial multi-marker enzymes, adenosine triphosphate and lowering calcium in isoproterenol induced myocardial infarcted rats. **Food and chemical toxicology**, v. 53, p. 409-416, 2013.

_____; ROY, A. J. p-Coumaric acid attenuates apoptosis in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats by inhibiting oxidative stress. **International journal of cardiology**, v. 168, p. 3259-3266, 2013.

_____; SATHYA, B. Protective effects of quercetin on mitochondrial oxidative stress in isoproterenol induced myocardial infarcted in rats: *in vivo* and *in vitro* study. **Phytotherapy research**, v. 49, n. 1, p. 233-241, 2012.

SEBRELL, W. H.; HARRIS, R. S. **The vitamins**: chemistry, physiology, pathology, methods. 2nd. ed. London: Academic Press, 1972. v. 5.

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.

QIN, C.; YAP, S.; WOODMAN, O.L. Antioxidants in the prevention of myocardial ischemia/reperfusion injury. **Expert review of clinical pharmacology**, v. 2, p. 673-695, 2009.

RAJ, A. G.; DANIEL, G. S. Static quenching of ruthenium(II)-polypyridyl complexes by gallic acid and quercetin in aqueous and micellar media. **International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy**, v. 32, p. 21-31, 2014.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

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

RIGHI, A. A. et al. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 2363-70, 2011.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.

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

- RUFINO, M. S. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). In: EMBRAPA. **Comunicado técnico Embrapa Agroindústria Tropical**, 2006. p. 1-4. (Comunicado Técnico on line 125).
- 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.
- SALATINO, A. et al. Origin and chemical variation of brazilian propolis. **Evidence Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2, p. 33-38, 2005.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (SBC). **IV Diretriz sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio com supradesnívelamento ST. Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. – v. 93, São Paulo, 2009.
- SCHOONEN, J. W.; SALES, M. G. F. Determination of polyphenols in wines by reaction with 4-aminoantipyrine and photometric flow-injection analysis. **Anal Bioanal Chem**, v. 372, p. 822–828, 2002.
- SERVIÇO DE APOIO AS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS (SEBRAE). Origem garantida: empreender. **Globo Rural**, v. 323, p. 1-3, 2012.
- SHAHABADI, N.; KHORSHIDI, A.; MOGHADAM, N. H. Study on the interaction of the epilepsy drug, zonisamide with human serum albumin (HSA) by spectroscopic and molecular docking techniques. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 114, p. 627-632, 2013.
- SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.
- SILVA, B. B. et al. Chemical composition and botanical origin of red própolis, a new type of brazilian propolis. **eCAM**, v. 5, n. 3, p. 313-316, 2008.
- SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, 1999.
- SILVA, W. J. M; FERRARI, C. K. B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 14, n. 3, p. 441-451, 2011.
- SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo: Thomson, 2006.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, p. 15, v. 1, p. 71-81, 2002.
- 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.

THOMES, P. et al. Cardioprotective activity of *Cladosiphon okamuranus* fucoidan against isoproterenol induced myocardial infarction in rats. **Phytomedicine**, v. 18, n. 1, p.52-57, 2010.

TOLEDO, M. C. F. **Determinação dos níveis de sulfitos em vinhos e em sucos de frutas e estimativa de sua ingestão**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

TORCHIO, F. et al. Influence of different withering conditions on phenolic composition of avanà, chatus and nebbiolo grapes for the production of ‘reinforced’ wines. **Food chemistry**, v. 194, p. 247-256, 2016.

TORETI, V. C. et al. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-13, 2013.

TRUSHEVA, B. et al. Bioactive constituents of brazilian red propolis: evid based complement. **Alternative Medicine**, v. 3, n. 2, p. 249-254, 2006.

VALLI, M. et al. Development of a natural products database from the biodiversity of Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 439-444, 2013.

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.

VÁZQUEZ, C. V. et al. Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin–Ciocalteu method. **Food Chemistry**, v. 176, p. 480-486, 2015.

VERLOOP, A. J. W. et al. Altering the phenolics profile of a green tea leaves extract using exogenous oxidases. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1197-1206, 2016.

VIÑAS, P. et al. Flow-injection fluorimetric determination of thiamine in pharmaceutical preparations. **Mikrochim. Acta**, v. 134, p. 83-87, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The top 10 causes of death**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>> Acesso em: 1 fev. 2016.

WARREN, J. J.; MAYER, J. M. Predicting organic hydrogen atom transfer rate constants using the Marcus cross relation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 12, 5282–5287, 2009.

YANG, S.Z. et al. Bioassay-guided isolation and identification of antifungal components from propolis against *Penicillium italicum*. **Food chemistry**, v. 127, p.210-215, 2011.

YAO, L. H. et al. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 59, p. 113-122, 2004.

YEN, G.; LAI, H.; CHOU, H. Nitric oxide-scavenging and antioxidante effects of uraria crinita root. **Food Chemistry**, v. 74, p. 471–478, 2001.

YOGEEETA, S.K. et al. Synergistic interactions of Ferulic acid with Ascorbic acid: Its cardioprotective role during isoproterenol induced myocardial infarction in rats. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 283, p. 139-146, 2006.

YU, Y.; CHING Y. J.; TAN Y.N. A simple and fast fluorimetric method for thiamine (vitamin B1) detection by Au³⁺-mediated formation of thiochrome. **Austin Journal of Biosensors & Bioelectronics**, v. 1, n. 1, p. 1004-1008, 2015.

ZHANG, S. et al. Cardioprotective effect of sulphonated formononetin on acute myocardial infarction in rats. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 108, p. 390-395, 2011.

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.