



UFAL

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

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM AMOSTRAS DE BEBIDAS EMPREGANDO MBTH (3-METIL-2-BENZOTIAZOLINONA HIDRAZINA) COMO REAGENTE ESPECTROFOTOMÉTRICO

BRUNA DA SILVA GRANJA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões
Tabuleiro dos Martins
57072-970 - Maceió - AL

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

BRUNA DA SILVA GRANJA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO
DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM AMOSTRAS DE BEBIDAS
EMPREGANDO MBTH (3-METIL-2-BENZOTIAZOLINONA HIDRAZINA) COMO
REAGENTE ESPECTROFOTOMÉTRICO**

MACEIÓ-AL
DEZEMBRO DE 2014

BRUNA DA SILVA GRANJA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO
DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM AMOSTRAS DE BEBIDAS
EMPREGANDO MBTH (3-METIL-2-BENZOTIAZOLINONA HIDRAZINA) COMO
REAGENTE ESPECTROFOTOMÉTRICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química e Biotecnologia, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química Analítica e Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos

Maceió-AL
Dezembro de 2014

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

G759d Granja, Bruna da Silva.
Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de
Compostos fenólicos totais em amostras de bebidas empregando MBTH como
Reagente espectrofotométrico / Bruna da Silva Granja. – Maceió, 2015.

87 f. : il

Orientador: Josué Carinhonha Caldas Santos.
Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade
Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia.
Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2015.

Bibliografia: f. 80-87.

1. Compostos fenólicos. 2. Bebidas - Reagente. 3. Espectrofotométrico.
I. Título.

CDU: 533.243:661.72

Dedico este trabalho à minha mãe, Alanilda da Silva, pois ela é a razão de tudo que tenho conquistado e nunca mediu esforços para que eu pudesse chegar até aqui. À ela, todo meu amor, respeito, carinho e gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar ao meu lado, me guiando e me fortalecendo todos os dias. Por me deixar sentir Tua presença a cada novo amanhecer, em todos os momentos da minha vida. Por me conceder a graça de ter uma família abençoada, que me ama, me acolhe e me protege incondicionalmente.

Agradeço a minha mãe Alanilda da Silva e a minha irmã Aretha Granja, por resistirem às minhas mudanças de humor, pela paciência e pela confiança depositada nas minhas decisões, tendo me apoiado e me incentivado nos momentos difíceis que até hoje enfrento. Aos meus sobrinhos Maria Ísis Xavier e João Guilherme Xavier, que por serem tão pequenos ainda nem sabem o quanto me ensinam sobre ser responsável como tia/mãe e o quanto sou imensamente feliz por tê-los em meus braços.

Agradeço a toda minha família, por se fazerem presente na minha vida, por acompanharem toda minha jornada estando sempre dispostos a me ajudar.

Agradeço ao meu padrinho Antônio de Castro (*in memoriam*), por todo amor que teve por mim. Por ter me mostrado como é possível ter tamanha felicidade com muita simplicidade, amor e caráter. Por ser um exemplo de pai e amigo. Onde quer que esteja, sei que está feliz por mais uma conquista minha.

Agradeço a todos os meus amigos pela alegria que me trouxeram durante os anos em que estive na Universidade, por todas as vezes que compreenderam a minha ausência, acreditando em mim e me dando forças para continuar.

Aos meus colegas de sala de aula e aos amigos do LINQA, por cada experiência compartilhada, por cada palavra de conforto ao longo desses dois anos, pelos momentos de descontração, sorrisos e lágrimas, companheirismo e sinceros votos de felicidade.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Josué C. C. Santos por todo ensinamento que foi me dado, pela compreensão nos momentos em que precisei, por todos os conselhos e principalmente por ter acreditado que eu seria capaz. Agradeço ainda por ter me acolhido no laboratório e ter disponibilizado do seu tempo para ajudar na minha formação como mestre.

Agradeço a todos os professores e funcionários do IQB que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

Os compostos fenólicos estão incluídos na categoria de sequestradores de radicais livres, sendo eficientes na prevenção da (auto)oxidação de compostos úteis nos organismos e alimentos. Aos compostos fenólicos presentes em alimentos, são atribuídos efeitos benéficos à saúde. Em consequência disso, a determinação destes compostos tem sido largamente estudada. Dentre os métodos analíticos conhecidos para determinação de compostos fenólicos totais, o método de Folin-Ciocalteu é atualmente o mais usado, apesar de apresentar limitações, quanto à seletividade de sensibilidade, o que pode comprometer o resultado do ensaio. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi promover a otimização de um método alternativo, empregando o MBTH (3-metil-2-benzotiazolinona hidrazina) como reagente espectrofotométrico para a determinação de compostos fenólicos totais. O método foi aplicado em amostras de bebidas ricas em compostos fenólicos e com comprovada ação antioxidante. Os parâmetros químicos e físicos (tipo do ácido, concentração e volume dos reagentes, entre outros), foram otimizados de forma univariada, empregando ácido gálico como padrão de referência e a sensibilidade (*inclinação* da curva analítica) foi utilizada como parâmetro analítico. O método espectrofotométrico proposto foi baseado em uma reação de acoplamento oxidativo do MBTH com compostos fenólicos, na presença de um oxidante em meio ácido para gerar um produto colorido. Para tanto, os oxidantes Fe(III) diluído em H_2SO_4 ou HCl e Ce(IV) diluído em H_2SO_4 , foram avaliados no método. A faixa linear obtida para o oxidante Fe(III) ($0,5 - 6,5 \text{ mg L}^{-1}$) e para o oxidante Ce(IV) ($1,0 - 18,0 \text{ mg L}^{-1}$), em equivalentes de ácido gálico, onde os valores de RSD (desvio padrão relativo) obtidos foram inferiores a 2,2% indicando boa precisão analítica. O método proposto foi aplicado à 18 compostos diferentes (fenólicos, tiólicos, vitamina, açúcar redutor, entre outros) e comparado com o método de Folin-Ciocalteu, aplicado aos mesmos compostos. O método foi aplicado em amostras de vinhos (branco e tinto), chás, infusões, cafés e cachacas e os resultados foram comparados aos métodos de Folin-Ciocalteu e 4-AAP (4-aminoantipirina) (métodos utilizados para determinação de compostos fenólicos totais) e ABTS^{•+} (Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) e DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (métodos utilizados para determinar capacidade antioxidante). Os resultados obtidos foram submetidos a uma análise de correlação linear para um intervalo de 95% de confiança, mostrando-se concordantes para a maioria dos ensaios, apresentando correlações entre MBTH e FC ($r = 0,9570$); MBTH e 4-AAP ($r = 0,9131$); MBTH e DPPH[•] ($r = 0,8566$) e MBTH e ABTS^{•+} ($r = 0,9602$). Uma análise mais detalhada foi realizada em função das diferentes classes de compostos, sendo observado que os resultados foram mais concordantes para as amostras de vinhos, chás e infusões em relação ao MBTH com outros métodos. Desta forma, o método espectrofotométrico desenvolvido mostrou-se compatível tanto para os ensaios de determinação de compostos fenólicos totais, como os de capacidade antioxidante, além de caracterizar-se como simples, rápido e viável para as amostras analisadas.

Palavras-Chave: fenólicos totais. Bebidas. Capacidade antioxidante.

ABSTRACT

The phenolic compounds are included in the category of free radical scavengers, and effective in preventing (self)oxidation of compounds useful in organisms and foods. The phenolic compounds present in foods, are given beneficial health effects. As a result, the determination of these compounds has been widely studied. Among the known analytical methods for determination of total phenolic compounds, the Folin-Ciocalteu method is currently the most widely used, despite its limitations, as the sensitivity of selectivity, which may affect the test result. In this context, the objective of the present work was to promote the optimization of an alternative method, using the MBTH (3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazine) as spectrophotometric reagent for the determination of total phenolic compounds. The method was applied to samples of beverages high in phenolic compounds with proven antioxidant action. The chemical and physical parameters (acid type, concentration and volume of reagents, among others), have been optimized using univariate analysis, using gallic acid as a reference standard and the sensitivity (*slope* of the analytics curve) was used as an analytical parameter. The spectrophotometric method was proposed based on an oxidative coupling reaction of MBTH with phenolic compounds, in the presence of an oxidant in acidic environment to generate a colored product. Therefore, the oxidizing Fe(III) diluted in H₂SO₄ or HCl and Ce(IV) diluted in H₂SO₄, were evaluated in the method. The linear range obtained for oxidant Fe(III) (0.5 to 6.5 mg L⁻¹) and the oxidant Ce(IV) (1.0 to 18.0 mg L⁻¹) equivalents of acid gallic where RSD values (relative standard deviation) were lower than 2.2% indicating a good analytical precision. The proposed method was applied to 18 different compounds (phenol, thiol, vitamin, reducing sugar, among others) and compared with the Folin-Ciocalteu method, applied to the same compounds. The method was applied to samples of wines (red and white), teas, infusions, coffees and sugar cane spirits and the results were compared with the Folin-Ciocalteu method and 4-AAP (4-aminoantipyrine) (methods used for determination of total phenolic compounds) and ABTS^{•+} (2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) and DPPH[•] (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) (methods used to determine antioxidant capacity). The results were submitted to a linear correlation analysis for a range of 95% confidence, being consistent for most of the tests, they showed correlations between MBTH and FC ($r = 0.9570$); MBTH and 4-AAP ($r = 0.9131$); MBTH and DPPH[•] ($r = 0.8566$) and MBTH and ABTS^{•+} ($r = 0.9602$). A more detailed analysis was performed according to the different classes of compounds, and we observed that the results were more consistent for samples of wines, teas and infusions in relation to the MBTH with other methods. Thus, the spectrophotometric method developed was compatible for both the tests to determine the total phenolic compounds, such as antioxidant capacity, and is characterized as simple, fast, and feasible for the samples analyzed.

Keywords: total phenolics. Beverages. Antioxidant capacity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema geral da reação entre MBTH e composto fenólico genérico formando cromóforo	16
Figura 2 - Padrão estrutural e substâncias derivadas de algumas classes de compostos fenólicos.....	22
Figura 3 - Estruturas químicas das principais substâncias fenólicas presentes nos vinhos.....	24
Figura 4 - Principais compostos presentes no chá verde e preto.	24
Figura 5 - Estrutura de alguns compostos presentes no café.....	25
Figura 6 - Reação geral para o ensaio FRAP.....	31
Figura 7 - Complexos formados entre Cu(I) e (a) batocuproína e (b) neocuproína.	32
Figura 8 - Reação entre o radical DPPH [•] e composto antioxidante genérico (HCA) ou radical (R [•]).....	33
Figura 9 - Reação de formação do radical ABTS ^{•+} , e estabilização deste radical por um antioxidante genérico (HCA) através do persulfato de potássio (considerando condições fisiológicas).....	34
Figura 10 - Esquema geral da reação entre 4-AAP e composto fenólico genérico. .	35
Figura 11 - Esquema geral do mecanismo de reação do MBTH com diferentes compostos em meio ácido e diferentes oxidantes.....	38
Figura 12 - Estrutura e pKa de compostos com a função hidrazina em função do solvente.....	39
Figura 13 - Híbridos de ressonância do MBTH em duas condições (neutro e protonado).....	40
Figura 14 - Mecanismo da reação entre MBTH e composto fenólico genérico em meio ácido.....	47
Figura 15 - a) Espectro de absorção molecular normalizados dos produtos de reação entre os compostos fenólicos e MBTH. b) Estrutura dos compostos avaliados e possíveis pontos de reatividade (em vermelho) para reação com MBTH em meio ácido. Condições: Concentração compostos avaliados: 50 mg L ⁻¹ , [MBTH] = 18 mmol L ⁻¹ , [H ₂ SO ₄] = 0,1 mol L ⁻¹ e 0,1% (m/v) em Fe(III).	49

Figura 16 - Avaliação da cinética reacional em função do oxidante (a) Fe(III) e (b) Ce(IV) empregando AG (20 mg L ⁻¹) como antioxidante modelo, frente amostra de vinho branco diluída. Condições: [MBTH] = 18 mmol L ⁻¹ , 0,1% (m/v) em Fe(III) e Ce(IV) e H ₂ SO ₄ (1,0 mol L ⁻¹) λ _{máx} = 450 nm.....	52
Figura 17 - Avaliação da concentração do ácido sulfúrico em função do oxidante. Condições: Faixa linear de concentração de 5 a 30 mg L ⁻¹ (N = 5), [MBTH] = 18 mmol L ⁻¹ e 0,1% (m/v) em Fe(III) e Ce(IV).	55
Figura 18 - Avaliação da concentração dos oxidantes Fe(III) e Ce(IV): a) em função da sensibilidade; b) branco analítico e c) relação s/b. Condições: faixa linear de concentração de 5 a 30 mg L ⁻¹ (N = 5), [MBTH] = 18 mmol L ⁻¹ e H ₂ SO ₄ 0,25 mol L ⁻¹ para Fe(III) e 2 mol L ⁻¹ para Ce(IV).	57
Figura 19 - Avaliação da concentração do MBTH em função do oxidante. Condições: faixa linear de concentração de 5 a 30 mg L ⁻¹ (N = 5), 0,5% (m/v) para Fe(III) e Ce(IV), H ₂ SO ₄ 0,25 mol L ⁻¹ para Fe(III) e 2 mol L ⁻¹ para Ce(IV).	58
Figura 20 - Avaliação do volume dos reagentes em função do oxidante. Condições: faixa linear de concentração de 5 a 20 mg L ⁻¹ (N = 5). Sendo Fe(III) a 0,5% (m/v), H ₂ SO ₄ 0,25 mol L ⁻¹ e MBTH a 5 mmol L ⁻¹ e Ce(IV) a 0,5% (m/v), H ₂ SO ₄ 2 mol L ⁻¹ e MBTH a 10 mmol L ⁻¹	60
Figura 21 - Curvas analíticas em função do oxidante empregando AG como padrão analítico nas condições otimizadas do método proposto. Condições: Para Fe(III) a 0,5% (m/v), H ₂ SO ₄ 0,25 mol L ⁻¹ e MBTH a 5 mmol L ⁻¹ e Ce(IV) a 0,5% (m/v), H ₂ SO ₄ 2 mol L ⁻¹ e MBTH a 10 mmol L ⁻¹	62
Figura 22 - Espectros de absorção molecular normalizados do produto reacional entre alguns compostos puros e MBTH nas condições otimizadas, sendo a) compostos com produtos que geram duas bandas de absorção e b) compostos que geram produtos com uma banda preferencial de absorção	67
Figura 23 - Proposta reacional para os produtos entre o ácido orto e p-hidroxicinâmico e o MBTH em meio ácido nas condições otimizadas em função das bandas de máxima absorção. Posições marcadas em vermelho indicam as possibilidade de reação com MBTH em relação a hidroxila.	68

Figura 24 - a) Proposta reacional para os produtos entre o ácido m-hidroxicinâmico e o MBTH em meio ácido nas condições otimizadas e b) Espectro de absorção molecular do produto reacional entre o ácido m-hidroxicinâmico e o MBTH em meio ácido nas condições otimizadas. Posições marcadas em vermelho indicam as possibilidade de reação com MBTH em relação a hidroxila.	69
Figura 25 - Proposta reacional para os produtos entre o ácido cafeico e o MBTH em meio ácido nas condições otimizadas em função das bandas de máxima absorção. Posições marcadas em vermelho indicam as possibilidade de reação com MBTH quanto em relação a hidroxila.....	70
Figura 26 - Espectro de absorção molecular normalizados de algumas amostras analisadas frente ao método proposto nas condições otimizadas. Sendo: a) chás e infusões b) vinhos (branco e tinto) c) cachaças envelhecidas d) cafés.....	72
Figura 27 - Correlação linear das amostras analisadas dos diferentes métodos aplicados frente ao método proposto (MBTH), nas condições otimizadas. a) MBTH vs FC b) MBTH vs 4-AAP c) MBTH vs DPPH d) MBTH vs ABTS. Pontos fora da curva (outliers), estão representados pela cor vermelha e o o número ao lado faz referência a amostra de acordo numeração descrita na Tabela 8.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico.....	20
Tabela 2 - Algumas figuras de mérito para as curvas analíticas dos compostos fenólicos avaliados em função dos diferentes oxidantes, Fe(III) e Ce(IV). Condições: [MBTH] = 18 mmol L ⁻¹ , [H ₂ SO ₄] = 0,1 mol L ⁻¹ e 0,1% (m/v) em Fe(III).....	50
Tabela 3 - Avaliação da ordem de adição dos reagentes em função do tipo de ácido considerando algumas figuras de mérito. Condições: Faixa linear de concentração de 5 a 40 mg L ⁻¹ (N = 5), [MBTH] = 18 mmol L ⁻¹ , [H ₂ SO ₄] = [HCl] = 1 mol L ⁻¹ e 0,1% (m/v) em Fe(III).....	51
Tabela 4 - Semi-reações de redução para Fe(III) e Ce(IV) em função de diferentes ácidos.....	53
Tabela 5 - Avaliação da influência do tipo de ácido em alguns parâmetros analíticos em função do oxidante. Condições: Faixa linear de concentração de 5 a 40 mg L ⁻¹ (N = 5), [MBTH] = 18 mmol L ⁻¹ e 0,1% (m/v) em Fe(III) e Ce(IV).....	54
Tabela 6 - Compilação das principais variáveis químicas e físicas otimizadas no método em função do oxidante.	61
Tabela 7 - Parâmetros analíticos de diferentes compostos fenólicos e redutores avaliados frente ao método proposto nas condições otimizadas e o método de Folin–Ciocalteu (FC). Condições reacionais (método proposto): Fe(III) a 0,5% (m/v), H ₂ SO ₄ 0,25 mol L ⁻¹ , MBTH 5 mmol L ⁻¹ e tempo de reação de 40 min.....	65
Tabela 8 - Determinação do teor de compostos fenólicos totais e da capacidade antioxidante (expressos em mg L ⁻¹ de AG) em bebidas empregando o método proposto, FC, 4-AAP, DPPH e ABTS (N = 3).	74
Tabela 9 - Análise de correlação entre os diferentes métodos aplicados em relação aos resultados obtidos com MBTH nas condições otimizadas por classe de amostra	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Ácido Gálico
ABTS	Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
AT	Ácido Tânico
CAO	Capacidade antioxidante
CERAC	Capacidade antioxidante reduzindo íon cério(IV)
CF	Composto(s) fenólico(s)
CUPRAC	Ensaio de poder antioxidante por redução do cobre
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
FC	Folin-Ciocalteu
FRAP	Ensaio do poder antioxidante por redução do ferro
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MBTH	3-metil-2-benzotiazolinona hidrazina
ORAC	Capacidade de absorção do oxigênio radical
QU	Quercetina
RU	Rutina
RSD	Desvio padrão relativo
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SOD	Superóxido Dismutase
TAH	Transferência de átomos de hidrogênio
TE	Transferência de elétrons
TEAC/ABTS	Ensaio da capacidade antioxidante equivalente ao trolox
UV-Vis	Ultravioleta-visível
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda de máxima absorção
4-AAP	4-aminoantipirina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos específicos.....	17
3	REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1	Compostos fenólicos	18
3.2	Bebidas e alimentos ricos em compostos fenólicos e com comprovada ação antioxidante.	23
3.2.1	Vinhos.....	23
3.2.2	Chás e infusões.....	24
3.2.3	Café.....	25
3.2.4	Cachaças envelhecidas.....	25
3.3	Métodos analíticos para a determinação de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante	26
3.3.1	Métodos baseados em transferência de elétrons para determinação de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante	28
3.3.1.1	Fenólicos totais pelo reagente de Folin-Ciocalteu (FC)	28
3.3.1.2	Ensaio do azul da Prússia	29
3.3.1.3	Ensaio do poder antioxidante por redução de ferro (FRAP), cobre (CUPRAC) e cério (CERAC)	30
3.3.2	Métodos baseados em transferência de átomo de hidrogênio.	32
3.3.2.1	Sequestro do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)	32
3.3.2.2	TEAC (<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>) ou ensaio do ABTS ^{•+}	33
3.3.3	Métodos baseados em acoplamento oxidativo do reagente com os compostos fenólicos	35
3.3.3.1	Método da 4-AAP (4-aminoantipirina).....	35
3.3.3.2	Método do MBTH: mecanismo, aplicações e justificativa do trabalho desenvolvido.....	366
4	EXPERIMENTAL.....	41
4.1	Reagentes e soluções	41
4.2	Equipamentos	42
4.3	Procedimentos.....	43
4.3.1	Método proposto (MBTH)	43
4.3.2	Método de Folin–Ciocalteu (Compostos fenólicos totais)	43
4.3.3	Método da 4-aminoantipirina (4-AAP).....	444

4.3.4	Ensaio do sequestro do radical DPPH•	44
4.3.5	Ensaio do sequestro do radical ABTS• ⁺	44
4.4	Preparo das amostras analisadas.....	44
4.5	Avaliação estatística dos dados.....	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1	Otimização do método: aspectos iniciais	47
5.2	Avaliação preliminar do método aplicado a compostos fenólicos	48
5.3	Ordem de adição dos reagentes	50
5.4	Cinética reacional	51
5.5	Influência do ácido	52
5.6	Avaliação da concentração do H ₂ SO ₄	54
5.7	Avaliação da concentração dos oxidantes (Fe(III) e Ce(IV))	55
5.8	Avaliação da concentração do MBTH.....	57
5.9	Avaliação do volume dos reagentes.....	59
5.10	Parâmetros otimizados	61
5.11	Figuras de mérito.....	62
5.12	Avaliação de diferentes compostos fenólicos empregando o método de Folin–Ciocalteu (FC) e o método proposto (MBTH).....	63
5.13	Análise da determinação do teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante das amostras	71
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	78
6.1	Conclusões	80
6.2	Perspectivas	81
	REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos anos, aumentaram-se as buscas por alimentos que contêm substâncias capazes de ajudar na prevenção e/ou combate aos processos oxidativos que ocorrem no organismo. Em função disso, aumentou-se também o interesse no estudo dos compostos fenólicos, devido principalmente, à habilidade antioxidante *in vitro* e *in vivo* destas substâncias em sequestrar radicais livres, os quais podem ser prejudiciais à saúde (NASO, et al., 2013; NEVES, et al., 2009).

No organismo, os radicais livres e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são produzidos naturalmente, mas fatores externos como radiação, poluição, exposição a radiação eletromagnética, tabagismo, entre outros fatores, podem levar a formação de quantidades excessivas destas espécies (radicais ou não), resultando no processo denominado *estresse oxidativo*, e consequentemente, em patologias como diabetes, câncer, arterosclerose, entre outras (ADEGOKE, et al., 2014; SCHNEIDER, et al., 2004).

Os radicais livres são espécies químicas que possuem pelo menos um elétron desemparelhado na camada mais externa, isto implica em alta reatividade considerando aspectos energéticos e cinéticos. Para estas espécies virem a ser estáveis, elas tendem a retirar um ou mais elétrons de outra molécula presente no meio reacional. Durante o processo de estresse oxidativo, os radicais livres produzidos no organismo são responsáveis por iniciarem diferentes cadeias de reações, conduzindo alterações em proteínas, DNA, lipídios (membranas celulares) e outras macromoléculas, e por consequência, levando a modificações celulares (SALVADOR, et al., 2004).

Neste contexto, o oxigênio e espécies oxigenadas desempenham papel crítico no metabolismo de sistemas aeróbios. Espécies reativas de oxigênio (ROS) são uma combinação de espécies produzidas através da redução parcial de oxigênio molecular (O_2). Os exemplos mais comuns dessas espécies são o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila ($HO^{\bullet}$) e ácido hipocloroso ($HOCl$). Apesar do sistema de defesa do corpo gerar antioxidantes celulares contra processos patológicos e fisiológicos, a superprodução de ROS pode acarretar o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, câncer, artrite, aterosclerose, estresse oxidativo e outras (ADEGOKE, et al., 2014). Outra classe de espécies quimi-

camente reativas que merece destaque, são as espécies reativas de nitrogênio (RNS), tais como radicais nitroxilo ($\text{NO}^\bullet$, $\text{NO}_2^\bullet$) e ânion peroxinitrito (ONOO^-) que também podem ter efeitos adversos a saúde (CRAFT, et al., 2012). As ROS e RNS tem propriedades químicas específicas, desta forma, sugere-se que a capacidade antioxidante de uma matriz, deva ser avaliada frente a cada ROS e RNS, a fim de se estabelecer um perfil mais completo do(s) composto(s) que compõe uma referida amostra (RODRIGUES, et al., 2014).

Em função disso, grande ênfase têm sido dada ao consumo de alimentos que apresentam compostos com comprovada capacidade antioxidante, pois, estas substâncias tendem a retardar ou inibir a oxidação de biomoléculas no organismo, e por consequência, prevenir a ocorrência de doenças (FREITAS, 2006). Sendo assim, torna-se essencial o equilíbrio entre as espécies reativas (radicalares ou não) e o sistema de defesa antioxidante, o qual está associado ao consumo de substâncias antioxidantes presentes nos alimentos ou por sistemas enzimáticos celulares, baseados nas enzimas superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase (VARGAS, et al., 2008).

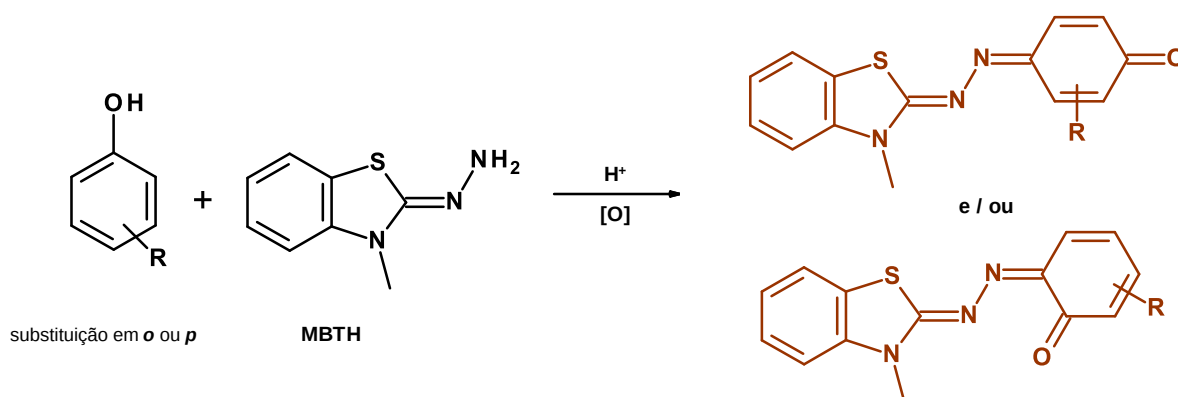
Devido ao fato dos compostos fenólicos englobarem uma gama enorme de substâncias com diferenças estruturais, que são, na maioria das vezes, de grande polaridade, reativas frente a oxidantes e susceptíveis à ação de enzimas, diversos pesquisadores enfrentam problemas metodológicos para separar, identificar e quantificar o teor dos compostos fenólicos presentes nos alimentos e/ou bebidas (PRIETO, et al., 2014). Sendo assim, diversas metodologias têm sido utilizadas a fim de minimizar estes problemas. Porém, como a determinação da concentração exata dos compostos fenólicos ainda é muito difícil de se obter, utiliza-se uma estimativa da concentração total destes compostos, conhecida como índice de (poli)fenólicos totais (ARCHELA, et al., 2013).

A quantificação de compostos fenólicos totais em alimentos/bebidas pode ser realizada por diferentes métodos analíticos *in vitro* baseadas em distintas técnicas, como: cromatografia líquida (ZHANG, et al., 2011), eletroforese (SCHÖNING, et al., 2005), voltametria (SAMRA, et. al., 2011), amperometria (SAZHINA, et. al., 2014), fluorescência molecular (LIN, et al., 2010), quimioluminescência (LIN et al., 2008) e espectrofotometria (STRATIL, et al., 2007). Apesar da variedade de técnicas e métodos, de forma geral, pela simplicidade e tempo de uso, o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu tem sido o mais empregado para quantificação de compos-

tos fenólicos totais em diferentes amostras, contudo apresenta limitações quanto a sensibilidade e sobretudo seletividade (SOUSA, et al., 2007). Neste sentido, há necessidade de desenvolver métodos alternativos aos já conhecidos e descritos na literatura, visando seletividade na determinação destes compostos, assim como simplicidade, rapidez, robustez e sensibilidade. De forma geral, os métodos empregados para determinação destes compostos, podem ser classificados em: quantificação total dos compostos fenólicos, individual e/ou de um grupo ou classe de compostos fenólicos (PRIETO, et al., 2014; SIMÕES, et al., 2003).

Com isso, o objetivo deste trabalho foi realizar o desenvolvimento e otimização de um método espectrofotométrico alternativo, visando melhorias quanto às limitações apresentadas nos métodos já existentes, sendo também rápido, prático e concordante com os demais. Logo, em função da seletividade e de outras vantagens que serão discutidas no corpo deste trabalho, o MBTH (3-metil-2-benzotiazolinona hidrazina) foi selecionado como reagente para determinação espectrofotométrica de compostos fenólicos totais em amostras de vinhos (tinto e branco), chás, infusões, cachaças e cafés. A reação empregada no método foi baseada no acoplamento oxidativo do MBTH após sua oxidação e reações dos compostos fenólicos em meio ácido (Figura 1), levando a formação de produto colorido (SUDHA, 2012).

Figura 1 - Esquema geral da reação entre MBTH e composto fenólico genérico formando cromóforo.



Fonte: elaborado pela autora, 2014.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolvimento e otimização de metodologia analítica para determinação espectrofotométrica de compostos fenólicos totais em amostras de bebidas explorando a reação de acoplamento oxidativo do MBTH (3-metil-2-benzotiazolinona hidrazina) em meio ácido na presença de um oxidante.

2.2 Objetivos específicos

- a)** Avaliar as condições reacionais para geração do produto colorido, com o intuito de quantificar o teor de compostos fenólicos totais em amostras de bebidas empregando espectrofotometria;
- b)** Otimizar o método proposto de forma univariada quanto aos parâmetros químicos e físicos: reagentes (oxidante e ácido empregado), ordem de adição dos reagentes, concentração e volume dos reagentes, cinética reacional, influência da acidez, entre outros;
- c)** Desenvolver um método alternativo para determinação de compostos fenólicos totais em amostras de vinhos (tinto e branco), chás, infusões, cachaças e cafés;
- d)** Comparar os resultados obtidos pelo método proposto com diferentes metodologias já presentes na literatura, como Folin–Ciocalteu e 4-AAP (4-aminoantipirina) para compostos fenólicos totais e DPPH e ABTS para determinação da capacidade antioxidante nas amostras de bebidas analisadas;
- e)** Avaliar estatisticamente o teor de compostos fenólicos totais com os valores de atividades antioxidantes obtidos pelos diferentes métodos em função da natureza das amostras analisadas;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos apresentam ampla diversidade de estruturas, desde moléculas com esqueletos mais simples até polímeros. Estes compostos, possuem no mínimo um anel aromático, com um ou mais substituintes hidroxílicos (incluindo seus grupos funcionais adicionais, em alguns casos). Esta condição estrutural, confere aos compostos fenólicos poder antioxidante, devido principalmente às suas propriedades relacionadas à transferência de elétrons, as quais são capazes de desempenhar um importante papel na neutralização de diferentes espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, além de radicais livres (DEGÁSPARI, et al., 2004).

Os compostos fenólicos podem ser de origem natural ou sintética. Estes encontram-se distribuídos no reino vegetal e nos microorganismos, fazendo parte também do metabolismo animal. Os vegetais e grande parte dos microorganismos conseguem sintetizar o núcleo aromático dos compostos fenólicos, contudo os animais não têm esta capacidade, fazendo-se necessário utilizar o anel benzênico de substâncias presentes em alimentos, para produzir estes compostos (SIMÕES, et al., 2003).

Os compostos de natureza fenólica presentes no metabolismo secundário dos vegetais podem estar livres ou complexados a açúcares e proteínas. Dentre os mais comuns, destacam-se como antioxidantes fenólicos de fonte natural, os flavonóides, ácidos fenólicos, taninos e tocoferóis (ÂNGELO, et al., 2007).

Os compostos fenólicos constituem um grupo heterogêneo, composto de várias classes de substâncias com propriedades antioxidantes. Essas substâncias estão presentes em uma ampla variedade de frutas como limão, laranja, tangerina, uva, cereja, ameixa, pera e maçã; legumes e verduras, como pimenta verde, brócolis, repolho roxo, cebola, alho e tomate. Além de alimentos e bebidas processados, como chás, vinhos, sucos e outros (VARGAS, et al., 2008).

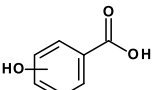
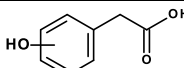
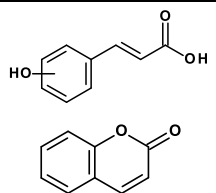
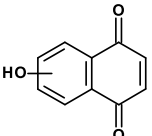
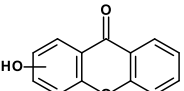
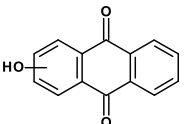
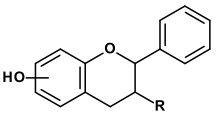
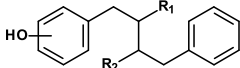
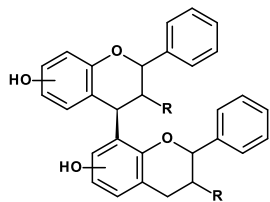
A composição dos compostos fenólicos nos alimentos pode variar com o tipo, época de colheita, fatores do meio ambiente, processamento e armazenamento dos mesmos. Os compostos fenólicos podem contribuir para o gosto amargo, adstringência, cor, odor, e estabilidade oxidativa dos alimentos (OLIVEIRA, 2011).

O organismo não apresenta mecanismos específicos para o acúmulo ou retenção dos compostos fenólicos a curto prazo, ao contrário do que acontece com algumas vitaminas e minerais. Eles são reconhecidos e tratados como os xenobióticos (compostos químicos estranhos a um organismo ou sistema biológico), sendo metabolizados de forma a serem rapidamente excretados (OLIVEIRA, D. et al., 2011). A atividade anticarcinogênica dos fenólicos têm sido relacionada à inibição dos cânceres de cólon, esôfago, pulmão, fígado, mama, pele, entre outros (ÂNGELO, et al., 2007).

Cada classe de composto fenólico apresenta uma ampla variação estrutural, principalmente pela presença de diferentes substituintes (hidroxilas, metoxilas, açúcares) em um esqueleto aromático comum. A estrutura química dos compostos fenólicos é que confere sua capacidade de atuar como captadores de radicais livres e outras espécies reativas, como já mencionado. Além das propriedades seqüestradoras de radicais e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, os compostos fenólicos podem ainda quelar metais de transição, impedindo que estes participem de reações redox (catalisando ou atuando como oxidantes) e conseqüentemente prevenindo eventos oxidativos ao organismo (FREITAS, 2006). A natureza do núcleo deste composto, o grau de metoxilação e o número de hidroxilas são alguns dos parâmetros que determinam a eficiência da atividade antioxidante (OLIVEIRA, 2011).

Os compostos fenólicos podem ser classificados segundo o tipo do esqueleto principal, conforme representado na Tabela 1, onde C_6 corresponde ao anel benzênico e C_x à cadeia substituinte com X átomos de carbono. Outro tipo de classificação está relacionada com a ocorrência desses compostos no reino vegetal. Assim, podem ser divididos em: **a)** compostos fenólicos amplamente distribuídos, como os derivados de ácidos cinâmicos, cumarinas, flavonoides, e derivados de polimerização (taninos e ligninas), e **b)** compostos fenólicos de distribuição restrita, abrangendo as classe de substâncias não citadas no item anterior (SIMÕES, et al., 2003).

Tabela 1 - Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico.

Esqueleto básico	Padrão estrutural (exemplo)	Classe
C ₆		<i>Fenóis simples¹, benzoquinonas</i>
C ₆ -C ₁		<i>Ácidos fenólicos</i>
C ₆ -C ₂		<i>Acetofenonas e ácidos fenilacéticos</i>
C ₆ -C ₃		<i>Fenilpropanóides: ácidos cinâmicos (acima) e análogos, fenilpropenos, cumarinas (abaixo), isocumarinas e cromonas.</i>
C ₆ -C ₄		<i>Naftoquinonas</i>
C ₆ -C ₁ -C ₆		<i>Xantonas</i>
C ₆ -C ₂ -C ₆		<i>Estilbenos, antraquinonas</i>
C ₆ -C ₃ -C ₆		<i>Flavonoides e isoflavonóides</i>
(C ₆ -C ₃) ₂		<i>Lignan</i>
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂		<i>Diflavonóides</i>
(C ₆) _n	polímeros	Melaninas vegetais
(C ₆ -C ₃) _n	polímeros	Ligninas
(C ₆ -C ₁) _n	polímeros	Taninos hidrolisáveis
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	polímeros	Taninos condensados

¹Designação em *italico* referente aos compostos com a estrutura representada.

Fonte: adaptado de SIMÕES, et al., 2003.

Na família dos compostos largamente distribuídos na natureza estão os fenólicos encontrados geralmente em todo o reino vegetal. Estes compostos fenólicos

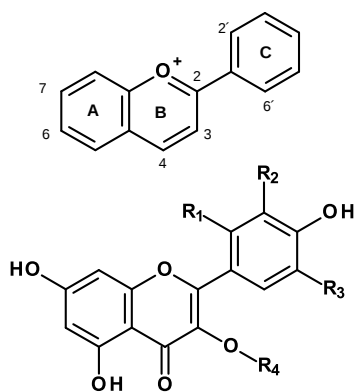
estão divididos em dois grandes grupos: flavonóides e derivados e ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas, os quais são metabólitos secundários presentes em frutas e vegetais (OLIVEIRA, 2011).

Os flavonóides são compostos de baixo peso molecular e apresentam estrutura química descrita como ($C_6-C_3-C_6$, vide Tabela 1). Neste grupo, são encontradas as antocianidinas, flavonas, flavonóis e, com menor frequência, as auronas, calconas e isoflavonas (SOARES, 2002).

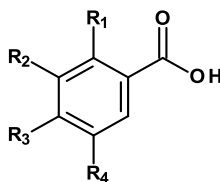
Um grupo importante de flavonóides são os flavonóis (Figura 2), os quais, apresentam nos compostos tricíclicos, unidades denominadas A, B e C e os átomos de carbono recebem identificação com números ordinários para os núcleos A e B, e os mesmos números seguidos de uma linha (') para o núcleo C (FREITAS, 2006). O que diferencia os flavonóis dos demais flavonóides é a presença do grupo hidroxílico (na posição 3) e do grupo carbonílico (na posição 4) no anel C. Nos alimentos, os flavonóis ocorrem geralmente como o-glicosídeos, com mono, di ou triglicosídeos ligados em sua maioria, na posição 3, e em alguns casos, na posição 7. Os flavonóis mais encontrados nos alimentos são a quercetina, miricetina e kaempferol (OLIVEIRA, 2011). As estruturas destes compostos podem ser observadas na Figura 2.

Substituições nos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonóides. Estas substituições podem incluir oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfação (ÂNGELO, 2007). Os flavonóides geralmente ocorrem em plantas na forma de glucosídios, sendo uma das substâncias responsáveis pela atribuição do perfil sensorial de frutas. Estima-se que 6.000 diferentes estruturas já foram identificadas e a tendência é que este número aumente ao longo dos anos (DEGÁSPARI, et al., 2004).

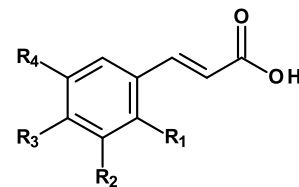
Os ácidos fenólicos (Tabela 1 e Figura 2), caracterizam-se por apresentar um anel benzênico, um grupamento funcional carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes tanto para os alimentos, como para o organismo, sendo, por isso indicado para o tratamento ou prevenção de diversas doenças (AÇARI, 2009).

Figura 2 - Padrão estrutural e substâncias derivadas de algumas classes de compostos fenólicos.**a) núcleo flavilium e flavanóis**

$R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=R_4=H$: quercetina
 $R_1=R_2=R_3=R_4=H$: kaempferol
 $R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=OH$; $R_4=H$: miricetina
 $R_1=OH$; $R_2=H$; $R_3=R_4=H$: morina
 $R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=OH$; $R_4=O$ -rutinosila: rutina

b) ácidos hidroxibenzóicos

$R_1=OH$: ácido salicílico
 $R_1=R_4=OH$: ácido gentísico
 $R_3=OH$: ácido *p*-hidroxibenzóico
 $R_2=R_3=OH$: ácido protocatequínico
 $R_2=OCH_3$; $R_3=OH$: ácido vanílico
 $R_2=R_3=R_4=OH$: ácido gálico
 $R_2=R_4=OCH_3$; $R_3=OH$: ácido siríngico.

c) ácidos hidroxicinâmicos

$R_1=R_2=R_3=R_4=H$: ácido cinâmico
 $R_1=OH$: ácido *o*-cumárico
 $R_2=OH$: ácido *m*-cumárico
 $R_3=OH$: ácido *p*-cumárico
 $R_2=R_3=OH$: ácido cafeico
 $R_2=OCH_3$; $R_3=OH$: ácido ferúlico
 $R_2=R_4=OCH_3$; $R_3=OH$: ácido sinápico

Fonte: adaptado de DEGÁSPARI, et al., 2004; AÇARI, 2009.

Os ácidos fenólicos são divididos em duas classes: os ácidos hidroxibenzóicos e os hidroxicinâmicos (Tabela 1 e Figura 2). Os ácidos hidroxibenzóicos, possuem sete átomos de carbono (C_6-C_1) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza, são componentes das complexas estruturas dos taninos hidrolizáveis e são menos abundantes nos vegetais consumidos pelo humano. Os ácidos hidroxicinâmicos possuem nove átomos de carbono (C_6-C_3) e estão presentes em vários alimentos e bebidas de origem vegetal, como o café, erva mate, maçã, ameixa, entre outros. As cumarinas (Tabela 1) são derivadas do ácido cinâmico por ciclicização da cadeia lateral do ácido *o*-cumárico (Figura 2) (OLIVEIRA, D. et al., 2011).

Os derivados mais importantes destes ácidos do ponto de vista nutricional e antioxidante ocorre na classe dos ácidos hidroxicinâmicos, uma vez que compostos como o ácido cafeico, *p*-cumárico, ferúlico e sinápico encontram-se esterificados ao ácido quínico, ácido tartárico ou carboidratos e derivados, na maioria dos alimentos (OLIVEIRA, D. et al., 2011).

Os compostos fenólicos possuem propriedades especiais, sendo mais ácidos que os álcoois, e com isso, oxidados com maior facilidade. A propriedade mais marcante dos fenóis, no entanto, é a sua acidez. Os fenóis são ácidos fracos e suas bases conjugadas são estabilizadas por ressonância. Assim, grupamentos que apresentem tendência a retirar elétrons do anel aromático por meio de efeitos eletrônicos

aumentam a sua acidez, enquanto grupos doadores de elétrons reduzem-na (CLAYDEN, J. et al., 2012).

Desta forma, foram avaliados algumas classes de amostras ricas em compostos fenólicos, afim de se obter a concentração do teor total desses compostos nas respectivas amostras, que serão apresentadas a seguir.

3.2 Bebidas e alimentos ricos em compostos fenólicos e com comprovada ação antioxidante.

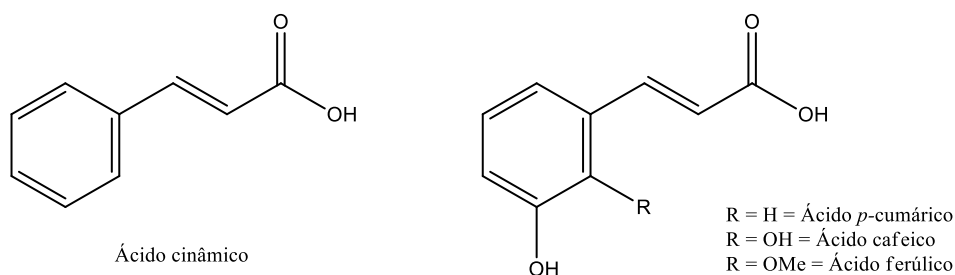
3.2.1 Vinhos

As uvas são matéria-prima para produção de vinhos. Estas são consideradas uma das principais fontes de compostos fenólicos quando comparadas a outras frutas e vegetais, porém a grande diversidade do seu cultivo resulta em uvas com diferentes características (sabor, tamanho, coloração e composição), influenciando assim, no conteúdo e perfil dos compostos polifenólicos. Dessa forma, a composição do vinho está estreitamente ligada à procedência da uva que lhe deu origem, bem como ao processo de produção, uma vez que nesse processo ocorrem transformações químicas das estruturas (ABE, et al, 2007). Além do sabor e cor, os fenólicos influenciam na aparência, fragrância, adstringência e propriedades antimicrobianas dos vinhos, e evidentemente são responsáveis pela diferença entre os vinhos branco e tinto (ARCHELA, et al., 2013).

O vinho é uma bebida proveniente da fermentação alcoólica dos açúcares de suco de uva pelas leveduras e, em alguns casos, pelas bactérias lácticas. Os compostos fenólicos presentes no vinho são relacionados aos efeitos benéficos a saúde que o consumo moderado desta bebida pode proporcionar (CABRITA, et al., 2003).

Os principais compostos polifenólicos presentes nos vinhos, estão compreendidos entre os ácidos fenólicos, flavonóides, lignanas e estilbenos. As substâncias fenólicas mais abundantes nos vinhos são: ácido cinâmico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico e o ácido cafeico (Figuras 2 e 3).

Figura 3 - Estruturas químicas das principais substâncias fenólicas presentes nos vinhos.



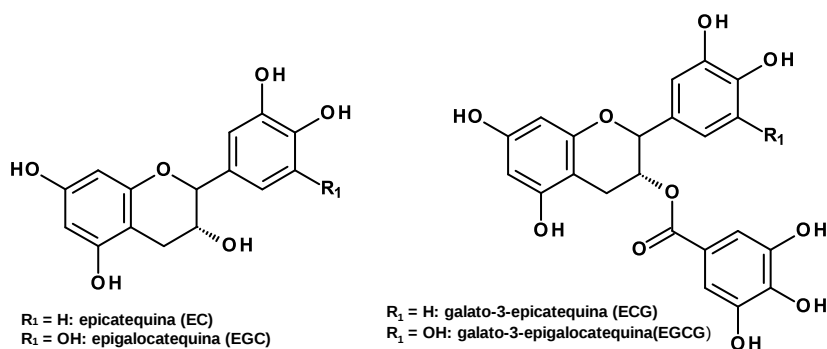
Fonte: adaptado de CABRITA, et al., 2003.

3.2.2 Chás e infusões

O chá obtido por infusão é a forma mais popular de uso desta bebida em todo mundo, por possuir fontes significativas de compostos fenólicos, sendo considerado portanto, como importante integrante da dieta humana, devido às suas propriedades antioxidantes (MORAIS, et al, 2009). Sua contribuição para a prevenção e auxílio no tratamento de doenças é dada pela presença de compostos biologicamente ativos, como os polifenóis (SCHMITZ, et al., 2005).

Os polifenóis da classe dos flavan-3-óis (catequinas, em especial, epicatequina (EC), epigallocatequina (EGC), galato-3-epicatequina (ECG) e galato-3-epigallocatequina (EGCG)) apresentam-se como os principais componentes químicos (Figura 4) terapêuticos dos chás verde e preto, cuja planta de origem é a *Camellia sinensis*, e são potentes antioxidantes e inibidores da lipoperoxidação, protegendo componentes proteicos e DNA celular (PEREIRA, et al., 2009; SHARANGI, 2009).

Figura 4 - Principais compostos presentes no chá verde e preto.



Fonte: adaptado de Pereira, et al., 2009.

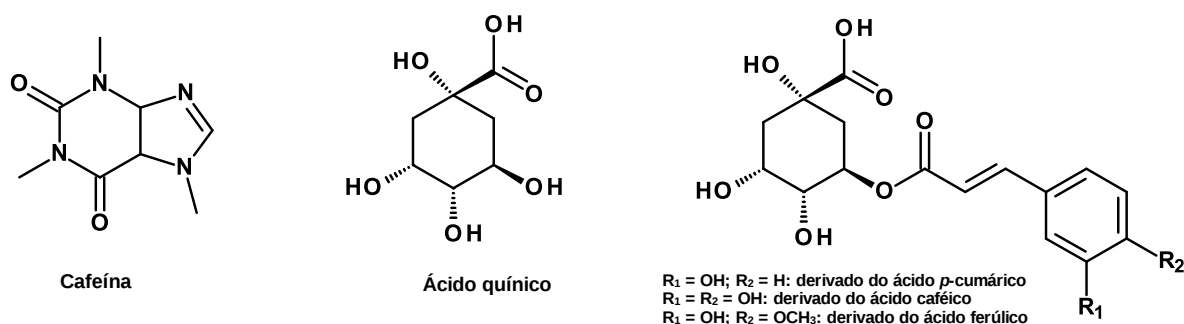
A composição do chá varia com a estação do ano, o clima, a idade da folha e a variedade do mesmo (GRAHAM, 1992).

3.2.3 Café

O café provém de uma árvore do gênero *Coffea* e sua composição química varia de acordo com a espécie. A cafeína é um alcalóide (Figura 5) e o composto mais conhecido do café, devido às suas propriedades fisiológicas e farmacológicas. Porém os ácidos clorogênicos (CGA) e os respectivos isômeros, são considerados os principais componentes fenólicos por estarem presentes em maior quantidade nesta bebida (MONTEIRO, et al., 2005).

Os ácidos clorogênicos são formados, principalmente através da esterificação do ácido quínico com um dos seguintes ácidos *trans*-cinâmicos: o ácido caféico (3,4-di-hidroxicinâmico), ferúlico (3-metoxi-4-hidróxi), sinápico (3,5-dimetóxi-4-hidróxi) ou o *p*-cumárico (4-hidróxi) (Figura 2) apresentando assim, um conjunto de 5 grupos principais de compostos fenólicos e seus isômeros formados (OLIVEIRA, D. 2011). A Figura 5 apresenta algumas estruturas relativas aos compostos citados.

Figura 5 - Estrutura de alguns compostos presentes no café.



Fonte: adaptado de OLIVEIRA, D. 2011

3.2.4 Cachaças envelhecidas

As cachaças (aguardente de cana-de-açúcar) são bastante apreciadas, principalmente por possuírem aroma e sabor característicos, que podem ser melhorados de acordo com a fermentação, destilação e envelhecimento das mesmas, em barris de madeira específicos. Estes barris de madeira são degradados pela ação do álcool

e da água (PARAZZI, et al., 2008) durante o processo de envelhecimento. Assim, alguns compostos extraídos da madeira que compõe o barril vão estar presentes na cachaça, podendo sofrer reações de oxidação, de modo a formar novos compostos aromáticos ou reações de esterificação com álcoois e ácidos do meio, produzindo os respectivos ésteres, fazendo com que as bebidas envelhecidas apresentem maiores concentrações destas substâncias (ZACARONI, et al., 2014). Além disto, outras reações e processos de transferência de massa (extração) proporcionam a incorporação de compostos fenólicos provenientes da madeira, com características multifuncionais e com propriedades antioxidantes, antibacteriana e anticarcinogênica (RODRIGUES, 2012).

Estudos indicam que cada tipo de madeira fornece através do processo de armazenamento/envelhecimento compostos fenólicos ou derivados característicos na composição final da bebida como, por exemplo, ácidos elágico e vanílico no carvalho, ácido vanílico e sinapaldeído na amburana, vanilina e ácido elágico no bálsamo, ácido gálico no jequitibá, coniferaldeído no jatobá e ácidos siríngico e vanílico e coniferaldeído no jaboti (MOREIRA, et al., 2012).

3.3 Métodos analíticos para a determinação de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante

Devido a diversidade e complexidade das substâncias fenólicas presentes nos alimentos e bebidas e as diferenças de reatividade entre estas substâncias e diferentes substratos (ou reagentes em um contexto analítico), torna-se difícil encontrar um padrão específico e conveniente para o desenvolvimento dos métodos de quantificação dos compostos fenólicos. Sendo assim, a determinação destes compostos é influenciada pela natureza do composto, amostra, tempo e condições de estocagem, e presença de possíveis interferentes (ÂNGELO, et al., 2007).

Atualmente, ainda não foi desenvolvido um método satisfatório para determinação de todos ou de uma classe específica de compostos fenólicos sem restrições, mas existem vários métodos que possibilitam relacionar diretamente a atividade antioxidante das amostras através da quantificação dos compostos fenólicos totais. Esta quantificação (*in vitro*) pode ser realizada por uma variedade de técnicas (JARRA-PALACIOS, et al., 2014).

Vale destacar uma demanda atual pela quantificação de compostos fenólicos empregando métodos cromatográficos para identificar e determinar o perfil químico, visando estabelecer marcadores em distintas amostras (KHODDAMI, et al., 2013). Porém, algumas limitações estão relacionadas à grande diversidade de padrões analíticos necessários e instrumentação mais sofisticada considerando a necessidade de identificação. Neste caso uma opção seria associação da técnica de separação com espectrometria de massas (LC-MS) (BATAGLION, et al., 2014). No entanto, pela simplicidade, boa sensibilidade para uma grande variedade de compostos e possibilidade de uma informação generalista e preliminar a maioria dos métodos exploram a detecção espectrofotométrica (JARA-PALACIOS, et al., 2014).

Dentre os métodos mais utilizados para determinação de compostos fenólicos totais por espectrofotometria, destacam-se o Folin–Ciocalteu e o azul da Prússia, e mais recentemente o uso do 4-AAP (4-aminoantipirina). Além destes, a determinação de compostos fenólicos totais pode ser realizada por outros métodos baseados em detecção via eletroquímica, quimiluminescência, fluorescência, espectrofotometria, entre outros (LU, et al., 2014). Vale destacar que alguns autores não fazem distinção entre determinação de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante (SZYDŁOWSKA-CZERNIAK, et al., 2013), visto existir uma relação direta entre estes parâmetros químicos. Contudo, neste trabalho será considerada esta diferenciação.

Assim, dentre os principais métodos para a determinação da capacidade antioxidante, destacam-se: (i) capacidade de absorção de radicais de oxigênio ORAC (do inglês “*oxygen radical absorbance capacity*”), (ii) o sequestro de radicais DPPH•, (iii) sequestro de radicais ABTS•+, (iv) sequestro dos radicais DMPD•+ (v) ensaio de poder antioxidante por redução férrica (FRAP), (vi) capacidade antioxidante cúprico (CUPRAC), e (vii) capacidade antioxidante empregando cério(IV) (CERAC). Vale salientar que a maioria destes métodos emprega estratégias onde os radicais usados ou sondas não são comuns ao meio biológico, constituindo uma das principais limitações destas metodologias (ZHANG, et al., 2014; RODRÍGUEZ-NOGALES, et al., 2011).

Os mecanismos de reação referentes aos métodos citados anteriormente, seja para capacidade antioxidante (C_{AO}) ou fenólicos totais (CF), são baseados preferencialmente em dois mecanismos: transferência de elétrons ou de átomo de hidrogênio, podendo em alguns casos ocorrer de forma simultânea (GÜNGÖR, et al., 2011). Ou ainda, métodos baseados em reação de acoplamento oxidativo do rea-

gente com os compostos fenólicos, no caso do 4-AAP (SCHOFIELD, et al., 2001; NASSIRI, et al., 2014).

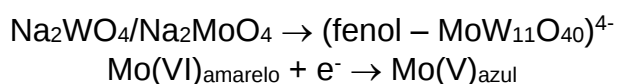
Diante de uma grande variedade de métodos descritos na literatura, foram selecionados alguns para um melhor detalhamento baseados no mecanismo de ação, ampla aplicação em diferentes tipos e classes de amostras e tempo de uso (método estabelecido). Assim, a seguir estas diferentes estratégias analíticas são descritas.

3.3.1 Métodos baseados em transferência de elétrons para determinação de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante

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

O ensaio de Folin-Ciocalteu, também conhecido como método dos fenóis totais, é o método mais frequentemente utilizado para a determinação do conteúdo fenólico total, sendo uma versão otimizada do método de Folin-Denis (usado para quantificar tirosina em proteínas), principalmente porque o uso do reagente de FC é mais sensível à redução pelos fenóis e diminui a tendência à precipitação (PREEDY, 2014). Este método pode ser usado para uma estimativa da atividade antioxidante, através da quantificação dos compostos fenólicos presentes na amostra. É um método colorimétrico, baseado na redução química de uma mistura de fosfomolibdato e fosfotungstato de sódio (ambos hexavalentes) pelas hidroxilas fenólicas (SCHOFIELD, et al., 2001). A reação se dá em meio básico e a solução saturada de carbonato de sódio é a base mais indicada. Os produtos da redução apresentam coloração azul intensa (devido aos produtos da redução do tungstato e molibdato se apresentarem no estado de pentavalente) ou seja, o número de grupos hidroxilas ou de grupos potencialmente oxidáveis controla a intensidade da cor, e por conseguinte, o valor de absorvância (ROVER, et al., 2013).

O método original de FC foi desenvolvido em 1927, caracterizado pela oxidação de fenóis pelo reagente molibdicotungstato de sódio produzindo produtos coloridos com absorção máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) entre 745-750nm, onde:



Singleton e Rossi melhoraram a sensibilidade e estabilidade do método empregando o reagente heteropoliânion fósforo molibdicotunstato, onde: $3\text{H}_2\text{O} - \text{P}_2\text{O}_5 - 13\text{WO}_3 - 5\text{MoO}_3 - 10\text{H}_2\text{O}$ e $3\text{H}_2\text{O} - \text{P}_2\text{O}_5 - 14\text{WO}_3 - 4\text{MoO}_3 - 10\text{H}_2\text{O}$. Além disto, a redução dos fenóis tornou-se mais seletiva e o $\lambda_{\text{máx}}$ dos produtos formados foi próximo a 765 nm. O princípio da reação continua o mesmo, redução do Mo(VI) para Mo(V), sendo a avaliação quantitativa realizada por espectrofotometria. O método de FC caracteriza-se por ser simples, rápido, sensível e preciso. No entanto, em meio ácido a reação é lenta, além disso, o método não é específico, podendo a reação ser afetada por moléculas que reduzem outros compostos não fenólicos, como ácido ascórbico, aminas, aminoácidos, comprometendo assim, o resultado do ensaio (PRIOR, et al., 2005).

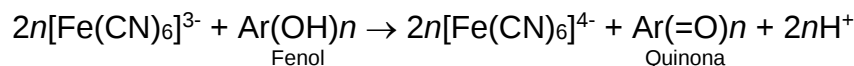
Geralmente, o ácido gálico é usado como padrão de calibração para construção da curva analítica, e a concentração das amostras são expressas em equivalentes de ácido gálico (mg L^{-1}), mas é possível a utilizar outros ácidos fenólicos como padrão, tais como: ácido cafeico, tânico, clorogênico, entre outros (ÂNGELO, et al., 2007).

3.3.1.2 Ensaio do azul da Prússia

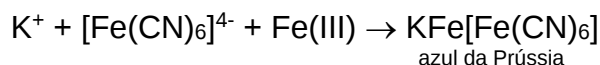
Este método caracteriza-se por ser simples, rápido, sensível e apresentar baixa interferência por compostos não fenólicos. Quando este método foi implementado, apresentava duas importantes limitações: (i) formação de precipitado após um período curto de incubação; (ii) aumento da intensidade da cor para longos períodos de tempo. Além disto, temperatura, pH e ordem de adição dos reagentes (para formação do $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, azul da Prússia) afetavam a intensidade e cinética de reação (SCHOFIELD, et al., 2001). No entanto, BERKER e colaboradores (2010) implementaram alterações no método, visando melhorar a reprodutibilidade e suplantando as limitações anteriormente reportadas. As modificações envolveram a utilização simultânea de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ e $\text{Fe}(\text{III})$, tornando as condições redox favoráveis para uma maior variedade de antioxidantes. A precipitação com azul da Prússia foi impedida com a adição de dodecil sulfato de sódio (surfactante), e o pH ótimo foi ajustado para 1,7 para manter a atividade redox do íon férrico, evitando a sua hidrólise. A mistura reacional foi incubada à temperatura ambiente durante 30 min, com isso, permitiu

oxidações mais completas do que as observadas no método convencional. (BERKER, 2010).

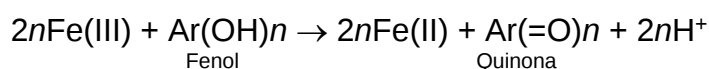
Quando o oxidante empregado do método é o $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ a reação de oxirredução simplificada do método pode ser representada por:



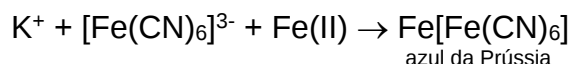
então,



Quando o oxidante a ser usado no meio são os íons Fe(III) , a reação proposta seria representada por:



tendo,



O princípio químico dessa metodologia está baseada na redução dos íons $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (ou Fe(III)) a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (ou Fe(II)) pelas hidroxilas fenólicas, em seguida, pela adição de Fe(III) (ou $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) em meio ácido ocorre a produção de pigmentos de coloração azul (azul da Prússia) intensa com máximo de absorção em 700 nm. A curva analítica pode ser construída com vários compostos fenólicos. 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 (GAHAM, 1992).

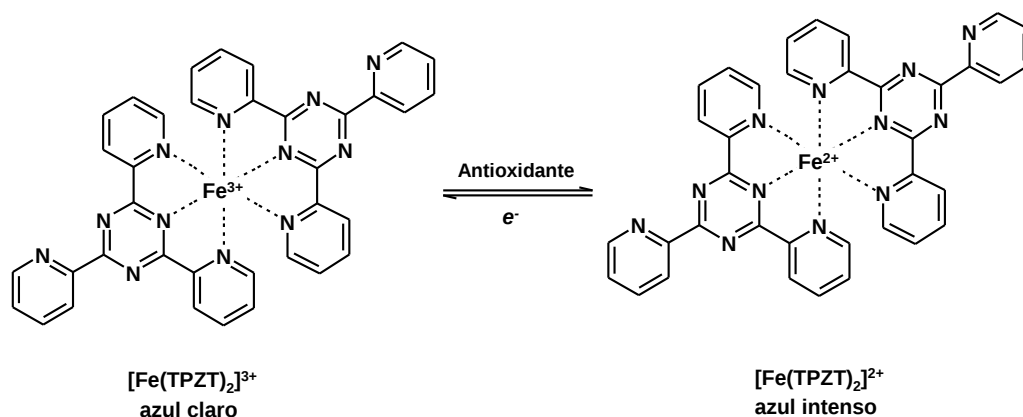
3.3.1.3 Ensaios do poder antioxidante por redução de ferro (FRAP), cobre (CUPRAC) e cério (CERAC)

Como todos os métodos utilizados para a avaliação de compostos fenólicos e capacidade antioxidante são baseados em propriedades redox, conclui-se que há correlação entre o teor de compostos fenólicos (livre ou total) e capacidade antioxidante medida pelos métodos individuais. Essas relações são evidentes a partir dos vários trabalhos descritos na literatura (DUDONNÉ, et al., 2009; WOOTTON-BEARD, et al., 2011). Sendo assim, os ensaios de FRAP, CUPRAC e CERAC ape-

sar de terem sido desenvolvidos para medir a capacidade antioxidante total (C_{AO}) de alimentos, além de apresentarem correlações significativas quando comparados entre si e entre os métodos do ABTS $^{\bullet+}$ e DPPH $^{\bullet}$, também apresentam correlações significativas quando comparados ao método de FC (STRATIL, et al., 2007; OZYURT, et al., 2010).

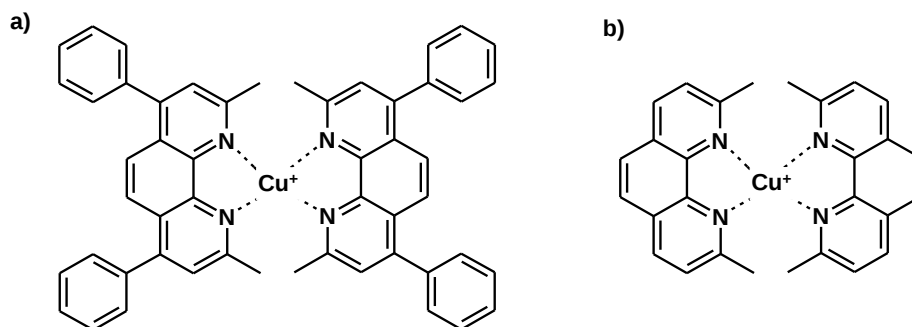
Os três ensaios ocorrem de forma semelhante, geralmente com determinação espectrofotométrica. Os ensaios do FRAP e CERAC são realizados em meio ácido, enquanto que o ensaio do CUPRAC é realizado em pH simulando as condições fisiológicas. O ensaio do FRAP baseia-se na redução do complexo férrico do TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina), onde $[Fe(TPZT)_2]^{3+}$ é reduzido para $[Fe(TPZT)_2]^{2+}$ e apresenta uma coloração azul intensa com $\lambda_{m\acute{a}x} = 593$ nm (Figura 6). Enquanto que no ensaio do CUPRAC, ocorre a redução de Cu(II) a Cu(I), e são formados complexos de Cu(I) com os ligantes cromóforos batocuproína (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina, $\lambda_{m\acute{a}x} = 490$ nm) e neocuproína (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina, $\lambda_{m\acute{a}x} = 450$ nm) (Figura 7) (HUANG, et al., 2005). No entanto, o ensaio do CUPRAC apresenta vantagens como rápida cinética de redução do complexo e maior seletividade, quando comparado ao FRAP, uma vez que, no ensaio do CUPRAC, a quantificação final da TAC numa mistura contendo vários antioxidantes só é realizada após uma combinação adequada de procedimentos de hidrólise ácida e de incubação, somada à capacidade inicialmente mensurada. (APAK, et al, 2004).

Figura 6 - Reação geral para o ensaio FRAP.



Fonte: Adaptado de HUANG, et al., 2005.

Figura 7 - Complexos formados entre Cu(I) e (a) batocuproína e (b) neocuproína.



Fonte: Adaptado de HUANG, et al., 2005.

Já no ensaio do CERAC, ocorre redução de Ce(IV) (amarelo intenso) a Ce(III), no qual se observa a diminuição da coloração proveniente do sulfato de cério, de acordo com o aumento da concentração das substâncias antioxidantes presentes na amostra ($\lambda_{\text{máx}} = 320 \text{ nm}$). Este ensaio apresenta boas correlações com os métodos de referência reportados na literatura, tais como ABTS^{•+}, CUPRAC e azul da Prússia. (OZYURT et al., 2011; OZYURT et al., 2010).

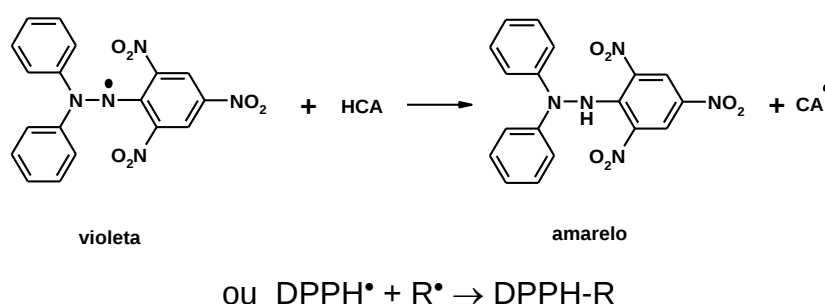
3.3.2 Métodos baseados em transferência de átomo de hidrogênio

3.3.2.1 Sequestro do radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

O ensaio do radical DPPH[•] foi descrito pela primeira vez por BLOIS (1958), quando observou que o radical DPPH[•] foi reduzido por cisteína (tiol) e outros compostos ativos. Mais tarde, BRAND-WILLIAMS e colaboradores (1995) revisaram o método original, tornando-o popular para estimar capacidade antioxidante (NOIPA, et al., 2011). O DPPH[•] (2,2 difenil-1-picrilhidrazil) é um dos poucos radicais estáveis de nitrogênio orgânico, que devido à deslocalização de um elétron desemparelhado, pode aceitar um elétron ou um radical de hidrogênio (dependendo das condições reacionais do meio e da natureza e estrutura do composto antioxidante) para tornar-se uma molécula diamagnética. Apresenta cor violeta intensa em solução alcoólica e é comercialmente disponível, não tendo que ser gerado antes do ensaio, como o TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) ou ensaio do ABTS^{•+} (NEVES, et al., 2009).

O método do sequestro de radicais livres do DPPH• é baseado em um ensaio fotométrico (ou por ressonância de spin do elétron, EPR), monitorando a diminuição de absorvância após a reação com compostos antioxidantes. O radical DPPH• possui uma absorção máxima característica entre 515 e 520 nm, a qual diminui após redução por moléculas antioxidantes (HCA), que vão neutralizar o radical doando um átomo de hidrogênio, formando um derivado amarelo (BRAND-WILLIAMS, et al., 1995). As reações gerais para este método estão representadas pela Figura 8.

Figura 8 - Reação entre o radical DPPH• e composto antioxidante genérico (HCA) ou radical (R•)



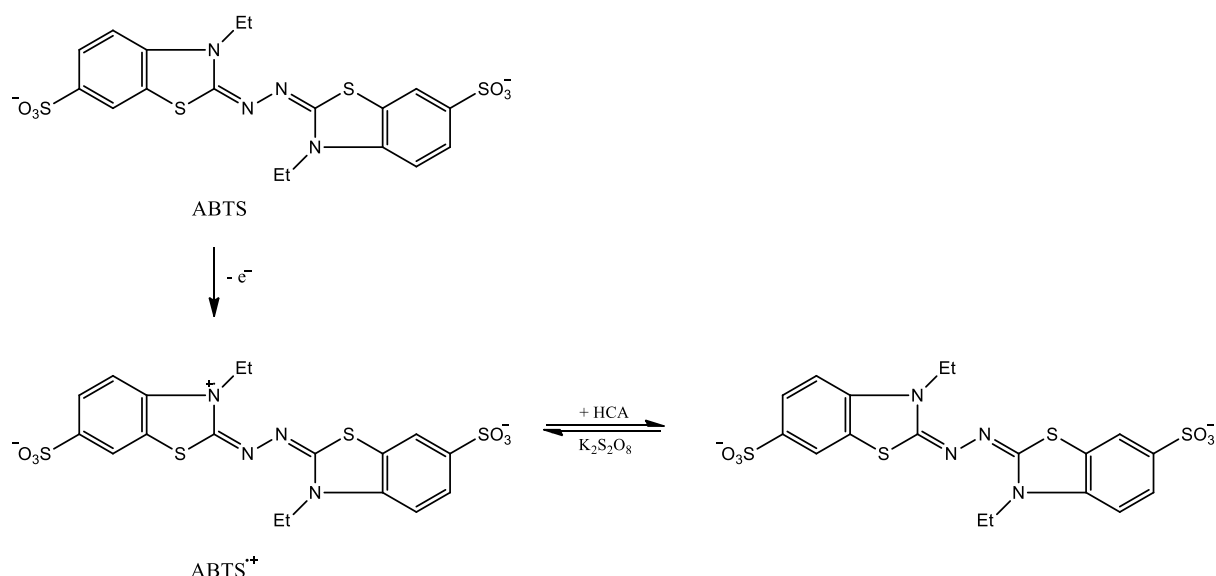
Fonte: Adaptado de WILLIAMS, et al., 1995.

Contudo, antioxidantes volumosos reagem lentamente, ou não reagem com o radical, uma vez que há impedimento estérico na molécula. E, pode gerar como consequência, um comprometimento dos resultados em amostras mais complexas (PRIOR et al., 2005).

3.3.2.2 TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) ou ensaio do ABTS•⁺

TEAC foi primeiramente desenvolvido por Miller e Rice-Evans (1993), entretanto têm sofrido modificações ao longo dos anos (NUNES, et al., 2012). O método é baseado na redução de radicais ABTS•⁺ por antioxidantes doadores de átomos de hidrogênio. Este radical de coloração verde intensa, apresentam absorção característica primária em 415 nm e absorções secundárias em 660, 734 e 820 nm. O radical ABTS•⁺ é produzido através da reação do ABTS em excesso com solução de persulfato de potássio, para posteriormente reagir com compostos antioxidantes (Figura 9) (VASCONCELOS, et al., 2007).

Figura 9 - Reação de formação do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, e estabilização deste radical por um antioxidante genérico (HCA) através do persulfato de potássio (considerando condições fisiológicas).



Fonte: adaptado de VASCONCELOS, 2007.

A avaliação quantitativa deste método pode ser por espectrofotometria. No que diz respeito ao comprimento de onda de detecção, recomenda-se a determinação em 734 nm, porque há uma possível interferência espectral de outros componentes da amostra, assim como alguma turbidez natural não minimizada (MAGALHÃES, et al., 2008).

O radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ é solúvel em água e solventes orgânicos, permitindo a determinação da capacidade antioxidante de amostras com compostos lipofílicos e hidrofílicos. No entanto, para gerar o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ deve-se deixar a solução em repouso e ao abrigo da luz entre 12-16 h, o que caracteriza uma das limitações do método (KARADAG, 2009). O mecanismo referente ao método é atribuído à transferência de elétrons (0,68 V), contudo, dependendo da estrutura dos antioxidantes e das condições reacionais, o ensaio pode ocorrer por transferência de átomos de hidrogênio (PRIOR et al., 2005).

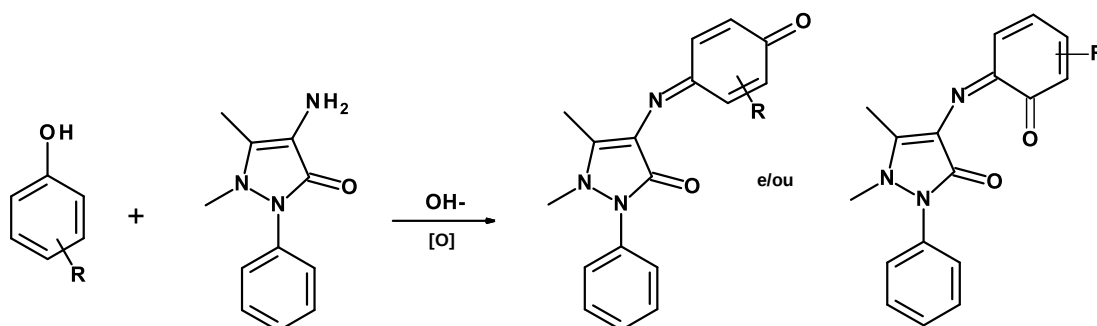
3.3.3 Métodos baseados em acoplamento oxidativo do reagente com os compostos fenólicos

3.3.3.1 Método da 4-AAP (4-aminoantipirina)

A determinação espectrofotométrica de compostos fenólicos usando o reagente 4-aminoantipirina (4-AAP) foi proposta por Emerson em 1943. Este método serve de referência e ainda tem sido empregado atualmente (NASSIRI, et al., 2014). Quando em presença de agentes oxidantes em meio alcalino, aminas aromáticas primárias e secundárias reagem com 4-AAP, dando origem a compostos intensamente coloridos, e sob estas mesmas condições fenóis também reagem (EMERSON, 1943). A reação de Emerson (1943) apresenta vantagens como resultados rápidos, fácil manipulação e reagentes relativamente estáveis (ETTINGER, 1951). Após ter sido observado que o método apresenta vantagens desta natureza para este tipo de determinação, estudos têm sido realizados desde então, e vem mostrando concordâncias quando comparado aos métodos de referência, tais como FC, DPPH• e FRAP (STRATIL, et al., 2007; KIM, et al., 2014).

Este método é baseado na reação em meio alcalino de 4-AAP com o composto fenólico na presença de oxidante. A reação geral de acoplamento oxidativo está representada na Figura 10, a qual apresenta melhor seletividade para compostos fenólicos com a posição *para* livre, seguido da posição *orto* (NASSIRI, et al., 2014).

Figura 10 - Esquema geral da reação entre 4-AAP e composto fenólico genérico.



Fonte: adaptado de STEVANA, et al., 2004.

Apesar das suas vantagens, uma grave deficiência do método é a sensibilidade insuficiente para detectar baixas concentrações de compostos fenólicos (ex-

pressos como fenol), sem uma etapa de concentração prévia dos analitos. Além disso, alguns fenóis não reagem com a 4-AAP ou não apresentam mudança batocrômica em relação ao fenol, por comparação espectral. Então, as condições experimentais ótimas deste método (pH, agente oxidante, interferências, entre outras), visando incremento de sensibilidade e seletividade tem sido avaliadas extensivamente (RODRIGUES, et al., 2010; FIAMEGOS, et al., 2002).

Sendo assim, a seletividade e sensibilidade do método em relação aos compostos fenólicos foram associadas: (i) deve haver pelo menos um grupo hidroxila livre na molécula fenólica, para um ensaio positivo; (ii) a presença de substituintes na posição *para* em relação ao grupo hidroxila inibe a ocorrência da reação, com exceções para halogênios, carboxila, ácido sulfônico, hidroxila e metoxila; (iii) um grupo nitro na posição *orto* inibe a reação enquanto que o mesmo grupo na posição *meta* ocasiona uma inibição parcial; (iv) a reação da 4-AAP ao composto fenólico tem lugar preferencial na posição *para*, quando livre (EMERSON, 1943).

Há poucos trabalhos descritos para a determinação de polifenóis em bebidas, usando este método. SCHOONEN e colaboradores (2002) propuseram, a determinação de composto polifenólicos em vinhos, através da reação com 4-AAP explorando um sistema por injeção em fluxo com detecção fotométrica e $K_3Fe(CN)_6$ como agente oxidante. Este método, quando comparado ao método de FC mostrou resultados concordantes (SCHOONEN, et al., 2002). Em 2004, STEVANA e colaboradores desenvolveram um método espectrofotométrico enzimático para a determinação do teor de compostos fenólicos totais em amostras de chás e vinhos, comparando os resultados os métodos de FC e DPPH*. Neste método a enzima polifenoloxidase oxidava os compostos fenólicos, os quais em seguida reagem com o 4-AAP a fim de serem quantificados. Concluiu-se que os resultados obtidos foram concordantes aos dois métodos (FC e DPPH*) apresentando vantagens como rapidez e elevada seletividade (STEVANATO, et al., 2004).

3.3.3.2 Método do MBTH: mecanismo, aplicações e justificativa do trabalho desenvolvido

Originalmente o método do MBTH (3-metil-2-benzotiazolinona hidrazina) para determinação de fenóis, proposto por HUNIG e colaboradores em 1957 foi realizado em meio alcalino, tendo sido usado o $K_3Fe(CN)_6$ como oxidante. O rendimento má-

ximo do produto colorido formado foi conseguido no intervalo de pH 8-10, ajustado com tampão amônia ou carbonato. Porém, para que este método possa ser empregado em meio básico existe a necessidade do uso de solventes orgânicos ou aquo-so-orgânicos (POSPISILOVÁ, et al., 1998).

FRIESTAD e colaboradores observaram em 1969, que a reação em meio alcalino apesar de ter sido satisfatória para alguns fenóis, obteve baixo rendimento do produto colorido formado, quando comparado à reação realizada em meio ácido (FRIESTAD, et al., 1969). Desde então, os mecanismos de reação deste método em meio ácido têm sido intensamente estudados, de forma que os compostos fenólicos são determinados principalmente empregando espectrofotometria (FRENZEL, et al., 1992; RIBEIRO, et al., 2009; OKTEM, et al., 2012).

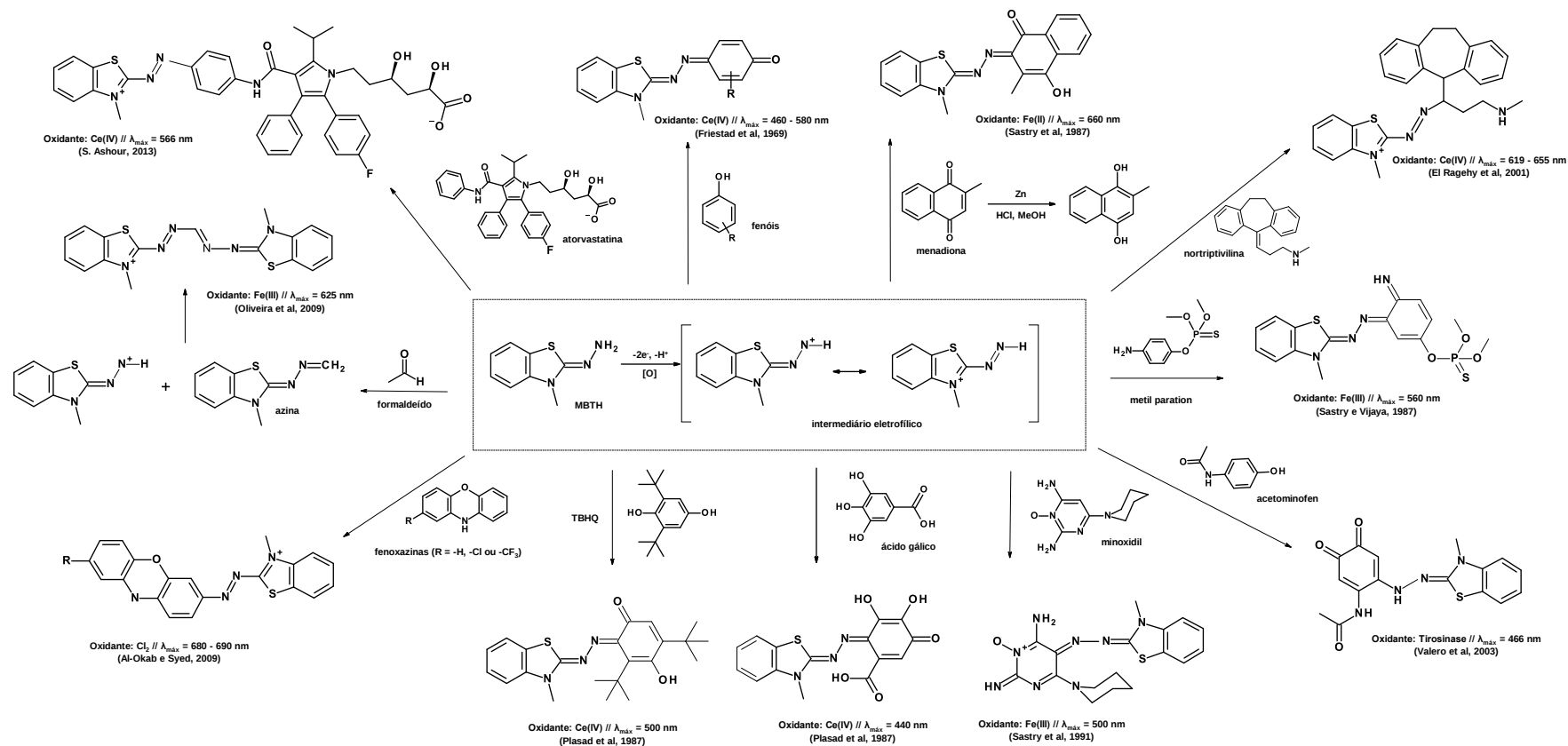
Em geral, o método do MBTH é aplicado na determinação de compostos fenólicos como substâncias puras, fármacos ou presentes em fluídos biológicos (sangue e urina). Este método apresenta cinco fatores que afetam a natureza e intensidade da coloração (e por consequência o sinal analítico), sendo: (i) natureza e concentração dos agentes oxidantes; (ii) concentração dos reagentes; (iii) pH ou acidez do meio; (iv) temperatura e (v) ordem de adição dos reagentes (SUDHA, 2012).

O método do MBTH pode ser implementado em meio ácido ou básico (ZAMUNER et al, 2008), como já mencionado. No entanto, foi visto que a reação se processa preferencialmente em meio ácido (visando a determinação de aminas aromáticas ou moléculas contendo a função fenol) e os oxidantes mais empregados são os íons Fe(III) e Ce(IV).

O mecanismo sugerido para reação do MBTH com diferentes compostos, de acordo com levantamento da literatura, independe das condições de pH ou acidez do meio. De forma geral, observou-se que o MBTH é inicialmente oxidado com a perda de dois elétrons e um próton, formando um intermediário eletrofílico (Figura 11). Este intermediário reage com aminas aromáticas, aldeídos, fenóis (preferencialmente na posição *para* ou *orto*), entre outras classes de moléculas por ataque eletrofílico ao anel aromático mais nucleofílico. Por fim, o composto resultante é oxidado, levando a formação de espécies coloridas (SUDHA, 2012).

De acordo com a Figura 11 observa-se que o MBTH foi capaz de reagir com varias moléculas sejam simples (como o formaldeído) ou polifuncionais (como a atorvastatina) em meio ácido (HCl ou H₂SO₄) com diferentes oxidantes, sendo, o intermediário eletrofílico formado (sugerido), o mesmo em todos os trabalhos.

Figura 11 - Esquema geral do mecanismo de reação do MBTH com diferentes compostos em meio ácido e diferentes oxidantes.

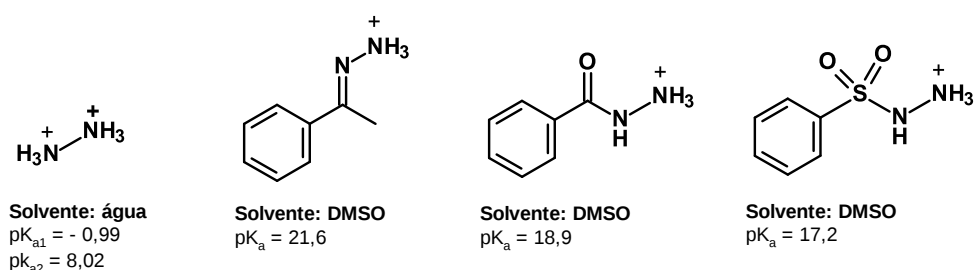


Fonte: elaborado pela autora, 2014.

Do ponto de vista mecanístico, a formação do intermediário descrito na Figura 11 em meio básico seria considerada normal, visto que a molécula de MBTH estaria parcialmente neutra ou distribuída em uma mistura entre as espécies neutras e protonadas. Contudo, isto dependeria do pH do meio e do valor de pKa do grupo hidrazina da molécula de MBTH. Para a formação destes intermediários em meio ácido, a premissa é que o grupo hidrazina não esteja protonado, e desta forma, o nitrogênio tenha o par de elétrons livre passível de sofrer oxidação, como descrito pela literatura para este padrão reacional. Caso semelhante seria a reação para determinação espectrofotométrica de sulfeto empregando a formação do corante azul de metileno, passando pela oxidação da amina aromática *N,N*-dimetil-*p*-fenilenodiamino em meio ácido com íons Fe(III) e posterior acoplamento com sulfeto (SUDHA, 2012).

Apesar de ainda não descrito na literatura consultada o valor de pKa do MBTH, considerou-se por questões de referência, compostos com a função hidrazido, a fim de se estabelecer uma comparação. Assim, de acordo com a Figura 12 abaixo, tem-se alguns compostos com a função hidrazina e seus respectivos valores de pKa. Nota-se que para a hidrazina (em água), a dissociação do primeiro próton seria bastante favorecida, logo, para que o mesmo esteja protonado o meio deve ser muito ácido. Para as outras estruturas apresentadas, os valores de pKa (em DMSO) são bastante elevados indicando ácidos muito fracos, mas em água (solvente prótico) estes valores devem ser menores.

Figura 12 - Estrutura e pKa de compostos com a função hidrazina em função do solvente.



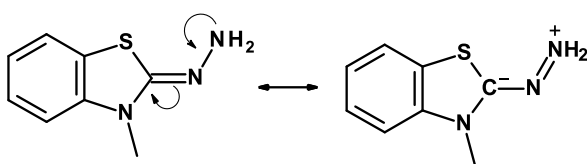
Fonte: adaptado de BISSOT, et al., 1957.

Assim, pode-se considerar dentre as estruturas do MBTH duas possibilidades, a molécula neutra ou protonada, a qual irá ser oxidada em meio ácido para formação do intermediário eletrófilico (Figura 11). Assim, na Figura 13A se descreve as estruturas de ressonância do MBTH antes da oxidação, considerando a espécie neutra.

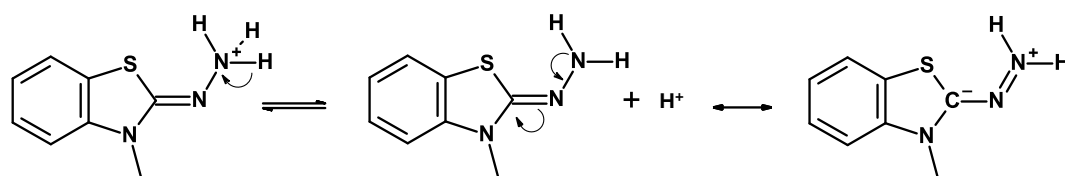
Em um segundo momento, justifica-se a formação do intermediário caso o mesmo esteja protonado (Figura 13B), tendo-se a primeira etapa uma dissociação da molécula, mesmo que em meio ácido, para levar a formação da espécie neutra, a qual segundo a literatura, sofre o processo de oxidação. Desta forma, pode-se justificar a formação de tal intermediário em meio ácido.

Figura 13 - Híbridos de ressonância do MBTH em duas condições (neutro e protonado).

A. Forma neutra



B. Forma protonada



Fonte: elaborado pela autora, 2014.

De acordo com o exposto e considerando o fato de não ter sido encontrado trabalhos reportados na literatura empregando o método do MBTH para a determinação de CF totais em amostras de bebidas, este trabalho propõe o uso do método do MBTH aos métodos espectrofotométricos já empregados, considerando Folin-Ciocalteu, azul da Prússia e 4-AAP como alternativa para tal propósito. O método do MBTH pode superar algumas desvantagens destes métodos citados, por reagir seletivamente com compostos fenólicos, como os *para*-substituídos, que apresentam limitações de reação com a 4-AAP; não ser afetado por moléculas redutoras, como ácido ascórbico, não subestimando assim os resultados; além de caracterizar-se por ser rápido, simples, versátil e apresentar boas condições em relação à linearidade, exatidão e precisão em relação a outros trabalhos da literatura (GOULDEN, et al., 1973; RIBEIRO, et al., 2009; OKTEM, et al., 2012).

4 EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados neste trabalho são de grau analítico de pureza. Todas as soluções foram preparadas com água (condutividade $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$) obtidas a partir de purificador Millipore Direct-Q5 UV.

A solução de MBTH (3-metil-2-benzotiazolinona hidrazina) a 5 mmol L^{-1} foi preparada dissolvendo-se 0,011 g de MBTH (Sigma) em 10 mL de uma solução $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 (ou 2 mol L^{-1} , quando empregou-se cério como oxidante), assim como a solução de sulfato de ferro(III) amoniacal (Merck) 0,5% (m/v) foi preparada dissolvendo-se 0,05 g do mesmo, em 10 mL da solução $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 . A solução de sulfato de cério(IV) (Merck) 0,5% (m/v) foi preparada dissolvendo-se 0,05 g do mesmo, em 10 mL de H_2SO_4 $2,0 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução tampão Britton-Robinson (solução formada pela mistura das soluções de ácido bórico, acético e *orto*-fosfórico, ajustando-se o pH com solução de hidróxido de sódio) foi preparada de acordo com os procedimentos descritos por PERRIN e DEMPSEY (1974). Esta solução foi preparada com a mistura de volumes idênticos de cada ácido com concentração de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ variando o volume de hidróxido de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ até que fosse atingido pH 9,0 desejado.

O reagente de Folin–Ciocalteu (FC) foi obtido comercialmente (Vetec). Sendo assim, preparou-se uma solução 10% (v/v) diluindo-se 10 mL do reagente de FC em 90 mL de água deionizada (VARGAS, et al., 2008). A solução de carbonato de sódio (75 g L^{-1}) foi preparada dissolvendo-se 7,5 g de Na_2CO_3 (Vetec) em 100 mL de água deionizada. Em seguida, as mesmas foram armazenadas em recipiente de polietileno.

A solução tampão borato ($\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$, Merck) a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ empregada no método da 4-aminoantipirina (4-AAP, Sigma) foi preparada pesando-se 1,91 g de tetraborato dissódico deca-hidratado e diluindo-se em 50 mL de água deionizada. Então, adicionou-se gotas de uma solução concentrada de hidróxido de sódio (Vetec) até que fosse atingido $\text{pH} = 11,0 \pm 0,1$. Adicionalmente usou-se $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Vetec) a 0,8% (m/v) como agente oxidante e uma solução de 4-AAP a 0,4% (m/v), ambas preparadas em tampão borato ($\text{pH} = 11 \pm 0,1$).

A solução ($600 \mu\text{mol L}^{-1}$) do radical DPPH^{*} foi preparada pesando-se 0,012 g do mesmo, em 50 mL de metanol (SHARMA, et al., 2009).

A solução estoque do radical derivado do ácido 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS^{•+}) a 5 mmol L^{-1} foi preparada pela dissolução de 0,026 g de ABTS (Sigma) e 0,004 g de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Merck) em 10 mL de água deionizada. Após 16 h de incubação ao abrigo da luz, a solução foi diluída para 25 mL com tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e pH ajustado para $7,4 \pm 0,1$ (ARTS, et. al., 2004).

As amostras analisadas de vinhos (brancos e tintos), chás, infusões e cafés foram adquiridas no comércio local. As amostras de cachaças envelhecida em diferentes madeiras foram adquiridas junto ao Engenho João Nunes, empresa incubada na UFAL. Os chás, infusões e cafés após serem abertos e/ou preparados eram acondicionadas em refrigerador a 4°C por no máximo 48 h.

As soluções estoque (300 mg L^{-1}) de ácido gálico (Sigma), L-cisteína (Vetec), D-glucose (Sigma), ácido ascórbico (Carlos Erba), L-Dopa (Sigma), sulfito de sódio (Vetec), N-propil galato (Sigma), ácido tânico (Sigma), ácido ferúlico (Sigma) e ácido clorogênico (Sigma) foram preparadas dissolvendo-se 0,012 g dos compostos em 40 mL de água deionizada. As soluções estoque (300 mg L^{-1}) de rutina, ácidos *o,m,p*-hidroxicinâmico (Acros organics) foram preparadas dissolvendo-se os compostos em $500 \mu\text{L}$ de DMSO (dimetilsufóxido) (Vetec) e em seguida avolumando-se as soluções para 40 mL de água deionizada. As soluções estoque (2000 mg L^{-1}) de quercetina (Sigma), trolox (Sigma) e kaempferol (Genay) foram preparadas dissolvendo-se 0,01 g dos compostos, em 5 mL de DMSO.

As soluções de trabalho foram preparadas diariamente, a partir da diluição adequada da solução estoque em água.

4.2 Equipamentos

As medidas espectrofotométricas foram realizadas empregando-se espectrofotômetro FEMTO (Modelo 700S, Brasil). Para as medidas de pH, foi utilizado um medidor de pH GEHAKA (Modelo PG 1800, Brasil) e, para a medida de massa dos reagentes e padrões visando o preparo de soluções foi empregada uma balança analítica GEHAKA com precisão de 0,001 g.

4.3 Procedimentos

Em todos os métodos descritos a seguir, o AG foi utilizado como padrão de referência para obtenção da curva analítica. Então, os resultados das amostras foram expressos em equivalentes (mg L^{-1}) de AG. O branco (sinal analítico de referência) foi obtido a partir de uma solução análoga às soluções realizadas para cada método e o volume da solução do padrão ou amostra foi substituído por água deionizada em cada caso.

4.3.1 Método proposto (MBTH)

Em um tubo tipo falcon graduado de 15 mL, adicionou-se 175 μL da solução estoque de MBTH (5 mmol L^{-1}) e da solução estoque do oxidante (sulfato de ferro(III) amoniacal) 0,5% (m/v) respectivamente. Em seguida, adicionaram-se 2 mL da solução dos padrões avaliados ou amostra previamente diluída e 650 μL de água deionizada, nesta ordem, perfazendo um volume final de 3,0 mL. Feito isso, aguardou-se 40 min para que a reação se estabilizasse e as medidas espectrofotométricas fossem realizadas. Após o tempo estabelecido, transferiu-se 1,50 mL para uma cubeta de vidro de 1,0 cm de caminho óptico e as medidas espectrofotométricas foram realizadas em 450 nm.

4.3.2 Método de Folin–Ciocalteu (Compostos fenólicos totais)

Em um tubo tipo falcon graduado de 15 mL, adicionou-se 500 μL da solução de Folin–Ciocalteu 10% (v/v) e da solução de Na_2CO_3 (75 g L^{-1}), respectivamente. Em seguida, adicionou-se 2 mL da solução do padrão avaliado ou amostra previamente diluída e 2 mL de água deionizada, nesta ordem, até um volume final de 5,0 mL. Feito isso, aguardou-se 30 min e após esse tempo, transferiu-se 1,50 mL para uma cubeta de vidro com 1,0 cm de caminho óptico, sendo realizadas as medidas espectrofotométricas em 770 nm (VARGAS, et al., 2008; ROVER, et al., 2013).

4.3.3 Método da 4-aminoantipirina (4-AAP)

Em um tubo tipo falcon graduado de 15 mL, adicionou-se 300 μ L da solução de $K_3Fe(CN)_6$ 0,8% (m/v), 2 mL da solução do padrão ou amostra previamente diluída e 1 mL da solução de 4-AAP 0,4% (m/v), respectivamente, por fim, completou-se com água deionizada para um volume final de 4 mL. Com isso, aguardou-se 30 min e após esse tempo, transferiu-se 1,50 mL para uma cubeta de vidro de 1,0 cm de caminho óptico, com a qual foram feitas as medidas espectrofotométrias em 428 nm (EMERSON, 1943; ETTINGER, 1951).

4.3.4 Ensaio do sequestro do radical DPPH•

Em um tubo tipo falcon graduado de 15 mL, adicionou-se 200 μ L da solução do radical DPPH• ($600 \mu\text{mol L}^{-1}$), 1 mL da solução do padrão ou amostra previamente diluídos e 2,8 mL de uma solução 25% (v/v) de metanol, nesta ordem, para um volume final de 4,0 mL. Feito isso, aguardou-se 30 min e após esse tempo, transferiu-se 1,50 mL para uma cubeta de vidro com 1,0 cm de caminho óptico. As medidas espectrofotométricas foram realizadas em 527 nm (NEVES, et al., 2009; NOIPA, et al., 2011).

4.3.5 Ensaio do sequestro do radical ABTS•⁺

Em um tubo falcon graduado de 15 mL, adicionou-se 220 μ L da solução estoque do radical ABTS•⁺, 1 mL da solução padrão ou amostra previamente diluídos e completou-se com água deionizada, nesta ordem, até um volume final de 4,0 mL. Feito isso, aguardou-se 15 min e transferiu-se 1,50 mL para uma cubeta de vidro de 1,0 cm de caminho óptico, sendo as medidas espectrofotométricas realizadas em 734 nm (KARADAG, 2009; NUNES, et al., 2012).

4.4 Preparo das amostras analisadas

As amostras de cachaças envelhecidas e vinhos (tinto e branco) foram adequadamente diluídas em água deionizada, antes das análises. As amostras de ervas foram preparadas conforme indicado nas embalagens, a partir da extração dos com-

postos por infusão, onde um sachê de cada tipo de chá ou infusão foi colocado em um erlenmeyer de 250 mL, e em seguida, adicionou-se 100 mL de água aquecida (~ 90 °C). Os sistemas foram deixados fechados, para evitar oxidação dos compostos fenólicos e em repouso por 15 min. Após esse tempo, os sachês foram retirados das soluções. Quando em temperatura ambiente, as amostras foram diluídas adequadamente, de acordo com o método a ser avaliado. As amostras de cafés também foram preparadas conforme indicado nas embalagens, sendo que para os cafés solúveis (cafeinados e descafeinados), pesou-se em vidro de relógio, 2,0 g de cada amostra (equivalente a uma colher de chá convencional) e em seguida, transferiu-se para béquero de 100 mL. Adicionou-se em cada béquero o volume de 50 mL de água aquecida (~ 90 °C) e dissolveu-se os grânulos com auxílio de bastão de vidro. Já para os cafés torrados e moídos, pesou-se em vidro de relógio, aproximadamente 16 g de cada amostra (equivalente a uma colher e meia de sopa) e em seguida, transferiu-se para coador de café (papel) (Modelo 102, Maratá especial) o qual estava em um suporte específico. Por fim, realizou-se extração adicionando-se 500 mL de água aquecida (~ 90 °C) nas amostras acondicionadas nos respectivos filtros. Todas as amostras foram reservadas em béquero até atingir temperatura ambiente, e posteriormente acondicionadas em frasco âmbar. As mesmas foram usadas até 48 h após o preparo.

4.5 Avaliação estatística dos dados

Para otimização de alguns parâmetros analíticos foi empregado como critério a sensibilidade a partir do valor do coeficiente angular da respectiva curva analítica em uma determinada condição de estudo. Portanto, as curvas analíticas avaliadas para os métodos que visavam a quantificação de compostos fenólicos totais foram contruídas com no mínimo cinco pontos, de acordo com a relação: $A = sC_{CF} + b$, sendo C_{CF} a concentração dos compostos fenólicos, s o coeficiente angular e b o coeficiente linear. O coeficiente de correlação linear (r) foi calculado com objetivo de avaliar a disposição dos pontos quanto à adequação ao comportamento linear. Procedimento semelhante foi realizado nos métodos de avaliação da capacidade antioxidante frente aos radicais ABTS^{•+} e DPPH[•], sendo que as curvas foram construídas de acordo com a relação: $\%IA = aC_{AO} + b$, onde $\%IA$ representa o percentual de inibição do sinal analítico referente ao radical e C_{AO} a concentração do composto anti-

oxidante. Todo o tratamento estatístico foi feito utilizando o software *Origin® 8.0* (*OriginLab Corporation, Inglaterra*).

O LOD (limite de detecção) pode ser definido como o início do intervalo em que é possível distinguir com uma dada confiança estatística (normalmente 95%), o sinal do branco do sinal da amostra, enquanto que o LOQ (limite de quantificação) é a menor concentração do analito que produz um sinal analítico a partir do qual possa ser quantificado. O conhecimento destas figuras de mérito é essencial porque são esses valores que mostram se é possível alcançar os níveis de concentração do analito em determinadas amostras em relação aos valores estabelecidos pela legislação. Desta forma, os cálculos relativos aos limites de detecção (LOD) (3σ) e de quantificação (LOQ) (10σ) foram realizados de acordo com as seguintes equações: $LOD = C_{\text{branco}} + 3(sb/ac)$ e $LOQ = C_{\text{branco}} + 10(sb/ac)$, onde C_{branco} = concentração relativa ao sinal do branco, sb equivale ao desvio padrão do branco analítico ($N = 10$), enquanto ac 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 analítico dentro da faixa linear e xp corresponde ao valor médio encontrado para este padrão ($N = 10$) (IPAC, 2011).

A avaliação dos resultados dos diferentes métodos empregados foi realizada a partir de procedimentos de correlação linear entre os resultados obtidos pelo método proposto e pelos métodos constantes na literatura. Para todas as correlações foi considerado um intervalo de confiança igual a 95%.

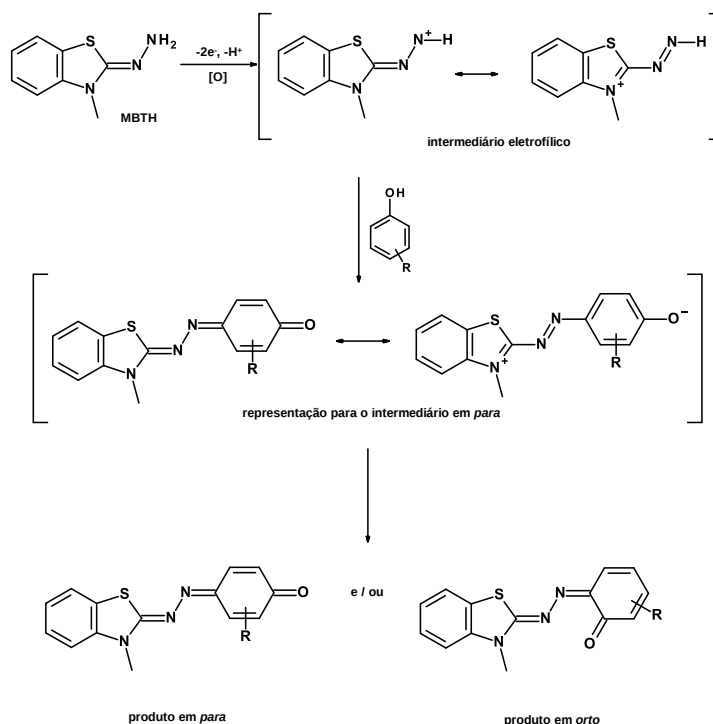
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização do método: aspectos iniciais

Neste trabalho, para fins de comparação, seria mais adequado o uso do método (MBTH) em meio básico, uma vez que métodos utilizados para determinação do teor total de compostos fenólicos, como FC e 4-AAP são realizados nesta condição. Mas, ressalta-se que o ensaio do azul da Prússia que também empregado para esta finalidade é realizado em meio ácido, e mostrou-se eficiente, tendo resultados concordantes com o método de FC (BERKER, et al, 2010).

De acordo com o trabalho publicado por POSPISILOVÁ (1998), existia um relato do método aplicado em meio básico. Sendo assim, usou-se inicialmente solução tampão Britton-Robinson (pH = 9,0) para uma avaliação inicial, porém verificou-se baixa solubilidade do MBTH e portanto, o desenvolvimento do método nesta condição não seria favorecido. Neste caso, a Figura 14 apresenta o mecanismo da reação do método desenvolvido em meio ácido.

Figura 14 - Mecanismo da reação entre MBTH e composto fenólico genérico em meio ácido.



Fonte: adaptado de SUDHA, 2012.

Com isto, e em função do reportado na literatura, ficou estabelecido que o método seria realizado em meio ácido, tendo sido selecionados, os ácidos H_2SO_4 e HCl , assim como os íons Fe(III) ou Ce(IV) , para o processo de otimização. A partir deste ponto, foram avaliados a influência de: (i) diferentes compostos fenólicos no sinal analítico; (ii) variação do comprimento de onda em função do composto fenólico; (iii) influência do tipo do ácido; (iv) ordem de adição dos reagentes; (v) cinética reacional; (vi) concentração dos reagentes; (vii) volume dos reagentes; (viii) reatividade frente a diferentes compostos fenólicos; (ix) figuras de mérito. Ao final da otimização, o método foi aplicado em diferentes amostras e os resultados obtidos comparados com outros métodos para determinação de compostos fenólicos totais ou capacidade antioxidante. Todos os parâmetros avaliados são apresentados e discutidos a seguir.

5.2 Avaliação preliminar do método aplicado a compostos fenólicos

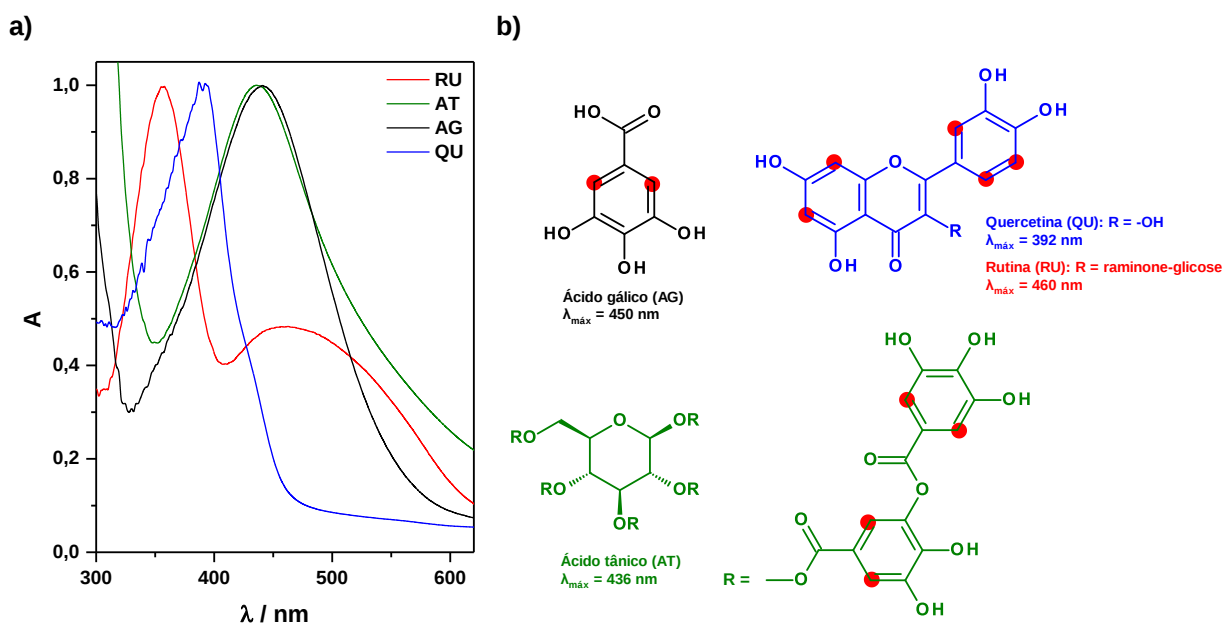
Nos trabalhos reportados na literatura, comumente o método do MBTH é aplicado a derivados do fenol ou fármacos contendo a função fenol, sendo em geral estruturas simples (THARPA, et al, 2010). Contudo, não existiam relatos da aplicação deste método visando a determinação de compostos fenólicos totais, ou reações com compostos fenólicos presentes em alimentos ou bebidas, desde moléculas com estruturas mais simples, como a do ácido gálico, a mais elaboradas (complexas), como a rutina, por exemplo.

Assim, inicialmente o padrão reacional do método foi testado com diferentes compostos fenólicos, com o objetivo de avaliar a influência da variação da estrutura molecular na resposta analítica, e selecionar um padrão de referência a ser utilizado na otimização do método. Em princípio, foram selecionados os seguintes compostos: ácido gálico (AG), ácido tânico (AT), quercetina (QU) e rutina (RU), baseado na presença em amostras de bebidas e alimentos e complexidade estrutural. A reação ocorreu para todos os compostos (mudança de cor em relação ao branco analítico) com variação do $\lambda_{\text{máx}}$ de 392 nm (QU) a 450 nm (AG), como apresentado na Figura 15. De acordo com os compostos avaliados se obteve uma variação de 58 nm, em função das diferenças estruturais dos compostos fenólicos. A diferença de intensidade se deu em função da variação da concentração molar, pois apesar de todos os compostos estarem a concentração de 50 mg L^{-1} , as massas moleculares são distin-

tas. Como resultado preliminar, ficou evidente que a estrutura do composto poderia levar a alterações do comprimento de onda de máxima absorção e desta forma, este fator influenciaria diretamente nos resultados com as amostras, onde existe uma mistura de compostos. Assim, a seleção do padrão de composto fenólico deveria levar isto em consideração.

Em seguida, foi verificado se estes compostos apresentariam uma relação linear quanto a variação de concentração em função do sinal analítico (absorvância) no comprimento de onda de máxima absorção. Para tanto, foram construídas curvas analíticas com variação da concentração (5 a 30 mg L⁻¹) dos compostos fenólicos anteriormente citados com os oxidantes, Fe(III) e Ce(IV). Os resultados relativos a este estudo são apresentados na Tabela 2.

Figura 15 - a) Espectro de absorção molecular normalizados dos produtos de reação entre os compostos fenólicos e MBTH. **b)** Estrutura dos compostos avaliados e possíveis pontos de reatividade (em vermelho) para reação com MBTH em meio ácido. Condições: Concentração compostos avaliados: 50 mg L⁻¹, [MBTH] = 18 mmol L⁻¹, [H₂SO₄] = 0,1 mol L⁻¹ e 0,1% (m/v) em Fe(III).



Fonte: elaborado pela autora, 2014.

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 2), foi possível observar que o AG foi o composto que apresentou melhor sensibilidade (inclinação da curva analítica) e uma boa linearidade (considerando a concentração em mol L⁻¹). Além disto, no geral, todos os compostos apresentaram sinal do branco elevado.

Tabela 2 - Algumas figuras de mérito para as curvas analíticas dos compostos fenólicos avaliados em função dos diferentes oxidantes, Fe(III) e Ce(IV). Condições: [MBTH] = 18 mmol L⁻¹, [H₂SO₄] = 0,1 mol L⁻¹ e 0,1% (m/v) em Fe(III).

Composto fenólico	$\lambda_{\text{máx}}$	Faixa linear, μM	Curva analítica: $A_{\lambda} = sC_{\text{CF}} + b$					
			Fe(III)			Ce(IV)		
			s ($\times 10^{-3}$)	b	r	s ($\times 10^{-3}$)	b	r
AG	450	29,39 - 176,35	$2,58 \pm 0,06$	$0,04 \pm 0,01$	0,9980	$3,50 \pm 0,24$	$0,08 \pm 0,02$	0,9813
AT	436	2,94 - 17,63	$15,17 \pm 0,86$	$0,17 \pm 0,01$	0,9872	$17,73 \pm 0,62$	$0,09 \pm 0,01$	0,9950
QU	392	16,54 - 99,27	$2,33 \pm 0,26$	$0,14 \pm 0,01$	0,9503	$1,99 \pm 0,30$	$0,03 \pm 0,01$	0,9361
RU	460	8,19 - 49,14	$7,68 \pm 0,24$	$0,13 \pm 0,01$	0,9961	$5,37 \pm 0,16$	$0,09 \pm 0,01$	0,9975

C_{CF} = concentração composto fenólico // todas as curvas apresentaram cinco pontos com o branco analítico ($N = 5$).

AG = ácido gálico; **AT** = ácido tânico; **QU** = quercetina; **RU** = rutina.

Fonte: elaborado pela autora, 2014.

Estes resultados indicaram que inicialmente todos os compostos tinham potencial para serem aplicados no método espectrofotométrico em desenvolvimento como padrões. O AG foi selecionado como padrão/referência para otimização do método, considerando alguns aspectos: apresentou boa sensibilidade na avaliação preliminar (sem otimização do método), é abundante em alimentos e bebidas, facilmente solúvel em água, de custo reduzido, e é o padrão mais utilizado nos métodos de determinação do teor de fenólicos totais e/ou da capacidade antioxidante (ÂNGELO, et al, 2007). Por fim, vale destacar que o AG é um derivado da classe do ácido hidroxibenzóico (sendo um não-flavonóide). Nesta classe de compostos, a atividade antioxidante e capacidade de transferência de elétrons está relacionada com a posição dos grupos hidroxilas e também com a proximidade do grupo $-\text{CO}_2\text{H}$ em relação ao grupo fenil (SILVA, et al 2010). Sendo assim, a ordem de adição dos reagentes foi avaliada, a fim de observar o comportamento da reação quanto a este aspecto, assim como a estabilidade da coloração do produto formado.

5.3 Ordem de adição dos reagentes

Na sequência, foi verificado como a ordem de adição dos reagentes poderia influenciar no produto reacional formado, e por consequência no desenvolvimento do método. Para tanto, foram avaliadas duas ordens distintas, mantendo-se o oxidante constante (íons férricos) e variando-se o tipo de ácido (HCl ou H₂SO₄): AG + Fe(III) + MBTH (ordem 1) e MBTH + Fe(III) + AG (ordem 2). Desta forma, observou-se que quando era utilizada a ordem 1, a coloração do produto formado era azul (independen-

dente do ácido avaliado), isto ocorreu provavelmente porque houve oxidação parcial do composto fenólico, e o produto formado, assim como o padrão reacional com MBTH deva ter sido alterado.

Em relação a ordem 2, obteve-se a coloração alaranjada esperada (SUDHA, 2012), para os dois ácidos avaliados, onde a diferença se deu apenas na intensidade da cor. Os resultados referentes a esta avaliação são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Avaliação da ordem de adição dos reagentes em função do tipo de ácido considerando algumas figuras de mérito. Condições: Faixa linear de concentração de 5 a 40 mg L⁻¹ (N = 5), [MBTH] = 18 mmol L⁻¹, [H₂SO₄] = [HCl] = 1 mol L⁻¹ e 0,1% (m/v) em Fe(III).

Composto fenólico	MBTH + Fe(III) + AG (ordem 2)					
	Curva analítica: $A_\lambda = sC_{CF} + b$					
	HCl			H ₂ SO ₄		
	$s(x10^{-3})$	b	r	$s(x10^{-3})$	b	r
AG	36,28 ± 0,02	0,17 ± 0,04	0,9902	31,00 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,9963

Fonte: elaborado pela autora, 2014.

Esses resultados para ordem de adição 2 (Tabela 3) mostram que a reação com ambos ácidos apresentou boa sensibilidade e linearidade (concentração em mg L⁻¹). Contudo, o sinal do branco foi mais elevado quando se empregou o HCl em relação do H₂SO₄. Esta consideração foi relevante quanto a escolha do ácido mais adequado a ser utilizado no método, em etapas posteriores para otimização do método.

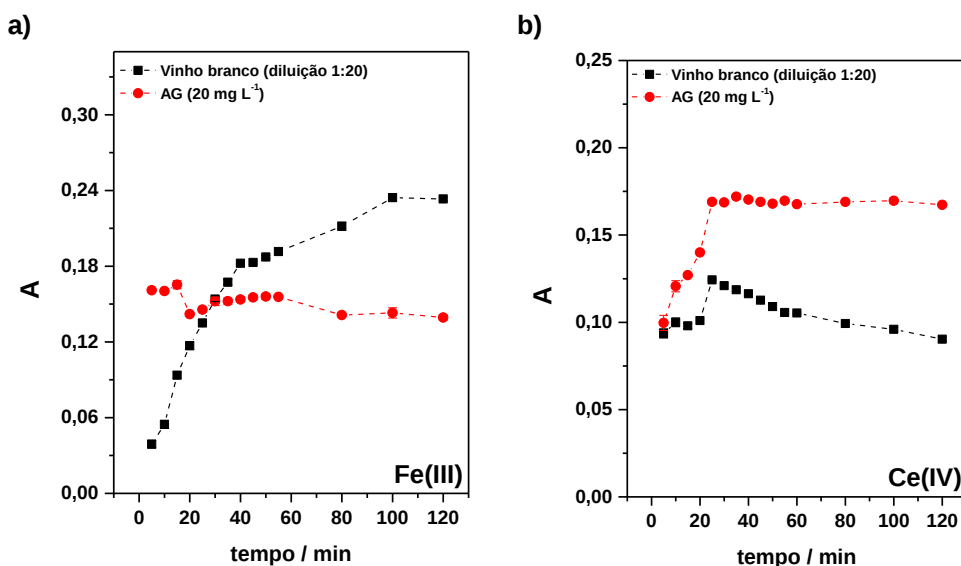
Em sequência, se avaliou a estabilidade do produto formado em função da flutuação do sinal analítico após 30 min (tempo mínimo estabelecido para iniciar as medidas) para ordem de adição 2. Foi verificado que até 2 h, após tempo o início das medidas analíticas, não ocorreu variação apreciável do sinal ($\pm 5\%$). Assim, considerou-se que o sinal se manteve estável durante este tempo, implicando que não ocorreu reações secundários e/ou formações de outros produtos que alterassem a cor original e absorvância da solução. Para os experimentos seguintes esta ordem 2 (MBTH + Fe(III) + AG) de adição foi mantida.

5.4 Cinética reacional

O tempo de equilíbrio (estudo cinético) da reação foi avaliado, tendo sido considerado uma solução de referência em AG e uma amostra de vinho branco para

comparação da estabilidade reacional. Os resultados relacionados a esta avaliação são apresentados na Figura 16 para um tempo de até 2 h (120 min). De acordo com avaliação dos resultados, verificou-se que quando as reações eram realizadas na presença de Fe(III), o sinal analítico apresentou pouca variação a partir de 40 min (Figura 16a), para amostra de vinho, mas que a reação apresentou sinal analítico praticamente constante com o AG. Este fato, provavelmente está associado a complexidade da amostra de vinho, com a presença de diferentes compostos fenólicos.

Figura 16 - Avaliação da cinética reacional em função do oxidante (a) Fe(III) e (b) Ce(IV) empregando AG (20 mg L^{-1}) como antioxidante modelo, frente amostra de vinho branco diluída. Condições: $[\text{MBTH}] = 18 \text{ mmol L}^{-1}$, 0,1% (m/v) em Fe(III) e Ce(IV) e H_2SO_4 ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) $\lambda_{\text{máx}} = 450 \text{ nm}$.



Fonte: elaborado pela autora, 2014.

Quando empregou-se o Ce(IV) como oxidante (Figura 16b), a estabilização do sinal analítico foi observada em 30 min, tanto para o padrão de AG como para a amostra de vinho, sendo que há um decaimento do sinal quanto a amostra. Este estudo mostrou que o perfil da cinética reacional entre o AG e o MBTH foi dependente do tipo de oxidante. Desta forma, para os estudos subsequentes, os tempos de 40 min (para Fe(III)) e 30 min (para Ce(IV)) foram considerados.

5.5 Influência do ácido

Para ajuste de acidez do meio, foram avaliados os ácidos H_2SO_4 e HCl quanto à influência na resposta analítica do método em função dos oxidantes Fe(III) e

Ce(IV). Considerando o comportamento redox dos oxidantes empregados em função da acidez do meio (Tabela 4), percebe-se que de forma geral tanto para o Fe(III) como para o Ce(IV) ocorre uma redução do potencial padrão de redução (ou potencial formal de eletrodo) em função da presença e/ou do tipo de ácido, o que poderia influenciar na etapa de oxidação do MBTH. Este comportamento dos oxidantes avaliados está diretamente associado às características dos ácidos presentes no meio, alterações na força iônica e por consequência da atividade das espécies. Assim, para avaliação selecionou-se o H₂SO₄ e HCl com Fe(III) e para o Ce(IV), somente o ácido sulfúrico. Esta seleção foi baseada considerando as soluções de Ce(IV) em meio de HCl não são estáveis como as que são preparadas em meio de H₂SO₄, por exemplo (SKOOG, et al., 2007).

Tabela 4 - Semi-reações de redução para Fe(III) e Ce(IV) em função de diferentes ácidos.

Meia-reação	Potencial, V	Meio (1 mol L ⁻¹)
Fe(III) + e ⁻ ⇌ Fe(II)	0,77	-
	0,70*	HCl
	0,68*	H ₂ SO ₄
Ce(IV) + e ⁻ ⇌ Ce(III)	1,28*	HCl
	1,44*	H ₂ SO ₄

*potencial formal de eletrodo.

Fonte: adaptado de BACCAN, et al., 2001.

Como pode ser observado na Tabela 5, a maior sensibilidade foi obtida quando empregou-se HCl como ácido e Fe(III) como oxidante. Contudo, o valor do branco analítico para esta condição também foi elevado. Assim, se concluiu que somente um parâmetro de avaliação não seria suficiente, para avaliar a influência do tipo de ácido. Desta forma, se empregou a relação entre o valor da sensibilidade e do branco analítico da curva (*s/b*) como parâmetro de otimização. Onde a melhor condição seria aquela com elevada sensibilidade e um reduzido valor de branco analítico. Desta forma, de acordo com a Tabela 5 a condição onde empregou-se H₂SO₄ como ácido e Fe(III) como oxidante, foi a que apresentou maior razão (*s/b*).

Tabela 5 - Avaliação da influência do tipo de ácido em alguns parâmetros analíticos em função do oxidante. Condições: Faixa linear de concentração de 5 a 40 mg L⁻¹ (N = 5), [MBTH] = 18 mmol L⁻¹ e 0,1% (m/v) em Fe(III) e Ce(IV).

Ácido (1 mol L ⁻¹)	Oxidante	Curva analítica: $A_\lambda = sC_{CF} + b$			s/b
		s(x10 ⁻³)	b	r	
HCl	Fe(III)	36,28 ± 0,02	0,17 ± 0,04	0,9902	2,17
H ₂ SO ₄	Fe(III)	31,00 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,9963	4,56
H ₂ SO ₄	Ce(IV)	22,88 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,9924	1,67

Fonte: elaborado pela autora, 2014.

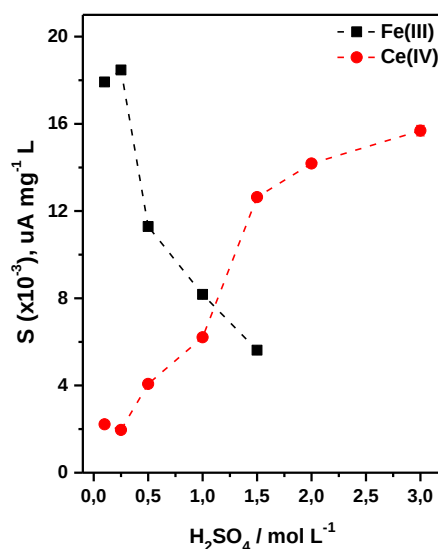
Assim, para os estudos futuros o H₂SO₄ foi selecionado como ácido para ambos os oxidantes avaliados. Apesar do uso do Ce(IV) como oxidante ter levando a menor sensibilidade (Tabela 5), este oxidante foi avaliado nas outras etapas de otimização do método, afim de se ter um comparativo com o desempenho do Fe(III) e sempre que possível, outra opção de reagente para aplicação do método.

5.6 Avaliação da concentração do H₂SO₄

Nesta etapa do processo de otimização, a concentração do ácido sulfúrico foi avaliada quanto ao preparo das soluções de MBTH e dos oxidantes Fe(III) e Ce(IV). Os resultados para esta avaliação são apresentados na Figura 15.

Quando foi avaliada a influência da concentração de H₂SO₄ quando empregou-se Fe(III) como oxidante percebeu-se um aumento na sensibilidade quando variou-se de 0,1 a 0,25 mol L⁻¹ e um decaimento acentuado (~70%) para maiores concentrações do ácido (até 1,5 mol L⁻¹). Este fato pode estar associado a redução do potencial de redução do ferro (padrão ou formal) em meio ácido (Tabela 4 – dos potenciais), o que diminui no meio a oxidação do MBTH ou a complexação dos íons férricos, mesmo em meio ácido, pela espécie HSO₄⁻ (BACCAN, et al., 2001). Outro fato, pode estar associado a uma maior protonação do MBTH, inibindo a oxidação deste reagente pelo Fe(III). Adicionalmente, nesta avaliação observou-se um baixo sinal do branco analítico que variou de 0,031 (0,1 mol L⁻¹) a 0,053 (1,5 mol L⁻¹) em unidades de absorvância. Por fim, selecionou-se a concentração de 0,25 mol L⁻¹ de H₂SO₄ quando empregou-se Fe(III) como oxidante.

Figura 17 - Avaliação da concentração do ácido sulfúrico em função do oxidante. Condições: Faixa linear de concentração de 5 a 30 mg L⁻¹ (N = 5), [MBTH] = 18 mmol L⁻¹ e 0,1% (m/v) em Fe(III) e Ce(IV).



Fonte: elaborado pela autora, 2014.

Para a avaliação da concentração do H₂SO₄ na solução de Ce(IV) notou-se um perfil distinto ao observado para o Fe(III), onde a sensibilidade do método aumentou em função da concentração do ácido (0,1 a 3 mol L⁻¹). O Ce(IV) é um oxidante mais efetivo em meio de H₂SO₄ (visto o Ce(IV) ser muito estável em meio de ácido sulfúrico (HARRIS, 2010). Vale salientar que nesta avaliação observou-se um baixo sinal do branco analítico que variou de 0,015 (0,1 mol L⁻¹) a 0,083 (3 mol L⁻¹) em unidades de absorvância. Neste sentido, observou-se que quando a concentração do H₂SO₄ foi igual a 2 mol L⁻¹ obteve-se uma sensibilidade ~8% menor quando comparada a concentração de 3 mol L⁻¹ e 12% maior em relação ao H₂SO₄ 1 mol L⁻¹. Assim quando empregou-se Ce(IV) como oxidante, foi selecionada a concentração de 2 mol L⁻¹ do ácido, considerando como parâmetro a sensibilidade e a influência menos efetiva do aumento da concentração do H₂SO₄ para valores maiores que o selecionado.

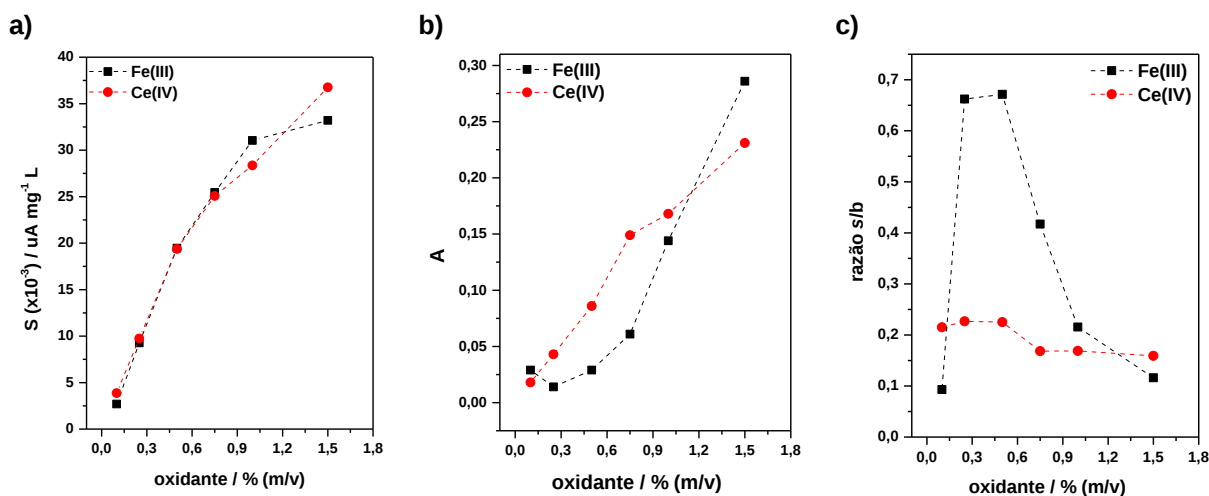
5.7 Avaliação da concentração dos oxidantes (Fe(III) e Ce(IV))

Para avaliação dos oxidantes Fe(III) e Ce(IV) as concentrações de ambos, foram avaliadas na faixa de 0,1 à 1,5% (m/v). Os resultados obtidos nesta avaliação são apresentados na Figura 18.

Inicialmente, considerando a variação de sensibilidade percebeu-se pela Figura 18a que este parâmetro analítico não poderia ser empregado, visto o perfil apresentado ser muito similar entre os oxidantes. Para estes dados foi aplicado teste t (com variâncias equivalentes, $F_{\text{cal}} = 1,00 < F_{\text{crit}} = 5,05$) e observou-se que não existia diferença significativa para um nível de confiança de 95% entre os valores de coeficiente angular ($t_{\text{cal}} = 0,05 < t_{\text{crit}} = 2,23$) entre os oxidantes testados. Em seguida, foi avaliado o valor do branco analítico, visto as soluções dos oxidantes avaliados eram naturalmente coloridas (amarelas) e absorviam próximo ao produto formado entre o AG e MBTH. Assim, um aumento na concentração destas espécies no meio iria exercer alguma influência nos respectivos valores de branco. Nesta avaliação (Figura 18b), percebeu-se, como esperado, que o aumento na concentração dos oxidantes conduziu ao aumento do sinal do branco, o que dentro de uma perspectiva analítica era ruim, pois comprometia o limite de detecção (LOD) do método. Isto ocorre, em função de maiores valores de branco, levarem ao aumento do desvio padrão dos resultados, e desta forma, aumento do valor do LOD.

Em função do exposto, decidiu-se empregar como resposta analítica a relação entre sensibilidade (s) e branco (b), visando uma condição com reduzido valor de branco, e com a máxima sensibilidade possível (Figura 18c). Para ambos os oxidantes avaliados a concentração de 0,25% (m/v) já apresentava um valor mais alto da relação s/b , contudo, para garantir no meio um excesso de oxidante e um aumento da sensibilidade sem comprometer o LOD do método, optou-se por selecionar a concentração de 0,5% (m/v) para o Fe(III) e Ce(IV) nas etapas subsequentes de otimização do método.

Figura 18 - Avaliação da concentração dos oxidantes Fe(III) e Ce(IV): a) em função da sensibilidade; b) branco analítico e c) relação s/b. Condições: faixa linear de concentração de 5 a 30 mg L⁻¹ (N = 5), [MBTH] = 18 mmol L⁻¹ e H₂SO₄ 0,25 mol L⁻¹ para Fe(III) e 2 mol L⁻¹ para Ce(IV).



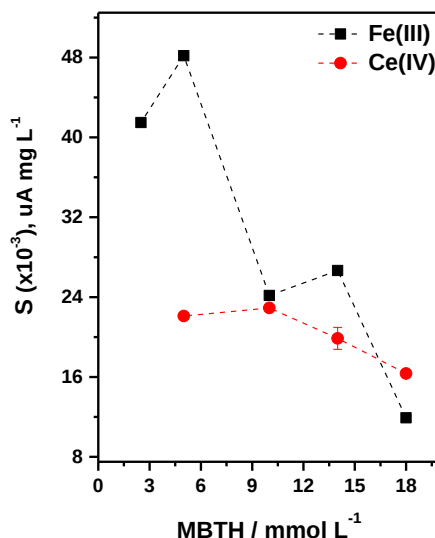
Fonte: elaborado pela autora, 2014.

5.8 Avaliação da concentração do MBTH

Inicialmente deve-se levar em consideração que a primeira etapa do método consistia na oxidação do MBTH, na qual, ocorre transferência de dois elétrons para o agente oxidante (Fe(III) ou Ce(IV)) em meio ácido (SUDHA, 2012). Assim, a melhor concentração do MBTH estaria condicionada a um excesso do oxidante, sendo o MBTH o reagente limitante do método. Para esta avaliação, as concentrações do MBTH foram variadas de 2,5 à 18 mmol L⁻¹ e os resultados são apresentados na Figura 19.

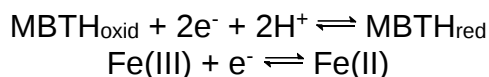
Como pode-se observar para quando emprega-se Fe(III) foi obtida máxima sensibilidade para a concentração de MBTH igual a 5 mmol L⁻¹. Para maiores valores de concentração do reagente de acoplamento, ocorreu uma diminuição da sensibilidade analítica.

Figura 19 - Avaliação da concentração do MBTH em função do oxidante. Condições: faixa linear de concentração de 5 a 30 mg L⁻¹ (N = 5), 0,5% (m/v) para Fe(III) e Ce(IV), H₂SO₄ 0,25 mol L⁻¹ para Fe(III) e 2 mol L⁻¹ para Ce(IV).



Fonte: elaborado pela autora, 2014.

Este fato pode ser explicado considerando as meias reações genéricas abaixo (sem os respectivos valores potenciais, visto já ter-se conhecimento da espontaneidade da reação global):



E a reação global: $\text{MBTH}_{\text{red}} + 2\text{Fe(III)} \rightleftharpoons \text{MBTH}_{\text{oxi}} + 2\text{Fe(II)} + 2\text{H}^+$

Pela reação global percebeu-se uma proporção molar de 1:2 em relação ao MBTH e oxidante, no caso Fe(III). A concentração de Fe(III) empregada foi igual a 0,5% (m/v) equivalente a ~10,4 mmol L⁻¹ em Fe(III). Ou seja, respeitando a estequiometria de 1:2 (MBTH e oxidante), esta seria a condição mínima (5 mmol L⁻¹ de MBTH) para uma oxidação eficiente do MBTH. Contudo, para concentrações superiores do MBTH, onde em tese, a sensibilidade não deveria variar em função da concentração do oxidante se limitante, observou-se uma redução de ~75% quando se comparou a concentração de 5 a 18 mmol L⁻¹ em MBTH. Este fato, pode estar associado a complexação, mesmo em meio ácido, dos íons Fe(III) pelo excesso de MBTH no meio e por consequência diminuição do potencial em função da variação da razão Fe(II)/Fe(III). Assim, para os estudos posteriores a concentração de 5 mmol L⁻¹ em MBTH foi mantida nos estudos com Fe(III).

Na avaliação da concentração de MBTH empregando Ce(IV) como oxidante a mesma estequiometria (1:2, MBTH e oxidante) deve ser considerada em função da meia reação do cério, sendo: $\text{Ce(IV)} + e^- \rightleftharpoons \text{Ce(III)}$, apresentar similaridade quanto ao ferro. Foi observado que a reação entre AG e MBTH não ocorria em presença de Ce(IV) para concentração de MBTH abaixo de 5 mmol L^{-1} , este fato pode estar condicionado a duas possibilidades: *i)* a concentração molar do Ce(IV) no meio era de $\sim 15,1 \text{ mmol L}^{-1}$ (0,5% m/v) e este oxidante tem valor de potencial elevado, o que pode ter conduzido a oxidações sucessivas do MBTH (justificado pela elevação do sinal do branco), ou *ii)* o excesso de Ce(IV) no meio após a oxidação de MBTH poderia ter reagido com o AG, oxidando-o e impossibilitando a formação do produto reacional com o MBTH.

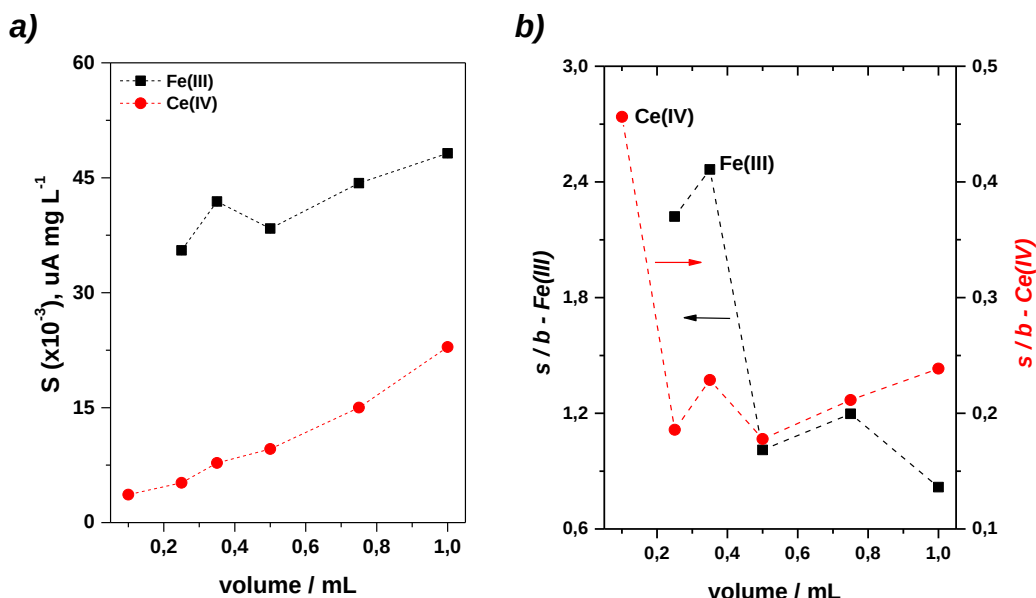
Para concentrações de MBTH igual 5 e 10 mmol L^{-1} ocorreu reação na presença de Ce(IV), sendo observado a máxima sensibilidade. Conduto, os valores do branco analítico para a condição de menor concentração de MBTH eram elevados em comparação com 10 mmol L^{-1} , sendo em unidades de absorvância 0,233 e 0,096; respectivamente. Desta forma, usando a relação *s/b* se obteve 0,095 (5 mmol L^{-1}) e 0,24 (10 mmol L^{-1}). Assim, selecionou-se a concentração de 10 mmol L^{-1} para os estudos futuros em relação ao Ce(IV), visto concentrações superiores de MBTH terem conduzido a redução da sensibilidade do método, provavelmente pelas mesmas razões associadas ao Fe(III), descritas anteriormente.

5.9 Avaliação do volume dos reagentes

O volume dos reagentes foi avaliado mantendo-se constante a proporção em volume de MBTH e do oxidante (1:1), para que os parâmetros otimizados anteriormente fossem mantidos, quanto a concentração das espécies. Assim, variou-se o volume total dos reagentes considerando o somatório MBTH + Fe(III) ou MBTH + Ce(IV) de 0,1 à 1,0 mL. Neste sentido, o volume final dos reagentes correspondia a 50% do volume da solução de MBTH e por consequência, a outra metade em relação ao oxidante. Por fim, fixou-se em 2,0 mL o volume de AG e aferiu-se proporcionalmente a cada variação de volume com água deionizada, até atingir volume final de 3,0 mL. Os resultados para esta avaliação são apresentados na Figura 20. Quando empregou-se volume inferior a 0,25 mL para mistura MBTH e Fe(III) não foi

verificada reação. Assim, para este oxidante, os resultados são considerados para volumes superiores ou igual a 0,25 mL.

Figura 20 - Avaliação do volume dos reagentes em função do oxidante. Condições: faixa linear de concentração de 5 a 20 mg L⁻¹ (N = 5). Sendo Fe(III) a 0,5% (m/v), H₂SO₄ 0,25 mol L⁻¹ e MBTH a 5 mmol L⁻¹ e Ce(IV) a 0,5% (m/v), H₂SO₄ 2 mol L⁻¹ e MBTH a 10 mmol L⁻¹.



Fonte: elaborado pela autora, 2014.

De acordo com a Figura 20a observa-se que ocorreu um aumento da sensibilidade do método em função do aumento do volume. Este fato já era esperado em função da maior concentração dos reagentes no meio reacional. Contudo, aumentando-se o volume dos oxidantes no meio (soluções coloridas), também observou-se um aumento do sinal relativo ao branco analítico (absorvância) de 0,016 (0,25 mL) – 0,059 (1,0 mL) e 0,008 (0,1 mL) – 0,096 (1,0 mL) para o Fe(III) e Ce(IV), respectivamente. Neste sentido, optou-se por usar como parâmetro de avaliação a relação entre sensibilidade e branco (s/b), como exposto na Figura 18b.

Considerando o parâmetro s/b (Figura 20b) percebeu-se em relação ao Fe(III) a maior razão quando empregou-se volume de 0,35 mL. Como a variação de sensibilidade não foi muito acentuada (Figura 20a) em relação a variação do branco, observou-se uma diminuição substancial (~67%) da razão s/b com aumento do volume dos reagentes. Desta forma, o volume de 0,35 mL foi selecionado para os estudos subsequentes quando empregou-se Fe(III) como oxidante.

Para o Ce(IV) a maior razão s/b foi observada para o volume igual a 0,1 mL. Contudo neste volume, apesar do menor valor de branco, também estava associado

a menor sensibilidade. Desta forma, selecionou-se o volume de 0,35 mL para os estudos com Ce(IV) em função de uma maior sensibilidade e razão similar ao maior volume testado (1,0 mL).

5.10 Parâmetros otimizados

O método espectrofotométrico proposto empregando a reação entre o MBTH após oxidação com compostos fenólicos foi otimizado de forma univariada empregando ácido gálico como padrão. A Tabela 6 apresenta a compilação das principais variáveis avaliadas nas etapas de otimização do método.

Tabela 6 - Compilação das principais variáveis químicas e físicas otimizadas no método em função do oxidante.

Variável	Condição avaliada	Condição selecionado		Parâmetro analítico empregado
		Fe(III)	Ce(IV)	
Padrão analítico	AG, AT, QU, RU	AG	AG	sensibilidade
λ , nm	400 – 600	450	450	sensibilidade
Ordem de adição reagentes	AG + Fe(III) + MBTH (1) MBTH + Fe(III) + AG (2)	(2)	(2)	formação do produto
Cinética reacional, min	5 – 120	40	30	sensibilidade
Tipo de ácido	HCl ou H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄	sinal analítico
[H ₂ SO ₄], mol L ⁻¹	0,1 – 3,0	0,25	2,0	razão s/b
Oxidante, % (m/v)	0,1 – 1,0	0,5	0,5	sensibilidade
[MBTH], mmol L ⁻¹	2,5 – 18	5	10	razão s/b
Volume, mL	0,1 – 1,0	0,35	0,35	sensibilidade
				razão s/b

AG = ácido gálico; AT = ácido tânico; QU = quercetina; RU = rutina.

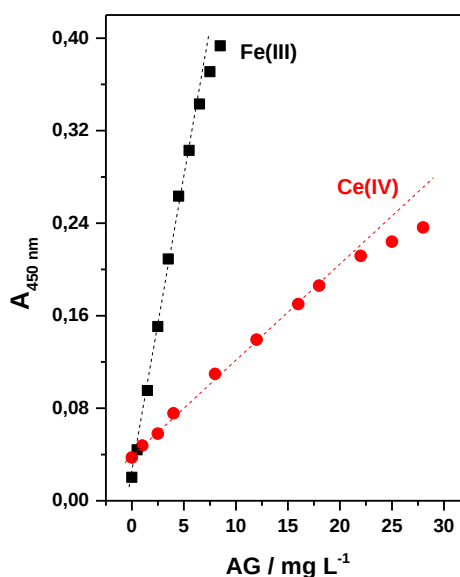
Fonte: elaborado pela autora, 2014.

Em função da compilação das variáveis Tabela 6 percebe-se que foram empregados diferentes parâmetros analíticos para otimização do método em função de em alguns casos somente a sensibilidade não permitir a seleção da melhor condição de análise. Assim, recorreu-se a relação s/b devido as variações elevadas do branco analítico, que comprometiam uma melhor performance do método proposto. Desta forma, após a otimização das variáveis (químicas e físicas) do método espectrofotométrico empregando o MBTH, foram estabelecidas as figuras de mérito em função de cada oxidante, sendo Fe(III) e Ce(IV).

5.11 Figuras de mérito

As figuras de mérito do método proposto empregando a reação entre AG e MBTH para quantificação de compostos fenólicos totais foram calculadas em função de cada oxidante. A Figura 21 apresenta as curvas analíticas para cada oxidante em meio ácido em função da variação de AG.

Figura 21 - Curvas analíticas em função do oxidante empregando AG como padrão analítico nas condições otimizadas do método proposto. Condições: Para Fe(III) a 0,5% (m/v), H₂SO₄ 0,25 mol L⁻¹ e MBTH a 5 mmol L⁻¹ e Ce(IV) a 0,5% (m/v), H₂SO₄ 2 mol L⁻¹ e MBTH a 10 mmol L⁻¹.



Fonte: elaborado pela autora, 2014.

Quando empregou-se o Fe(III) como oxidante obteve-se faixa linear de concentração de 0,5 a 6,5 mg L⁻¹ em equivalentes de AG correspondente a equação: $A_{450nm} = 0,051(\pm 0,001)C_{CF} + 0,021(\pm 0,003)$, $r = 0,9985$ ($N = 8$). De acordo com a curva analítica foi possível calcular o limite de detecção (3σ) de 0,073 mg L⁻¹ e limite de quantificação (10σ) de 0,20 mg L⁻¹. O desvio padrão relativo (RSD) foi calculado para valores de concentração nos extremos da curva analítica, visto que são as regiões com maior erro instrumental. Para as concentrações de 0,5 e 6,5 mg L⁻¹ em AG se obteve 2,2 e 0,3% de RSD, respectivamente.

Para o emprego do Ce(IV) como oxidante obteve-se faixa linear de concentração de 1,0 a 18 mg L⁻¹ em equivalentes de AG, correspondendo a seguinte equação: $A_{450nm} = 0,008(\pm 0,001)C_{CF} + 0,039(\pm 0,001)$, $r = 0,9984$ ($N = 8$). O limite de de-

tecção (3σ) calculado foi de $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ e limite de quantificação (10σ) de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. O desvio padrão relativo (RSD) foi calculado para valores de concentração de $1,0$ e 16 mg L^{-1} em AG, obtendo-se $1,9$ e $0,3\%$ de RSD, respectivamente. Os resultados indicam que a metodologia proposta apresentou boa precisão e sensibilidade adequada para determinação de compostos fenólicos.

Após estudos de otimização realizados com ambos oxidantes, ficou estabelecido que, de modo geral, o Fe(III) apresentou melhores resultados e por este motivo, apenas ele foi usado nas avaliações a seguir.

5.12 Avaliação de diferentes compostos fenólicos empregando o método de Folin–Ciocalteu (FC) e o método proposto (MBTH)

Após otimização, o método proposto foi avaliado frente a 18 compostos diferentes com propriedades redutoras e antioxidantes. Estes compostos foram selecionados em função da classe (fenólicos, tiólicos, vitamina, açúcar redutor, entre outros), grau de hidro ou lipofilicidade, solubilidade em água, complexidade estrutural, distribuição destas espécies nas amostras reais analisadas e disponibilidade. Assim, nesta avaliação foram empregados os seguintes compostos: ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido tânico, kaempferol, *L*-dopa, ácidos (*o*, *m*, *p* – hidroxicinânico), *N*-propil galato, quercetina, rutina, ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (trolox), ácido ascórbico, *L*-cisteína, sulfito de sódio e glicose (*D*-glucose). Como comparativo, os mesmo compostos foram avaliados de acordo com o método de FC, a fim de se estabelecer uma possível comparação entre os resultados empregando substâncias puras, sem considerar efeitos sinérgicos, comuns em amostras complexas, como vinhos e chás. Os resultados para esta avaliação são apresentados na Tabela 7, para produtos reacionais que absorviam na região do visível (produtos coloridos).

A partir dos dados da Tabela 7, podemos considerar alguns pontos quanto a comparação dos resultados entre os métodos de FC e MBTH, assim como em relação a reatividade dos diferentes compostos avaliados somente em relação ao método proposto (MBTH).

Para os compostos ácido ascórbico e trolox, somente o método de FC (baseado em transferência de elétrons) apresentou resposta, como esperado, em função do princípio do método de FC. Não sendo composto fenólico (ácido ascórbico) e

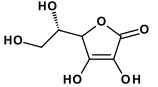
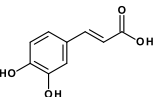
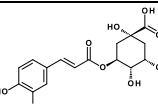
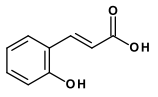
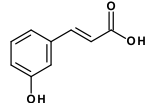
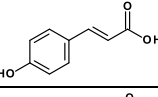
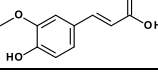
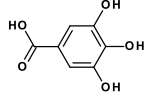
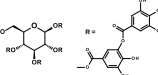
não apresentado posição de ataque disponível em relação a hidroxila fenólica (trolox) estas moléculas não reagiram com o MBTH nas condições otimizadas. Adicionalmente, para o sulfito de sódio e glicose, em ambos os métodos nas condições reacionais empregadas não se observou reação.

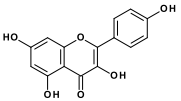
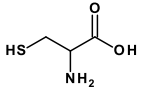
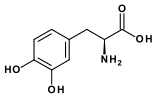
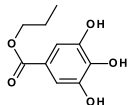
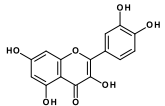
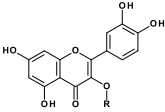
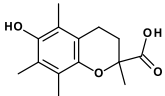
Em relação aos métodos de FC e MBTH podemos tomar a relação entre as sensibilidades (s_{FC}/s_{MBTH}) como um parâmetro de comparação. Desta forma, quando o valor desta relação tende a unidade, é um indicativo que os métodos apresentam uma resposta similar (para um nível de confiança de 95%), caso estes compostos sejam empregados como padrão. Assim, para o ácido cafeico (627 nm), ácido clorogênico (615 nm), ácido gálico, ácido tânico, *N*-propil galato e rutina a relação de sensibilidade variou de 0,72 a 1,48 (Tabela 7). Desta forma, também pode ser considerado que amostras que sejam ricas nestas classes ou compostos apresentem resultados semelhantes quando se comparar as respectivas análises pelos métodos de FC e MBTH.

Para os compostos ácido cafeico (409 nm), ácido clorogênico (350 nm), ácido ferúlico, kaempferol, *L*-dopa, ácido *o*-hidroxicinânico, ácido *p*-hidroxicinânico e quercetina a relação entre as sensibilidades (s_{FC}/s_{MBTH}) variou de 1,98 a 10,63 (Tabela 7). Para estes compostos, caso fosse empregados como padrões ou as amostras apresentassem concentrações elevadas dos mesmos, os resultados seriam divergentes em termos de concentração, mas concordantes considerando a tendência de concentração geral das amostras.

Em relação ao método proposto, percebeu-se que para alguns compostos se obtinham dois comprimentos de onda de máxima absorção em função da formação de diferentes produtos, na posição *orto* ou *para*.

Tabela 7 – Parâmetros analíticos de diferentes compostos fenólicos e redutores avaliados frente ao método proposto nas condições otimizadas e o método de Folin–Ciocalteu (FC). Condições reacionais (método proposto): Fe(III) a 0,5% (m/v), H₂SO₄ 0,25 mol L⁻¹, MBTH 5 mmol L⁻¹ e tempo de reação de 40 min.

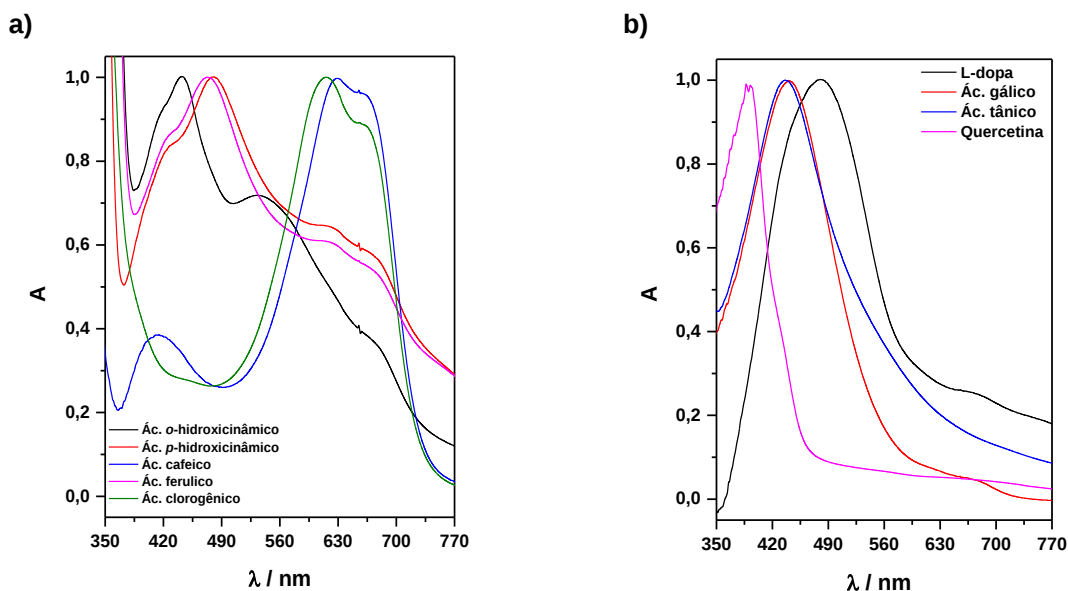
Composto	Estrutura	Curva analítica: $A_{\lambda} = sC_{CF} + b$									$\frac{S_{FC}}{S_{MBTH}}$
		FC ($\lambda_{\text{máx}} = 770 \text{ nm}$)				MBTH					
		Faixa linear (μM)	s ($\times 10^{-3}$)	b	r	$\lambda_{\text{máx}}$	Faixa linear (μM)	s ($\times 10^{-3}$)	b	r	
Ácido ascórbico		1,42 – 111	7,18 ± 0,03	0,04 ± 0,02	0,9898	-	-	-	-	-	-
Ácido cafeico		1,40 – 166	5,00 ± 0,06	0,02 ± 0,01	0,9971	409	1,39 – 83	3,90 ± 0,03	0,01 ± 0,01	0,9920	1,98
						627		5,48 ± 0,27	0,01 ± 0,01	0,9901	0,91
Ácido clorogênico		0,70 – 141	5,41 ± 0,07	0,01 ± 0,01	0,9977	350	0,70 – 85	2,87 ± 0,10	0,01 ± 0,01	0,9936	1,89
						615		7,53 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,9896	0,72
Ác. <i>o</i> -hidroxicinâmico		1,11 – 134	3,88 ± 0,05	0,02 ± 0,01	0,9978	442	1,11 – 18	0,62 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,9991	6,29
						535		0,52 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,9978	7,46
Ác. <i>m</i> -hidroxicinâmico		1,11 – 67	4,97 ± 0,04	0,02 ± 0,01	0,9893	292	-	-	-	-	-
Ác. <i>p</i> -hidroxicinâmico		1,11 – 89	6,36 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,9965	479	1,11 – 18	0,88 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,9965	7,23
Ácido ferúlico		1,28 – 154	4,63 ± 0,10	0,01 ± 0,01	0,9902	473	1,29 – 102	1,48 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,9987	3,13
Ácido gálico		1,47 – 118	7,03 ± 0,03	0,01 ± 0,01	0,9999	450	1,47 – 38	8,33 ± 0,31	0,03 ± 0,01	0,9943	0,84
Ácido tânico		0,15 – 18	38,5 ± 0,1	0,01± 0,01	0,9966	440	0,15 – 2,94	38,7 ± 2,4	0,02 ± 0,01	0,9902	0,99

Kaempferol		0,87 – 17,5	3,09 ± 0,06	0,02 ± 0,01	0,9902	372	17,5 – 210	0,41 ± 0,03	0,01 ± 0,01	0,9801	7,54
L-cisteína		28,5 – 342	1,66 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,9962	391	2,85 – 44	5,24 ± 0,18	0,01 ± 0,01	0,9970	0,32
L-dopa		1,27 – 76	11,5 ± 0,1	0,03 ± 0,01	0,9915	450	2,54 – 51	5,55 ± 0,23	0,01 ± 0,01	0,9947	2,07
N-propil galato		1,18 – 141	5,02 ± 0,11	0,02 ± 0,01	0,9974	440	2,36 – 71	4,97 ± 0,12	0,03 ± 0,04	0,9980	1,01
Quercetina		0,83 – 50	10,7 ± 0,1	0,01 ± 0,01	0,9978	390	0,83 – 198	1,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,9915	10,63
						372	0,83 – 100	1,34 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,9970	8,01
Rutina (R = raminose-glicose)		0,49 – 33	10,5 ± 0,1	0,01 ± 0,01	0,9935	358	0,41 – 33	7,09 ± 0,24	0,01 ± 0,01	0,9947	1,48
Trolox		1,00 – 240	2,40 ± 0,07	0,01 ± 0,01	0,9957	-	-	-	-	-	-

Fonte: elaborado pela autora, 2014.

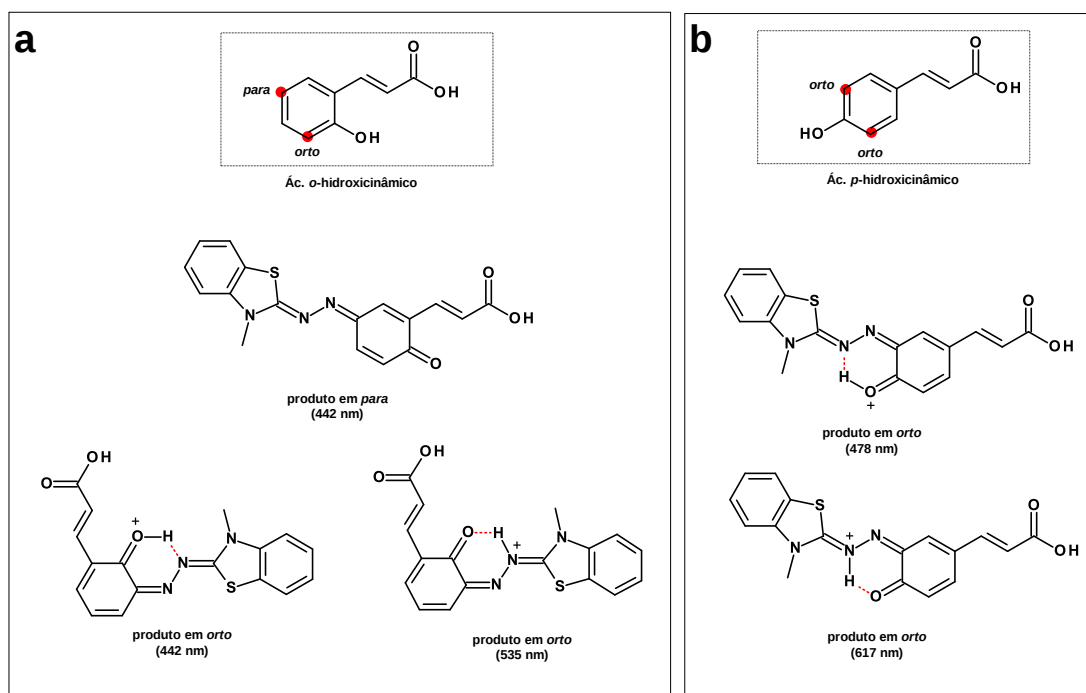
Foi observado que o(s) produto(s) de reação para compostos como ácido *o*-hidroxicinâmico, ácido *p*-hidroxicinâmico e ácido ferúlico e o MBTH nas condições otimizadas (empregando Fe(III) como oxidante) apresentavam duas bandas com máximos de absorção na região de 441 a 480 nm e um segundo máximo na região de 536 a 627 nm como observado nos espectros da Figura 22a. Considerando o ácido *o*-hidroxicinâmico (Figura 22a) realizou-se uma proposta dos principais produtos reacionais com o MBTH, justificando o perfil espectral obtido. Percebeu-se que para o produto em *orto*, podia-se obter dois tautômeros em meio ácido, sendo o protonado no átomo de oxigênio com absorção no menor comprimento de onda, enquanto o tautômero com o átomo de nitrogênio protonado com absorção em maiores comprimentos de onda (POSPISILOVÁ, et al., 1990). Assim, a banda de absorção em 442 nm seria relacionada ao produto em *para* e o tautômero com o oxigênio protonado, enquanto que, a banda em 535 nm seria relativa ao tautômero com nitrogênio protonado, o qual estaria em menor proporção, logo menor sinal normalizado.

Figura 22 – Espectros de absorção molecular normalizados do produto reacional entre alguns compostos puros e MBTH nas condições otimizadas, sendo a) compostos com produtos que geram duas bandas de absorção e b) compostos que geram produtos com uma banda preferencial de absorção.



Fonte: elaborado pela autora, 2014.

Figura 23 – Proposta reacional para os produtos entre o ácido orto e *p*-hidroxicinâmico e o MBTH em meio ácido nas condições otimizadas em função das bandas de máxima absorção. Posições marcadas em vermelho indicam as possibilidades de reação com MBTH em relação a hidroxila.

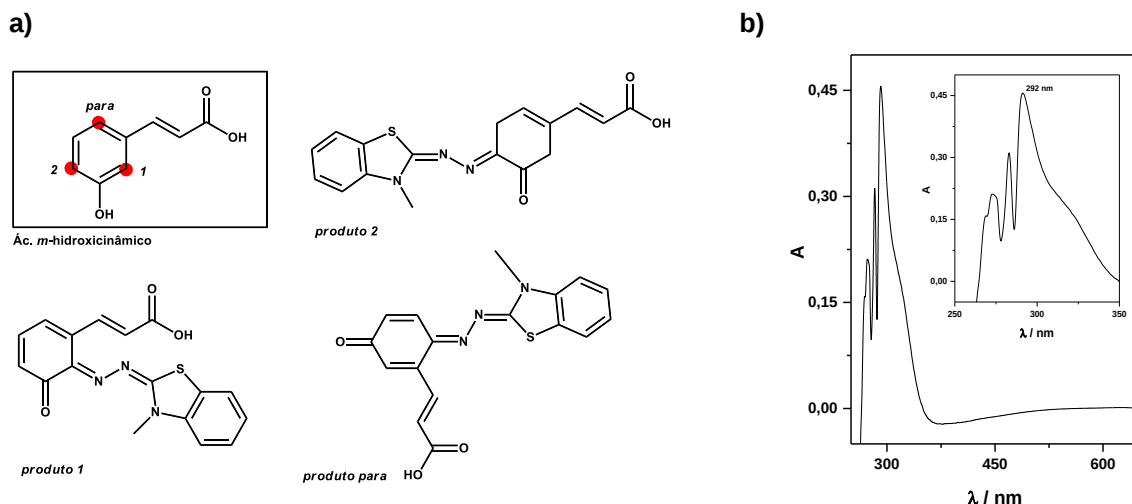


Fonte: adaptado de Pospíšilová, 1990.

Para o ácido *p*-hidroxicinâmico não foi observado banda de absorção secundária tão resolvida quanto o derivado *orto*, além de um deslocamento em relação a banda principal para maiores comprimentos de onda. Este fato pode ser atribuído a formação de apenas um possível produto reacional (Figura 23b) em *orto*. Porém, este produto pode coexistir pela mistura de dois tautômeros (com o oxigênio ou nitrogênio protonado), sendo que cada um absorve em comprimentos de onda diferentes. Tal comportamento e proposta mecanística pode ser estendida a compostos com perfil espectral similar.

Apesar da diferença entre os produtos da reação dos ácidos *orto* e *p*-hidroxicinâmicos com o MBTH em meio ácido, o perfil espectral apresentado foi similar. Contudo, para o ácido *m*-hidroxicinâmico não foi observado a formação de produto colorido, porém não podia-se afirmar ausência de reação entre o composto e o MBTH em meio ácido. Para tanto, foram consideradas três possíveis produtos com ataque ao anel aromático (Figura 24a), admitindo a possibilidade do(s) mesmo(s) não absorverem na região do visível.

Figura 24 – a) Proposta reacional para os produtos entre o ácido m-hidroxicinâmico e o MBTH em meio ácido nas condições otimizadas e b) Espectro de absorção molecular do produto reacional entre o ácido m-hidroxicinâmico e o MBTH em meio ácido nas condições otimizadas. Posições marcadas em vermelho indicam as possibilidades de reação com MBTH em relação a hidroxila.



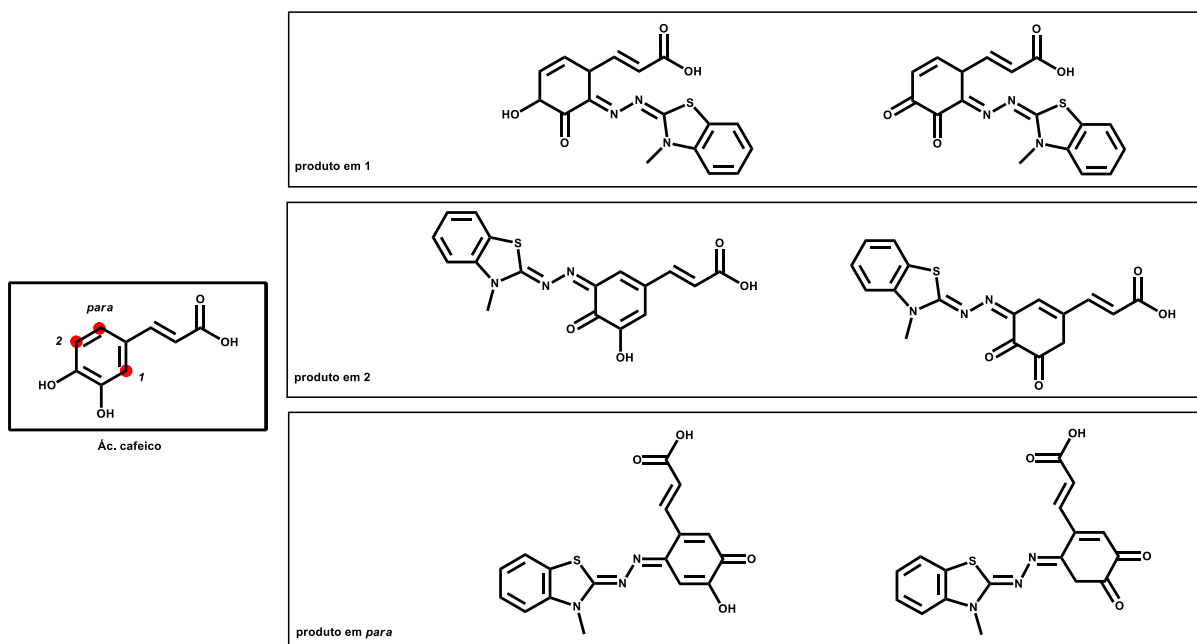
Fonte: elaborado pela autora, 2014.

De acordo com a estrutura dos três possíveis produtos, o composto relativo ao ataque do MBTH (intermediário eletrofílico) posição designada como **1** poderia ser formado, mas teria alguma dificuldade em função de impedimento estérico, quando comparado às outras posições. Para o composto oriundo da reação em **2**, o grau de conjugação seria comprometido, em relação aos demais, levando a absorção em menores comprimentos de onda. Por fim, o produto em **para** seria aquele com maior grau de conjugação e sem impedimento estérico, logo o que deveria ser formado em maior proporção. De acordo com o espectro de absorção molecular (Figura 24b) não foi observado banda de absorção na região do visível, como já mencionado, tendo-se um máximo em 292 nm. Em parte, este resultado foi concordante com as propostas dos possíveis produtos, e considerando que uma banda absoluta seria relativa ao composto com ataque em **para** pelo MBTH, porém, de acordo com a estrutura sugerida, esperaria-se que o máximo de absorção fosse em maior(es) comprimento(s) de onda. Desta forma, estudos complementares em outras condições reacionais devem ser implementados visando uma elucidação mais completa dos aspectos reacionais para moléculas com este padrão estrutural e o MBTH.

Para os produtos oriundos da reação do MBTH em meio ácido com compostos como o ácido cafeico e clorogênico foram observados preferencialmente máximos de absorção na faixa de 613–631 nm (Figura 22a). Considerando o ácido cafei-

co como modelo foi proposta uma série de produtos reacionais em função dos pontos de reatividade da molécula, como apresentado na Figura 25.

Figura 25 – Proposta reacional para os produtos entre o ácido cafeico e o MBTH em meio ácido nas condições otimizadas em função das bandas de máxima absorção. Posições marcadas em vermelho indicam as possibilidades de reação com MBTH quanto em relação a hidroxila.



Fonte: elaborado pela autora, 2014.

O produto na posição **1** (similar ao *m*-hidroxicinâmico) deve apresentar restrições quanto a impedimento estérico. Porém, os produtos relativos as posições **2** e **para** não devem apresentar este problema. Dentre as possibilidades é possível que os produtos com a formação das orto quinonas devem ser predominante em relação as hidroxiquinonas correspondentes. A formação de orto quinonas aumenta o grau de conjugação do sistema, o que deve auxiliar na observação de máximos em maiores comprimentos de onda, provavelmente para os produtos na posição em **2** (assim como os respectivos tautômeros). Como em ambos os casos observou-se absorção na região de 360–480 nm, o produto em **para** foi formado, mas em menor proporção que o produto) na posição **2**.

Para os produtos da reação do MBTH em meio ácido com os compostos *L*-dopa, ácido gálico, ácido tânico e quercetina (como modelos) observou-se absorção preferencial na região de 350–550 nm (Figura 22b), indicando provavelmente a formação de produtos na posição **para**, além da influência da conjugação dos derivados do ácido hidroxicinâmico. Este fato foi mais acentuado quando tomou-se como

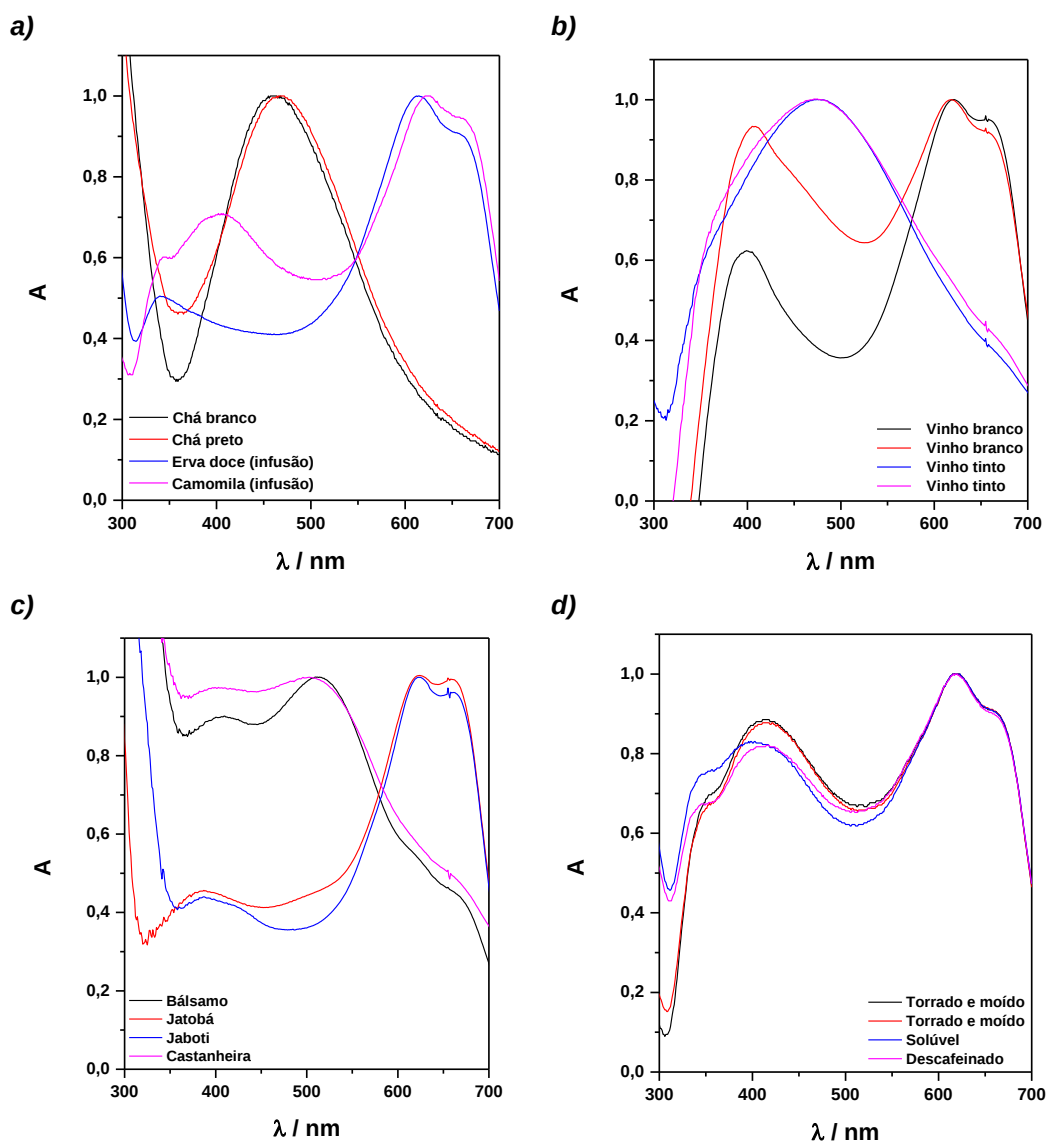
referência a *L*-dopa, onde foi observada absorção na região de 570–770 nm, mas sem formação de uma banda resolvida como observado para derivados dos compostos ácido *orto* e *p*-hidroxicinâmico e ácido cafeico. Este fato, pôde ser atribuído a ausência da dupla ligação conjugada ao anel aromático, o que aumentava o grau de conjugação dos produtos formados. Por fim, a formação de tautômeros em meio ácido em relação ao derivados em ***orto***, possivelmente foram em baixa proporção ou espécies de baixa estabilidade, quando comparado com os derivados na posição ***para***, de acordo com o perfil espectral obtido.

5.13 Análise da determinação do teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante das amostras

Inicialmente a análise das amostras foi realizada em função da avaliação do perfil espectral das mesmas após a reação com MBTH em meio ácido nas condições otimizadas (Figura 26) a fim de se verificar as principais bandas de absorção e por consequência as (possíveis) classes de compostos presentes.

Todas as amostras analisadas apresentaram banda de absorção em 450 nm após reação com MBTH. Este fato, corrobora com a seleção do ácido gálico como padrão de calibração ($\lambda_{\text{máx}} = 450 \text{ nm}$) do método, apesar de nem todas as amostras apresentarem máximo nesta região. As amostras de chás (branco e preto) apresentaram máximo de absorção em 450 nm, enquanto que as amostras de infusões (erva doce e camomila) o máximo foi próximo a 630 nm, indicando que para estas amostras existe diferença entre as classes de compostos fenólicos (Figura 26a). Perfil similar foi observado para as amostras de vinho tinto (absorção preferencial em 470 nm), enquanto as amostras de vinho branco apresentavam máximo absoluto próximo a 625 nm (Figura 26b). Vale destacar que para estas classes de amostras também se observou uma banda próximo a 400 nm, a qual pode estar associada à flavonóides, enquanto as outras, a derivados dos ácidos hidroxicinâmicos, ácido gálico e taninos, baseado nos resultados do estudo anterior. Este fato, constitui uma vantagem adicional do método proposto no que tange a possibilidade de indicação de diferentes classes de compostos presentes em uma determinada amostra, contudo também poderia ser uma limitação em relação a qual padrão selecionar para mediar a concentração de compostos fenólicos totais.

Figura 26 - Espectro de absorção molecular normalizados de algumas amostras analisadas frente ao método proposto nas condições otimizadas. Sendo: a) chás e infusões b) vinhos (branco e tinto) c) cachaças envelhecidas d) cafés.



Fonte: elaborado pela autora, 2014.

Para as amostras de cachaças envelhecidas em diferentes madeiras observou-se perfis espectrais distintos conforme a madeira onde as mesmas foram envelhecidas (Figura 26c). Para as amostras envelhecidas em Bálsamo e Castanheira a absorção foi preferencial entre 400-500 nm, enquanto que para as amostras de cachaças envelhecidas em Jatobá e Jaboti observou-se absorção predominante em ~625 nm, o que indica diferenças na composição entre as amostras. Para esta classe amostral já era esperado tal comportamento em função das características intrínsecas de cada madeira empregada no processo de envelhecimento da cachaça.

Contudo, para as amostras de café (Figura 26d) independente do tipo e processo de produção o perfil espectral obtido foi similar entre as amostras, evidenciando que composição em relação aos compostos presentes apresenta elevada semelhança quanto a reatividade ao MBTH em meio ácido. Quanto a composição das amostras de cachaças e cafés, devem apresentar compostos derivados de flavonóides e ácidos hidroxicinâmicos, mas em menor proporção, se comparada as amostras de chás, infusões e vinhos.

Uma vez estabelecido (mesmo que de forma superficial) as possíveis classes de compostos que compõe as amostras, as mesmas foram analisadas segundo diferentes métodos, sendo Folin–Ciocalteu, 4–AAP, DPPH e ABTS empregando o AG como padrão de referência. Os resultados para esta avaliação são apresentados na Tabela 8.

Em função dos métodos apresentarem padrões reacionais e por consequência reatividade diferenciada para compostos variados uma comparação estatística direta por testes de hipótese não seria adequada, pois estes testes consideram que a média dos resultados em função dos diferentes métodos seria em função da mesma classe ou conjunto de compostos quantificados. Assim, uma comparação dos resultados obtidos explorando análise de correlação seria a estratégia estatística mais adequada para este tipo de trabalho.

Inicialmente foi realizada uma correlação com o conjunto completo de amostras, não realizando uma discriminação entre as classes, como apresentado na Figura 27.

De acordo com os resultados obtidos podem ser observadas algumas amostras anômalas (*outliers*) para todas as correlações realizadas, as quais foram identificadas em função das amostras, e excluídas do cálculo de correlação.

Assim, para se estabelecer uma relação entre resultados obtidos pelos diferentes métodos foi realizada uma análise de correlação (intervalo de 95% de confiança). As equações que descrevem estas correlações lineares são descritas abaixo:

$$C_{FC} = 2,96(\pm 0,17)C_{MBTH} - 154(\pm 163); r = 0,9570$$

$$C_{4-AAP} = 4,06(\pm 0,34)C_{MBTH} - 221(\pm 319); r = 0,9131$$

$$C_{DPPH} = 0,70(\pm 0,08)C_{MBTH} + 114(\pm 62); r = 0,8566$$

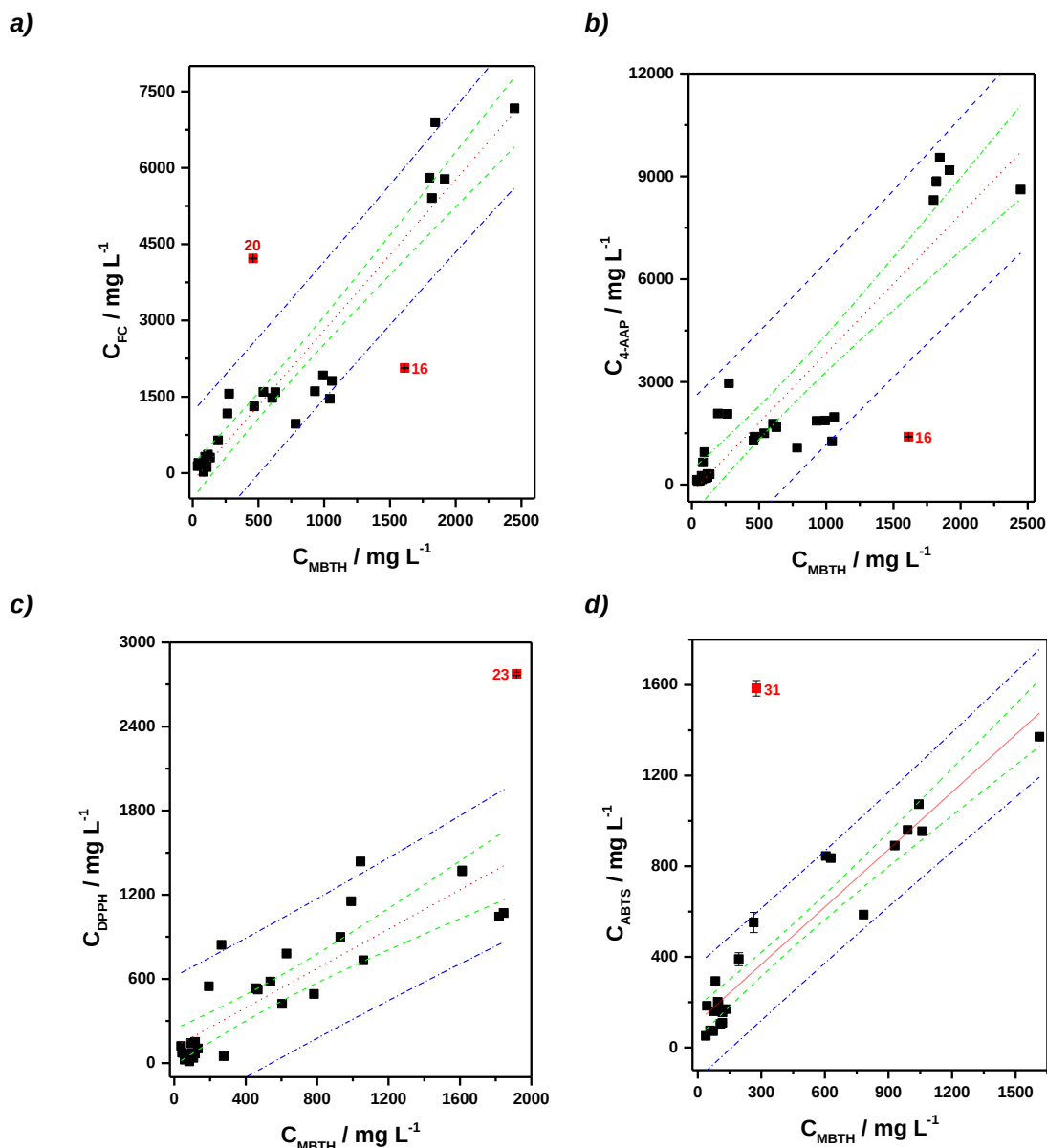
$$C_{ABTS} = 0,84(\pm 0,05)C_{MBTH} + 114(\pm 34); r = 0,9602$$

Tabela 8 - Determinação do teor de compostos fenólicos totais e da capacidade antioxidante (expressos em mg L⁻¹ de AG) em bebidas empregando o método proposto, FC, 4-AAP, DPPH e ABTS (N = 3).

Amostra	Bebida	Tipo	Diluição (Dil.) e concentração, equivalentes em mg L ⁻¹ de AG									
			Dil.	MBTH	Dil.	FC	Dil.	4-AAP	Dil.	DPPH	Dil.	ABTS
1	Vinho	Tinto	380	930 ± 8	290	1607 ± 7	150	1860 ± 1	1250	899 ± 14	800	891 ± 5
2	Vinho	Tinto	390	991 ± 1	290	1920 ± 4	150	1870 ± 15	1250	1153 ± 8	800	960 ± 5
3	Vinho	Tinto	380	1059 ± 4	290	1812 ± 15	150	1973 ± 15	1250	733 ± 14	800	954 ± 5
4	Vinho	Tinto	250	604 ± 3	290	1475 ± 14	120	1777 ± 12	650	421 ± 11	800	845 ± 2
5	Vinho	Tinto	250	628 ± 3	290	1590 ± 7	120	1678 ± 12	800	781 ± 10	800	836 ± 3
6	Vinho	Branco	24	76 ± 1	54	200 ± 2	10	152 ± 1	100	63 ± 2	150	160 ± 1
7	Vinho	Branco	29	98 ± 1	54	251 ± 1	12	186 ± 2	100	72 ± 2	150	191 ± 1
8	Vinho	Branco	18	43 ± 1	54	200 ± 1	07	101 ± 1	100	73 ± 1	150	184 ± 1
9	Vinho	Branco	41	132 ± 1	54	305 ± 3	18	302 ± 4	125	103 ± 1	150	170 ± 1
10	Vinho	Branco	41	117 ± 1	54	365 ± 1	18	219 ± 1	80	67 ± 5	150	155 ± 1
11	Chá	Preto	260	783 ± 3	120	968 ± 2	40	1080 ± 4	500	492 ± 5	400	586 ± 1
12	Chá	Verde	523	1613 ± 5	440	2065 ± 11	100	1398 ± 10	1500	1371 ± 34	1000	1372 ± 2
13	Chá	Branco	320	1043 ± 5	240	1459 ± 3	70	1263 ± 7	1500	1437 ± 16	1200	1074 ± 3
14	Infusão	Cidreira	22	58 ± 1	38	184 ± 1	08	112 ± 1	25	24 ± 1	60	76 ± 5
15	Infusão	Carqueja	12	38 ± 1	36	137 ± 1	04	142 ± 1	160	121 ± 3	60	51 ± 1
16	Infusão	Hortelã	36	116 ± 1	48	312 ± 1	14	310 ± 2	200	151 ± 5	100	109 ± 1
17	Infusão	Erva doce	22	73 ± 1	42	190 ± 1	08	257 ± 2	80	47 ± 3	80	73 ± 1
18	Infusão	Camomila	41	107 ± 1	20	118 ± 1	06	190 ± 1	80	37 ± 2	80	103 ± 1
19	Café	Torrado e Moído	320	538 ± 2	340	1596 ± 8	95	1498 ± 9	200	580 ± 1	-	-
20	Café	Torrado e Moído	200	459 ± 2	490	4219 ± 7	95	1282 ± 19	190	534 ± 1	-	-
21	Café	Torrado e Moído	190	468 ± 2	260	1312 ± 10	95	1400 ± 9	190	524 ± 1	-	-
22	Café	Solúvel	590	1845 ± 10	1150	6896 ± 28	590	9549 ± 57	400	1070 ± 3	-	-
23	Café	Solúvel	860	1917 ± 18	1200	5778 ± 1	860	9180 ± 84	1060	2775 ± 11	-	-
24	Café	Solúvel	710	1819 ± 13	1120	5404 ± 32	710	8851 ± 138	400	1044 ± 3	-	-
25	Café	Descafeinado	740	1800 ± 13	1150	5805 ± 16	740	8307 ± 72	-	-	-	-
26	Café	Descafeinado	740	2448 ± 20	1350	7168 ± 19	740	8613 ± 72	-	-	-	-
27	Cachaça	Bálsamo	120	264 ± 2	100	1171 ± 4	120	2066 ± 23	300	843 ± 4	1200	552 ± 45
28	Cachaça	Jaboti	50	83 ± 1	05	25 ± 1	50	647 ± 5	05	12 ± 1	300	293 ± 10
29	Cachaça	Jatobá	65	193 ± 1	40	642 ± 1	65	2077 ± 13	200	548 ± 1	800	390 ± 29
30	Cachaça	Timborana	40	94 ± 1	20	323 ± 1	40	953 ± 4	50	143 ± 1	400	201 ± 13
31	Cachaça	Umburana	100	277 ± 2	100	1561 ± 1	100	2961 ± 19	20	50 ± 1	1600	1585 ± 34

Fonte: elaborado pela autora, 2014.

Figura 27 – Correlação linear das amostras analisadas dos diferentes métodos aplicados frente ao método proposto (MBTH), nas condições otimizadas. a) MBTH vs FC b) MBTH vs 4-AAP c) MBTH vs DPPH d) MBTH vs ABTS. Pontos fora da curva (outliers), estão representados pela cor vermelha e o o número ao lado faz referência a amostra de acordo numeração descrita na Tabela 8.



Fonte: elaborado pela autora, 2014.

Neste tipo de avaliação os métodos são concordantes se o coeficiente angular (*inclinação*) tende a unidade enquanto o linear (*intercepto*) tende a zero (MILLER, et al., 2005). O coeficiente de correlação é um indicativo da distribuição linear entre os resultados. Desta forma, percebeu-se que independente do método, todos apresentaram alto coeficiente de correlação ($r \geq 0,8566$), indicando boa tendência linear entre os resultados. Em relação a comparação com os outros métodos, os resulta-

dos empregando o método do MBTH nas condições otimizadas foi mais concordante com o DPPH e ABTS, respectivamente. Este fato pode estar associado as condições reacionais onde o método de FC e 4-AAP foram aplicados em meio básico, e desta forma, difeririam de forma mais acentuada das demais metodologias analíticas ou em função de determinada(s) classe(s) de amostra(s). Assim, realizou-se a análise de correlação por classe de amostra, visando uma melhor avaliação dos resultados obtidos. Os resultados para avaliação são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Análise de correlação entre os diferentes métodos aplicados em relação aos resultados obtidos com MBTH nas condições otimizadas por classe de amostra.

Classe	N	Método	$C_{\text{método}} = sC_{\text{MBTH}} + b$		
			s	b	r
Vinho	10	FC	$1,76 \pm 0,15$	151 ± 90	0,9732
	10	4-AAP	$1,99 \pm 0,19$	79 ± 119	0,9641
	10	DPPH	$0,94 \pm 0,12$	-4 ± 73	0,9415
	10	ABTS	$0,88 \pm 0,08$	121 ± 81	0,9665
Chás e infusões	8	FC	$1,23 \pm 0,05$	88 ± 34	0,9958
	8	4-AAP	$0,89 \pm 0,10$	167 ± 71	0,9667
	8	DPPH	$0,94 \pm 0,14$	8 ± 104	0,9384
	8	ABTS	$0,87 \pm 0,05$	14 ± 37	0,9903
Cafés	7	FC	$3,14 \pm 0,31$	5 ± 538	0,9753
	8	4-AAP	$4,60 \pm 0,59$	-557 ± 948	0,9553
	5	DPPH	$0,38 \pm 0,01$	360 ± 11	0,9991
	-	ABTS	-	-	-
Cachaças	5	FC	$6,58 \pm 1,04$	-545 ± 209	0,9642
	5	4-AAP	$9,69 \pm 1,96$	-25 ± 391	0,9438
	4	DPPH	$4,04 \pm 0,28$	-312 ± 50	0,9956
	4	ABTS	$1,65 \pm 0,40$	97 ± 70	0,9458

Fonte: elaborado pela autora, 2014.

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 9) ficou evidente que existe uma boa correlação para todos os métodos em relação as amostras de vinhos, chás e infusões onde o coeficiente angular foi mais próximo a unidade, quando comparado com as amostras de cafés e cachaças envelhecidas, que foram mais discrepantes.

Este fato pode estar associado a uma possível reação do MBTH nas condições otimizadas com compostos nitrogenados aromáticos (HUNIG, et al., 1957), como alcalóides (cafeína e derivados, por exemplo) presentes no café ou extraídos da madeira durante o processo de envelhecimento da cachaça levando a formação de produtos que absorvem em uma região espectral diferente da monitorada, condições

reacionais distintas (método aplicado em meio ácido, enquanto o FC e 4-AAP foram em meio básico) e menor reatividade frente aos diferentes compostos fenólicos presentes nas amostras, implicando em uma maior seletividade por parte do método, que de forma geral foi mais concordante com os ensaios antioxidantes, do que em relação aos métodos de FC e 4-AAP.

Assim, ficou evidente que nem todas as classes de amostras são concordantes com o método proposto (MBTH) em relação aos métodos avaliados, isto em função do mecanismo e princípio de cada método e da diversidade e complexidade da química das amostras selecionadas e analisadas. Por fim, o método mostrou uma boa performance para as amostras de vinhos, chás e infusões em relação aos métodos já mencionados.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6.1 Conclusões

O método espectrofotométrico proposto para determinação de compostos fenólicos totais foi otimizado de forma univariada quanto a diferentes parâmetros físicos e químicos. O ácido gálico foi selecionado como padrão frente a outros compostos fenólicos e o produto reacional apresentou máximo de absorção de 450 nm. A ordem de adição de mistura dos reagentes que apresentou os melhores resultados foi MBTH+Fe(III)+AG sendo 40 min o tempo mínimo estabelecido para realização das medidas espectrofotométricas. Os melhores resultados foram obtidos empregando-se H_2SO_4 ($0,25 \text{ mol L}^{-1}$), Fe(III) (0,5%, m/v) e MBTH a 5 mmol L^{-1} , nestas condições obteve-se faixa linear de concentração de 0,5 a $6,5 \text{ mg L}^{-1}$ em equivalentes de AG correspondente a equação $A_{450\text{nm}} = 0,051(\pm 0,001)C_{\text{CF}} + 0,021(\pm 0,003)$, $r = 0,9985$ ($N = 8$) e limite de detecção (3σ) de $0,073 \text{ mg L}^{-1}$ com desvio padrão relativo (RSD) inferior a 2,2%.

Nas condições otimizadas, o método foi aplicado à 18 diferentes compostos e a razão da sensibilidade entre o método do MBTH e de FC foi comparada. Para as moléculas ácido ascórbico e trolox foi obtida resposta somente com o método de FC, enquanto que para sulfito de sódio e glicose, não se obteve formação de produto colorido para nenhum dos métodos. Foi verificado que a depender da estrutura do composto fenólico os métodos podem apresentar resposta similar estatisticamente, da mesma forma que foram observadas diferenças consideráveis. A formação de possíveis produtos reacionais (*orto* e *para*) foi proposta para justificar o perfil espectral obtido, considerando a formação de tautômeros com oxigênio ou nitrogênio protonado em meio ácido para o produto em *orto*.

O perfil espectral de diferentes amostras após reação do MBTH em meio ácido nas condições otimizadas foi avaliado e inferiu-se sobre a possível composição quanto as classes de compostos presentes nas referidas amostras. Os resultados obtidos pelo método proposto foi comparado com os resultados do método de FC, 4-AAP, DPPH e ABTS. Foi observado que na análise de correlação empregando todas as amostras que os métodos de FC e 4-AAP (fenólicos totais) apresentaram maior divergência, enquanto que DPPH e ABTS (capacidade antioxidante) foram os mais concordantes. Contudo, quando se avaliou estatisticamente a correlação baseada nas diferentes classes de amostras todos os métodos foram mais concordantes, pa-

ra as amostras de vinhos, chás e infusões. Contudo, para as amostras de cachaças envelhecidas e cafés a compatibilidade estatística (intervalo de 95% de confiança) foi comprometida, possivelmente em função da composição química destas amostras. Assim, de forma geral o método proposto mostrou-se sensível, simples e viável para as classes de amostras analisadas, podendo ser aplicado para determinação de compostos fenólicos totais.

6.2 Perspectivas

As principais perspectivas do trabalho desenvolvido são:

- i)* ampliação das diferentes classes de substâncias puras e misturas, assim como outras amostras (cervejas, extratos de própolis, sucos de frutas, entre outras) avaliadas pelo método espectrofotométrico proposto em comparação estatística com outros métodos para fenólicos totais e capacidade antioxidante;
- ii)* comparação dos resultados obtidos com o método do azul da Prússia, para diferentes amostras, visto que o mesmo é empregado em meio ácido, assim como o método proposto (MBTH);
- iii)* uso de outros padrões de calibração e monitoramento em diferentes comprimentos de onda para o método proposto e comparação estatística com outros métodos;
- iv)* avaliação do perfil cromatográfico quanto a composição de diferentes compostos fenólicos e os resultados obtidos pelo método espectrofotométrico propostos em comparação com outros métodos reportados na literatura para fenólicos totais e capacidade antioxidante;
- v)* automação do método proposto para aplicação em sistemas miniaturizados.

REFERÊNCIAS

- ABE, L. T., et al. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 27(2): 394-400, abr.-jun. 2007.
- ADEGOKE, O.; FORBES, P. B. C. Challenges and advances in quantum dot fluorescent probes to detect reactive oxygen and nitrogen species: A review. **Analytica Chimica Acta**. Available online 23 August 2014.
- ÂNGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 66(1): 1-9, 2007.
- ARÇARI, D. P. Efeitos biológicos do consumo de chá-mate (*Ilex paraguariensis*) frente à obesidade em camundongos. Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo – SP. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Saúde Pública) - São Paulo, 2009.
- ARCHELA, E.; DALL'ANTONIA, L. H. Determinação de compostos fenólicos em vinho: Uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 193-210, jul./dez. 2013.
- ARTS, M. J. T. J., et al. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. **Food Chemistry**, 88, 567–570, 2004.
- APAK, R., et al. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC **Method. J. Agric. Food Chem.** 2004, 52, 7970–7981.
- BACCAN, N., et al. **Química Analítica Quantitativa Elementar**. 3ª ed. São Paulo: Editora Edgar Blücher; Campinas: Editora da UNICAMP, 2001.
- BATAGLIONB, G. A., et al. Simultaneous quantification of phenolic compounds in buriti fruit (*Mauritia flexuosa* L.f.) by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Food Research International**. Volume 66, December 2014, Pages 396–400.
- BERKER, K. I., et al. Total Antioxidant Capacity Assay Using Optimized Ferricyanide/Prussian Blue Method. **Food Anal. Methods** (2010) 3:154–168.
- BISSOT, T. C.; PARRY, R. W.; CAMPBELL, D. H. **Journal of the American Chemical Society**. February 1, 1957. Vol 79, Issue 4. Page 796.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, 181 (1958), pp. 1199–1200.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technologies**, 28 (1995), pp. 25–30.

BROINIZI, P. R. B., et al. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 27(4): 902-908, out.-dez. 2007.

CABRITA, J. M.; SILVA, J. R.; LAUREANO, O. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. I **Seminário Internacional de Vitivinicultura**. Ensenada, México. 2003

CRAFT, B. D., et al. Phenol-Based Antioxidants and the *In Vitro* Methods Used for Their Assessment. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. Vol.11, 2012.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, Jan.- Jun./2004.

DUDONNÉ, S., et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. **J. Agric. Food Chem.** 57, 1768–1774. 2009.

EL RAGEHY, N. A.; ABBAS, S. S.; EL-KHATEEB, S. Z. STABILITY indicating method for determination of nortriptyline hydrochloride using 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 25 (2001) 143–151.

EMERSON, E. The condensation of aminoantipyrine. II. A new color test for phenolic compounds, **Journal Organic Chemistry**, 8, 417-428, 1943.

ETTINGER, M. B.; KUCHIIOFT, C. C.; LISHI, R. J. Sensitive 4-Aminoantipyrine Method for Phenolic Compounds. Environmental Health Center, Public Health Service, Cincinnati, Ohio. **Analytical Chemistry**. Volume 23, n. 12, December 1951.

FIAMEGOS, Y. C., et al. Synthesis and analytical applications of 4-aminopyrazolone derivatives as chromogenic agents for the spectrophotometric determination of phenols. **Analytica Chimica Acta** 403 (2000) 315–323.

FIAMEGOS, Y. C.; STALIKAS, C. D.; PILIDIS, G. A. 4-Aminoantipyrine spectrophotometric method of phenol analysis: Study of the reaction products via liquid chromatography with diode-array and mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**. Volume 467, Issues 1–2, 3 September 2002, Pages 105–114.

FREITAS, G. L. Potencial antioxidante e compostos fenólicos na cerveja, chopp, cevada (*hordeum vulgare* L.) e no cagaço de crasagem. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Centro de Ciências Agrárias (Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos). Florianópolis, 2006.

FRENZEL, W.; FRENZEL, J. O. Spectrophotometric determination of phenolic compounds by flow-injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, 261(1992) 253-259.

FRIESTAD, H. O.; OTT, D. E.; GUNTHER, F. A. Automated Colorimetric Microdetermination of Phenols by Oxidative Coupling with 3-Methyl-2-Benzothiazolinone Hydrazone. **Analytical Chemistry**, Vol. 41, No, 13, November 1969.

GOULDEN, P. D.; BROOKSBANK, P.; DAY, M. B. Determination of Submicrogram Levels of Phenol in Water. **Analytical Chemistry**, Vol. 45, No. 14, December 1973.

GÜNGÖR, N., et al. Comparative evaluation of antioxidant capacities of thiol-based antioxidants measured by different in vitro methods. **Talanta**. Volume 83, Issue 5, 15 February 2011, Pages 1650–1658.

GRAHAM, H. D. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. **Preventive Medicine**. Volume 21, Issue 3, May 1992, Pages 334–350.

GRAHAM, H. D. Stabilization of the prussian blue color in the determination of polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 40, 801-805, 1992.

HARRIS, D. C. **Quantitative Chemical Analysis**. W. H. Freeman and Company. New York, NY. Eighth Edition, 2010.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **J. Agric. Food Chem.** 2005, 53, 1841–1856.

HUNIG, S.; FRITSCH, K., H. **Ann. Chem.**, 609,143 (1957).

JARA-PALACIOSA, M., J., et al. Antioxidant potential of white grape pomaces: Phenolic composition and antioxidant capacity measured by spectrophotometric and cyclic voltammetry methods. **Food Research International**. Volume 66, December 2014, Pages 150–157.

KALYANARAMAN, B., et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. **Free Radical Biology and Medicine**. Volume 52, Issue 1, 1 January 2012, Pages 1–6.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. **Food Anal. Methods** (2009) 2:41–60.

KIM, H. Y.; LEE, H. J.; CHANG, S. K. Reaction-based colorimetric signaling of Cu²⁺ ions by oxidative coupling of phenols with 4-aminoantipyrine. **Talanta**. Volume 132, 15 January 2014, Pages 625–629.

KHAN, I., et al. Acute effect of sorghum flour-containing pasta on plasma total polyphenols, antioxidant capacity and oxidative stress markers in healthy subjects: A randomised controlled trial. **Clinical Nutrition Available** online 14 August 2014.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. **Molecules** 2013, 18, 2328-2375.

LIN, W.; LONG, L.; TAN, W. A highly sensitive fluorescent probe for detection of benzenethiols in environmental samples and living cells. **Chem. Commun.** Volume 46, Issue 9, 2010, Pages 1503-1505.

LU, Q., et al. An electrogenerated chemiluminescence sensor based on gold nanoparticles@C₆₀ hybrid for the determination of phenolic compounds. **Biosensors and Bioelectronics**. Volume 60, 15 October 2014, Pages 325–331.

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

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

MONTEIRO, M. C.; TRUGO, L. C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Quim. Nova**, Vol. 28, No. 4, 637-641, 2005.

MORALES, F. J.; BABBEL, M-B. Antiradical efficiency of Maillard reaction mixtures in a hydrophilic media, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 50, 2788 – 2792, 2002.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 19(1B): 315-320, Jan./Mar. 2009.

MOREIRA, R. F. A.; NETTO, C. C.; CARLOS A. B. de M. A fração volátil das aguardentes de cana produzidas no Brasil. **Quim. Nova**, Vol. 35, No. 9, 1819-1826, 2012.

NASO, L. G., et al. Biological evaluation of morin and its new oxovanadium(IV) complex as antio-xidant and specific anti-cancer agents. **Chemico-Biological Interactions**. Volume 206, Issue 2, 25 November 2013, Pages 289–301.

NASSIRIA, M., et al. Optimization of dispersive liquid–liquid microextraction for pre-concentration and spectrophotometric determination of phenols in Chabahar Bay seawater after derivatization with 4-aminoantipyrine. **Marine Pollution Bulletin**. Volume 86, Issues 1–2, 15 September 2014, Pages 512–517.

NEVES, L. C.; ALENCAR, S. M.; CARPES, S. T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *apis melífera*. **Braz. J. Food Technol.**, VII BMCFB, junho 2009.

NOIPA, T., et al. New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. **Food Research International**. Volume 44, Issue 3, April 2011, Pages 798–806.

OLIVEIRA, A. M. C. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e atividade antifúngica de pimentas do gênero *capsicum spp*. Universidade Federal do Piauí – UFPI, Centro de Ciências da Saúde (Mestrado em Alimentos e Nutrição - Área: Qualidade em alimentos). Teresina, 2011.

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Quím. Nova** vol.34 no.6 São Paulo 2011.

OKTEM, H. A., et al. Development of a laccase based paper biosensor for the detection of phenolic compounds. **Journal of Food, Agriculture & Environment** Vol.10 (2): 1030-1034. 2012

OZYURT, D.; DEMIRATA, B.; APAK, R. Modified cerium(IV)-based antioxidant capacity (CERAC) assay with selectivity over citric acid and simple sugars. **Journal of Food Composition and Analysis** 23 (2010) 282–288.

OZYURT, D.; DEMIRATA, B.; APAK, R. Determination of Total Antioxidant Capacity by a New Spectrofluorometric Method Based on Ce(IV) Reduction: Ce(III) Fluorescence Probe for CERAC Assay. **J Fluoresc** (2011) 21:2069–2076.

PARAZZI, C.; ARTHUR, C. M.; LOPES, J. J. C.; BORGES, M. T. M. R. Avaliação e caracterização dos principais compostos químicos da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de carvalho (*Quercus sp.*). **Ciênc. Tecnol. Aliment.** vol.28 no.1 Campinas Jan./Mar. 2008.

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

PERRIN, D.D. e DEMPSEY, B. Buffer for pH and metal ion control. Londres: Chapman and Hall, 1974.

POSPISILOVÁ, M.; POLÁSEK, M.; SVOBODOVÁ, D. Spectrophotometric Study of Reactions of Substituted Phenols with MBTH in Alkaline Medium: The Effect of Phenol Structure on the Formation of Analytically Useful Coloured Products. **Mikrochim. Acta** 129, 201-208 (1998).

POSPISILOVÁ, M., et al. Investigation of the Colour Reaction of Phenols with MBTH, II: Properties of the Isolated Products of the Reaction with Phenol, 2,6-Dimethylphenol and 4-Methylphenol. **Mikrochim. Acta** [Wien] 1990, III, 117 128

PREEDY, V. R. **Processing and Impact on Antioxidants in Beverages**. Release Date: 10 Apr 2014. Imprint: Academic Presse Book. ISBN :9780124046955. Print Book ISBN: 9780124047389. Pages: 290 – 300.

PRIETO, M. A., et al. A. An efficient methodology for quantification of synergy and antagonism in Single Electron Transfer antioxidant assays. **Food Research International**. Available online 28 November 2014.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **J. Agric. Food Chem.** 53, 4290-4302, 2005.

RIBEIRO, D. S. M., et al. Exploiting the oxidative coupling reaction of MBTH for indapamide determination. **Talanta** 79 (2009) 1161–1168.

ROVER, M. R.; BROWN, R. C. Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin–Ciocalteu method. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**. Volume 104, November 2013, Pages 366–371.

RODRIGUES, G. D., et al. A green and sensitive method to determine phenols in water and wastewater samples using an aqueous two-phase system. **Talanta**. Volume 80, Issue 3, January 2010, Pages 1139–1144.

RODRIGUES, J. A. Determinação da atividade antioxidante e composição fenólica de vinhos portugueses e correlação com parâmetros de cor. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa. Tecnologia e Segurança Alimentar – Qualidade Alimentar (Dissertação de Mestrado). 2011.

RODRIGUES, L. M. A. Cachaças envelhecidas em diferentes tipos de madeira: Quantificação de compostos fenólicos, atividade antibacteriana e antifúngica. Universidade Federal de Lavras – UFLA, Departamento de Ciência dos Alimentos (Dissertação de mestrado). Minas Gerais, 2012.

RODRIGUES, N. P.; BENASSI, M. T.; BRAGAGNOLO, N. Scavenging capacity of coffee brews against oxygen and nitrogen reactive species and the correlation with bioactive compounds by multivariate analysis. **Food Research International**. Volume 61, July 2014, Pages 228–235.

RODRÍGUEZ-NOGALES, J. M.; VILA-CRESPOB, J.; GÓMEZA, M. Development of a rapid method for the determination of the antioxidant capacity in cereal and legume milling products using the radical cation DMPD^{•+}. **Food Chemistry**. Volume 129, Issue 4, 15 December 2011, Pages 1800–1805.

SAMRAA, M. A., et al. Antioxidant/prooxidant properties of model phenolic compounds: Part I. Studies on equimolar mixtures by chemiluminescence and cyclic voltammetry. **Food Chemistry**. Volume 125, Issue 2, 15 March 2011, Pages 622–629.

SANTOS, S. C., MELLO, J. C. P. **Compostos Fenólicos Simples e Heterosídicos**. 519-533p. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento (C.M.O. Simões; E.P. Schenkel; G. Gosman; J.C.P. Mello; L.A. Mentz & P.R. Petrovick, eds.) 5.ed. Porto Alegre. p. 1102, 2003.

SAZHINA, N. N., et al. Determination of Total Antioxidant Content in Various Drinks by Amperometry. **Procedia Chemistry**. Volume 10, 2014, Pages 64–73.

SILVA, M. L. C., et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, jul./set. 2010.

SCHMITZ, W. et al. O chá verde e suas ações como quimioprotetor. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 26, n. 2, p.119-130, jul./dez. 2005.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: Mecanismos de formação e adaptação ao Treinamento Físico. **Rev. Bras. Med. Esporte**, Vol. 10, Nº 4 – Jul/Ago, 2004.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**. Volume 91, Issues 1–2, 16 May 2001, Pages 21–40. Tannins: Analysis and Biological Effects in Ruminant Feeds.

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** (2002) 372 :822–828.

SCHÖNING, M.J., et al. Amperometric PDMS/glass capillary electrophoresis-based biosensor microchip for catechol and dopamine detection. **Sens. Actuators B**, 108 (2005), pp. 688–694.

SHARANGI, A. B. Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.) – A review. **Food Research International**, v. 42, 529–535, 2009.

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**, 113, 1201-1205, 2009.

SKOOG, D. A., et al. **Fundamentos da Química Analítica**. Tradução da 8ª edição norte americana. São Paulo, Ed.Thomson, 2007.

SOARES, S. E. Ácidos Fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.** vol.15 no.1 Campinas Jan. 2002.

SOUSA, C. M. M., et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quím. Nova** vol.30 no.2 São Paulo Mar./Apr. 2007.

STEVANATO, R.; FABRIS, S.; MOMO, F. New Enzymatic method for the determination of total phenolicContent in tea and wine. **J. Agric. Food Chem.** 2004, 52, 6287–6293.

STINCO, C. M., et al. Hydrophilic antioxidant compounds in orange juice from different fruit cultivars: Composition and antioxidant activity evaluated by chemical and cellular based (*Saccharomyces cerevisiae*) assays. **Journal of Food Composition and Analysis**. Volume 37, February 2015, Pages 1–10.

STRATIL, P.; KLEJDUS, B.; KUBAN, V. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. **Talanta** 71 (2007) 1741–1751.

SUDHA, P. D. C. **Pharmaceutical Analysis**. Unit VII – Reagents: Chapter 1, 3-Methyl-2-Benzothiazolinone Hydrazone (MBTH). Pearson Education India. July 20, 2012.

SZYDŁOWSKA-CZERNIAK, A.; TUŁODZIECKA, A. Comparison of a silver nanoparticle-based method and the modified spectrophotometric methods for assessing antioxidant capacity of rapeseed varieties. **Food Chemistry**. Volume 141, Issue 3, 1 December 2013, Pages 1865–1871.

THARPA, K., et al. Spectrophotometric determination of isoxsuprine hydrochloride using 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride in spiked human urine and pharmaceuticals. **Talanta** 81 (2010) 1216–1223.

VARGAS, P. N.; HOELZEL, S. C.; ROSA, C. S. Determinação do teor de polifenóis totais e atividade antioxidante em sucos de uva comerciais. **Alim. Nutr.**, Araraquara v.19, n.1, p. 11-15, jan./mar. 2008.

VASCONCELOS, S. M. L., et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, anti-oxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, Vol. 30, No. 5, 1323-1338, 2007.

WILLIAMS, B. W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 28.25-30. 1995.

WOOTTON-BEARD, P. C.; MORAN, A.; RYAN, L. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. **Food Research International**. Volume 44, Issue 1, January 2011, Pages 217–224.

ZACARONI L. M., et al. Avaliação multivariada da composição fenólica de cachaças envelhecidas em diferentes barris de madeira. **Científica**, Jaboticabal, v.42, n.2, p.101–107, 2014.

ZAMUNER, M. L. M.; CARRION, R. C. E.; MAGALHÃES, J. F. Determinação espectrofotométrica do bromidrato de fenoterol em preparações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 44, n. 4, out./dez., 2008.

ZHANG, Y., et al. Phenolic compositions and antioxidant capacities of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruits. **Food Chemistry**. Volume 145, 15 February 2014, Pages 674–680

- Site

IPAC, Instituto Português de Acreditação. Guia para a acreditação de laboratórios químicos. De 08.05.2011. Disponível em <http://www.ipac.pt/docs/publicdocs/regras/OGC002.pdf>. acessado em maio de 2014.