

UFAL

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

**AVALIAÇÃO DE RADICAIS CÁTIOS DERIVADOS DE AMINAS AROMÁTICAS
COMO SONDAS ESPCTROFOTOMÉTRICAS PARA DETERMINAÇÃO DA
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM AMOSTRAS DE BEBIDAS**

ROSICLEIDE VITURINA DOS SANTOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins

57072-970 - Maceió - AL

ROSICLEIDE VITURINA DOS SANTOS

**Avaliação de radicais cátions derivados de aminas aromáticas como sondas
espectrofotométricas para determinação da capacidade antioxidante em amostras de
bebidas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos

Maceió - AL
2014

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

S237a Santos, Rosicleide Viturina dos.
Avaliação de radicais cátions derivados de amins aromáticas como sondas espectrofotométricas para determinação da capacidade antioxidante em amostras de bebidas / Rosicleide Viturina dos Santos. – 2014.
156 f. : il., grafs., tabs.

Orientador: Josué Carinhanha Caldas Santos.
Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2014.

Bibliografia: f. 115 - 126.
Anexos: f. 128 – 156.

1. Capacidade antioxidante. 2. Amins aromáticas. 3. Cátion radical.
4. Sondas espectrofotométricas. I. Título.

CDU: 543.42



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



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Dissertação da mestranda Rosicleide Viturina dos Santos, intitulada: **“Avaliação de Radicias Cátions Derivados de Aminas Aromáticas como Sondas Espectrofotométricas para Determinação da Capacidade Antioxidante em Amostras de Bebidas”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 1º de agosto de 2014, às 09h30, na Sala de Aulas do PPGQB/IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

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

Prof.ª Dr.ª Ana Catarina Rezende Leite
(PPGQB/IQB/UFAL)

Prof.ª Dr.ª Anita Jocelyne Marsaioli
(IQ - UNICAMP)

RESUMO

Existem na literatura muitos métodos bem estabelecidos para a determinação da capacidade antioxidante (C_{AO}) em uma variedade de amostras, dois deles empregando reações com radicais como sondas espectrofotométricas, DPPH[•] e ABTS^{•+}. No entanto, tais métodos apresentam algumas limitações como cinética lenta, efeito de solventes, polaridade dos compostos, custo dos reagentes, entre outros aspectos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método espectrofotométrico alternativo para determinação da C_{AO} em bebidas empregando radicais cátions derivados das aminas aromáticas: DMPD, DEPD, EHPD e EHMPD. Os parâmetros químicos e físicos do método foram otimizados para a amina DEPD e aplicados às outras aminas. O método espectrofotométrico proposto foi baseado na oxidação das aminas aromáticas pelo Fe(III) (pH = 4,0) levando à formação dos respectivos cátions radicais de coloração púrpura e, com $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 500 nm (DEPD^{•+}) e 510 nm (DMPD^{•+}, EHPD^{•+} e EHMPD^{•+}). Após a sua formação, os radicais produzidos apresentavam redução da intensidade da coloração proporcional à concentração de compostos antioxidantes no meio. Os parâmetros tempo de geração e reação do radical, pH, concentração dos reagentes e da solução tampão, proporção amina e Fe(III), efeito de solventes orgânicos e contra-íons foram otimizados. Para avaliar a reatividade dos radicais cátions gerados, foram calculados os valores de EC_{50} (capacidade de inibir 50% do respectivo radical) para 17 compostos diferentes (fenólicos, tiólicos, glicosilados e sais redutores). Os menores valores de EC_{50} foram obtidos para os compostos fenólicos (ácido cafeico, ácido tânico e *L*-dopa) e os maiores para *N*-propilgalato, rutina e *N*-acetilcisteína. Para um melhor entendimento dos processos envolvidos foram realizados estudos eletroquímicos empregando voltametria cíclica e cálculos teórico-quânticos das aminas avaliadas. Os potenciais catódicos (E_{pc}) e anódicos (E_{pa}) das aminas foram obtidos em cinco velocidades de varredura, e o perfil voltamétrico indicou tendência quase-reversível para o processo redox. Os mapas de potencial eletrostático e as energias dos orbitais HOMO e LUMO foram calculados, indicando os possíveis sítios reativos em reações de oxidação. As principais figuras de mérito foram calculadas empregando ácido gálico (AG), ácido tânico (AT), ácido ascórbico (AA) e quercetina (QC) (para o DEPD^{•+}), para as demais sondas foi utilizado apenas AG como referência, exceto para a EHMPD^{•+}, para qual sem empregou trolox (TR). Em relação ao método com a amina DEPD, a faixa linear mais estreita foi obtida para o AG (0,10 – 1,25 mg L⁻¹) e a mais ampla para o ácido ascórbico (0,50 – 7,50 mg L⁻¹), os valores de limite de detecção (LOD) variaram de 0,0002 mg L⁻¹ (para AG) a 0,002 mg L⁻¹ (para AT), enquanto o desvio padrão relativo (RSD) variou de 0,9 a 9,2%. As sondas DMPD^{•+}, EHPD^{•+} e EHMPD^{•+} apresentaram faixas lineares variáveis, sendo a mais ampla para EHMPD^{•+} (0,50 – 5,0 mg L⁻¹ em equivalente de TR) e a mais estreita para o DMPD^{•+} (0,2 – 1,2 mg L⁻¹ em equivalente de AG). Os valores de RSD obtidos foram todos inferiores a 2,0% indicando boa precisão analítica. O método foi aplicado às amostras de vinhos, chás e infusões ($14 \leq N \leq 30$) e os resultados foram comparados aos métodos de Folin-Ciocalteu (FC), Folin-Denis (FD), ABTS e DPPH. Os resultados obtidos foram submetidos a uma análise de correlação linear para um intervalo de 95% de confiança, mostrando-se concordantes e com coeficiente de correlação $r > 0,9000$ para a maioria dos ensaios, sendo as correlações entre EHMPD e ABTS ($r = 0,8797$) e EHMPD e FC ($r = 0,8415$) as que apresentaram os menores coeficientes. Dessa forma, o método desenvolvido explorando os radicais cátions das aminas como sondas espectrofotométricas mostrou-se simples, preciso e concordante com outros ensaios para determinação de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante.

Palavras chave: capacidade antioxidante, cátion radical, aminas aromáticas, sondas espectrofotométricas.

ABSTRACT

Many well-established methods for antioxidant capacity (C_{AO}) determination are described in literature for a wide samples variety, and these only two methods DPPH \cdot and ABTS \cdot^{+} exploring radicals as spectrophotometric probes for analytical purpose. However, these methods have some limitations such as slower kinetic, solvent polarity effect, hydro and lipophilicity of compounds, chemical cost, among others. Thus, the aim of this study was the development an alternative spectrophotometric method for C_{AO} determination in beverages exploring cation radicals derived from aromatic amines: DMPD, DEPD, EHPD and EHMPD. The chemical and physical parameters of the method were optimized for DEPD such as amine model and after these steps the optimal conditions was applied for other aromatic amines. The spectrophotometric method proposed was based on aromatic amines oxidation by Fe(III) ions (pH = 4.0) leading to corresponding purple color cation radical with $\lambda_{max} = 500$ nm (DEPD \cdot^{+}) and 510 nm (DMPD \cdot^{+} , EHPD \cdot^{+} and EHMPD \cdot^{+}). After the radical formation the addition of an antioxidant compound lead to color reduction intensity of solution, proportional to the antioxidant concentration in the medium. In the optimization method the allowing parameters was evaluated: time of the cation radical generation and reaction of different species, pH, reactants and buffer concentration, amine and Fe(III) ratio and organic solvents and counter ions effect. To reactivity radicals cation generated evaluated was employed the EC₅₀ values (ability to inhibit 50% of their radical) of 17 compounds (phenolic, thiolic, glycosylated and reducing salt). The lower EC₅₀ values were obtained for phenolic compound (caffeic acid, tannic acid and L-dopa) and higher for *N*-propyl gallate, rutin and *N*-acetylcysteine. Electrochemical studies using cyclic voltammetry and theoretical quantum calculations of amines evaluated were performed for a better processes understanding. For the aromatic amines cathode (E_{pc}) and anodic (E_{pa}) potential were obtained in five sweep speeds, and the voltammetric profile showed quasi-reversible redox process. The electrostatic potential map, HOMO and LUMO energies were calculated indicating the possible reactive sites to oxidation reactions. The main analytical figures were calculated using gallic acid (GA), tannic acid (TA), ascorbic acid (AA) and quercetin (QC) (for DEPD \cdot^{+}), for the other probes AG only was used as reference, except EHMPD \cdot^{+} , which was employed trolox (TR). In the method with DEPD amine AG presented the narrower (0.10 - 1.25 mg L⁻¹) and ascorbic acid (0.50 - 7.5 mg L⁻¹) the widest linear range, the values of limit of detection (LOD) varied from 0.0002 mg L⁻¹ (AG) to 0.002 mg L⁻¹ (AT), while the relative standard deviation (RSD) ranged from 0.9 to 9.2%. The spectrophotometric probes DMPD \cdot^{+} , EHPD \cdot^{+} , EHMPD \cdot^{+} showed linear ranges variables being the widest to EHMPD \cdot^{+} (0.50 - 5.0 mg L⁻¹ at TR equivalent) and closer to the DMPD \cdot^{+} (0.2 to 1.2 mg L⁻¹ at GA equivalent). The values of RSD obtained were all less than 2.0% indicating good analytical precision. The methods developed were applying in wines, teas and infusions samples ($14 \leq N \leq 30$) and the data obtained compared with Folin-Ciocalteu (FC), Folin-Denis (FD), ABTS and DPPH methods. Linear correlation analysis at the level of 95% confidence was employed for results comparison and was observed good agreement and correlation coefficient $r > 0.9000$, and the correlations between EHMPD and ABTS ($r = 0.8797$) and EHMPD and FC ($r = 0.8415$) showed that the lower linear coefficients. Thus, the method developed exploring the radical cations of aromatic amines as spectroscopic probes proved simple, accurate and consistent with other assays for determination of total phenolic compounds and antioxidant capacity.

Keywords: antioxidant capacity, cation radical, aromatic amines, spectrophotometric probes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Produção de espécies reativas a partir do ânion radical superóxido</i>	16
Figura 2. <i>Exemplo da ação de ERs em lipídio</i>	17
Figura 3. <i>Formação de endoperóxidos e hidroperóxidos pela ação do oxigênio singlete.</i>	18
Figura 4. <i>Representação esquemática do ciclo catalítico da glutatona</i>	22
Figura 5. <i>Mecanismo de oxidação do ascorbato</i>	23
Figura 6. <i>Estruturas químicas dos constituintes da vitamina “E” e do trolox</i>	24
Figura 7. <i>Bioconversão de carotenoides em diferentes formas ativas de vitamina A.</i>	25
Figura 8. <i>Estruturas químicas de alguns carotenoides importantes e dos anéis alfa e beta.</i> .	26
Figura 9. <i>Equilíbrio redox da ubiquinona e suas formas reduzidas.</i>	27
Figura 10. <i>Exemplo de reação envolvendo a atividade antioxidante do ácido úrico.</i>	28
Figura 11. <i>Estrutura química dos principais tipos de flavonoides</i>	29
Figura 12. <i>Estruturas de AAPH e AMVN e esquema competitivo do ensaio ORAC</i>	34
Figura 13. <i>Reação genérica e forma oxidada e reduzida do ABTS</i>	35
Figura 14. <i>Reação genérica do DPPH[•] gerando a espécie não radical</i>	36
Figura 15. <i>Formação e mecanismo de atuação do radical cátion DMPD^{•+}</i>	37
Figura 16. <i>Possível interferência do ferro na reação do método DMPD</i>	38
Figura 17. <i>Reação geral para o ensaio FRAP.</i>	38
Figura 18. <i>Complexos formados entre Cu(I) e batocuproína e neocuproína</i>	40
Figura 19. <i>Reação química genérica envolvida no método de Folin-Ciocalteu.</i>	41
Figura 20. <i>Aspectos gerais dos voltamogramas cíclicos</i>	47
Figura 21. <i>Estrutura molecular das aminas aromáticas utilizadas.</i>	66
Figura 22. <i>Etapas envolvidas para formação e atuação do radical cátion DEPD^{•+}</i>	67
Figura 23. <i>Espectros de absorção molecular referente aos radicais cátions DMPD^{•+}, DEPD^{•+}, EHPD^{•+}, EHMPD^{•+} e TMPD^{•+}</i>	69
Figura 24. <i>Mecanismo proposto para a oxidação da amina DEPD em meio aprótico</i>	71
Figura 25. <i>Perfil da oxidação do DEPD frente ao O₂ atmosférico</i>	72
Figura 26. <i>Avaliação da influência do pH para geração do radical DEPD^{•+}</i>	73
Figura 27. <i>Perfil de geração do radical cátion DEPD^{•+} em função do oxidante</i>	74
Figura 28. <i>Avaliação do tempo de geração dos radicais DMPD^{•+}, DEPD^{•+}, EHPD^{•+}, EHMPD^{•+} e TMPD^{•+}</i>	75
Figura 29. <i>Avaliação do efeito do contra-íon na estabilidade do sinal de DEPD^{•+}</i>	76
Figura 30. <i>Observação da oxidação das aminas DMPD, DEPD, EHPD e EHMPD pelo oxigênio atmosférico em função do tempo de reação.</i>	78
Figura 31. <i>Avaliação da influência do pH na formação e inibição (%I) do radical cátion DEPD^{•+}</i>	79
Figura 32. <i>Efeito da concentração da solução tampão em pH 4,0 na geração e inibição (%I) do radical cátion DEPD^{•+} frente aos compostos antioxidantes</i>	81
Figura 33. <i>Avaliação da concentração da amina na formação e inibição do radical DEPD^{•+} frente aos compostos com atividade antioxidante</i>	82
Figura 34. <i>Avaliação das proporções de Fe(III):DEPD na formação e inibição do DEPD^{•+} frente aos compostos com atividade antioxidante</i>	84

Figura 35. Avaliação do volume de DEPD e Fe(III) para geração e inibição do radical DEPD ^{•+} frente aos compostos antioxidantes	85
Figura 36. Avaliação do volume dos compostos antioxidantes	86
Figura 37. Avaliação da sensibilidade do método proposto em função do tempo de inibição para AG, AT e QC	88
Figura 38. Variação da sensibilidade do método em função da concentração percentual (v/v) dos solventes orgânicos avaliados	90
Figura 39. Avaliação da variação do EC ₅₀ em função da concentração percentual (v/v) dos solventes orgânicos avaliados.....	91
Figura 40. Valores de EC ₅₀ para os compostos avaliados a partir da reação com as sondas espectrofotométricas propostas.....	101
Figura 41. Gráfico boxplot para os resultados das amostras obtidos pelas sondas propostas (DMPD, DEPD, EHPD e EHMPD) e os métodos FC, DPPH e ABTS	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Testes diagnósticos em VC para os processos reversíveis, irreversíveis e quase-reversíveis.</i>	48
Tabela 2. <i>Voltamogramas cíclicos das aminas e dos radicais, em meio prótico, para uma velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.</i>	92
Tabela 3. <i>Dados obtidos a partir do estudo eletroquímico para as aminas.</i>	94
Tabela 4. <i>Equações de reta para I_{pc} vs v^{1/2} para as aminas e radicais.</i>	95
Tabela 5. <i>Descritores teóricos químico-quânticos.</i>	96
Tabela 6. <i>Orbitais de fronteira HOMO e LUMO e mapas de densidade eletrônica para as estruturas calculadas.</i>	97
Tabela 7. <i>Dados da avaliação da C_{AO} de compostos puros frente ao TMPD^{•+}</i>	99
Tabela 8. <i>Figuras de mérito para compostos com atividade antioxidantes avaliados frente aos radicais cátions DMPD^{•+}, DEPD^{•+}, EHPD^{•+} e EHMPD^{•+}.</i>	103
Tabela 9. <i>Análise de correlação (para um intervalo de 95% de confiança) entre o método proposto nas condições ótimas e os métodos avaliados</i>	105
Tabela 10. <i>Determinação da capacidade antioxidante em bebidas empregando o método proposto (DEPD), DPPH, ABTS, Folin-Denis e Folin-Ciocalteu.</i>	107
Tabela 11. <i>Determinação da capacidade antioxidante em bebidas empregando o método proposto (DMPD, DEPD, EHPD e EHMPD), DPPH, ABTS e Folin-Ciocalteu (FC).</i> .	108
Tabela 12. <i>Avaliação do efeito do solvente sobre a sensibilidade e o EC₅₀ do método proposto para a sonda DEPD^{•+}.</i>	128
Tabela 13. <i>Voltamogramas cíclicos da amina DMPD e cátion radical DMPD^{•+}</i>	129
Tabela 14. <i>Voltamogramas cíclicos da amina DEPD e cátion radical DEPD^{•+}</i>	132
Tabela 15. <i>Voltamogramas cíclicos da amina EHPD e cátion radical EHPD^{•+}</i>	135
Tabela 16. <i>Voltamogramas cíclicos da amina EHMPD e cátion radical EHMPD^{•+}</i>	139
Tabela 17. <i>Gráficos da corrente de pico catódico (I_{pc}) em função da v^{1/2}.</i>	143
Tabela 18. <i>Avaliação da reatividade da sonda DMPD^{•+} frente a compostos com atividade antioxidante</i>	145
Tabela 19. <i>Avaliação da reatividade da sonda DEPD^{•+} frente a compostos com atividade antioxidante.</i>	148
Tabela 20. <i>Avaliação da reatividade da sonda EHPD^{•+} frente a compostos com atividade antioxidante.</i>	151
Tabela 21. <i>Avaliação da reatividade da sonda EHMPD^{•+} frente a compostos com atividade antioxidante</i>	154

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – ácido ascórbico

AG – ácido gálico

AT – ácido tânico

C_{AO} - capacidade antioxidante

CAT – catalase

CoQ - coenzima Q

CoQ₁₀ - ubiquinona-10

CoQH₂ – ubiquinol

CUPRAC - ensaio de poder antioxidante por redução do cobre

DEPD - *N,N*-dietil-1,4-fenilenodiamina

DMF – dimetilformamida

DMPD - *N,N*-dimetil-1,4-fenilenodiamina

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucleico

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

EC₅₀ – concentração mínima necessária para inibição de 50% do radical em solução

ECV - eletrodo de carbono vítreo

EHMPD - *N*-etil-*N*-(2-hidroxietyl)-2-metil-1,4-fenilenodiamino

EHPD - *N*-etil-*N*-(2-hidroxietyl)-1,4-fenilenodiamino

E_{pa} – potencial de pico anódico

E_{pc} – potencial de pico catódico

ER - espécie reativa

ERN - espécie reativa denitrogênio

ERO - espécie reativa de oxigênio

FC - Folin-Ciocalteu

FD - Folin-Denis

FPD - *N*-fenil-1,4-fenilenodiamina

FRAP - ensaio de poder antioxidante por redução do ferro

GPx - glutaciona peroxidase

GR - glutaciona redutase

GSH - glutaciona reduzida

HAc/NaAc – ácido acético/acetato de sódio

HCA – composto antioxidante doador de átomo de hidrogênio

HOMO – orbital molecular ocupado de alta energia

I_A – inibição do sinal de absorvância

I_{pa} – corrente de pico anódico

I_{pc} – corrente de pico catódico

LOD – limite de detecção

LOQ – limite de quantificação

LUMO – orbital molecular desocupado de baixa energia

MPO – mieloperoxidase

NADPH – nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NOS - óxido nítrico sintases

ORAC - capacidade de absorção do oxigênio radical

QC- quercetina

RNA - ácido ribonucleico

RSD - desvio padrão relativo

SOD - superóxido dismutase

TAH - transferência de átomos de hidrogênio

TE - transferência de elétrons

TEAC / ABTS - ensaio da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox

TMPD - *N,N,N',N'*-tetrametil-1,4-fenilenodiamina

TR - trolox

TRAP - parâmetro antioxidante da captura total do radical

UV-Vis – ultravioleta/visível

VC – voltametria cíclica

$\lambda_{m\acute{a}x}$ – comprimento de onda de máxima absorção

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio	15
1.1.1	Ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	15
1.1.2	Radical hidroxila (HO^{\cdot})	16
1.1.3	Radicais peroxila (ROO^{\cdot}) e alcoxila (RO^{\cdot})	18
1.1.4	Oxigênio singleto (1O_2)	18
1.1.5	Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	19
1.1.6	Ácido hipocloroso (HClO)	19
1.1.7	Espécies reativas de nitrogênio (ERN)	20
1.2	Defesas antioxidantes	21
1.2.1	Antioxidantes enzimáticos	21
1.2.2	Antioxidantes não enzimáticos	23
1.2.2.1	Ácido ascórbico	23
1.2.2.2	Vitamina E	23
1.2.2.3	Carotenoides	25
1.2.2.4	Ubiquinona ou coenzima Q	27
1.2.2.5	Ácido úrico	28
1.2.2.6	Polifenóis como antioxidantes	29
1.3	Métodos para determinação da capacidade antioxidante total (<i>in vitro</i>)	31
1.3.1	Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC)	33
1.3.2	Parâmetro antioxidante da captura total do radical (TRAP)	34
1.3.3	Ensaio da capacidade antioxidante equivalente ao trolox-TEAC (ABTS ^{•+})	35
1.3.4	Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH [•])	36
1.3.5	Método do DMPD ^{•+}	37
1.3.6	Ensaio de poder antioxidante por redução do ferro (FRAP)	38
1.3.7	Ensaio de poder antioxidante por redução do cobre (CUPRAC)	39
1.3.8	Fenólicos totais pelo reagente de Folin-Denis (FD)	40
1.3.9	Fenólicos totais pelo reagente de Folin-Ciocalteu (FC)	40
1.4	Composição química das amostras de vinhos, chás e infusões	42
1.4.1	Vinhos tintos e brancos	42
1.4.2	Chás (<i>Camellia sinensis</i>) e infusões	43
1.5	Estudo voltamétrico das aminas e radicais	45
1.6	Algumas aplicações de aminas aromáticas	48
1.7	Justificativa do método proposto	50
2	OBJETIVOS	52
2.1	Gerais	52
2.2	Específicos	52
3	EXPERIMENTAL	55
3.1	Preparo das soluções	55
3.2	Equipamentos e softwares utilizados	57
3.3	Procedimentos	58

3.3.1	Avaliação do tempo de reação entre os radicais e os antioxidantes	58
3.3.2	Método proposto (DMPD ⁺ , DEPD ⁺ , EHPD ⁺ , EHMPD ⁺)	59
3.3.3	Método de Folin-Denis	59
3.3.4	Método de Folin-Ciocalteu	60
3.3.5	Ensaio do sequestro do radical DPPH [•]	60
3.3.6	Ensaio do sequestro do radical ABTS ^{•+}	60
3.3.7	Avaliação do efeito do contra-íon.....	61
3.3.8	Estudos eletroquímicos	61
3.3.9	Limpeza do eletrodo de carbono vítreo (ECV).....	61
3.3.10	Cálculos teóricos.....	62
3.3.11	Preparo das amostras	62
3.3.12	Tratamento estatístico dos dados	63
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1	Parâmetros avaliados e otimizados no desenvolvimento do método	67
4.2	Avaliação do comprimento de onda de máxima absorção relativo aos radicais.....	68
4.3	Avaliação da oxidação do DEPD frente ao oxigênio atmosférico	71
4.4	Avaliação do efeito do pH na geração do radical DEPD⁺	72
4.5	Avaliação da geração do DEPD⁺ frente aos oxidantes Fe(III) e K₂S₂O₈.....	73
4.6	Avaliação do efeito do contra-íon na estabilização o sinal do DEPD⁺	76
4.7	Formação de um cátion radical ou complexo?	77
4.8	Avaliação da inibição do DEPD⁺ frente às moléculas redutoras em função do pH da solução	78
4.9	Avaliação da concentração da solução tampão	80
4.10	Avaliação da concentração de DEPD	81
4.11	Avaliação da proporção de Fe(III) e DEPD.....	83
4.12	Avaliação dos volumes dos reagentes e amostra	85
4.13	Avaliação do tempo de reação de compostos antioxidantes frente ao radical DEPD⁺	87
4.14	Avaliação do efeito do solvente frente à inibição do radical DEPD⁺ pelo AG	88
4.15	Estudo eletroquímico das aminas e radicais.....	91
4.16	Estudo teórico	95
4.17	Reatividade dos radiais DMPD⁺, DEPD⁺, EHPD⁺, EHMPD⁺ e TMPD⁺ frente a diferentes compostos redutores e antioxidantes	98
4.18	Figuras de mérito para o método proposto.....	102
4.19	Análise das amostras.....	104
5	CONCLUSÕES	112
6	REFERÊNCIAS	115
7	ANEXOS	128
7.1	Anexo 1: Avaliação do efeito do solvente sobre a sonda DEPD⁺	128
7.2	Anexo 2: Voltamogramas cíclicos de todas as aminas e cátions radicais.....	129
7.3	Anexo 3: Gráficos da corrente de pico catódico (I_{pc}) em função da $v^{1/2}$	143
7.4	Anexo 4: Avaliação da reatividade das sondas propostas frente a compostos antioxidantes/redutores.....	145

Introdução

1 INTRODUÇÃO

As reações de óxido-redução são essenciais para os organismos vivos, pois delas se obtém energia necessária para as funções de manutenção da vida (BARREIROS, et al., 2006). Durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular, há formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs), as quais, em geral, são instáveis e assim, apresentam tempo de meia vida curto podendo reagir com diversas biomoléculas (HALLIWELL, 2000).

A presença dessas espécies reativas (radicalares ou não radicalares), em concentrações fisiológicas normais, é responsável pela manutenção de muitas funções biológicas necessárias, um exemplo é a fagocitose, processo utilizado pela célula para englobar tanto partículas sólidas, que lhe servirão de alimento, como também microorganismos invasores como bactérias, inativando-as; nesse último caso as espécies reativas são produzidas para eliminar o agente agressor (PIETTA, 2000). Outros exemplos são produção de energia, controle da pressão sanguínea, regulação do crescimento celular, apoptose, sinalização intercelular e síntese de substâncias de importância biológica. Tudo isso está relacionado com a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no organismo (BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006; VASCONCELOS et al., 2007).

Dessa forma, entende-se que a presença das espécies reativas (ERs) no organismo é necessária, no entanto seu excesso é prejudicial e pode causar lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, inclusive podendo resultar na morte celular (ROVER JÚNIOR, et al., 2001). Essas ERs também podem ser produzidas a partir de fontes exógenas, como tabaco, poluição do ar, maus hábitos alimentares, prática inadequada de exercícios físicos, anestésicos, quimioterápicos, pesticidas, exposição a radiações, entre outras (BIANCHI, ANTUNES, 1999; SOARES, 2002; NAGENDRAPPA, 2005; VALKO, et al., 2006). Os sistemas de defesa antioxidante (enzimático e não enzimático), quando eficientes, combatem o excesso das espécies reativas, produzidas por fontes exógenas ou endógenas, mantendo a homeostase fisiológica (VASCONCELOS, et al., 2007).

Os compostos antioxidantes responsáveis por inibir ou reduzir os danos causados por EROs e ERNs podem ser produzidos pelo corpo ou obtidos através da dieta e/ou suplementação. Halliwell e colaboradores (1995) definem antioxidante como “*qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera ou previne significativamente a oxidação do referido substrato*”. De acordo com

essa definição nem todos redutores envolvidos em uma reação química são antioxidantes; apenas os compostos que são capazes de proteger o alvo biológico da oxidação cumprem este critério (KARADAG, OZCELIK, SANER, 2009).

Quando as defesas antioxidantes presentes no organismo são insuficientes para combater as ERs, o sistema antioxidante torna-se ineficiente e permite a instalação do estresse oxidativo, caracterizado pelo desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes, isso resulta em danos às células que podem se expressar clinicamente como envelhecimento ou doença (SOARES, ANDREAZZA, SALVADOR, 2005).

Os efeitos prejudiciais causados pelo estresse oxidativo no organismo incluem, peroxidação dos lipídios de membrana, inativação de proteínas (e enzimas), formação de produtos de glicação avançada e danos oxidativos causados ao DNA nuclear ou mitocondrial (HUSAIN, CILLARD, CILLARD, 1987; GLISZCZYNSKA-SWIGŁO, 2006). Dessa forma, o estresse oxidativo encontra-se relacionado a várias patologias, tais como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, diabetes, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS (em pacientes soropositivos), podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (BIANCHI, ANTUNES, 1999; VALKO, et al., 2007; KARADAG, OZCELIK, SANER, 2009).

Pelo fato dos antioxidantes atuarem no combate às espécies reativas (radicalares e não radicalares) e por prevenir a oxidação de compostos oxidáveis, espécies com propriedades antioxidantes também estão sendo empregadas em indústrias de alimentos, cosméticos e bebidas (DOROSHOW, 1983; HALLIWELL, et al., 1995; WEIJL, et al., 1997) visando a proteção de seus produtos, prevenindo a decomposição oxidativa destes pela ação da luz, temperatura e umidade, mantendo assim por mais tempo suas propriedades organolépticas e, por consequência, aumentando o tempo de prateleira (FAURÉ, et al., 1990).

Dentre os compostos que apresentam atividade antioxidante de ocorrência natural destacam-se o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (provitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos, como os flavonoides e poli flavonoides (HALLIWELL, et al., 1995). Estes compostos são capazes de inibir radicais livres e outras EROs e ERNs gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre lipídeos, aminoácidos das proteínas e bases do DNA, evitando assim, a formação de lesões e perda da integridade celular (BIANCHI, ANTUNES, 1999; SOARES, 2002; VALKO, et al., 2007).

De acordo com Oliveira e colaboradores (2009) uma larga variedade de vegetais (frutas, verduras e hortaliças) e bebidas tem sido estudada em relação ao seu potencial antioxidante. Dentre essas se destacam frutas como: romã, laranja, manga morango, abacaxi,

graviola, cupuaçu, maracujá, entre outras. Entre as verduras e hortaliças merecem destaque quanto ao potencial antioxidante, couve, cenoura, cebola, alface, chuchu, batata inglesa e espinafre. Entre as bebidas, destacam-se os vinhos (branco e tinto), os chás (mate, preto, verde e branco), infusões de várias ervas e as cervejas.

Essa proteção por parte das espécies antioxidantes pode ser baseada em vários mecanismos de ação, como: (i) inibição da produção de ERO e ERN, (ii) redução da capacidade oxidativa, (iii) capacidade de quelação de metais, (iv) atividade de enzimas como antioxidante [superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR), entre outras] e (v) inibição das enzimas oxidativas (MAGALHÃES, et al., 2008).

As principais EROs e ERNs distribuem-se em dois grupos: radicalares e não-radicalares. As características de algumas das espécies reativas mais importantes são apresentadas abaixo, com destaque para o grupo das EROs devido a sua maior importância em organismos aeróbicos.

1.1 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

As principais espécies reativas de oxigênio radicalares são: ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (HO^{\bullet}), radical hidroperóxido (HO_2^{\bullet}), radical peroxila (ROO^{\bullet}) e radical alcoxila (RO^{\bullet}); e as não-radicalares: oxigênio singleto (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ozônio (O_3) e ácido hipocloroso ($HOCl$). Entre as espécies reativas de nitrogênio, incluem-se o óxido nítrico (NO^{\bullet}), dióxido de nitrogênio ($^{\bullet}NO_2$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos ($ONOO^-$) (HALLIWELL, 1996; HALLIWELL, 1997; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2000; BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006; COSTA, et al., 2008; OLIVEIRA, et al., 2009).

Enquanto algumas dessas espécies podem ser altamente reativas no organismo atacando lipídios, proteínas, DNA e carboidratos, outras são mais seletivas reagindo apenas com lipídios. Existem ainda algumas que são pouco reativas, mas podem gerar espécies muito danosas, um exemplo é o H_2O_2 que, apesar de ser isoladamente inofensivo, gera a mais danosa das EROs, o radical HO^{\bullet} (COSTA, et al., 2008).

1.1.1 Ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

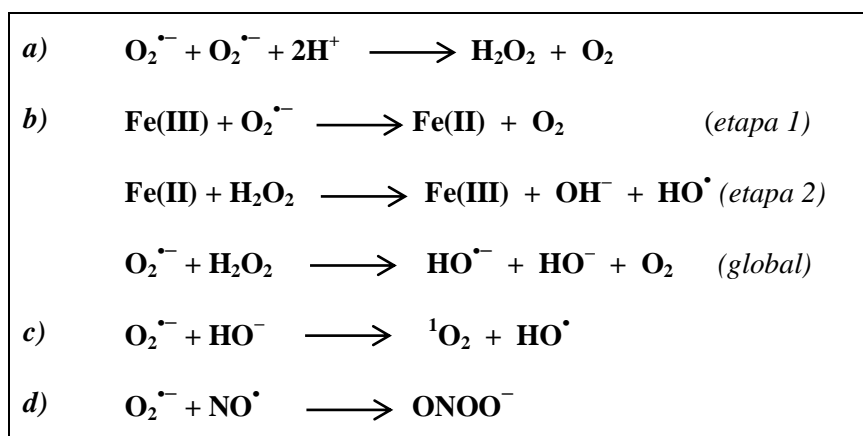
Esse radical é gerado continuamente pela cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, também através de enzimas como xantina oxidase e NADPH oxidase

e, adicionalmente, pela redução monoelétrica de O_2 molecular (VASCONCELOS, et al., 2007).

Em fagócitos, como neutrófilos e macrófagos, o ânion radical superóxido é um dos microbicidas mais importantes, capaz de inativar proteínas ferro-sulfurosas das bactérias (VASCONCELOS, et. al., 2006). Além disso, pode gerar alguns produtos que possuem forte atividade antimicrobiana, tais como ácido hipocloroso, peróxido de hidrogênio e peroxinitrito que são os principais responsáveis pelo combate a corpos estranhos. Dessa forma o $O_2^{\bullet-}$ tem importância vital para as células de defesa e sem ele o organismo estaria desprotegido contra agentes infecciosos (BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006).

O ânion radical superóxido como oxidante direto não é muito importante. Diferentemente de outras espécies reativas que oxidam aminoácidos e proteínas, apenas a cisteína sofre oxidação com esse radical dentre todos os aminoácidos (HALLIWELL, et al., 2000). Sua toxicidade deve-se principalmente a sua participação como intermediário na produção de espécies como, peróxido de hidrogênio através da dismutação (sua principal reação em meio aquoso); radical hidroxila através da reação de Haber-Weiss; oxigênio singlete e peroxinitrito (HALLIWELL, CROSS, 1994). As reações de produção de tais espécies são demonstradas na Figura 1.

Figura 1. Produção de espécies reativas a partir do ânion radical superóxido, sendo a) reação de dismutação do $O_2^{\bullet-}$; b) reação de Haber-Weiss; c) reação de formação do oxigênio singlete e d) reação de formação do peroxinitrito.



Fonte: Adaptado de VASCONCELOS, et al., 2007.

1.1.2 Radical hidroxila (HO^\bullet)

É o radical mais reativo já conhecido e, sem dúvida, o mais deletério ao organismo, pois devido a sua curta meia-vida (10^{-9} s) e alta reatividade, dificilmente pode ser sequestrado *in vivo* por um antioxidante específico. É formado no organismo, principalmente, por dois

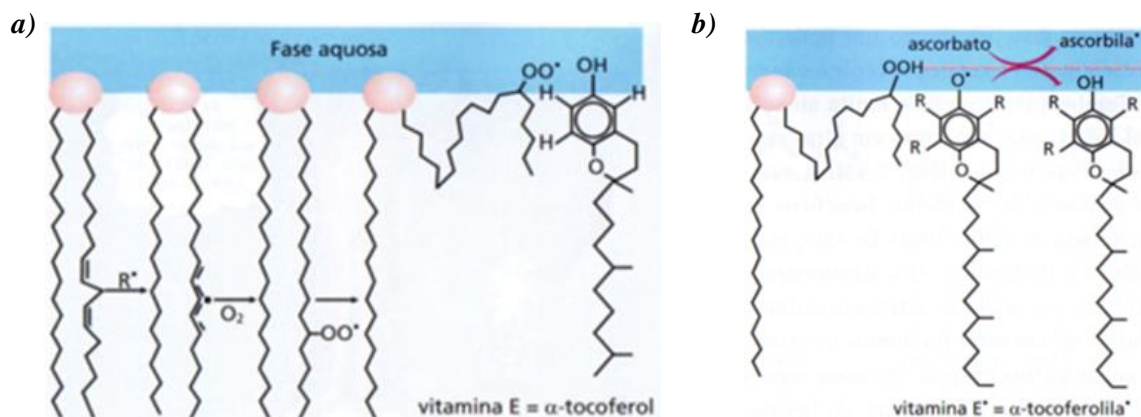
mecanismos: reação de H_2O_2 com metais de transição e a homólise da água por exposição à radiação ionizante (HALLIWELL, CROSS, 1994; RIBEIRO, et al., 2005; VASCONCELOS, et al., 2007). A exposição intensiva e frequente a este radical pode originar mutações no DNA e, conseqüentemente, levar ao desenvolvimento de câncer (BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006).

Além da agressão ao DNA, que ocorre tanto pelo ataque às bases nitrogenadas quanto à desoxirribose; ele também causa lesão ao RNA, às proteínas, aos lipídeos e às membranas nuclear e mitocondrial. O ataque às bases púricas e pirimidínicas do DNA ocorre devido à alta eletrofilicidade do radical, que possibilita sua interação por adição às insaturações dessas bases nitrogenadas, por outro lado, os danos à desoxirribose ocorrem através da abstração de um átomo de hidrogênio (BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006).

Os ataques do radical HO^\bullet aos aminoácidos das proteínas podem gerar danos como clivagens de ligações com ou sem geração de fragmentos e ligações cruzadas, o que pode causar perda da atividade enzimática, dificuldades do transporte ativo das membranas celulares, citólise e morte celular. O ataque ocorre por adição do HO^\bullet ao aminoácido ou por abstração de átomos de hidrogênio (BERGER, et al., 1999).

Em relação aos lipídeos, o ataque mais comum é aos lipídeos de membrana. O HO^\bullet ataca a cadeia lipídica em sítios susceptíveis, como o grupo metilênico alílico, convertendo-o em novo centro radicalar. Na etapa seguinte, o carbono radicalar formado reage com oxigênio gerando o radical lipídio-peroxila, o qual pode reagir com proteínas de membrana, produzindo danos celulares (BLAIR, 2001), os compostos antioxidantes podem atuar desativando o radical lipídio-peroxila gerado e impedindo lesões celulares. Um exemplo do exposto acima é mostrado na Figura 2.

Figura 2. Exemplo de: a) ação de ERs em lipídio e atuação da vitamina E como antioxidante e b) regeneração do radical α -tocoferila pelo ascorbato.



Fonte: AUGUSTO, 2006.

1.1.3 Radicais peroxila (ROO^\bullet) e alcoxila (RO^\bullet)

São formados durante a decomposição de peróxidos orgânicos e reações de carbono radicalar com oxigênio, como na peroxidação lipídica (FRANÇA, et al., 2013). Por estarem envolvidos nas reações em cadeia da oxidação lipídica são comumente encontrados em alimentos e amostras biológicas. Eles têm efeitos nocivos para a saúde e também estão associados à deterioração de alimentos (MAGALHÃES, et al., 2008).

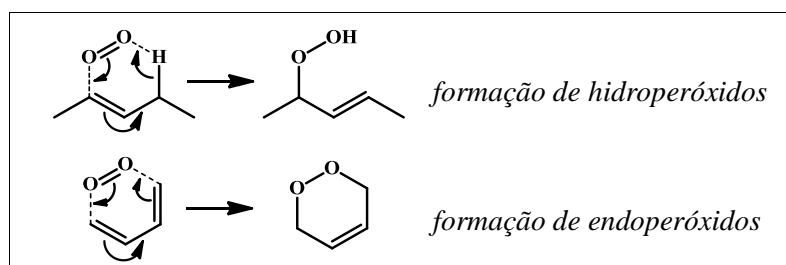
1.1.4 Oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$)

A aceitação de excesso de energia pela molécula de O_2 pode levar à formação do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), uma forma eletronicamente excitada do O_2 molecular. O oxigênio singlete é a forma mais deletéria do oxigênio molecular ao organismo, pois é a causa ou o intermediário da toxicidade fotoinduzida do O_2 em seres vivos (BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006).

O seu tempo de meia-vida depende do meio onde se encontra. Em meio aquoso, sua meia-vida é muito pequena (4 a 6 μs), pois colide com as moléculas de H_2O transferindo sua energia, desativando-se e retornando ao estado fundamental (oxigênio tripleto). Esse processo é conhecido como supressão física do $^1\text{O}_2$ e também pode ser realizado por moléculas como: carotenoides, bilirrubina, tocoferóis, fenóis e azidas (RONSEIN, et al., 2006).

Em meio orgânico, a meia-vida desta ERO é maior (100 μs), portanto pode causar algumas reações químicas com determinados aceptores por incorporação do O_2 (RONSEIN, et al., 2006). O oxigênio singlete reage com algumas classes de biomoléculas e, em geral, essas reações podem ser do tipo: adição a dienos conjugados (cicloadição do tipo Diels-Alder, 4 + 2), geralmente levando à formação de endoperóxidos; adição 1,3 a uma dupla ligação, formando hidroperóxidos (FOOT, DENNY, 1971; GREER, 2006), como apresentado na Figura 3.

Figura 3. Formação de endoperóxidos e hidroperóxidos pela ação do oxigênio singlete.



Fonte: Adaptado de BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006.

O $^1\text{O}_2$ ainda pode reagir com compostos fenólicos para formar hidroperoxidienonas (GREER, 2006); com alcenos substituídos por grupos contendo átomos de nitrogênio ou enxofre, formando 1,2-dioxetanos; e com sulfetos, formando sulfóxidos (GREER, 2006; RONSEIN, et al., 2006). Através desses mecanismos de reação, o oxigênio singlete é capaz de oxidar biomoléculas como lipídios, proteínas (e aminoácidos), ácidos nucleicos e carboidratos. Os compostos naturais mais reativos frente ao $^1\text{O}_2$ são os carotenoides, devido às múltiplas insaturações conjugadas; mas o $^1\text{O}_2$ também reage com ácidos graxos e, a cinética reacional é dependente do número de insaturações presentes nos ácidos graxos, (RONSEIN, et al., 2006; BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006).

1.1.5 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O H_2O_2 é gerado *in vivo* pela dismutação do ânion radical superóxido. Esta espécie reativa de oxigênio está presente em grande quantidade nas mitocôndrias, uma vez que grande parte do $\text{O}_2^{\cdot-}$ ali produzido é convertida em H_2O_2 pela ação da SOD. O H_2O_2 é pouco reativo frente a moléculas orgânicas na ausência de metais de transição, uma vez que tais metais catalisam a decomposição do H_2O_2 levando à formação de HO^\bullet . O peróxido de hidrogênio oxida apenas proteínas que apresentem resíduos de metionina ou grupos tiol reativos, no entanto exerce papel importante no processo do estresse oxidativo por ser difusível intra e extracelular, e ser capaz de gerar facilmente o nocivo radical hidroxila quando metais de transição (como o Fe(II)) estão presentes no meio (HALLIWELL, et al., 2000; BABIOR, 2000; VASCONCELOS, et al., 2007).

O H_2O_2 gerado *in vivo* é parcialmente eliminado por CAT, GPx, e peroxidases ligadas a tioredoxina, porém como essa eliminação não é completa grande parte do peróxido de hidrogênio é liberado para a célula (BABIOR, 2000) reagindo com proteínas ou atuando em reações químicas para produção de outras ERs.

1.1.6 Ácido hipocloroso (HClO)

O HClO é uma espécie não radicalar que possui alta permeabilidade nas membranas, sendo capaz de oxidar um grande número de compostos biológicos como, tióis, tio éteres, aminas, ácidos nucleicos, fenóis e moléculas com ligações insaturadas. Esta ERO é mais seletiva que HO^\bullet , contudo pode oxidar também Fe(II) a Fe(III) e proteínas (VASCONCELOS, et al., 2007). O HClO é formado a partir da reação do H_2O_2 com o Cl^- (catalisada pela mieloperoxidase - MPO) sendo considerado um oxidante com uma atividade microbicida

potente, mas que, também, pode lesar os tecidos circundantes contribuindo para os processos inflamatórios (BABIOR, 2000).

O ácido hipocloroso é produzido por neutrófilos e monócitos ativados, reage com $O_2^{\cdot-}$ para formar HO^{\cdot} , por isso há muito tempo lhe é reconhecido um papel fundamental no processo inflamatório. Embora a formação de $HClO$ tenha como finalidade matar os microrganismos invasores dentro do fagossoma, ele pode ser libertado para fora da célula e levar à lesão dos tecidos, contribuindo, deste modo, para a patogênese de doenças inflamatórias (GARCIA, 2010) como já mencionado.

1.1.7 Espécies reativas de nitrogênio (ERN)

O óxido nítrico (NO^{\cdot}) é uma espécie radical centrada no átomo de nitrogênio, que atua como sinalizador e age em vários processos biológicos, incluindo relaxamento muscular, neurotransmissão e vasorregulação, além de ser um potente vasodilatador, envolvido na regulação da pressão arterial (HUANG, et al., 2012; FRANÇA, et al., 2013). O Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina de 1998 foi atribuído a Ferid Murad, a Robert F. Furchgott e a Louis Ignarro pela descoberta das propriedades sinalizadoras do óxido nítrico (SANTIAGO, et al., 2000). O óxido nítrico é formado pela ação das enzimas óxido nítrico sintases (NOS), que convertem o aminoácido L-arginina a NO^{\cdot} e L-citrulina. Adicionalmente, o NO^{\cdot} pode reagir com o $O_2^{\cdot-}$ formando peroxinitrito ($ONOO^-$), o qual é instável, possuindo tempo de vida curto (da ordem de milissegundos) (RIBEIRO, et al., 2005; BARBOSA, MEDEIROS, AUGUSTO, 2006; HUANG, et al., 2012).

O peroxinitrito gerado *in vivo*, pode sofrer reações secundárias formando agentes capazes de levar à oxidação e nitração de lipídios, bases do DNA, em particular a guanina e, também de proteínas (RIBEIRO, et al, 2005; BARBOSA, MEDEIROS, AUGUSTO, 2006). Essa ERN também pode ser produzida em maiores quantidades através dos fagócitos humanos, quando estimulados (BABIOR, 2000). A formação excessiva de peroxinitrito está relacionada a várias doenças humanas, como Alzheimer, aterosclerose e câncer (BAI, et al., 2010).

Outra ERN importante é o óxido nitroso (N_2O_3), precursor do HNO_2 através da sua reação com a água. O HNO_2 tem a capacidade de promover a desaminação das bases do DNA que contêm grupo $-NH_2$ livre, que são a citosina, adenina e guanina, levando à formação de uracila, hipoxantina e xantina, respectivamente (BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006).

Para combater essas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio os organismos vivos produzem espécies que são capazes de regenerar ou prevenir os danos oxidativos, exercendo função de antioxidante. Adicionalmente, substâncias com habilidade de sequestrar radicais livres e outras espécies danosas podem ser obtidas de fontes externas, como alimentos, bebidas e suplementos (ALVES, et al., 2010). Os sistemas antioxidantes mais importantes são descritos a seguir.

1.2 Defesas antioxidantes

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos culminou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante no sistema biológico, que têm como objetivo controlar os níveis intracelulares de tais espécies reativas, além de limitar os danos decorrentes dessas espécies (FRANÇA, et al., 2013).

Os antioxidantes naturais ou sintéticos possuem estabilidade oxidativa em função de sua estrutura molecular e, por isso, desempenham papel fundamental na prevenção da oxidação resultante da ação das EROs e ERNs (BROINIZI, et al., 2008).

Os sistemas antioxidantes existem sob a forma de sistemas enzimáticos e não enzimáticos. O sistema antioxidante enzimático inclui principalmente as enzimas: superóxido dismutase (SOD), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR) e catalase (CAT). Estas enzimas são responsáveis pela remoção do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroperóxidos orgânicos e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), respectivamente (PIETTA, 2000; SILVA, et al., 2013).

O sistema antioxidante não enzimático relaciona-se com um grupo de antioxidantes que podem ser congregados em compostos produzidos *in vivo*; como a glutaciona, ubiquinona, ácido úrico; e compostos obtidos diretamente da dieta (ou suplementação) tais como o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (provitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonoides e poliflavonoides (FRANÇA, et al., 2013).

1.2.1 Antioxidantes enzimáticos

Babior (1997) descreve os três sistemas antioxidantes enzimáticos conhecidos: o primeiro é composto por dois tipos de enzimas superóxido dismutase (SOD), que catalisam a dismutação do radical ânion superóxido $O_2^{\bullet-}$, convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio. A decomposição do $O_2^{\bullet-}$ ocorre naturalmente, porém por ser uma reação de

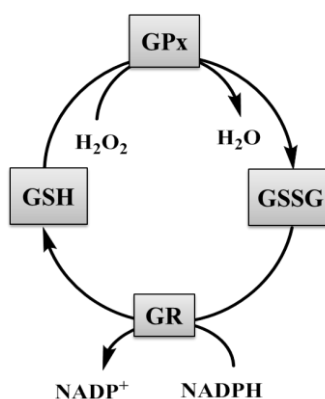
segunda ordem, necessita da colisão entre duas moléculas de $O_2^{\bullet-}$, de forma que há necessidade de maior concentração do radical ânion superóxido. Desta forma, a presença da enzima SOD favorece esse processo tornando a reação de primeira ordem, assim elimina-se a necessidade da colisão entre as moléculas, e permite-se a eliminação do $O_2^{\bullet-}$ mesmo em baixas concentrações.

Existem duas formas de SOD no organismo, a primeira contém Cu(II) e Zn(II) como centros redox e ocorre no citosol, sendo que sua atividade não é afetada pelo estresse oxidativo. A segunda contém Mn(II) como centro redox, ocorre na mitocôndria e sua atividade aumenta com o estresse oxidativo.

O segundo sistema de prevenção antioxidante é muito mais simples, sendo formado pela enzima catalase que atua na dismutação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água (BABIOR, 1997).

O terceiro sistema é composto pela glutathiona reduzida (GSH) em conjunto com duas enzimas, GPx e GR. A presença do selênio na enzima GPx (contém 4 resíduos de selenocisteína) explica a importância do Se e sua atuação como antioxidante nos organismos vivos (BABIOR, 1997; VALKO, et al., 2006). Este sistema também catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, sendo que a glutathiona opera em ciclos entre sua forma oxidada (GSSG) e sua forma reduzida (GSH). A GSH reduz o H_2O_2 a água na presença da GPx formando uma ponte dissulfeto (glutathiona oxidada) e, em seguida, a GSSG é regenerada à GSH pela ação da GR na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclometabólico da glutathiona (ROVER JÚNIOR, et al., 2001; HUBER, ALMEIDA, FÁTIMA, 2008). Uma representação do ciclo da glutathiona é mostrada na Figura 4.

Figura 4. Representação esquemática do ciclo catalítico da glutathiona, sendo: GSH (glutathiona reduzida), GPx (glutathiona peroxidase), GSSG (glutathiona oxidada) e GR (glutathiona redutase).



Fonte: Adaptado de ROVER JÚNIOR, et al., 2001; HUBER, ALMEIDA, FÁTIMA, 2008.

1.2.2 Antioxidantes não enzimáticos

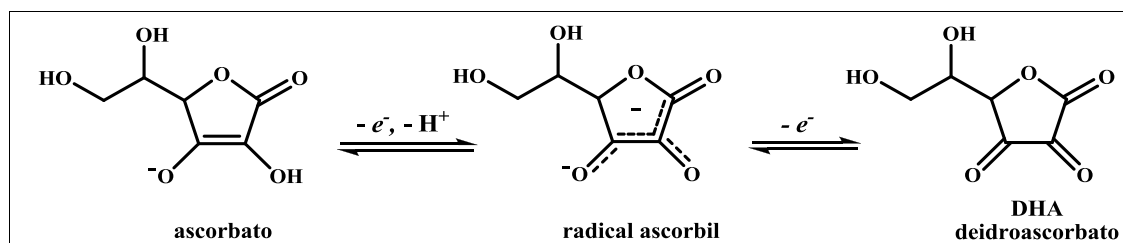
Dentre os antioxidantes biológicos de baixo peso molecular, podem ser destacados os carotenoides, bilirrubina, ubiquinona e ácido úrico. Porém, as mais importantes moléculas no combate ao estresse oxidativo são os tocoferóis, ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos (HALLIWELL, 1997; BABIOR, 1997). Os antioxidantes não enzimáticos mais importantes são discutidos abaixo.

1.2.2.1 Ácido ascórbico

O ácido ascórbico ou vitamina C é comumente encontrado em nosso organismo na forma de ascorbato (Figura 4), por ser muito solúvel em água, está localizado nos compartimentos aquosos dos tecidos. O ascorbato desempenha papel metabólico fundamental no organismo humano, atuando como agente redutor, reduzindo metais de transição (em particular Fe(III) e Cu(II)) presentes nos sítios ativos das enzimas ou nas formas livres no organismo (HALLIWELL, 1999).

Tendo em vista que o ascorbato converte as EROs e ERNs em espécies inofensivas ou de menor efeito deletério e que seus derivados (Figura 5) apresentam pouca reatividade, isso o leva a atuar como antioxidante *in vivo*. O ascorbato pode atuar contra a peroxidação de lipídios de duas maneiras: no plasma sanguíneo, de forma preventiva através da reação com as EROs e ERNs presentes, ou na restauração do substrato lipídico oxidado, doando hidrogênio ao radical gerado (HALLIWELL, 1999).

Figura 5. Mecanismo de oxidação do ascorbato.



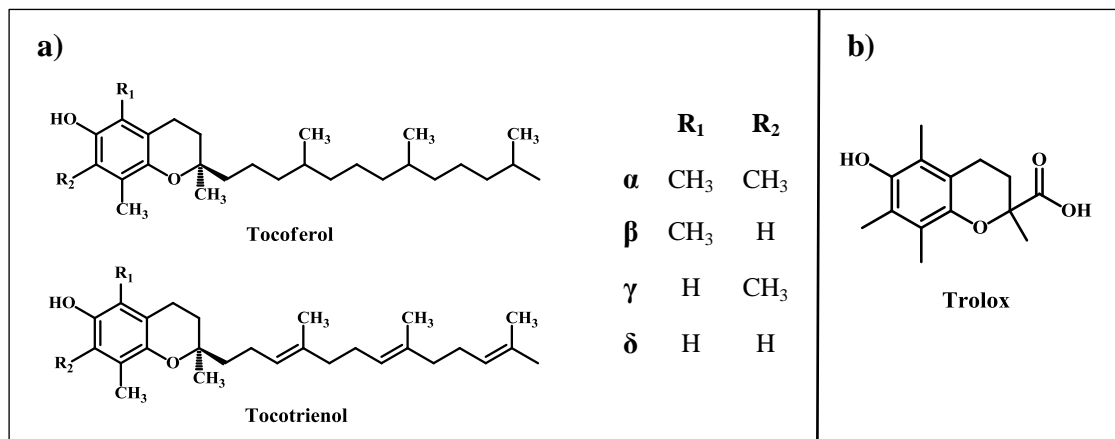
Fonte: BARBOSA, MEDEIROS, AUGUSTO, 2006.

1.2.2.2 Vitamina E

O termo genérico “vitamina E” é utilizado para representar um grupo de oito compostos de ocorrência natural estruturalmente relacionados, os α -, β -, γ - e δ - (alfa, beta, gama e delta) tocoferóis e tocotrienóis, todos de caráter lipossolúvel (THERIAUL, et al., 1999; BRAMLEY, et al., 2000). Os tocoferóis e tocotrienóis ocorrem em uma variedade de

isômeros que diferem na estrutura de acordo com o número e a localização de grupos substituintes no anel cromanol (GUINAZI, et al., 2009), como apresentado na Figura 6a.

Figura 6. a) Estruturas químicas dos constituintes da vitamina “E” e do b) trolox.



Fonte: Adaptado de GUINAZI, et al., 2009; CERQUEIRA, MEDEIROS, AUGUSTO, 2007.

A vitamina E é um eficiente inibidor da peroxidação de lipídios *in vivo*, sendo o α -tocoferol apontado como o antioxidante mais ativo (YOSHIDA, NIKI, NOGUCHI, 2003), principalmente na proteção de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (THOMAS, STOCKER, 2000; CERQUEIRA, MEDEIROS, AUGUSTO, 2007). Estas substâncias agem como doadores de átomos de hidrogênio para o radical peroxila, formado durante a oxidação de lipídeos, interrompendo a propagação da reação radicalar. Cada tocoferol pode reagir com até dois radicais peroxila e, nesse caso, o tocoferol é irreversivelmente desativado. Para que eles não se desativem, necessitam do mecanismo de regeneração sinérgico com o ascorbato (ver Figura 2b) nas membranas celulares e com a ubiquinona na membrana mitocondrial (BUETTNER, 1993).

O número de estudos envolvendo a atividade antioxidante dos tocotrienóis pode ser considerado escasso quando comparado com o número de pesquisas que envolvem os tocoferóis (YOSHIDA, NIKI, NOGUCHI, 2003), no entanto, estudos têm apontado os tocotrienóis como sendo os mais potentes na atividade antioxidante *in vitro*, mas pesquisas *in vivo* ainda devem ser melhores conduzidas para essa classe de compostos (FRANKEL, 1996; YOSHIDA, NIKI, NOGUCHI, 2003; MASUCHI, et al., 2008; GUINAZI, et al., 2009).

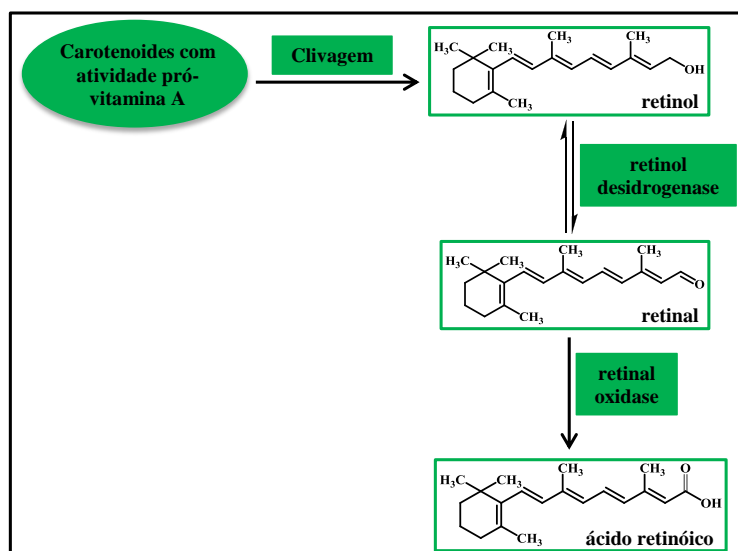
Em vários métodos analíticos para avaliação da capacidade antioxidante (C_{AO}) usa-se como padrão de calibração o trolox (Figura 5b), um derivado mais solúvel da vitamina E. Esse composto sintético é utilizado em métodos onde o antioxidante reage com a sonda, que pode ser um radical ou um complexo, e a reação de óxido-redução pode ocorrer por

transferência de elétrons e/ou transferência de prótons. Exemplos de tais métodos são o ORAC (Capacidade de absorção do oxigênio radical), o FRAP (Ensaio de poder antioxidante por redução do ferro), TEAC ou ABTS (Ensaio da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox), DPPH (Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil), entre outros (MAGALHÃES, et al., 2008).

1.2.2.3 Carotenoides

Carotenoides são isoprenóides, geralmente constituídos por oito unidades de isoprenos, formando uma longa cadeia poliênica que pode conter de 3 a 15 duplas ligações conjugadas. São amplamente distribuídos na natureza e sintetizados por plantas, algas e fungos; sendo responsáveis pela coloração de frutas (vermelha, amarela e alaranjada) e hortaliças (verde-escura) (FRASER, BRAMLEY, 2004). Alguns desses compostos têm atividade provitamina A, ou seja, após transformação bioquímica produzem retinol, retinal ou ácido retinóico (Figura 7); dentre eles, o β -caroteno é considerado a mais importante fonte para produção dessa vitamina (WOODALL, BRITTON, JACKSON, 1997).

Figura 7. Bioconversão de carotenoides em diferentes formas ativas de vitamina A.



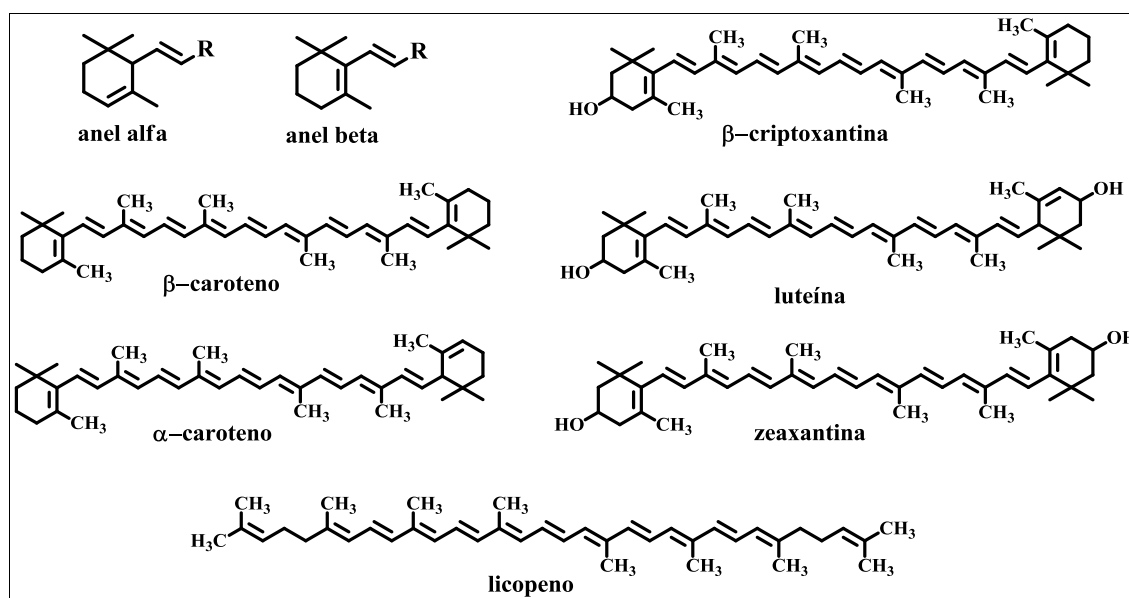
Fonte: Adaptado de PALACE, et al., 1999; AMBROSIO, CAMPOS, FARO, 2006.

A exigência mínima para que um carotenoide possua atividade pró-vitamina A é apresentar um anel- β não substituído, com uma cadeia poliênica de 11 carbonos, dessa forma, carotenoides como o α -caroteno e β -criptoxantina têm cerca de 50% da atividade do β -caroteno, ao passo que a luteína, licopeno e a zeaxantina não possuem atividade provitamina A (RODRIGUEZ-AMAYA, et al., 2008). A estrutura dos anéis β e α , bem como dos carotenoides citados são mostradas na Figura 8.

Os carotenoides agem *in vivo* como desativadores do oxigênio singlete ou como sequestradores dos radicais peroxila, reduzindo a oxidação do DNA e lipídios, os quais estão associadas a doenças degenerativas, como câncer e doenças cardíacas (PALACE, et al., 1999).

Outro aspecto importante da atividade antioxidante dos carotenoides diz respeito à polaridade. Aqueles compostos que possuem substituintes polares nos dois anéis, como zeaxantina e luteína são mais efetivos na prevenção da oxidação das membranas, pois devido à sua polaridade (um pouco maior) eles se localizam mais próximos à fase aquosa interceptando as espécies reativas em meio aquoso e na superfície das membranas (CERQUEIRA, MEDEIROS, AUGUSTO, 2007). Os carotenoides apolares, tais como o licopeno e o β -caroteno tem uma função mais regeneradora que preventiva, combatendo os radicais formados (e outras ERs) com mais eficiência no interior da bicamada lipídica (WOODALL, et al., 1997; WOODALL, BRITTON, JACKSON, 1997).

Figura 8. Estruturas químicas de alguns carotenoides importantes e dos anéis alfa e beta.



Fonte: Adaptado de EL-AGAMERY, et al., 2004; RODRIGUEZ-AMAYA, et al., 2008.

A atuação dos carotenoides como antioxidante é mais eficiente em meio hipóxico, pois em altos níveis de oxigênio sofrem auto-oxidação. Como na maioria dos tecidos biológicos o nível de oxigênio é baixo, os carotenoides têm grande importância como antioxidante (PALACE, et al., 1999). Outra característica importante é a diminuição da capacidade antioxidante desses compostos quando estão em concentrações elevadas, levando-os a atuar como pró-oxidantes, isso pode causar alterações nas propriedades das membranas,

influenciando a permeabilidade a toxinas, oxigênio e metabólitos (EL-AGAMERY, et al., 2004).

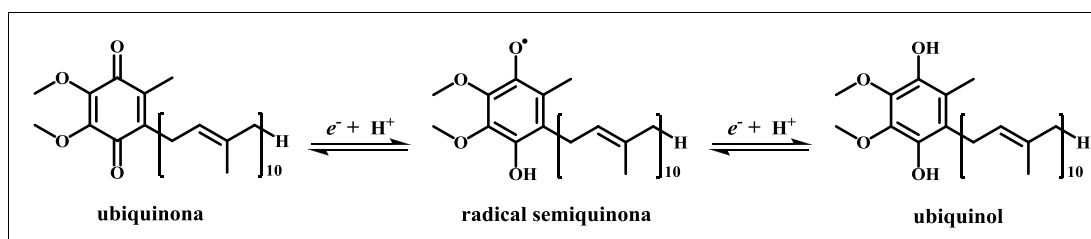
1.2.2.4 Ubiquinona ou coenzima Q

A ubiquinona ou coenzima Q (CoQ) é o único antioxidante lipossolúvel sintetizado endogenamente. Este composto está presente em todas as membranas celulares, sendo formado por um núcleo quinoide com atividade redox e uma cadeia lateral hidrofóbica constituída por unidades de trans-isoprenos. A forma predominante da ubiquinona em animais e seres humanos é a ubiquinona-10 (CoQ₁₀), contendo 10 unidades isoprenóides na cadeia lateral, e o ubiquinol (CoQH₂), resultado da redução dieletrônica da CoQ₁₀ (FREI, et al., 1990; LENINGER, NELSON, COX, 1995; BERG, TYMOCZKO, STRYER, 2012; LÖNN, DENNIS, STOCKER, 2012).

Embora de forma diferenciada e bem específica, é (bio) sintetizada por todas as células, e sua principal função biológica é a agir como componente redox de sistemas de transporte de elétrons transmembranares (FREI, et al., 1990; DALLNER, SINDELAR, 2000).

Tanto a CoQ quanto o CoQH₂ atuam como antioxidantes. Um exemplo disso constitui a desativação do O₂^{•-} que após ser gerado na mitocôndria é prontamente oxidado pela CoQ formando oxigênio e sua forma reduzida, CoQH₂ (LONN, DENNIS, STOCKER, 2012). Em outras situações, radicais livres como o radical peroxila e o radical tocoferil são desativados através da doação de um hidrogênio do ubiquinol para o radical, gerando o radical semiquinona (CoQH[•]) e um composto peroxila ou tocoferol reduzido. O prosseguimento da oxidação leva à formação da CoQ com a desativação final de duas moléculas dos radicais livres (existentes anteriormente). Dessa maneira, a CoQ possui grande poder antioxidante através do sequestro de radicais livres, bem como se mostra eficiente na interrupção de reações radicalares em cadeia (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006). O equilíbrio redox da ubiquinona é mostrado na Figura 9.

Figura 9. Equilíbrio redox da ubiquinona e suas formas reduzidas.



Fonte: Adaptado de BERG, TYMOCZKO, STRYER, 2012.

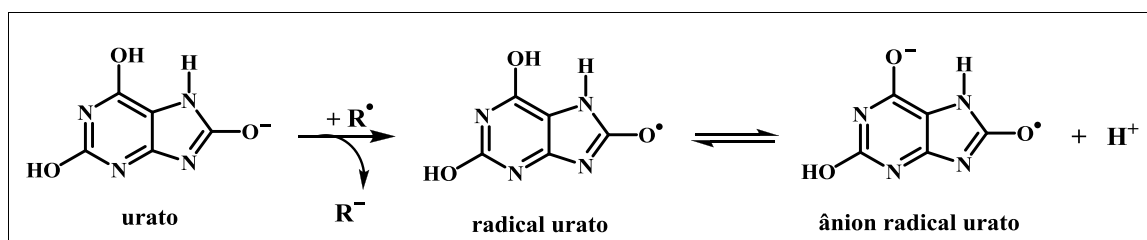
Devido sua ação como antioxidante, a CoQ inibe a oxidação de proteínas e DNA, a peroxidação lipídica em membranas celulares (DALLNER, SINDELAR, 2000), como também reduz a atividade pró-oxidante da vitamina E através da regeneração do tocoferol (BUETTNER, 1993). A cadeia lateral da ubiquinona e ubiquinol (Figura 8) também exerce função importante na atividade antioxidante desses compostos, uma vez que suas insaturações participam na redução dos níveis de oxigênio singleto $^1\text{O}_2$, tanto por desativação física colisional quanto por adição às insaturações (DALLNER, SINDELAR, 2000).

1.2.2.5 Ácido úrico

O ácido úrico é a principal forma de excreção de nitrogênio das aves e dos répteis. Nos mamíferos é produto secundário de excreção derivado das bases purínicas. Na maioria dos tecidos orgânicos encontra-se na forma de ânion urato (ALCAÍNO, et al., 2011). O urato reage rapidamente com o radical hidroxila, no entanto, é inerte às espécies superóxido, ânion radical superóxido, peróxidos orgânicos (ROOH) e peróxido de hidrogênio. Sozinho não é capaz de desativar o oxigênio singleto, porém no meio biológico causa indiretamente sua desativação através da desativação de outras espécies excitadas. Sua reação mais importante é com os radicais peroxila (ROO^\bullet) e NO_2^\bullet (gerando NO_2^-). Essa grande atividade contra os radicais peroxila constitui a base do seu efeito antioxidante para proteção do DNA e lipídios (BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006).

Como ocorre em meio aquoso, o urato reage com os radicais peroxila antes de sua penetração na membrana. O urato é capaz de recuperar estruturas já atacadas que se tornaram radicais livres através da doação de um elétron e um próton, como mostrado na Figura 10. Ele também é responsável pela estabilização do ascorbato no plasma sanguíneo, inibindo a reação de Fenton (NIETO, et al., 2000) através de sua capacidade de complexar íons metálicos como Fe(III), Fe(II), Cu(II) e Cu(I) (BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006).

Figura 10. Exemplo de reação envolvendo a atividade antioxidante do ácido úrico.



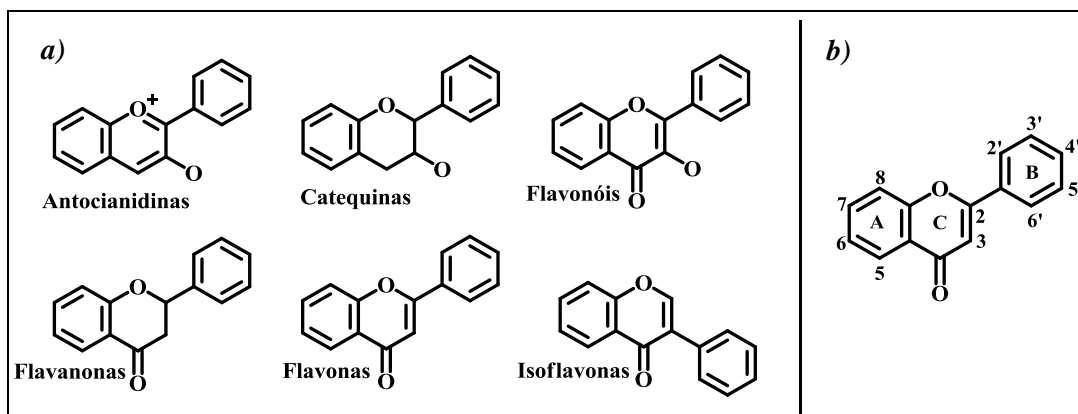
Fonte: Adaptado de BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006.

1.2.2.6 Polifenóis como antioxidantes

Os compostos fenólicos (polifenóis) são metabólitos secundários sintetizados por plantas durante o desenvolvimento normal em resposta a condições de estresse tais como infecção, fermentos, radiação UV e outros. Esses compostos formam um grupo diversificado de fitoquímicos composto por fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos, lignanas e ligninas (NACZK, SHAHIDI, 2004; SOUSA, et al., 2007).

De modo geral, os polifenóis e em particular os flavonoides possuem estrutura adequada para o sequestro de radicais, atuando como antioxidantes. A atividade antioxidante dos flavonoides (Figura 11) depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores: *i*) reatividade como agente doador de átomos de hidrogênio e elétrons, *ii*) estabilidade do radical formado, *iii*) reatividade frente a outros antioxidantes, *iv*) capacidade de complexar metais de transição e *v*) solubilidade e interação com as membranas (BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006).

Figura 11. a) Estrutura química dos principais tipos de flavonoides; b) Indicação genérica das posições possíveis de substituição por grupos hidroxila.



Fonte: Adaptado de MOLNÁR-PERL, FÜZFAL, 2005.

Para proteger membranas celulares contra o efeito do estresse oxidativo é necessário que os flavonoides possuam, no mínimo, duas hidroxilas fenólicas e quanto maior o número de hidroxilas, maior a atividade como agente doador de átomos de H. Outro fator que deve ser considerado é o potencial de redução do polifenol e da espécie reativa. O último fator importante que influencia na atividade antioxidante dos flavonoides é a sua interação com as biomembranas, pois a lipofilicidade do flavonoide possibilita sua incorporação pela membrana, que é alvo da maioria das EROs e ERNs (CAO, SOFIC, PRIOR, 1997).

O átomo de hidrogênio ativo do antioxidante é sequestrado pelos radicais livres (R^\bullet e ROO^\bullet) com maior facilidade que os hidrogênios alílicos das moléculas biológicas insaturadas. Assim, a espécie reativa torna-se inativa levando à inibição da reação em cadeia e a um

radical menos reativo procedente do antioxidante (RAMALHO, JORGE, 2006). Adicionalmente, os polifenóis podem atuar também retardando a etapa de iniciação da autoxidação, por diferentes mecanismos que incluem complexação de metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécies não radicalares, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete (ANGELO, JORGE, 2007).

Dentre os compostos fenólicos que possuem tal potencial, encontram-se compostos da classe dos ácidos fenólicos, como o ácido tânico (AT) e o ácido gálico (AG) e compostos da classe dos flavonóis, como a quercetina (QC).

A quercetina é um flavonoide capaz de inibir o processo de formação de radicais em três etapas diferentes, na iniciação (pela interação com íons superóxido), na formação de radicais hidroxila (por complexar íons de ferro) e na peroxidação lipídica (por reagir com radicais peroxil de lipídeos) (BEHLING, et al., 2004). As maiores fontes da quercetina são, vinho tinto, chá preto, cerveja, frutas (maçã, uva, morango), vegetais (cebola, couve, vagem, brócolis), grãos, nozes, sementes e especiarias. A quercetina é considerada o mais abundante flavonoide presente na dieta humana, representando *ca.* 95% do total dos flavonoides ingeridos (NIJVELDT, et al., 2001).

Em relação aos alimentos vegetais, vale salientar que os compostos fenólicos são responsáveis por muitas de suas propriedades organolépticas, como sabor, odor, cor e também estabilidade oxidativa (NACZK, SHAHIDI, 2004). Dessa forma, a presença de ácidos fenólicos está relacionada de forma direta e indireta na qualidade de bebidas como vinhos e sucos naturais. A cor, corpo e adstringência do vinho são atribuídos à presença dessas espécies. Os ácidos fenólicos nas uvas encontram-se na forma de ésteres, sendo que no processo de fabricação e conservação do vinho hidrolisam lentamente, assim podem ser encontrados como compostos livres ou combinados (CABRITA, SILVA, LAUREANO, 2003).

O AT é um tanino hidrossolúvel encontrado em vinhos tintos e também em lentilhas, uvas, chocolate, cerveja, café, chá preto e verde. Pesquisas têm demonstrado a atuação do AT como antioxidante, anticarcinogênico, agente antimicrobiano e antimutagênico. Quando presente *in vivo*, o ácido tânico pode complexar íons de cobre e ferro agindo como agente inibidor da formação de H_2O_2 e do radical hidroxila (MATTOS, 2009).

O ácido 3,4,5-triidroxibenzóico, mais conhecido como ácido gálico (AG) é um dos compostos fenólicos mais pesquisados devido ao seu potencial na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. Naturalmente, pode ser encontrado em frutas, chás, vinhos e plantas medicinais, tendo propriedades anticancerígenas, antimutagênicas, antifúngicas,

antibacterianas, antivirais e anti-inflamatórias (EGER, 2010). Esse composto tem sido usado como padrão analítico em vários métodos para determinação da capacidade antioxidante de várias amostras.

A capacidade que vários compostos antioxidantes, presentes em vegetais, possuem de proteger a saúde é de grande importância para os produtores, processadores e principalmente os consumidores (NACZK, SHAHIDI, 2004), bem como pesquisadores das áreas da biologia, medicina e nutrição (MAGALHÃES, et al., 2008). Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos eficientes, rápidos, padronizados e com mecanismo de ação definidos para a determinação desses compostos ou da sua ação (como antioxidantes) em amostras variadas. Atualmente há grande variedade desses métodos, sendo as características dos principais apresentadas a seguir.

1.3 Métodos para determinação da capacidade antioxidante total (*in vitro*)

A correlação entre o consumo de antioxidantes e a prevenção de doenças decorrentes do estresse oxidativo tem despertado o interesse do público em geral (HUANG, OU, PRIOR, 2005). Atualmente existem vários métodos para a avaliação da capacidade antioxidante (C_{AO}) de compostos químicos sintéticos e naturais. No entanto, a diversidade de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (radicalares ou não) e as diferentes formas de atuação das mesmas no organismo têm dificultado a obtenção de um método padronizado que possa quantificar a atividade/capacidade antioxidante nos diversos sistemas de interesse (ALVES, et al., 2010).

Muitas metodologias e diretrizes têm sido desenvolvidas com o objetivo de minimizar as divergências dos resultados obtidos por diferentes ensaios de avaliação da C_{AO} . Essas divergências podem ser minimizadas pelo aperfeiçoamento de métodos mais seletivos capazes de definir quais condições e quais os produtos formados e inibidos pelos antioxidantes (ALVES et al., 2010). Devido à complexidade da composição de bebidas e alimentos, há uma grande dificuldade para quantificar individualmente os compostos antioxidantes, com isso, grande parte dos métodos determina a C_{AO} total (HUANG, OU, PRIOR, 2005).

Em função da variedade de ensaios, Prior, Wu e Schaich (2005) propuseram diretrizes para padronização de métodos destinados a determinação da capacidade antioxidante total *in vitro*. Para eles, um método destinado à determinação da C_{AO} deve obedecer as seguintes exigências: (i) medidas químicas que conduzam a uma aplicação potencial, (ii) utilização de radicais de relevância biológica, (iii) simplicidade, (iv) mecanismo de ação e ponto final definidos, (v) instrumentação prontamente disponível, (vi) boa reprodutibilidade, (vii)

adaptável para antioxidantes de caráter hidrofílico e lipofílico, assim como, permitir o emprego de radicais de diferentes fontes e que (viii) apresente alta frequência analítica. Adicionalmente, devem ser considerados aspectos relativos à faixa analítica de trabalho, efeito de matriz, repetibilidade, reprodutibilidade e reconhecimento de possíveis interferentes. Desta forma, fica evidente dentre tantos fatores mencionados que um método que englobe todos estes parâmetros seria o ideal, contudo é “*quase impossível*” um método que contemple todas diretrizes citadas. Isso torna o desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação da C_{AO} um campo ainda aberto para novas contribuições.

De acordo com Magalhães e colaboradores (2008), os métodos analíticos para a determinação da capacidade antioxidante *in vitro* baseiam-se em dois princípios: (i) o princípio competitivo e (ii) não competitivo.

- (i) **Nos ensaios competitivos**, a espécie alvo (definida como um composto que representa uma biomolécula) e, portanto pode ser atacada *in vivo*, e os compostos antioxidantes competem pela espécie reativa (radical ou não radical). Nesse sistema, a avaliação da capacidade antioxidante é baseada na quantificação de um composto que permita a medição analítica baseada na alteração de alguma propriedade física (alteração da cor, por exemplo), definida como sonda. Na maioria dos ensaios competitivos, a sonda é a espécie alvo (ou a forma oxidada desta), também pode ser um composto adicionado após a reação, que permite a quantificação das moléculas-alvo ou espécies reativas restantes.
- (ii) **Nos ensaios não competitivos**, os compostos antioxidantes interagem diretamente com as espécies reativas sem que haja uma espécie alvo concorrente, e a sonda analítica para monitorar a reação é a espécie reativa (MAGALHÃES et al., 2008).

Os mecanismos reacionais dos métodos de medição da C_{AO} baseiam-se na transferência de elétrons (TE) e na transferência de átomos de hidrogênio (TAH) e em alguns casos, ocorrem as duas formas simultaneamente. A maioria dos ensaios baseados em TAH emprega a estratégia competitiva, em contrapartida, os ensaios baseados em TE normalmente são baseados na forma não competitiva (HUANG, OU, PRIOR, 2005). Contudo, ainda não há um consenso quanto aos aspectos reacionais existentes para os principais métodos de medição da C_{AO} , visto que a condição reacional pode levar a alterações dos mecanismos atuantes.

São caracterizados por apresentarem mecanismo preferencial quanto à transferência de átomos de hidrogênio os ensaios: i) capacidade de absorção de radicais de oxigênio - ORAC (do inglês “*oxygen radical absorbance capacity*”), ii) parâmetro antioxidante da captura total do radical – TRAP (do inglês “*total radical-trapping antioxidant parameter*”), iii) sequestro de radicais DPPH[•] e (iv) DMPD^{•+}. Os métodos com mecanismo baseado

preferencialmente na transferência de elétrons mais utilizados são: *i*) ensaio de poder antioxidante por redução do ferro (FRAP); *ii*) ensaio de poder antioxidante por redução do cobre (CUPRAC); *iii*) Folin-Denis e/ou Folin-Ciocalteu (geralmente utilizados para determinar a concentração de compostos fenólicos totais) e *iv*) sequestro dos radicais ABTS^{•+} (HUANG, OU, PRIOR, 2005).

Ainda não há consenso quanto ao mecanismo de reação dos métodos ABTS^{•+}, DPPH[•] e DMPD^{•+} devido à dificuldade na interpretação dos mecanismos de inibição desses radicais. Alguns autores classificam seus mecanismos como TAH, outros como TE; no entanto o que deve ser considerado é que na maioria dos casos os dois mecanismos atuam simultaneamente, pois tudo depende das condições reacionais, principalmente do solvente e do pH (KARADAG, OZCELIK, SANER, 2009). Os métodos mais utilizados para avaliação da capacidade antioxidante total *in vitro* têm suas características descritas abaixo.

1.3.1 Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC)

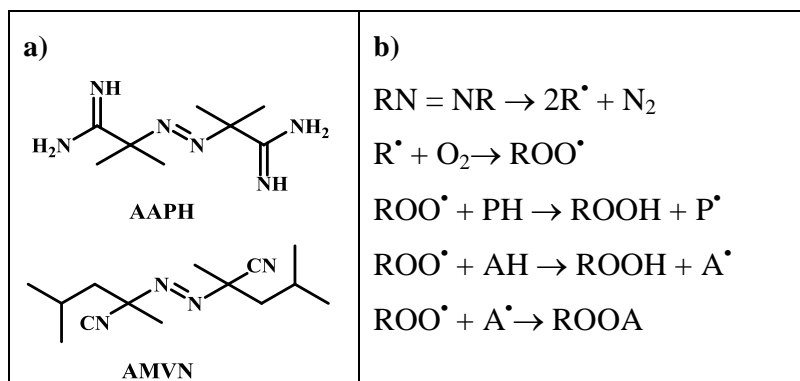
Este método é baseado na propriedade fluorescente das proteínas B-ficoeritrina (B-PE) e R-ficoeritrina (R-PE) que ao reagir com o radical peroxil, gerado pela reação do AAPH (2,2'-azobis-2-metil-propanimidamida, Figura 12a) com oxigênio atmosférico, forma um produto não fluorescente que pode ser medido por espectrofluorimetria, com máxima emissão em 575 nm (B-PE) e 578 nm (R-PE) (GLAZER, 1988). Quando o meio do ensaio é lipossolúvel, o gerador de radical peroxil mais utilizado é o AMVN (2,2'-azobis-2,4-dimetilvaleronitrilo, Figura 12a) (KRAINEV, BIGELOW, 1996).

Quando uma substância ou amostra com atividade/capacidade antioxidante é adicionada ao meio, a oxidação, induzida pelo radical peroxil, do reagente fluorescente é inibida. Assim, a atividade/capacidade antioxidante do composto ou da amostra é relacionada à taxa de redução da fluorescência e à quantidade de produto não fluorescente formado com o decorrer do tempo (ALVES, et al., 2010).

Este ensaio obedece ao princípio competitivo, sendo constituído por um sistema de três componentes: *i*) azocompostos termolábeis (RN=NR) que produzem radicais centrados no átomo de carbono (R[•]) os quais reagem rapidamente com o O₂ atmosférico para gerar radicais peroxil (ROO[•]), *ii*) o alvo oxidável (PH) e *iii*) o composto com atividade antioxidante (AH) a ser avaliado (MAGALHÃES, et al., 2008). A sequência de reações é apresentada na Figura 12b. Comumente, o Trolox (análogo hidrossolúvel da vitamina E) é empregado como

referência para construção da curva analítica do método, sendo o resultado expresso em unidades de ORAC ou equivalentes de Trolox (mg L^{-1}) (ALVES, et al., 2010).

Figura 12. Estruturas de a) AAPH e AMVN e b) esquema competitivo do ensaio ORAC.



Fonte: Adaptado de MAGALHÃES, et al., 2008.

A utilização da B-PE, como sonda espectrofluorimétrica, apresentou algumas limitações: variação da qualidade em função do lote produzido por ser um produto natural, extraído da *Porphyridium cruentum*; fotossensibilidade sob as condições de medida do sinal analítico; interação não seletiva com polifenóis e diminuição da fluorescência intrínseca, mesmo sem adição do radical gerado. Atualmente, utiliza-se como sonda a fluoresceína ou diclorofluoresceína, por serem mais estáveis superam as limitações das proteínas naturais (PRIOR, WU, SCHAICH, 2005). Além disso, os produtos da reação de radical peroxil com a fluoresceína foram caracterizados, e o padrão do produto era consistente com um mecanismo de reação transferência de átomos de H clássico. O ensaio ORAC melhorado proporciona uma medida da capacidade antioxidante em meio hidrofílico e lipofílico, desde que sejam usados sondas e solventes adequados (HUANG, OU, PRIOR, 2005).

1.3.2 Parâmetro antioxidante da captura total do radical (TRAP)

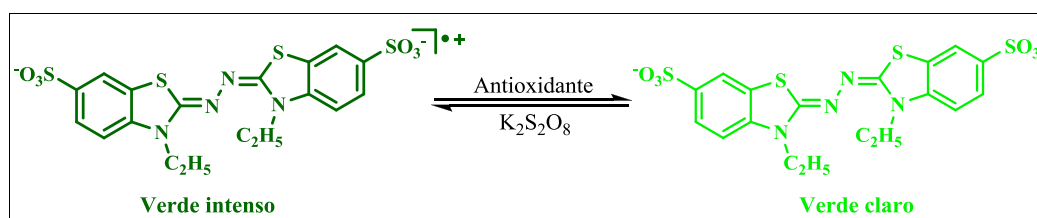
O TRAP foi o primeiro ensaio desenvolvido para determinar a C_{AO} do plasma sanguíneo. O ensaio foi introduzido por Wayner e colaboradores em 1985 e consiste na geração de radicais peroxil a partir de azocompostos (AAPH), semelhantemente ao ORAC (VASCONCELOS, et al., 2007). Os radicais peroxil gerados tem energia suficiente para abstrair um átomo de hidrogênio da sonda fluorescente R-PE, iniciando assim uma reação de oxidação. No ensaio de Wayner, o consumo de oxigênio dissolvido é o marcador da taxa de oxidação e, por conseguinte, uma medida indireta da capacidade do plasma para inibir a reação (GHISELLI, et al., 2000; VASCONCELOS, et al., 2007).

O período no qual a oxidação é inibida pelos antioxidantes plasmáticos é comparado ao do Trolox de acordo com a seguinte equação: $C_{trolox} = (X \cdot T_{trolox}) / T_{plasma}$ onde, C_{trolox} corresponde a concentração de trolox; T_{trolox} é a fase de inibição (fase *log*) do trolox; X é a capacidade antioxidante do plasma em equivalente de trolox e T_{plasma} é a fase de inibição na presença do plasma (HUANG, OU, PRIOR, 2005). O Trolox neste ensaio é usado como antioxidante de referência e quantitativamente relacionado à C_{AO} do plasma.

1.3.3 Ensaio da capacidade antioxidante equivalente ao trolox–TEAC (ABTS^{•+})

Neste ensaio, a capacidade antioxidante é mensurada pela redução do radical ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) de coloração verde intensa ($\lambda_{m\acute{a}x} = 734$ nm). O aumento da concentração do antioxidante conduz a diminuição da intensidade da cor e a avaliação quantitativa se dá espectrofotometricamente (MAGALHÃES, et al., 2009). Uma das limitações do método é que a geração do radical ABTS^{•+} é muito demorada, levando no mínimo 16 h. A Figura 13 apresenta a reação genérica deste radical.

Figura 13. Reação genérica e forma oxidada e reduzida do ABTS.



Fonte: Adaptado de HUANG, OU, PRIOR, 2005.

Este método pode ser aplicado a antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis. A inibição é estabelecida em função da concentração remanescente do radical e do tempo de inibição do mesmo. A medição é relativa a concentrações conhecidas de Trolox (referência) sob as mesmas condições da amostra avaliada. Os resultados do ensaio são expressos em equivalentes de Trolox (TEAC) (VASCONCELOS, et al., 2007).

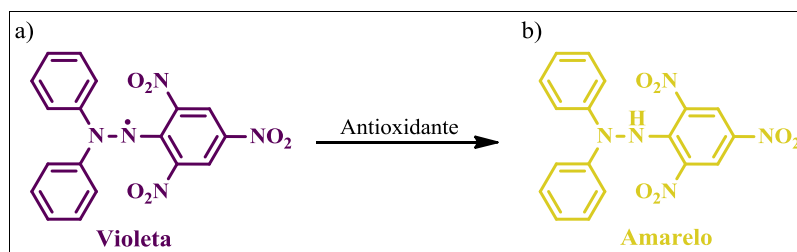
Este ensaio tem sido utilizado para a determinação da C_{AO} total em alimentos, mas as avaliações têm mostrado que a reação pode demorar um longo período de tempo para chegar ao seu ponto final, fazendo-se necessária a utilização de um tempo mais curto, antes da reação ser concluída (KARADAG, OZCELIK, SANER, 2009). Isto resulta em valores de TEAC reduzidos, comprometendo a avaliação da C_{AO} da amostra. O mecanismo referente ao método é atribuído à transferência de elétrons (0,68 V), no entanto, estudos têm mostrado que o

ensaio pode ocorrer com a transferência de átomos de hidrogênio a depender da estrutura dos antioxidantes e das condições reacionais (PRIOR, WU, SCHAICH, 2005).

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

O DPPH[•] é um radical estável devido à deslocalização de um elétron desemparelhado por toda a molécula. Essa característica lhe confere uma cor violeta (em metanol ou etanol) com absorção na região do visível ($\lambda_{\text{máx}} = 520 \text{ nm}$). A atividade antioxidante de uma substância é medida pela redução do radical DPPH[•], levando à formação da hidrazina correspondente, em função da doação de átomos de hidrogênio (ao radical). A hidrazina resultante possui uma coloração amarelo pálido, isso causa o decréscimo da absorvância em relação ao sinal da solução de referência (branco analítico, na ausência do composto antioxidante) (ALVES, et al., 2010). A Figura 14 apresenta um esquema da reação geral entre o radical DPPH[•] e um antioxidante.

Figura 14. Reação genérica do DPPH[•] (a) gerando a espécie não radicalar (b).



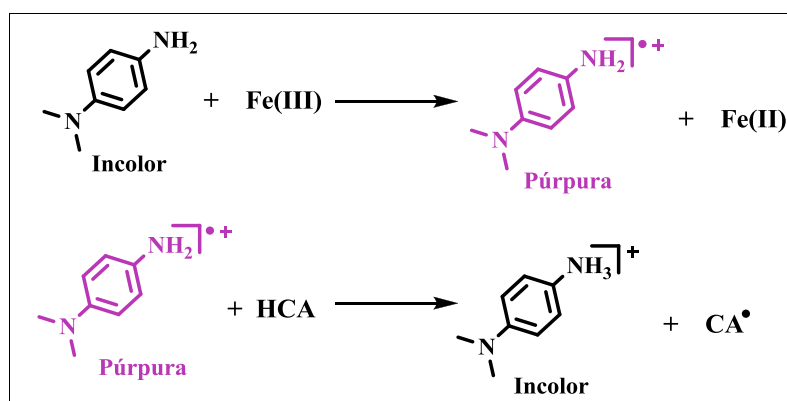
Fonte: Adaptado de HUANG, OU, PRIOR, 2005.

Este método não tem um mecanismo preferencialmente definido, ele pode ocorrer através da transferência de átomos de hidrogênio ou de elétrons, dependendo das condições reacionais do meio e da natureza e estrutura do composto antioxidante. Todavia, em meio metanólico ou etanólico existe a tendência do mecanismo TAH atuar de maneira secundária devido à formação de ligações de hidrogênio entre o solvente e o antioxidante. Nesse caso a TE é o mecanismo mais rápido e favorável (HUANG, OU, PRIOR, 2005). Muitos antioxidantes reagem rapidamente com DPPH[•], existindo uma tendência por moléculas mais hidrofóbicas do que hidrofílicas. Contudo, antioxidantes volumosos reagem lentamente, ou sequer reagem com o radical, devido ao impedimento estérico na molécula. Essa condição compromete os resultados do ensaio para a determinação da C_{AO} de amostras mais complexas (KARADAG, OZCELIK, SANER, 2009; PRIOR, WU, SCHAICH, 2005).

1.3.5 Método do DMPD^{•+}

O método do DMPD (*N,N*-dimetil-*p*-fenilenodiamina) foi proposto por Fogliano e colaboradores em 1999. Neste método a amina aromática DMPD é oxidada na presença de cloreto férrico (FeCl₃) em meio ácido (pH 5,2) e a absorvância da solução do radical DMPD^{•+} é medida em 505 nm. A atividade antioxidante da amostra é estimada pela descoloração da solução do cátion radical causada pela sua redução, a qual é proporcionada pela doação de átomos de hidrogênio pelo composto antioxidante. Nesse método o Trolox foi usado como padrão de calibração para construção da curva analítica. A Figura 15 apresenta as etapas do ensaio.

Figura 15. Formação e mecanismo de atuação do radical cátion DMPD^{•+}.

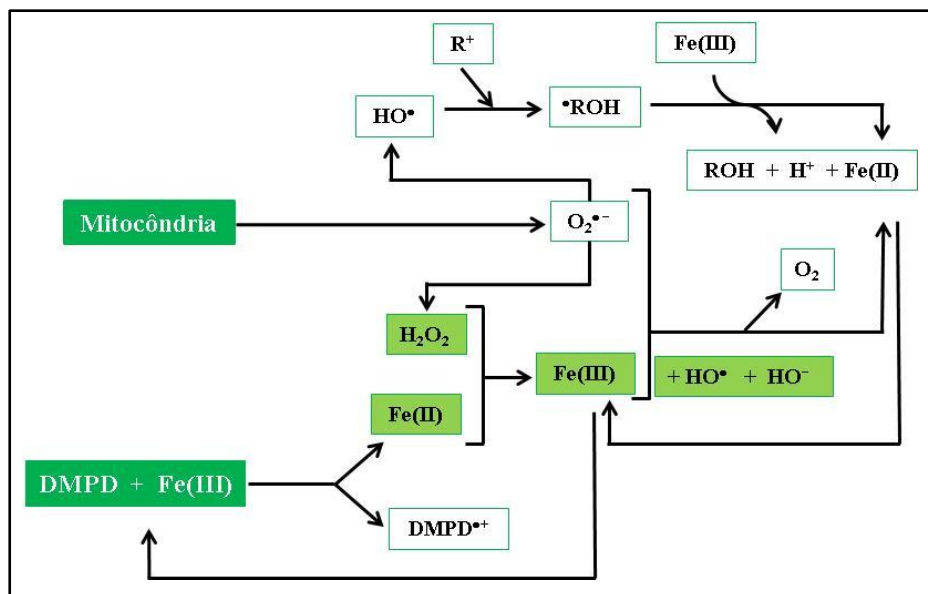


Fonte: Adaptado de FOGLIANO et al., 1999.

Métodos envolvendo o DMPD^{•+} originado a partir da reação com Fe(III) têm sido criticados na literatura, pelo fato do ferro está presente em amostras de frutos e vegetais, assim esse metal (presente nas amostras) poderia contribuir para a oxidação de DMPD (em excesso), causando assim um desvio negativo em relação aos valores reais de antioxidantes. Outro ponto relevante em relação à presença de Fe(II) em um método analítico é a dificuldade de sua aplicação em meio biológico, pois tal íon pode aumentar a produção de EROs através da reação de Fenton (KHAN, et. al., 2007), de acordo com a Figura 16.

Para evitar tais inconvenientes, Khan e colaboradores (2007) desenvolveram um método utilizando a amina DMPD para a avaliação da C_{AO} em amostras de alimentos, utilizando como agente oxidante o persulfato de potássio (K₂S₂O₈) no lugar do Fe(III). Outra vantagem desta metodologia é que ela pode ser aplicada para avaliação da capacidade antioxidante em meios hidrofílicos e lipofílicos, contudo ela ainda apresenta limitações quanto à natureza do solvente orgânico, tendo os melhores resultados em meio aquoso.

Figura 16. Possível interferência do ferro na reação do método DMPD para aplicação do ensaio *in vivo*.

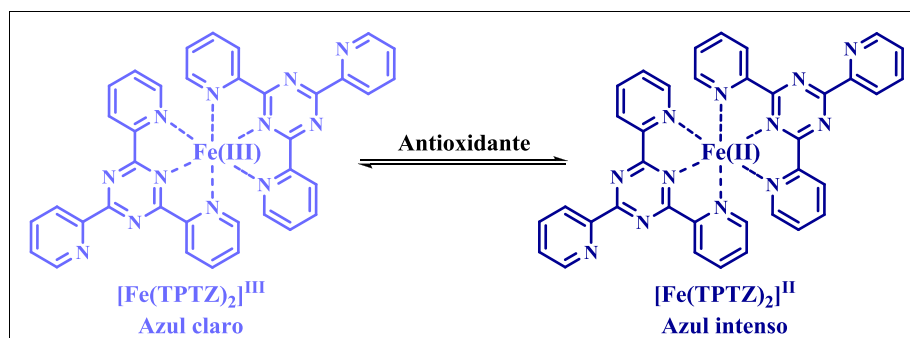


Fonte: adaptado de KHAN, et al., 2007.

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

O ensaio FRAP foi originalmente desenvolvido para medir a capacidade de redução no plasma, mas posteriormente, foi adaptado e utilizado para o ensaio de antioxidantes em extratos de plantas. O método analítico baseia-se na redução do complexo férrico 2,4,6-tripiridil-*s*-triazina (TPTZ), de $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{III}$ para $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{II}$ o qual apresenta uma coloração azul intensa (Figura 17); os valores são calculados medindo o aumento da absorvância a $\lambda_{\text{máx}} = 593 \text{ nm}$ em meio ácido (PRIOR, WU, SCHAICH, 2005; MAGALHÃES, et al., 2008).

Figura 17. Reação geral para o ensaio FRAP.



Fonte: Adaptado de HUANG, OU, PRIOR, 2005.

A reação ocorre na presença de compostos que apresentem potencial redox menor que 0,70 V. Desta forma, seria esperado que os resultados deste método tivessem uma boa

correlação com o ABTS (0,68 V). Contudo, as condições reacionais podem levar a desvios. O meio ácido do método FRAP ($\text{pH} \cong 3,60$) está relacionado à manutenção da solubilidade dos íons férricos. Além disto, reações em baixos valores de pH diminuem o grau de ionização das espécies responsáveis pela transferência de elétrons e aumentam o potencial redox, causando alteração no mecanismo dominante da reação. Desta forma, existe uma baixa relação dos resultados do FRAP com outros métodos, como o ABST, por exemplo. As medidas de absorvância são realizadas até 4 min e a variação ($A_{4\text{min}} - A_{0\text{min}}$) é relacionada à concentração do complexo de ferro(II) formado, sendo que a variação da absorvância é linearmente proporcional à concentração do antioxidante (HUANG, OU, PRIOR, 2005; PRIOR, WU, SCHAICH, 2005).

A avaliação quantitativa de amostras com grande número de compostos é comprometida pela diminuição da cinética do FRAP, principalmente quando se emprega moléculas complexas (HUANG, OU, PRIOR, 2005; RUFINO, et al., 2007). Mesmo assim, se comparado a outros ensaios de capacidade antioxidante total, o FRAP pode ser classificado como simples, rápido, robusto e de baixo custo. Além disso, pode ser utilizado em sistemas automatizados ou manuais (PRIOR, WU, SCHAICH, 2005).

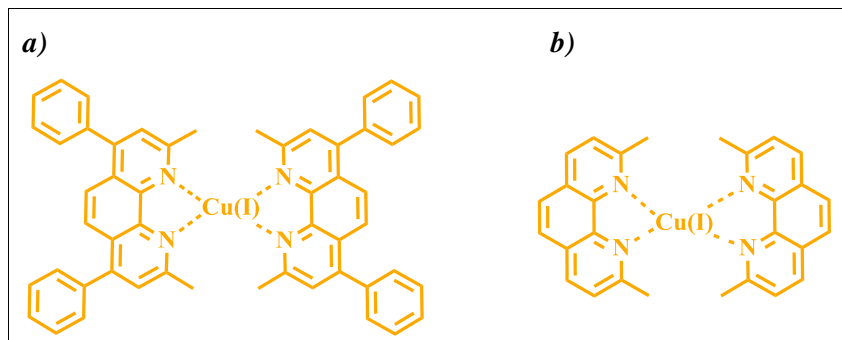
1.3.7 Ensaio de poder antioxidante por redução do cobre (CUPRAC)

Neste ensaio, inicialmente é formado um complexo entre Cu(II) com ligantes cromogênicos como a batocuproína (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina, $\lambda_{\text{max}} = 490 \text{ nm}$ – Figura 18a) ou neocuproína (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina, $\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$ – Figura 18b) na proporção de 2:1 (ligante: metal), com princípio semelhante ao método FRAP. Na presença de compostos com atividade antioxidante o íon complexado Cu(II) é reduzido a Cu(I) e a cor do complexo é alterada passando de amarelo para laranja intenso (HUANG, OU, PRIOR, 2005). Assim, a capacidade antioxidante da amostra pode ser mensurada. A Figura 18 apresenta os complexos formados com Cu(I) e os ligantes orgânicos.

O método CUPRAC foi inicialmente aplicado para avaliar o potencial de redutores importantes como polifenóis e vitaminas (C e E) em alimentos e bebidas, utilizando como ligante a neocuproína. O ensaio empregando o Cu(II) tem vantagens em relação ao método FRAP, pois a cinética de redução do complexo de cobre é mais rápida em relação à do Fe(III). Além disso, os complexos empregados no ensaio CUPRAC possuem um menor potencial de redução (0,60 V) em relação ao complexo férrico (0,70 V), acarretando em um aumento de seletividade (APAK, et al., 2004). O ácido úrico normalmente é utilizado como padrão na

curva analítica, sendo o resultado expresso em equivalentes de ácido úrico (PRIOR, WU, SCHAICH, 2005).

Figura 18. Complexos formados entre Cu(I) e (a) batocuproína e (b) neocuproína.



Fonte: Adaptado de HUANG, OU, PRIOR, 2005.

1.3.8 Fenólicos totais pelo reagente de Folin-Denis (FD)

Folin e Denis em 1912 sintetizaram, a partir de combinações de ácido fosfórico com tungstato de sódio e molibdato de sódio, um reagente que recebeu o nome dos pesquisadores. Esse reagente é capaz de reagir com ácido úrico, fenol e seus derivados formando um cromóforo azul. Para a reação, eles utilizaram 1 a 2 mL do reagente, o mesmo volume da amostra a ser testada e 3 a 10 mL de uma solução saturada de carbonato de sódio para acelerar a formação do cromóforo ($\lambda_{\text{máx}} \cong 750 \text{ nm}$).

Esse método é derivado da proposta de quantificação do ácido úrico feita por Folin e Macallum (1912) e foi aplicado por Folin e Denis (1915) para determinação de fenóis e seus derivados em amostras de urina. Atualmente, o reagente de FD é utilizado para determinação de fenóis totais em amostras de extratos de plantas, chás, infusões, vinhos, sucos de uva e própolis, (APPEL, et al., 2001; PRADO, et al., 2005; MAEDA, et al., 2005; FUNARI, FERRO, 2006; VARGAS, HOELZEL, ROSA, 2008; PEREIRA, et al., 2009), além de ter seu preparo descrito na farmacopeia brasileira (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

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

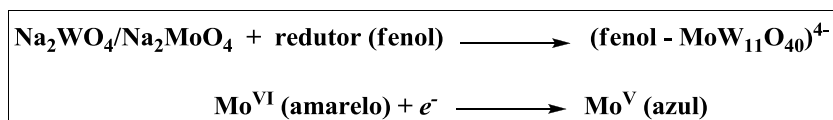
Com princípio semelhante ao método de Folin-Denis, o método de FC é baseado na oxidação de compostos fenólicos pelo reagente de FC, o qual é constituído principalmente por uma mistura de molibdato e tungstato. Ao oxidar os compostos fenólicos presentes na amostra ou na solução de referência, o reagente de FC, que apresenta coloração amarela, adquire

coloração azul ($\lambda_{\text{máx}} \cong 750 \text{ nm}$), dessa forma, a concentração de fenóis totais pode ser estimada por espectrofotometria (HUANG, OU, PRIOR, 2005).

A reação química do ensaio de FC baseia-se na transferência de elétrons de compostos fenólicos ou outras espécies redutoras para o Mo(VI) em meio alcalino (5 a 10% (m/v) em Na_2CO_3). A alcalinidade do meio causa a desprotonação dos compostos fenólicos levando a formação do íon fenolato, o qual é um redutor mais eficiente que a sua forma associada; são os íons fenolatos que reagem com o Mo(VI) reduzindo-o a Mo(V) como mostrado na Figura 19 (ROGINSKY, LISSI, 2005).

Esse método é um dos ensaios mais conhecidos e antigos para a determinação da concentração total de compostos fenólicos. É empregado principalmente na análise de extratos de plantas como etapa inicial de qualquer investigação de funcionalidade fisiológica para posterior estímulo ao consumo, com o objetivo de prevenir doenças crônico-degenerativas (ANTOLOVICH, et al., 2000).

Figura 19. Reação química genérica envolvida no método de Folin-Ciocalteu.



Fonte: PRIOR, WU, SCHAICH, 2005.

O reagente de FC possui natureza química complexa e indefinida, apesar disso o método caracteriza-se por ser simples, rápido, sensível e preciso. No entanto, em meio ácido a reação é lenta. Outra desvantagem é a baixa seletividade do método, uma vez que apresenta vários interferentes como açúcares, compostos nitrogenados, compostos de enxofre, dióxido de carbono, ácido ascórbico, ácidos orgânicos, Fe(II) e outros redutores. Para melhorar este parâmetro analítico, atualmente o método é aplicado utilizando reagentes à base do heteropoliânion molibidotungstato fosfórico, $3\text{H}_2\text{O} - \text{P}_2\text{O}_5 - 13\text{WO}_3 - 5\text{MoO}_3 - 10\text{H}_2\text{O}$ e $3\text{H}_2\text{O} - \text{P}_2\text{O}_5 - 14\text{WO}_3 - 4\text{MoO}_3 - 10\text{H}_2\text{O}$. O princípio da reação continua o mesmo, a redução do Mo(VI) para Mo(V) (PRIOR, WU, SCHAICH, 2005).

O ácido gálico geralmente é usado como padrão de calibração da curva analítica e a concentração total de compostos fenólicos é calculada como equivalentes de ácido gálico (mg L^{-1}). O método permite a utilização de outras substâncias como padrão de calibração. Ácidos fenólicos como: tânico, clorogênico, cafeico, protocatequínico, vanílico e ferúlico têm sido empregados como padrão. Contudo, essa variedade de compostos pode levar a várias ordens

de grandeza de fenóis quantificados, o que compromete a comparação de resultados com outros trabalhos reportados na literatura (KARADAG, OZCELIK, SANER, 2009).

Um grande número de amostras já foi analisado pelo método de FC e os dados obtidos foram comparados com resultados oriundos de métodos que determinam a capacidade antioxidante, como DPPH, ABTS e DMPD, apresentando boa correlação, por isso FC tornou-se um ensaio de rotina para o estudo de antioxidantes fenólicos (ROGINSKY, LISSI, 2005).

1.4 Composição química das amostras de vinhos, chás e infusões

1.4.1 Vinhos tintos e brancos

O vinho é uma das bebidas mais antigas e consumidas no mundo, existindo registros há mais de 7 mil anos no Mediterrâneo sobre suas origens. É uma das mais nobres bebidas alcoólicas com propriedades organolépticas próprias proporcionadas por sua composição química variada e complexa (MORAES, LOCATELLI, 2010). É uma bebida proveniente da fermentação alcoólica dos açúcares de suco de uva pelas leveduras e, em alguns casos, pelas bactérias lácticas. As principais substâncias que constituem o vinho são: água, açúcares, álcoois, ácidos orgânicos, sais de ácidos minerais e orgânicos, compostos fenólicos, substâncias nitrogenadas, pectinas, gomas e mucilagens, compostos voláteis e aromáticos (ésteres, aldeídos e cetonas), vitaminas, sais e anidrido sulfuroso (SOUZA et al., 2006; ALI, et al., 2010).

Os compostos fenólicos presentes no vinho são relacionados aos efeitos benéficos à saúde que o consumo moderado desta bebida pode proporcionar. Esses compostos são classificados em flavonoides como os flavonóis e as antocianinas e não flavonoides como ácidos fenólicos, benzóicos e cinâmicos, e outros derivados fenólicos como os estilbenos (CABRITA, SILVA, LAUREANO, 2003).

A presença e quantidade dos compostos fenólicos nos vinhos estão relacionadas às características ambientais sob as quais ocorre o desenvolvimento das uvas (bagos) e também à sua natureza genética. Além disso, eles se distribuem de modo desigual pelas partes do fruto, sendo encontrados nas grainhas (sementes), polpa e película (CABRITA, SILVA, LAUREANO, 2003).

Dessa forma, a composição do vinho está estreitamente ligada a procedência da uva que lhe deu origem, bem como ao processo de produção, uma vez que nesse processo ocorrem transformações químicas das estruturas componentes. A quantidade de polifenóis que um

vinho possui varia de forma considerável entre os vinhos brancos e tintos, novos e velhos. Esta variação vai desde 1000 a 4000 mg L⁻¹ no vinho tinto e entre 200 a 300 mg L⁻¹ no vinho branco. Essa grande diferença que se observa quanto ao teor em polifenóis deve-se ao fato de serem utilizados diferentes processos na produção dos vinhos brancos e tintos. Na produção do vinho tinto verifica-se um maior tempo de contato com as partes sólidas da uva (BRAVO, 1998; GUEDES, 2013).

1.4.2 Chás (*Camellia sinensis*) e infusões

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os chás são definidos como “produtos constituídos de partes vegetais, inteiras, fragmentadas ou moídas, obtidas por processos tecnológicos adequados a cada espécie, utilizados exclusivamente na preparação de bebidas alimentícias por infusão ou decocção em água potável, não podendo ter finalidades farmacoterapêuticas” (ANVISA, 1998). De acordo com essa definição pode-se considerar várias ervas para a produção de chá, no entanto, a literatura denomina **chá** apenas a bebida obtida a partir da planta *Camellia sinensis* (sendo esses: chá verde, chá branco, chá preto, chá vermelho (Pu-erh) e chá oolong), e denomina **infusão** as bebidas obtidas a partir de outras ervas, como camomila, carqueja, cidreira, hortelã, erva doce, entre outras (WEISBURGER, 1997; VINSON, DABBAGH, 1998; WANG, PROVAN, HELLIWELL, 2000).

O chá é atualmente a segunda bebida mais consumida no mundo, perdendo apenas para a água, pelo fato de ser considerada uma bebida saudável e atuar no combate e prevenção de algumas doenças (COSTA, SILVA, 2011). Essa prevenção de doenças creditada ao chá obtido a partir da *Camellia sinensis* (verde, branco, preto, vermelho (Pu-erh) e oolong) pode ser atribuída à composição química desses chás uma vez que essa bebida contém grande quantidade de compostos com ação antioxidante como os polifenóis, mais precisamente as catequinas e os flavonoides (SHARANGI, 2009;).

Por ser o menos processado de todos os chás, o **chá branco** é o que apresenta maiores concentrações de compostos fenólicos, e o mais alto poder antioxidante, sendo mais rico em catequinas; ao contrário, o **chá preto** apresenta menor concentração desses compostos (3 a 10%) devido ao processo de fermentação das folhas da *Camellia sinensis* que libera a enzima polifenol oxidase e acaba oxidando parte das catequinas presente nas folhas. O processamento do **chá verde**, apesar de ser mais agressivo que o do chá branco, consegue preservar a maior parte dos compostos fenólicos, mantendo uma concentração de 30 a 40%,

devido à desnaturação da enzima polifenol oxidase que ocorre no início do processamento (WEISBURGER, 1997; VINSON, DABBAGH, 1998; WANG, PROVAN, HELLIWELL, 2000; SHARANGI, 2009). O chá oolong e o chá vermelho possuem um tipo de processamento intermediário entre aqueles realizados para os chás verde e preto, isso faz com que eles ainda apresentem compostos antioxidantes (COSTA, SILVA, 2011).

Além de catequinas e flavonoides, os chás (verde, branco, preto, vermelho (Pu-erh) e oolong) ainda contém alcaloides como cafeína, teofilina e teobromina, óleos voláteis, polissacarídeos, aminoácidos, lipídios, vitaminas como a vitamina C e elementos inorgânicos como alumínio, flúor e manganês (SHARANGI, 2009;).

As infusões utilizadas nesse trabalho para avaliar a capacidade antioxidante foram: erva-doce, carqueja, hortelã, camomila e cidreira (capim cidreira, capim limão ou capim santo), estas infusões apresentam composições químicas diferentes, mas todas apresentam, em maior ou menor proporção, certa atividade antioxidante.

A **erva-doce** (*Foeniculum vulgare* Mill) conhecida também como funcho é uma planta usada popularmente como analgésico, digestivo, diurético, expectorante, anti-inflamatório, e antiespasmódico. As sementes da erva-doce apresentam em sua composição química triterpenos, açúcares redutores, terpenos menores (monoterpenóides, sesquiterpenóide e diterpenóides), e glicosídeos de flavanóides, responsáveis pelas potenciais propriedades antioxidantes exibidas em estudos in vitro (ARAUJO, et al., 2013).

O gênero *Baccharis*, pertencente à família Asteraceae, compreende muitas espécies denominadas popularmente de **carqueja**, a composição química desse gênero de plantas compreende diterpenos, sesquiterpenos saponinas, taninos, óleo essencial e flavonoides como eupafolina, quercetina, luteolina, nepelina, rutina, entre outros (BUDEL, DUARTE, SANTOS, 2004; DIAS, et al., 2009), apresentando uma atividade antioxidante moderada (DIAS, et al., 2009).

O gênero *Mentha* (*Lamiaceae*) compreende cerca de 30 espécies de plantas que podem ser encontradas na América do Sul e são popularmente conhecidas como **hortelã**. Em diferentes extratos de hortelã foram encontrados compostos como ácidos fenólicos, flavonóides, terpenóides e alguns compostos voláteis. O papel dos ácidos fenólicos, seus derivados e flavonóides envolve a capacidade de eliminar os radicais através de transferência eletrônica e átomos de hidrogênio (GONÇALVES, et al., 2009).

O gênero *Matricaria* apresenta um total de vinte e três espécies, sendo uma delas a *Matricaria chamomilla* L. conhecida como **camomila**. Mais de 120 metabólitos secundários já foram identificados na inflorescência da camomila germânica, incluindo 28 terpenóides, 36

flavonóides e 52 componentes adicionais, sendo a maioria de importância devido às suas propriedades biológicas. Aminoácidos, polissacarídeos e ácidos graxos de cadeia longa que compõem a mucilagem constituem aproximadamente 10% da inflorescência da camomila. Os flavonóides mais comuns são quercetina, apigenina, luteolina e patuletina. Além desses compostos, encontram-se cumarinas como umbeliferona e herniarina e ainda ácidos orgânicos derivados do ácido cinâmico (OLIVEIRA, 2012).

Cymbopogon citratus conhecido como **capim limão**, **capim cidreira** e outros nomes populares é uma erva perene que cresce formando touceiras de até 1 m ou mais de altura. A infusão de suas folhas frescas ou secas é muito utilizada na medicina popular em quase todos os continentes e abrange uma ampla gama de indicações (GOMES, NEGRELLE, 2003). Faz parte da composição química do seu óleo essencial, o citral, apresentando-se em maior quantidade nas folhas jovens. Também são descritos outros metabólitos secundários como limoneno, eugenol, β -mirceno, luteolina, os ácidos clorogênico, cafeico e p-cumárico, α -pineno, canfeno, β -pineno, mentol, metil-2-heptanona, 6-metil-5-hepten-2-ona, linalol, acetato de citronelil, acetato de neril, acetato de geranil, farnesol, mentadienol, entre outros compostos (SILVA, et al., 2010). Devido à composição química dessas amostras e da atividade antioxidante diferenciada exibida por elas as tais foram selecionadas para este estudo.

1.5 Estudo voltamétrico das aminas e radicais

A voltametria cíclica (VC) é a técnica mais comumente usada para obtenção de informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos. Do ponto de vista dos estudos mecanísticos, a voltametria cíclica representa uma das principais técnicas não espectrométricas empregadas inclusive por não eletroquímicos, especialmente devido a sua facilidade de aplicação e interpretação (PACHECO, et al., 2013).

O funcionamento da técnica de VC consiste basicamente na aplicação de uma variação de potencial linear a um eletrodo de trabalho, ocasionando reações de oxidação e redução na presença de espécies eletroativas na solução ou presentes na superfície do eletrodo. Um potencial inicial (E_{inicial}) é selecionado e varrido linearmente (varredura direta), a uma velocidade constante em função do tempo (mV s^{-1}), até se alcançar um potencial final (E_{final}) desejado. A partir daí, a direção da varredura é invertida em direção ao E_{inicial} , e o ciclo é repetido quantas vezes forem necessárias, obtendo-se como resposta a tal perturbação um

gráfico de corrente (μA) vs potencial (V), denominado voltamograma cíclico (SKOOG, 2006).

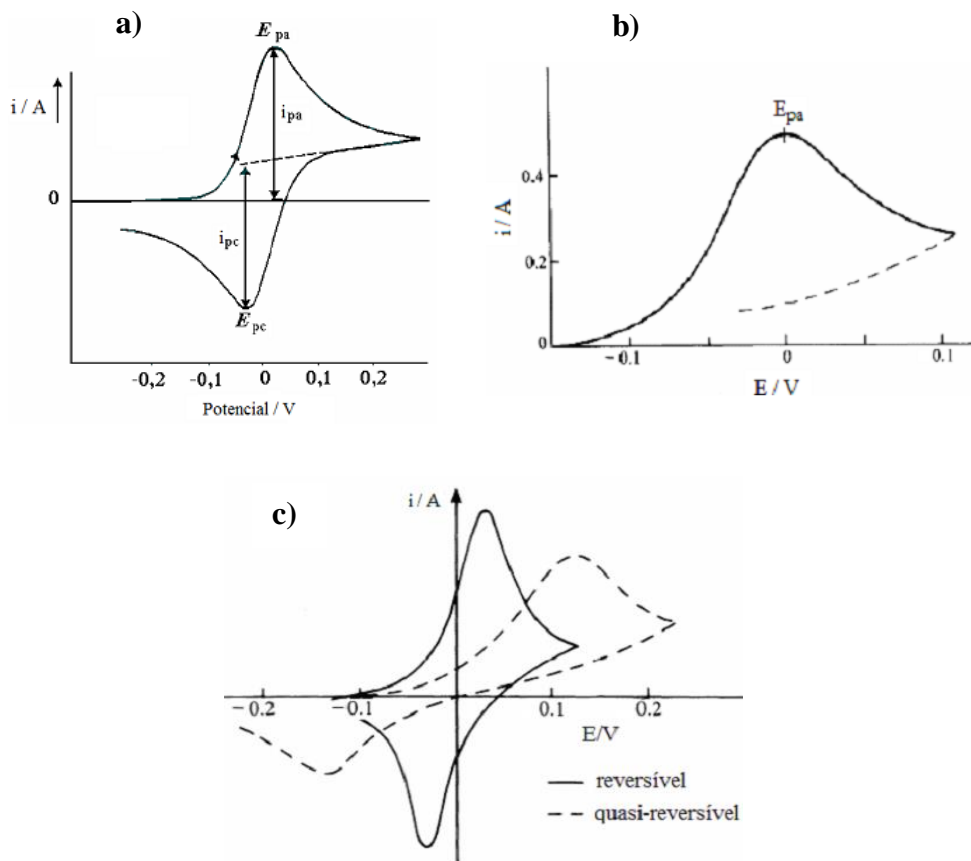
De acordo com o voltamograma cíclico visto na Figura 20a quando o potencial inicialmente aplicado é varrido para regiões mais positivas, ocorre a oxidação da espécie eletroativa em solução com conseqüente aumento da corrente, gerando assim um pico anódico de corrente proporcional à concentração do analito em estudo. Posteriormente, a corrente passa a diminuir a medida que o potencial aumenta até atingir o potencial final da varredura. Quando o E_{final} é atingido, o potencial passa a ser varrido no sentido inverso. No caso de uma reação reversível, ou seja, uma reação que é suficientemente rápida para manter as concentrações de equilíbrio dos reagentes e produtos na superfície do eletrodo, os produtos que foram gerados no sentido de varredura direta são então reduzidos na varredura inversa, gerando assim um potencial de pico catódico simétrico ao pico anódico (HARRIS, 2001).

Existem dois componentes principais que determinam as reações que podem ocorrer no eletrodo: a transferência difusional de massa do analito em solução para a superfície do eletrodo e a transferência heterogênea de carga entre o analito e o eletrodo, em alguns casos ainda pode ocorrer reações químicas acopladas a alguns destes processos. Em função desses componentes, os sistemas podem ser classificados como reversíveis, irreversíveis ou quase-reversíveis (SOUZA, 2011).

Em um sistema reversível, a velocidade da reação de transferência de carga é elevada e apenas a etapa de transferência de massa controla o processo, ou seja, essa reação ocorre com velocidade suficientemente alta para estabelecer um equilíbrio dinâmico na interface do eletrodo. Nesse tipo de sistema, as varreduras na direção catódica e anódica originam o mesmo número de picos. A Figura 20a mostra um voltamograma cíclico representativo de um sistema reversível.

Os sistemas irreversíveis são caracterizados por apresentarem corrente controlada somente pela transferência de carga. Nesse tipo de sistema, a velocidade de transferência de carga é lenta comparada com a velocidade de varredura (v), assim as concentrações das espécies oxidadas e reduzidas não serão mais funções apenas do potencial. Nesses sistemas costuma-se observar apenas o pico anódico, conforme observado na Figura 20b, o qual tende a deslocar-se com o aumento da velocidade de varredura (BRETT, BRETT, 1996).

Figura 20. Aspectos gerais dos voltamogramas cíclico a) reversíveis, b) irreversíveis e c) quase-reversíveis.



Fonte: Adaptado de SOUZA, 2011.

Em uma reação eletrodica quase-reversível, a corrente é controlada tanto pela etapa de transferência de massa como pela etapa de transferência de carga. Geralmente, nesses sistemas a reação pode ser reversível a baixas velocidades de varredura e irreversível em altas velocidades, de modo que o processo quase-reversível é observado em valores de velocidade intermediários. A Figura 20c mostra um voltamograma cíclico representativo de um sistema quase-reversível. Uma característica comum que pode ser observada nos sistemas quase-reversíveis é a separação crescente entre E_{pa} (potencial de pico anódico) e E_{pc} (potencial de pico catódico) à medida que ocorre o aumento da velocidade de varredura, ou seja, o valor de ΔE_p (diferença entre o potencial de pico anódico e de pico catódico) varia com o aumento da velocidade (BARD, FAULKNER, 2001). A Tabela 1 apresenta alguns testes diagnósticos que devem ser aplicados para classificar um determinado sistema redox.

Tabela 1. Testes diagnósticos em VC para os processos reversíveis, irreversíveis e quase-reversíveis.

Processo reversível	Processo irreversível	Processo quase-reversível
1. $ I_{pa}/I_{pc} = 1$	1. Ausência do pico reverso	1. $ I_{pa}/I_{pc} = 1$, se $\alpha = 0,5$
2. $\Delta E = 59/n$ (mV)	2. $I_{pc} \propto v^{1/2}$	2. $I_{pc} \propto v$
3. E_p independe de v	3. E_p independe de v	3. E_{pc} diminui com o aumento de v
4. I_p depende de v	4. $ E_p/E_{p2} = 48/\alpha n$ (mV)	4. $\Delta E > 59/n$ (mV) e aumenta com v .
5. $I_p \propto v^{1/2}$		

Fonte: Adaptado de SOUZA, 2011; PAIVA, 2011.

Em meio prótico (meio no qual este trabalho foi realizado) não há muitos dados eletroquímicos sobre as aminas aromáticas avaliadas, uma vez que a oxidação delas é mais estudada em meio aprótico devido a maior estabilidade do cátion radical nesse meio (SEO, et al., 1966; STÖRLE e EYER, 1991). Dessa forma, faz-se necessário um estudo mais profundo dessas aminas nesse meio. Contudo, em meio prótico pode-se inferir algumas conclusões de acordo com os dados obtidos e estudos reportados na literatura. Uma vez que se conhecendo o perfil voltamétrico das espécies, em diferentes v , é possível avaliar o tipo de mecanismo eletroquímico envolvido no processo.

1.6 Algumas aplicações de aminas aromáticas

A amina aromática DMPD tem sido largamente aplicada em Química Analítica para uma série de determinações. A partir do trabalho de Fogliano e colaboradores em 1999, muitos outros pesquisadores tem utilizado o cátion radical $DMPD^{*+}$ para determinar a C_{AO} em amostras de variados tipos de produtos alimentícios, como vegetais, cereais, sucos naturais, vinhos, chás e infusões e também em compostos puros (FOGLIANO, et al., 1999; SCALFI, et al., 2000; BORELLI, et al., 2004; FIORE, et al., 2005; KHAN, et al., 2007; CORRAL-AGUAYO, et al., 2008; BELTRÁN-OROZCO, et al., 2009; KRISHNA, et al., 2010; RODRÍGUEZ-NOGALES, VILA-CRESPO, GOMÉZ, 2011). Para geração do $DMPD^{*+}$, na maioria dos trabalhos, emprega-se Fe(III) como oxidante, isso impossibilita o uso do método na determinação do potencial antioxidante do plasma humano devido a presença desse íon metálico no plasma. No entanto outros oxidantes podem ser usados (KHAN, et. al., 2007) para esse ensaio.

Em busca de um método simples, rápido e de baixo custo capaz de medir o estado de oxidação do plasma, Verde e colaboradores em 2002 desenvolveram uma metodologia analítica utilizando como sonda o radical $DMPD^{*+}$, introduzindo uma nova aplicação analítica

para essa espécie. Nesse caso foi utilizado o poder oxidante do plasma para gerar o radical cátion DMPD^{*+} . Nesse método o peróxido de hidrogênio foi utilizado como padrão e os resultados expressos em equivalentes de H_2O_2 . Seguindo a mesma tendência Mehdi e Rizvi (2013), desenvolveram um método analítico também empregando DMPD, o método determinou, com precisão, rapidez e reprodutibilidade, a capacidade oxidante do plasma associado ao envelhecimento humano. O Fe(III) foi utilizado como padrão para obtenção da curva analítica e os resultados expressos em equivalente de Fe(III) em mol L^{-1} . Outra amina aromática que também tem sido usada com o mesmo objetivo é a DEPD (*N,N*-dietil-1,4-fenilenodiamino) (ALBERTI, et al., 2000; BUICO, et al., 2009).

Outra aplicação analítica para a amina DMPD consistiu na determinação de tiol e sulfetos a partir da geração de corantes, como os fenotiazínicos (para o sulfeto), nomeadamente o azul de metileno (KUBAN, DASGUPTA, MARX, 1992). Nesse ensaio a DMPD gera o azul de metileno na presença de Fe(III) e de sulfeto em meio ácido, e um corante a partir da adição de Michael para compostos tiólicos (LAWRENCE, DAVIS, COMPTON, 2000; LAWRENCE et al., 2000, CHAGAS, et al., 2009). O DMPD também encontra emprego na determinação catalítica de ferro, um exemplo é o trabalho apresentado por Carneiro e colaboradores (2002), que usou a DMPD para a determinação de Fe(III) em amostras de águas estuarinas.

A amina TMPD (*N,N,N',N'*-tetrametil-1,4-fenilenodiamina) é utilizada em estudos bioquímicos relacionados a cadeia respiratória mitocondrial, uma vez que a TMPD atua como doador de elétrons artificial, transferindo elétrons para o citocromo *c*, possibilitando o estudo da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas. Como esta amina pode ser facilmente oxidada pelo oxigênio, o ascorbato deve ser empregado conjuntamente com a TMPD (KUZNETSOV, GNAIGER, 2010; WIMALASEN e WIMALASEN, 1991). Apesar de não ser uma molécula natural aos sistemas biológicos, dependendo das condições compostos como a TMPD pode atuar mimetizando espécies naturais em (bio) químicos em *in vivo*.

O uso de aminas aromáticas tem-se mostrado muito versátil, tanto que algumas aminas, além de serem usadas na determinação da C_{AO} , também tem encontrado aplicação como indicador do estado oxidativo em amostras biológicas; são utilizadas também na determinação de ferro em amostras de água (CARNEIRO, et al., 2002) e na determinação de moléculas contendo enxofre (KUBAN, DASGUPTA, MARX, 1992; LAWRENCE, DAVIS, COMPTON, 2000; LAWRENCE et al., 2000) em diferentes amostras. Dessa forma, faz-se necessário um estudo comparativo entre essas e outras aminas aromáticas a fim de avaliar a

possibilidade de utilização de outras moléculas como estas na determinação da C_{AO} em bebidas e em outras amostras.

1.7 Justificativa do método proposto

Um ponto que deve ser considerado na maioria dos métodos analíticos apresentados é o “*volume*” das espécies (radicais e complexos) que são submetidas à ação dos antioxidantes. Quanto maior o volume da espécie (radical / sonda analítica) mais restrito será o acesso dos compostos antioxidantes a ela. Dessa forma, esses métodos podem apresentar limitações quando utilizados na determinação da C_{AO} em amostras complexas (como vinho), devido a dificuldades no acesso ao sítio reativo do radical (ou sonda analítica) para moléculas volumosas, como os taninos. O método aqui proposto não apresenta essa limitação, pois os radicais utilizados ($DMPD^{\bullet+}$, $DEPD^{\bullet+}$, $EHPD^{\bullet+}$ e $EHMPD^{\bullet+}$), não são volumosos como os radicais derivados do DPPH e ABTS (normalmente empregados), por exemplo.

Outra desvantagem encontrada em grande parte dos métodos existentes para determinação da C_{AO} está associada ao custo quanto à aquisição dos reagentes e padrões. Isso limita análises em larga escala e sua implementação em diferentes laboratórios de alimentos, direcionando a determinação da C_{AO} a amostras de interesse apenas científico ou comercial, como extratos de planta para o desenvolvimento de fármacos, por exemplo. Para exemplificar, segue o valor por grama de alguns reagentes e padrões comumente empregados nestes ensaios: DPPH (R\$ 418 por g), ABTS (R\$ 276 por g), Trolox (R\$ 322 por g) e ácido gálico (R\$ 0,5 por g), DEPD (R\$ 8,0 por g), DMPD (R\$ 5,0 por g), EHPD (R\$ 5,0 por g) e EHMPD (R\$ 4,0 por g) (SIGMA-ALDRICH, 2014). Considerando que para a realização de um ensaio sejam necessários 50 mg da sonda espectrofotométrica, o custo associado seria de R\$ 20,90 se a sonda for DPPH, R\$ 13,80 para o ABTS, apenas R\$ 0,40 para a DEPD e ainda um menor custo caso se empregue as outras aminas.

Para aplicações em larga escala o custo associado à implementação de um método faz diferença. Desta forma, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos que sejam eficientes, rápidos, padronizados, mas também de baixo custo para a determinação da C_{AO} em amostras variadas. Usando as aminas aromáticas DMPD, DEPD e EHPD e o ácido gálico (como padrão analítico) foi desenvolvido um método para determinação da C_{AO} de amostras de vinhos, chás e infusões. Para a amina EHMPD foi usado como padrão o trolox.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Desenvolvimento de um método analítico para determinação da capacidade antioxidante em amostras de bebidas, empregando radicais cátions derivados de aminas aromáticas como sondas espectrofotométricas. Aplicar os parâmetros químicos e físicos otimizados nesse método na avaliação da capacidade antioxidante de amostras de bebidas, avaliando os radicais cátions derivados das aminas aromáticas, nomeadamente: *N,N*-dietil-1,4-fenilenodiamino (DEPD^{•+}), *N,N*-dimetil-1,4-fenilenodiamino (DMPD^{•+}), *N*-etil-*N*-(2-hidroxi-*etil*)-1,4-fenilenodiamino (EHPD) e *N*-etil-*N*-(2-hidroxi-*etil*)-2-metil-1,4-fenilenodiamino (EHMPD), *N*-fenil-1,4-fenilenodiamina (FPD) e *N,N,N',N'*-tetrametil-1,4-fenilenodiamina (TMPD).

2.2 Específicos

- a) Avaliar as condições reacionais de geração e inibição do radical DEPD^{•+} (espécie selecionado para o processo de otimização) como sonda espectrofotométrica para medir a capacidade antioxidante em amostras de vinhos (branco e tinto), chás e infusões;
- b) Otimizar o método desenvolvido de forma univariada quanto aos parâmetros químicos e físicos: comprimento de ondas de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$), oxidante, tempo para geração do radical, efeito do contra-íon, pH e concentração da solução tampão, concentração dos reagentes (Fe(III) e DEPD), proporção Fe(III): DEPD, volumes de reagentes e amostras e tempo de inibição do radical pelo antioxidante;
- c) Avaliar a variação da sensibilidade e EC₅₀ do método DEPD frente a diferentes solventes orgânicos;
- d) Estender os parâmetros otimizados, no método DEPD, para as demais aminas aromáticas citadas nos objetivos gerais;
- e) Avaliar a capacidade de inibição e cinética de reação dos radicais gerados frente a diferentes classes de substâncias com atividade antioxidante;
- f) Empregar cálculos quânticos teóricos para avaliar as energias dos orbitais homo e luno das aminas aromáticas avaliadas;

- g) Aplicar a técnica de voltametria cíclica para obter informações eletroquímicas relativas aos potenciais (de oxidação e redução) das aminas e dos respectivos radicais derivados;
- h) Determinar as principais figuras de mérito para as aminas aromáticas avaliadas como sondas espectrométricas para determinação da capacidade antioxidante;
- i) Analisar amostras de bebidas para determinar a capacidade antioxidante através das metodologias propostas neste trabalho e dos métodos descritos na literatura;
- j) Comparar estatisticamente os resultados obtidos pelos métodos propostos com aqueles oriundos de métodos amplamente empregados na literatura, nomeadamente Folin-Denis (apenas para DEPD), Folin–Ciocalteu, DPPH e ABTS para as amostras de vinhos, chás e infusões avaliadas.

Experimental

3 EXPERIMENTAL

3.1 Preparo das soluções

Todos os reagentes utilizados são de grau analítico de pureza. Todas as soluções aquosas foram sempre preparadas com água ultrapura (condutividade $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$) obtidas a partir de purificador Millipore Millipak Gamma Gold.

Para o preparo das soluções ($2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) das aminas foram pesadas as seguintes massas: 0,0524 g de DEPD ($\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$, Sigma); 0,0418 g de DMPD ($\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2[\text{N}(\text{CH}_3)_2] \cdot 2\text{HCl}$, Sigma); 0,0474 g de TMPD ($\text{C}_6\text{H}_4[\text{N}(\text{CH}_3)_2] \cdot 2\text{HCl}$, Sigma), 0,0593 g de EHPD ($\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2\text{NC}_4\text{H}_9\text{OH} \cdot \text{H}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Sigma); 0,0585 g de EHMPD ($\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2\text{NC}_5\text{H}_{12}\text{OH} \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$, Sigma), por fim 0,0368 g de FPD ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NHC}_6\text{H}_4\text{NH}_2$, Sigma). As aminas foram solubilizadas (exceto FPD), individualmente, em solução tampão (HAc/NaAc $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ajustado para pH $4,0 \pm 0,1$), cada uma das soluções foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL completando-se o volume com o referido tampão. A amina FPD foi solubilização em etanol (Dinâmica), tendo o volume do balão ajustado com o tampão citado (sendo a concentração mínima do solvente orgânico no meio de 10% (v/v)).

Para o preparo da solução de Fe(III) ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em HCl $0,02 \text{ mol L}^{-1}$) foi pesado 0,0482 g do sal $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Merck) e solubilizado em 10,40 mL de uma solução de HCl (Vetec) a $0,97 \text{ mol L}^{-1}$. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 500 mL e o volume completado com água ultrapura.

Para o preparo das soluções (com precisão de $\pm 0,1$ unidade de pH) nos valores de pH igual a 1,0 e 2,0 empregou-se soluções de ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Para preparar soluções tampão com valores de pH iguais a 3,0; 4,0 e 5,0 foi utilizado tampão ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ (HAc)/ $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ (NaAc)) $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. De forma semelhante para valores de pH 6,0 e 7,0 foi utilizada solução tampão ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) $0,2 \text{ mol L}^{-1}$.

As soluções para avaliação do efeito do contra-íon foram preparadas a partir de sais dos respectivos íons (todos a $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), todos solubilizados em tampão (HAc/NaAc $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ajustado para pH $4,0 \pm 0,1$) como segue: cloreto foi obtido a partir do NaCl (Vetec); sulfato foi obtido a partir do Na_2SO_4 (Vetec); dihidrogenofosfato foi obtido a partir do NaH_2PO_4 (Vetec) e perclorato foi obtido a partir do KClO_4 (Vetec).

As soluções estoque (200 mg L^{-1}) dos compostos antioxidantes hidrofílicos, nomeadamente ácido ascórbico, ácido gálico (Vetec), ácido tânico (Sigma), captopril (Sigma),

glutaciona (Sigma), *L*-dopa (Sigma), *L*-cisteína (Vetec), *N*-acetil-*L*-cisteína (Sigma), penicilamina (Sigma), e sulfito de sódio (Vetec) foram preparadas a partir das massas correspondentes a cada composto, sendo estas solubilizadas em tampão (HAc/NaAc 0,2 mol L⁻¹ ajustado para pH 4,0±0,1) e transferidas para um balão volumétrico de 50 mL; sendo o volume final foi completado com a solução tampão citada anteriormente. As soluções de trabalhos foram diluídas de forma apropriada empregando solução tampão.

Para o preparo das soluções estoque (200 mg L⁻¹) dos compostos antioxidantes com maior caráter lipofílico nomeadamente, (i) ácido clorogênico (Sigma) , (ii) *N*-propilgalato (Sigma), (iii) ácido cafeico (Sigma), (iv) trolox (Sigma), (v) kaempferol (Sigma) e (vi) rutina (Sigma) foi pesada uma massa correspondente a cada composto, a qual foi solubilizada em 5,0 mL de etanol (*compostos i e ii*); 4,0 mL de etanol (*compostos iii e iv*); 15 mL de etanol (*composto v*) e 5,0 mL de metanol (*composto vi*). A solução estoque de *N*-propilgalato, para a reação com a sonda EHMPD^{•+} exclusivamente, foi preparada a partir da solubilização da massa do soluto em 1,0 mL de acetonitrila. Por fim, a solução resultante foi adicionada a um balão volumétrico de 50 mL, o volume final do balão foi completado com solução tampão (HAc/NaAc 0,2 mol L⁻¹ ajustado para pH 4,0±0,1). As soluções de trabalhos foram diluídas de forma apropriada empregando a mesma solução tampão.

A solução estoque (200 mg L⁻¹) de quercetina (Sigma) foi prepara a partir de 0,0100 g do composto solubilizado em etanol. A solução resultante foi adicionada a um balão volumétrico de 50 mL, o volume final do balão foi completado com etanol. As soluções de trabalhos foram diluídas de forma apropriada empregando solução tampão.

Para os estudos eletroquímicos dos radicais, a solução do cátion radical correspondente a cada amina foi preparada adicionando-se a um tubo falcon 2,5 mL da amina (2,0x10⁻³ mol L⁻¹) e 2,5 mL de uma solução de persulfato de potássio (Merck), K₂S₂O₈ (2,0x10⁻⁴ mol L⁻¹). Após 20 min do início da mistura dos reagentes as medidas eletroquímicas foram realizadas.

O reagente de Folin-Ciocalteu (Vetec) foi obtido comercialmente. O mesmo, antes do uso, foi diluído em água ultrapura na proporção de 1:9 (v/v) (VARGAS *et al.*, 2008). Para o preparo da solução de carbonato de sódio (75 g L⁻¹) foram pesados 7,5 g de Na₂CO₃ (Reagen Quimibrás) e solubilizado em água. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água ultrapura.

Para o preparo da solução do radical DPPH[•] (Sigma) foi pesado 0,0120 g e solubilizado em metanol. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de

50 mL e o volume completado com álcool metílico. A concentração final da solução foi de $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ (SHARMA, BHAT, 2009).

A solução estoque do radical derivado do ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS, 5 mmol L^{-1}) foi preparada pela dissolução de 0,0260 g de ABTS (Sigma) em água ultrapura; em seguida foi acrescentada à solução resultante 3,0 mL de uma solução de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Merck) a 5 mmol L^{-1} . O conteúdo foi adicionado a um balão volumétrico de 10 mL, o qual teve seu volume completado pela adição de água ultrapura. Após 16 h de incubação ao abrigo da luz, a solução foi diluída para 25 mL com tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ com pH ajustado para $7,2 \pm 0,1$ (ARTS *et. al.*, 2004).

As amostras de vinhos (brancos e tintos), chás e infusões analisadas foram adquiridas no comércio local. As amostras de vinhos, antes de serem analisadas, foram apenas diluídas em tampão (HAc/NaAc $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ajustado para pH $4,0 \pm 0,1$). As amostras de chás e infusões foram preparadas como determinado em suas embalagens. Após abertas (vinhos) ou preparadas (chá e infusões), as amostras foram acondicionadas em refrigerador a 4°C por um período máximo de 96 horas.

3.2 Equipamentos e softwares utilizados

Para as medidas espectrofotométricas foram empregados espectrofotômetro Femto (Brasil) de três modelos diferentes, nomeadamente Femto 600, Femto 600S e Femto 700 plus, cada equipamento foi utilizado de acordo com a disponibilidade. O espectrofotômetro foi equipado com cubetas de vidro com 1,0 cm de caminho óptico.

Para as medidas de pH foi utilizado um medidor de pH Marte (MB-10, Brasil) com incerteza de $\pm 0,01$ acoplado a um eletrodo combinado de vidro.

Para as medidas de massas ($\geq 10 \text{ mg}$) dos reagentes e padrões visando o preparo de soluções foi empregada uma balança analítica Bel com precisão de 0,1 mg e para as medidas de massas ($< 10 \text{ mg}$) foi empregada uma balança analítica Mettler Toledo-AG245 com precisão de 0,01 mg.

Os estudos eletroquímicos de todas as aminas foram realizados em um potenciostato Autolab PGSTAT 20 (Metrohm Penslab, Brasil), interfaceado a um microcomputador, e o posterior tratamento dos dados com o auxílio do programa Origin[®] 8.0 (OriginLab Corporation, Inglaterra). Os estudos voltamétricos foram realizados em sistema de três eletrodos em cela de vidro (5,0 mL): eletrodo de trabalho de carbono vítreo (Microquímica, \varnothing

= 3 mm), eletrodo auxiliar fio de platina (Pt) e Ag|AgCl, Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹) como eletrodo de referência.

Para a realização dos cálculos teóricos foi utilizado microcomputador com sistema operacional Windows[®] 7 e processador Intel Core[®] i3. Os programas utilizados para desenhar as estruturas e calcular a mecânica molecular foram ChemDraw e Chem3D pertencentes ao pacote ChemOffice[®] (CHEMOFFICE, 2006). Após a realização dos cálculos da mecânica molecular, os arquivos de saída foram utilizados para os cálculos da mecânica quântica utilizando o software HyperChem (HYPERCUBE[®], 2002) através do método semi-empírico com a base AM1 (Austin Model 1). A obtenção dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO, bem como a representação dos mapas de potencial eletrostático foram obtidos fazendo-se uso do software Spartan (SPARTAN[®], 2002).

3.3 Procedimentos

3.3.1 Avaliação do tempo de reação entre os radicais e os antioxidantes

Para avaliar a cinética da reação entre os antioxidantes e os radicais procedeu-se como segue: inicialmente foi avaliada a faixa linear de trabalho, considerando um tempo de reação de 30 min entre o radical e o antioxidante; assim obtiveram-se as concentrações que apresentavam resposta linear em relação ao sinal analítico.

Em seguida, foi selecionado o ponto (concentração) mais central dessa faixa linear e realizou-se o estudo cinético. Para isso foram adicionados a um balão volumétrico de 5,0 mL uma alíquota de 1,0 mL da solução da amina ($2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) e 1,0 mL da solução de Fe(III) ($2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em HCl 0,02 mol L⁻¹), essa solução foi mantida em repouso por 5 min para os radicais DMPD^{•+} e EHPD^{•+}, 6 min para o EHMPD^{•+}, 7 min para TMPD^{•+} e 10 min para o radical DEPD^{•+}. Após esse tempo foram adicionados 2,5 mL da solução do antioxidante diluída em tampão (HAc/NaAc 0,2 mol L⁻¹ ajustado para pH 4,0±0,1). O volume final da solução foi ajustado para 5,0 mL com o mesmo tampão.

Em seguida procederam-se as medidas espectrofotométricas em 510 nm (DMPD^{•+}, EHPD^{•+}, EHMPD^{•+}), 500 nm (DEPD^{•+}) e 550 nm (TMPD^{•+}). Essas medidas iniciaram-se 1 min após a adição do antioxidante e foram finalizadas quando o valor de inibição não apresentou variação significativa. O tempo no qual se observou a máxima inibição foi selecionado para os estudos posteriores.

3.3.2 Método proposto (DMPD^{•+}, DEPD^{•+}, EHPD^{•+}, EHMPD^{•+})

O método proposto apresenta semelhanças quanto à aplicabilidade para todos os cátions radicais empregados, dessa forma todos serão abordados na mesma descrição.

Para execução do ensaio, foram adicionados a um balão volumétrico de 5,0 mL uma alíquota de 1,0 mL da solução da amina ($2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e 1,0 mL da solução de Fe(III) ($2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em HCl $0,02 \text{ mol L}^{-1}$). Para geração do radical se aguardou 5 min para DMPD^{•+} e EHPD^{•+}, 6 min para EHMPD^{•+} e 10 min DEPD^{•+}. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL da amostra ou solução de referência diluída em tampão (HAc/NaAc $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ajustado para pH $4,0 \pm 0,1$). O volume final da solução foi ajustado para 5,0 mL com o mesmo tampão. Após o tempo de reação entre o radical e o antioxidante/amostra, o qual estabelecido em 60 min para DMPD^{•+} e 30 min para os demais radicais. As medidas espectrofotométricas foram realizadas em 510 nm (DMPD^{•+}, EHPD^{•+}, EHMPD^{•+}) e 500 nm (DEPD^{•+}) utilizando cubetas de vidro com 1,0 cm de caminho óptico.

O sinal analítico de referência (branco) foi obtido a partir do procedimento descrito anteriormente onde a alíquota da amostra foi substituída pela solução tampão. Para construção da curva analítica o ácido gálico foi empregado como referência para todos os radicais; exceto EHMPD^{•+}, o qual teve como padrão o trolox; a partir dos dados da curva, a capacidade antioxidante da amostra foi estimada, assim como outros parâmetros analíticos.

3.3.3 Método de Folin-Denis

O reagente de Folin-Denis foi preparado pesando-se 10,0 g de Na₂WO₄·2H₂O (Merck), 0,25 g de H₃MoO₄ (Merck) e acrescentado-se 5,0 mL de H₃PO₄ (Vetec) concentrado em um balão de fundo redondo de 250 mL. A essa mistura adicionou-se 100 mL de água ultrapura e o sistema foi colocado em refluxo a 110 °C por 2 horas. Em seguida, retirou-se o balão do sistema de aquecimento, deixando-o atingir a temperatura ambiente, o volume final foi ajustado para 200 mL com adição de água ultrapura (FOLIN, DENIS, 1915; FOLIN, CIOCALTEU, 1927).

Para realização do ensaio, foram adicionados, a um balão volumétrico de 5,0 mL, 500 µL do reagente de Folin–Denis, 2,0 mL da amostra ou solução de referência e 500 µL de Na₂CO₃ (75 g L^{-1}). O volume final de 5,0 mL foi completado com água ultrapura e após 15 minutos foram realizadas as medidas espectrofotométricas em 770 nm. O sinal analítico de referência (branco) foi obtido a partir de uma solução semelhante à anterior, onde o mesmo volume de amostra foi substituído por água. Ácido gálico foi empregado como padrão para

obtenção da curva analítica e, a partir dos dados da curva, a concentração total de compostos fenólicos na amostra foi calculada, expressos em equivalentes (mg L^{-1}) de ácido gálico.

3.3.4 Método de Folin-Ciocalteu

Em um balão volumétrico de 5,0 mL foram inseridos, 500 μL do reagente de Folin–Ciocalteu previamente diluído (1:9, v/v), 2,0 mL da amostra ou solução de referência e 500 μL da solução de Na_2CO_3 (75 g L^{-1}). O volume final de 5,0 mL foi completado com água ultrapura, após 30 min procederam-se as medidas espectrofotométricas em 770 nm utilizando cubetas de vidro com 1,0 cm de caminho óptico. O sinal analítico de referência (branco) foi obtido a partir de uma solução semelhante à anterior, onde o mesmo volume de amostra foi substituído por água. Ácido gálico foi empregado como padrão para obtenção da curva analítica e, a partir dos dados da curva, a concentração total de compostos fenólicos na amostra foi calculada, expressos em equivalentes (mg L^{-1}) de ácido gálico.

3.3.5 Ensaio do sequestro do radical DPPH $^{\bullet}$

Em um tubo falcon de 10 mL foram adicionados 200 μL da solução do radical DPPH $^{\bullet}$ ($600 \mu\text{mol L}^{-1}$), 1,0 mL da amostra previamente diluída ou solução de referência e 2,80 mL de água ultrapura, totalizando um volume final de 4,0 mL. Após 30 min procederam-se as medidas espectrofotométricas em 517 nm utilizando cubetas de vidro de 1,0 cm de caminho óptico. O sinal de referência foi obtido a partir de uma solução semelhante a anterior, onde o mesmo volume de amostra foi substituído por água. Para construção da curva analítica o ácido gálico foi empregado como padrão e, a partir dos dados da curva, a capacidade antioxidante da amostra foi estimada, tendo seus resultados expressos em equivalentes (mg L^{-1}) de ácido gálico.

3.3.6 Ensaio do sequestro do radical ABTS $^{\bullet+}$

Para o método empregando o radical ABTS $^{\bullet+}$ procedeu-se de forma similar ao DPPH $^{\bullet}$: Em um tubo falcon de 10 mL adicionou-se 220 μL da solução estoque do radical ABTS $^{\bullet+}$ (2 mmol L^{-1}), 1,0 mL da solução padrão ou da amostra previamente diluída e aferiu-se com água até 5,0 mL. Aguardou-se 15 min após a mistura dos reagentes e procederam-se as medidas espectrofotométricas em 734 nm empregando-se cubetas de vidro com 1,0 cm de caminho óptico. O sinal de referência foi obtido a partir de uma solução semelhante a anterior, onde o mesmo volume de amostra foi substituído por água. Para construção da curva analítica

o ácido gálico foi empregado como padrão e, a partir dos dados da curva, a capacidade antioxidante da amostra foi estimada, tendo seus resultados expressos em equivalentes (mg L^{-1}) de ácido gálico.

3.3.7 Avaliação do efeito do contra-íon

Para a avaliação do efeito do contra-íon sobre a estabilidade do radical $\text{DEPD}^{\bullet+}$ formado foi utilizado um balão de 5,0 mL, no qual foi adicionado 1,0 mL da solução da amina DEPD ($2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$); 1,0 mL da solução de Fe(III) ($2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em HCl $0,02 \text{ mol L}^{-1}$); 2,5 mL de tampão (HAc/NaAc $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ajustado para $\text{pH } 4,0 \pm 0,1$) e 0,5 mL da solução dos contra-íons analisados, a saber Cl^- , SO_4^{2-} , ClO_4^- , H_2PO_4^- todas a $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida foram realizadas as medidas espectrofométricas por um período de 10 a 180 min. O sinal analítico de referência (branco) foi obtido a partir de uma solução semelhante à anterior, onde o mesmo volume da solução do contra-íon foi substituído pelo tampão acima citado.

3.3.8 Estudos eletroquímicos

Os estudos eletroquímicos em meio prótico foram realizados tendo como eletrólito suporte solução tampão HAc/NaAc $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ajustado para $\text{pH } 4,0 \pm 0,1$. Os estudos eletroquímicos foram conduzidos utilizando a técnica de voltametria cíclica. As medidas foram realizadas usando 5,0 mL da solução da amina correspondente ($2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão. A eliminação de oxigênio dissolvido foi realizada pelo borbulhamento de um fluxo constante de nitrogênio ($\text{N}_{2(\text{g})}$) nas soluções durante as análises. O nitrogênio foi necessário para evitar a oxidação da amina pelo oxigênio atmosférico.

As medidas voltamétricas foram realizadas em diferentes velocidades, a saber: 35, 75, 100, 500 e 1000 mVs^{-1} . A fim de garantir a estabilidade dos compostos e respectivos radicais durante o tempo de estudo voltamétrico, realizaram-se duas medidas em voltametria cíclica ($v = 100 \text{ mV s}^{-1}$), sendo uma no começo e outra ao final do experimento para verificar se os potenciais de pico catódico e anódico assim como as feições das curvas voltamétricas sofreriam modificações entre o início e fim do experimento.

3.3.9 Limpeza do eletrodo de carbono vítreo (ECV)

O ECV foi polido com alumina em diferentes granulações ($\phi = 0,3, 0,5$ e $1,0 \mu\text{m}$), lavado com água ultrapura, levado ao ultrassom por 2–3 min em etanol e lavado novamente com água destilada. A limpeza do eletrodo foi verificada por voltametria cíclica, utilizando

uma sonda eletroquímica bem conhecida, o ferrocianeto de potássio, $K_3[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} em KCl $0,05$ mol L^{-1} , um sistema reversível, em potenciais estabelecidos. Em seguida, o ECV foi lavado com água ultrapura e seco a temperatura ambiente.

3.3.10 Cálculos teóricos

Para a obtenção dos descritores físico-químicos foram realizados os seguintes procedimentos:

- i.* Desenho das estruturas: as estruturas dos compostos foram desenhadas fazendo-se uso do software ChemDraw contido no pacote de programas do ChemOffice® (CHEMOFFICE, 2006).
- ii.* Cálculos da mecânica molecular: as estruturas desenhadas, na etapa (i) foram disponibilizadas no programa Chem3D pertencente ao pacote de programas do ChemOffice®. Nesse software realizou-se a pré-otimização dos compostos, através de cálculos da mecânica molecular, para obtenção de parâmetros moleculares como comprimento de ligação, ângulos de ligação e ângulos diedros.
- iii.* Cálculos da mecânica quântica: após a realização dos cálculos da mecânica molecular, os arquivos de saída foram utilizados para os cálculos de mecânica quântica. Para o cálculo dos descritores físico-químicos mecânico-quânticos, foi utilizado o software HyperChem (HYPERCUBE®, 2002) que faz uso de equações da mecânica quântica, através do método semi-empírico, com a base AM1 (Austin Model 1).
- iv.* Obtenção dos mapas de energia e eletrônicos: a obtenção dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO bem como a representação dos mapas de potencial eletrostático foram obtidos fazendo-se uso do software Spartan (SPARTAN®, 2002).

3.3.11 Preparo das amostras

As amostras de chá e infusões foram preparadas, a partir da extração de seus compostos por infusão, visando reproduzir o método de preparo determinado em suas embalagens, a saber: cada sachê (de chá ou infusão) foi colocado em um erlenmeyer de 250 mL, em seguida adicionou-se 100 mL de água aquecida (~ 95 °C). Após 10 min do início do processo físico de extração, o sachê foi retirado da mistura. Quando a mistura atingiu a temperatura ambiente, procedeu-se a filtração. O filtrado foi acondicionado em frascos de vidro âmbar e o resíduo foi descartado. As amostras de vinho foram apenas diluídas antes da análise.

3.3.12 Tratamento estatístico dos dados

Para otimização de alguns parâmetros analíticos foi empregado como critério à sensibilidade a partir do valor de coeficiente angular da respectiva curva analítica em uma determinada condição de estudo. A curva analítica avaliada foi construída com no mínimo cinco pontos de acordo com a relação: $\%I_A = aC_{AO} + b$, sendo $\%I_A$ o percentual de inibição, C_{AO} a concentração do composto antioxidante, a o coeficiente angular e b o coeficiente linear. O coeficiente de correlação linear (r) foi calculado visando avaliar a disposição dos pontos quanto à adequação ao comportamento linear. Procedimento semelhante foi realizado para os métodos propostos e os métodos de comparação visando à quantificação da capacidade antioxidante em diferentes amostras por interpolação dos dados. Todo o tratamento estatístico foi feito utilizando o software Origin[®] 7.0 (OriginLab Corporation, Inglaterra).

A inibição do sinal analítico ($\%I$) pela presença de substâncias antioxidantes frente aos radicais $DEPD^{\bullet+}$, $DMPD^{\bullet+}$, $EHPD^{\bullet+}$ e $EHMPD^{\bullet+}$ foi calculada a partir da equação: $\%I = (1 - A_{amostra}/A_{branco}) \times 100$, onde $A_{amostra}$ corresponde a absorvância após a adição da amostra a solução contendo o radical e A_{branco} a absorvância relativa ao branco analítico (FOGLIANO, et al., 1999).

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

O EC_{50} , concentração mínima do antioxidante necessária para inibir 50% da concentração do radical, (MORALES, BABEL, 2002) foi calculado de acordo com a curva analítica obtida para cada antioxidante em relação a cada radical analisado. Considerando a curva: $\%I_A = aC_{AO} + b$, calcula-se o EC_{50} atribuindo o valor de 50 à variável I_A . Dessa forma, pode-se calcular o valor de C_{AO} que é a concentração necessária para redução de 50% do radical em solução, ou EC_{50} .

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%.

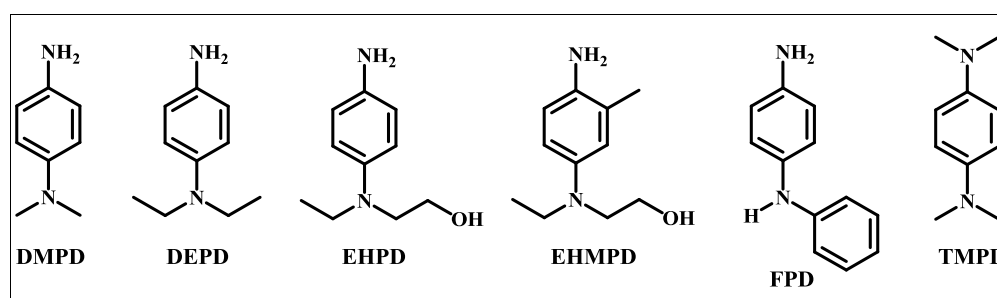
Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O principal objetivo do trabalho foi o desenvolvimento de um método para determinação da capacidade antioxidante em amostras de bebidas empregando radicais cátions, derivados de aminas aromáticas, como sondas espectrofotométricas. Assim, selecionou-se para avaliação seis aminas aromáticas disponíveis comercialmente (Figura 21) com grupo amino livre (ou dissubstituído) na posição 1 e um grupo amino mono ou dissubstituído na posição 4 do anel aromático. Na avaliação prévia das aminas como sondas espectrofotométricas verificou-se a baixa solubilidade da *N*-fenil-1,4-fenilenodiamina (FPD) em água e na solução tampão utilizada (HAc/NaAc 0,2 mol L⁻¹, pH = 4,0). A solubilidade desta amina era condicionada a solventes orgânicos (etanol ou acetona) ou soluções aquo-orgânicas (com pelo menos 10% (v/v) do solvente orgânico). Nestas condições tanto a reação de geração do radical quanto a de compostos redutores com o referido radical (possivelmente gerado) a partir da FPD não era favorecida. Desta forma, esta amina não foi avaliada nos estudos subsequentes.

Para dar prosseguimento aos trabalhos, selecionou-se a DEPD para otimização dos diferentes parâmetros físicos e químicos do método em função da semelhança estrutural entre ela e as outras aminas aromáticas (precursoras dos radicais cátions).

Figura 21. Estrutura molecular das aminas aromáticas utilizadas.

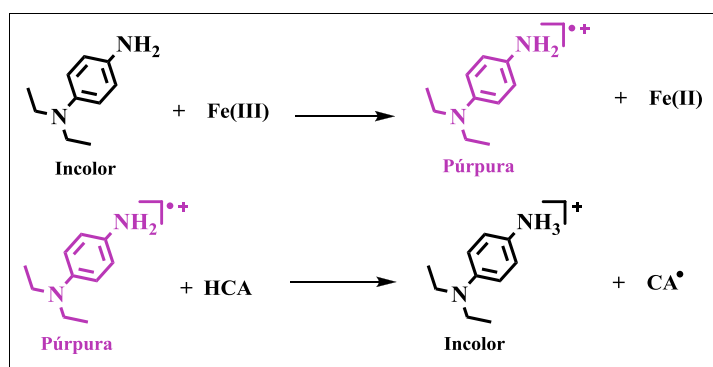


Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

A DEPD, assim como as outras aminas, em solução aquosa apresenta-se incolor, mas quando submetida à oxidação por um determinado reagente, forma o cátion radical DEPD^{•+} de coloração rósea (exceto o TMPD^{•+} que apresentou uma coloração violácea), desde que a amina esteja em excesso. Na presença de compostos com atividade antioxidante (ou redutora) o cátion DEPD^{•+} é reduzido e a intensidade da coloração da solução diminui, assim a C_{AO} da amostra pode ser mensurada através de medidas espectrofotométricas. Na Figura 22 são apresentadas as etapas associadas ao processo. Um comportamento similar ocorre para as

aminas DMPD, EHPD, EHMPD e TMPD, as quais foram avaliadas neste trabalho como sondas espectrofotométricas para determinação da C_{AO} de amostras de bebidas. Ressalta-se que, dentre as aminas avaliadas a DMPD já foi empregada com esta finalidade (Fogliano, et al., 1999). Contudo, até o momento não foi realizado um estudo sistemático com outras aminas aromáticas visando à determinação da C_{AO} , nem uma avaliação comparativa da reatividade dos respectivos radicais cátions com diferentes compostos antioxidantes/redutores. Desta forma, este trabalho pretende contribuir de forma significativa quanto a este aspecto.

Figura 22. Etapas envolvidas para formação e atuação do radical cátion $DEPD^{+\bullet}$.



Fonte: Adaptado de FOGLIANO et al., 1999

4.1 Parâmetros avaliados e otimizados no desenvolvimento do método

Para o desenvolvimento do método analítico, foram avaliados e otimizados alguns parâmetros químicos e físicos empregando a amina DEPDA (a maioria dos parâmetros). Contudo, alguns parâmetros foram otimizados de forma individualizada para cada cátion radical, como: comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{m\acute{a}x}$), tempo para geração dos radicais e tempo de reação entre radical e antioxidante (padrão).

Os demais parâmetros avaliados foram: pH para a formação do radical e sua inibição por diferentes espécies antioxidantes, concentração da solução tampão, oxidante a ser utilizado em função da velocidade de geração do radical cátion, efeito de contra-íons, efeito do teor de diferentes solventes orgânicos, concentração da amina e do oxidante, proporção oxidante:amina, volume da solução do oxidante e da amina, assim como, o volume da solução de referência e da amostra. Todos os parâmetros avaliados são apresentados e discutidos a seguir.

4.2 Avaliação do comprimento de onda de máxima absorção relativo aos radicais

A espectroscopia no ultravioleta/visível (UV-Vis) fornece informações importantes sobre substâncias contendo ligações duplas. Como a radiação na região do ultravioleta/visível possui energia suficiente para provocar transição eletrônica, uma espécie absorverá luz (no UV ou Vis) dependendo da energia necessária para que ocorra essa transição (SILVERTEIN, BASSLER, MORRIL, 1994; PAVIA, LAMPMAN, KRIZ, 2001; BRUICE, 2006), ou seja, a absorção depende da variação de energia entre o orbital ocupado de mais alta energia (HOMO) e o orbital desocupado de mais baixa energia (LUMO).

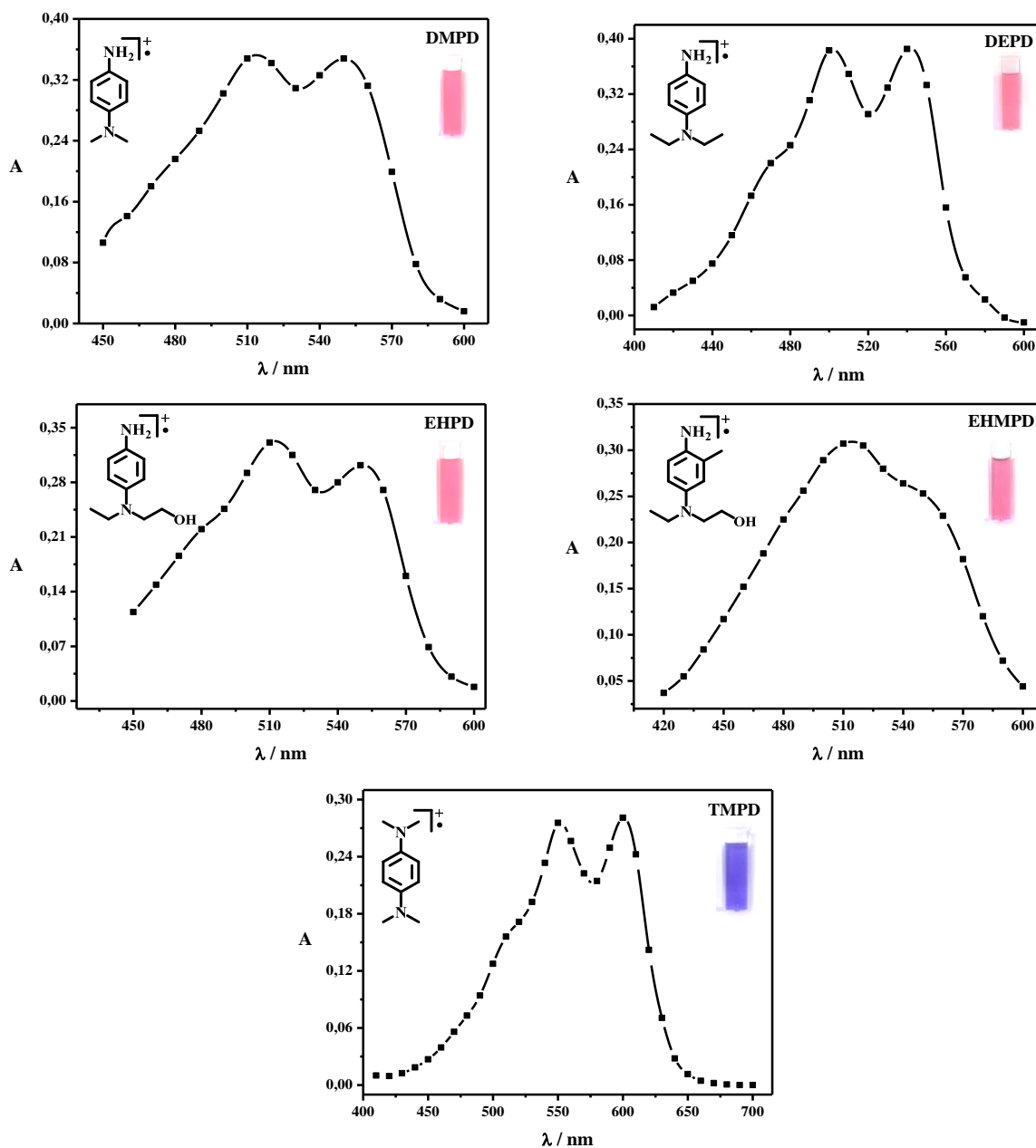
Como a relação entre energia e comprimento de onda são inversamente proporcionais, uma transição eletrônica que necessite de grande quantidade de energia se dará em um baixo comprimento de onda (no UV, por exemplo), ao passo que uma transição eletrônica que necessite de pouca energia ocorrerá em um alto comprimento de onda (na região do visível, por exemplo). A radiação UV abrange uma faixa de comprimentos de onda de 180 a 380 nm, enquanto a radiação no Vis compreende a faixa de 380 a 800 nm (SILVERTEIN, BASSLER, MORRIL, 1994; BRUICE, 2006). As transições eletrônicas dos radicais utilizados nesse trabalho ocorrem na região do visível e seus espectros de absorção são mostrados na Figura 23.

Ao trabalhar com absorção molecular é fundamental definir o comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) das espécies químicas analisadas, pois a absorvância medida depende do coeficiente de absortividade molar e este por sua vez varia com o comprimento de onda. Dessa forma, trabalhar na região do espectro de máxima absorção além de garantir ao método máxima sensibilidade ainda pode reduzir erros instrumentais em função da radiação policromática, uma vez que em comprimentos de onda próximos ao máximo de absorção o coeficiente de absortividade molar varia pouco, sendo praticamente constante. Isso garante linearidade ao sinal de absorvância em relação à variação de concentração evitando desvios da Lei de Beer (SKOOG, 2006).

O $\lambda_{\text{máx}}$ está diretamente relacionado à estrutura da molécula, mais precisamente ao cromóforo e auxocromo (quando presente). O primeiro corresponde a parte insaturada da molécula que absorve luz (no UV ou Vis) e o segundo caracteriza-se pelos grupos ligados ao cromóforo que podem facilitar ou dificultar a transição eletrônica na molécula, assim, dependendo do número, da natureza e da posição dos auxocromos, pode ocorrer diminuição ou aumento do $\lambda_{\text{máx}}$ e da intensidade da(s) banda(s) de absorção (PAVIA, LAMPMAN, KRIZ, 2001; BRUICE, 2006).

A ligação de grupos doadores de elétrons ao cromóforo facilita a transição eletrônica para o estado excitado, pois esses elétrons interagem com a nuvem de elétrons π do cromóforo, essa interação reduz a diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO, aumentando assim o valor do $\lambda_{\text{máx}}$ (SILVERTEIN, BRASSLER, MORRILL, 1994; BRUICE, 2006).

Figura 23. Espectros de absorção molecular referente aos radicais cátions $\text{DMPD}^{\bullet+}$, $\text{DEPD}^{\bullet+}$, $\text{EHPD}^{\bullet+}$, $\text{EHMPD}^{\bullet+}$ e $\text{TMPD}^{\bullet+}$. Condições: DEPD ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão HAC/NaAc ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$; pH 4,7) e Fe(III) ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em HCl $0,02 \text{ mol L}^{-1}$); DMPD , EHPD , EHMPD e TMPD ($2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão HAC/NaAc ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$; pH 4,0) e Fe(III) ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em HCl $0,02 \text{ mol L}^{-1}$).



Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

Ao observar as bandas de absorção dos espectros do $\text{DMPD}^{\bullet+}$ e $\text{TMPD}^{\bullet+}$ nota-se que o cátion radical da amina mais simples ($\text{DMPD}^{\bullet+}$) apresenta dois $\lambda_{\text{máx}}$, em 510 e 550 nm, ao passo que no espectro da $\text{TMPD}^{\bullet+}$ o primeiro $\lambda_{\text{máx}}$ ocorre em 550 nm, enquanto o segundo em 600 nm. O efeito batocrômico (deslocamento para maior comprimento de onda) pode ser atribuído à substituição de dois átomos de hidrogênio por dois grupos metila ($-\text{CH}_3$) em relação ao grupo amino livre (do $\text{DMPD}^{\bullet+}$) levando à estrutura do $\text{TMPD}^{\bullet+}$. Uma vez que grupos alquilas atuam como doadores de elétrons, facilitam a transição eletrônica, o que conduz ao aumento do $\lambda_{\text{máx}}$ (SILVERTEIN, BRASSLER, MORRILL, 1994).

Um deslocamento batocrômico mais sutil (de 10 nm) foi observado ao se comparar as duas bandas de absorção presentes nos espectros de $\text{DEPD}^{\bullet+}$ e $\text{EHPD}^{\bullet+}$; nesse caso, o deslocamento pode ser atribuído aos elétrons não ligantes (n) do oxigênio, aumentando a capacidade de relaxamento de elétrons (por efeito indutivo) do auxocromo presente na posição 4 do anel do $\text{EHPD}^{\bullet+}$.

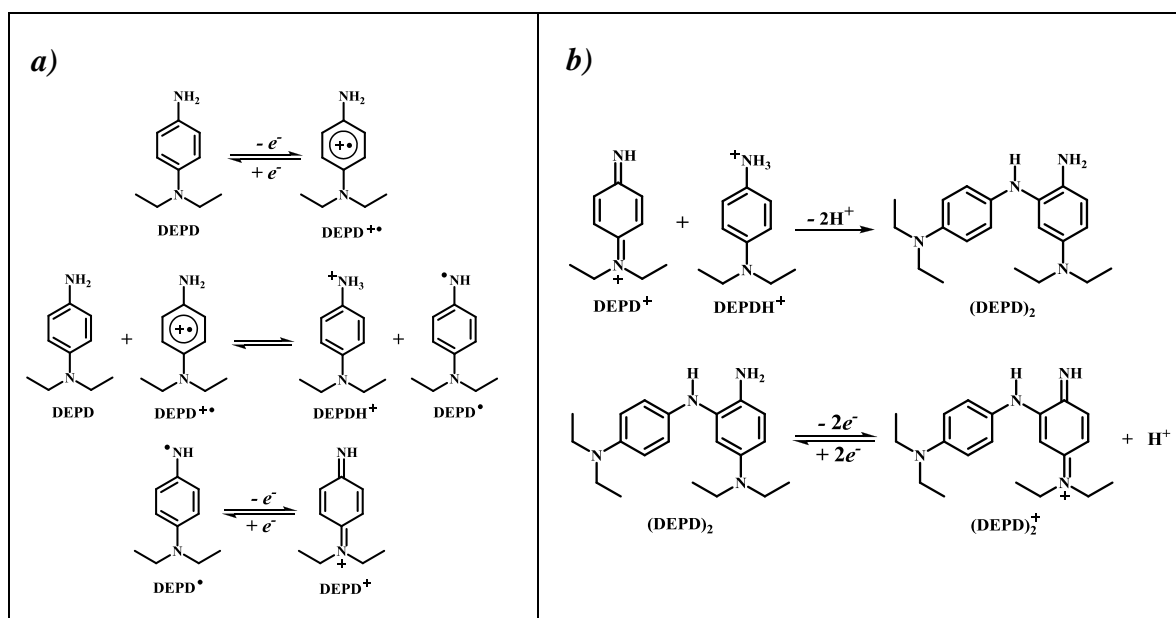
Comparando os espectros de $\text{EHPD}^{\bullet+}$ e $\text{EHMPD}^{\bullet+}$ nota-se que não há deslocamentos para a primeira banda de absorção, estando ambas em 510 nm. No entanto a segunda banda do radical $\text{EHMPD}^{\bullet+}$ aparece como um “ombro”. Isso pode ter ocorrido devido à substituição de um átomo de hidrogênio do anel aromático pelo grupo metila, na posição *orto* em relação ao grupo amino ($-\text{NH}_2$) no radical $\text{EHMPD}^{\bullet+}$. Como substituições dessa natureza causam efeito hipsocrômico (deslocamento para menor comprimento de onda), a segunda banda de absorção pode ter sido sobreposta pela primeira, uma vez que (a primeira) apresentou maior intensidade, por isso apresentou este perfil, sem uma separação adequada (SILVERSTEIN, BRASSLER, MORRILL, 1994).

A formação de dois máximos em todos os espectros pode ser atribuída à coexistência de duas espécies coloridas em solução. Como mostrado por Wildgoose e colaboradores (2004) e Klymenko e colaboradores (2003) em seus trabalhos (Figura 24a) a oxidação do DEPD envolve a transferência de dois elétrons formando outras espécies, além do cátion radical esperado. Devido à existência de um elétron desemparelhado para as espécies químicas $\text{DEPD}^{\bullet+}$ e DEPD^{\bullet} (paramagnéticas), estas podem ser as responsáveis pela absorção na região do visível.

Visando uma aplicação analítica quantitativa, poder-se-ia selecionar qualquer um dos $\lambda_{\text{máx}}$, com sensibilidade semelhante. Este critério poderia ser utilizado para os radicais cátions $\text{DMPD}^{\bullet+}$, $\text{DEPD}^{\bullet+}$ e $\text{TMPD}^{\bullet+}$. Para estes, foi selecionado o $\lambda_{\text{máx}}$ da primeira banda de absorção, ou seja, 500 nm para $\text{DEPD}^{\bullet+}$, 510 nm para $\text{DMPD}^{\bullet+}$, e 550 nm para $\text{TMPD}^{\bullet+}$. Esses

comprimentos de onda foram selecionados por estarem próximos aos comprimentos de onda utilizados na literatura quando se trata dos referidos cátions radicais com estruturas similares ou iguais (FOGLIANO, et al., 1999; ALVES, et al., 2004; KHAN, et al., 2007; ESPOSITO, et al., 2003; DO NASCIMENTO, et al., 2002; CARLSSON, MOBERG, KARLBERG, 1999). Por fim, para os radicais cátions $\text{EHPD}^{+\bullet}$ e $\text{EHMPD}^{+\bullet}$ os comprimentos de onda selecionados foram 510 nm, por apresentarem maior intensidade.

Figura 24. Mecanismo proposto para a oxidação da amina *DEPD* em meio aprótico (*DMF*) dividido em duas partes. Sendo: a) oxidação dieletrônica sem dimerização e b) prosseguimento da oxidação com dimerização.

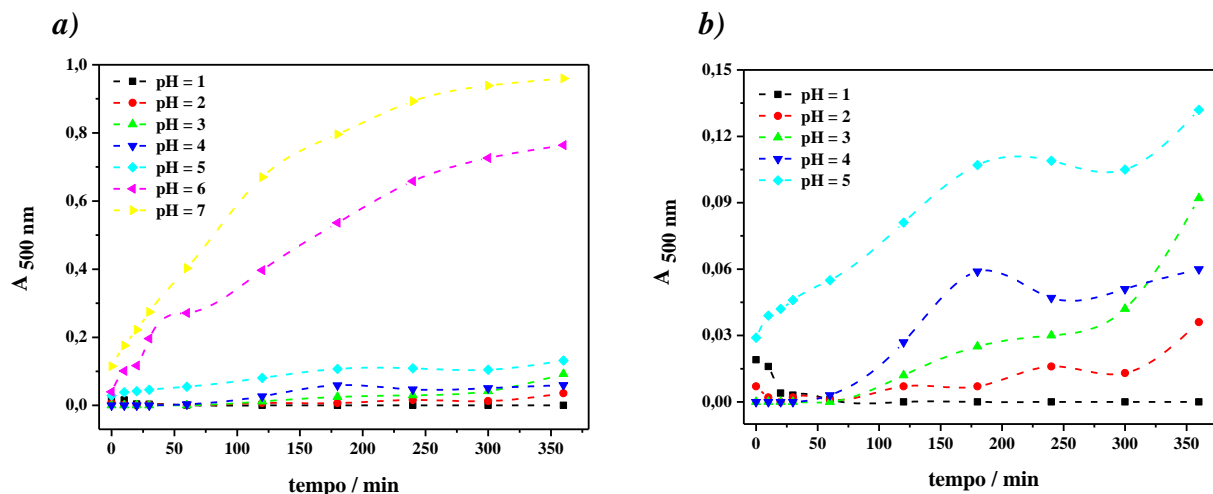


Fonte: Adaptado de WILDGOOSE, et al., 2004; KLYMENKO, et al., 2003.

4.3 Avaliação da oxidação do DEPDA frente ao oxigênio atmosférico

O oxigênio atmosférico ($\text{O}_{2(\text{g})}$) quando dissolvido em solução também atua como oxidante ($\text{O}_{2(\text{g})} + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- \rightleftharpoons 2\text{H}_2\text{O}$, $E^0 = 1,23 \text{ V}$ ou $\text{O}_{2(\text{g})} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}_2$, $E^0 = 0,70 \text{ V}$) sobre as moléculas de DMPD, DEPDA, EHPD, EHMPD e TMPD levando a formação do radical correspondente. Contudo, a extensão dessa oxidação depende do pH do meio. Desta forma, foi necessário avaliar qual faixa de pH seria mais adequada para preparar a solução da amina aromática sem que ela sofresse oxidação pelo O_2 atmosférico levando a alteração da concentração inicial do radical e, conseqüentemente mudanças no sinal da solução de referência (branco analítico). Neste sentido, foi realizado um estudo preparando a solução de DEPDA em solução tampão, variando-se o pH da mesma de 1 a 7, em escala unitária. Os resultados obtidos para este estudo são discriminados na Figura 25.

Figura 25. Perfil da oxidação do DEPD ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) frente ao O_2 atmosférico a partir do monitoramento da formação do radical $\text{DEPD}^{\bullet+}$. Condições: pH = 1 e 2 ($[\text{HCl}] = 0,1$ e $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente); pH = 3 a 5 (tampão HAc/NaAc a $0,2 \text{ mol L}^{-1}$); pH = 6 e 7 (tampão $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ a $0,2 \text{ mol L}^{-1}$). Sendo a) valores de pH de 1 a 7 e b) expansão do gráfico a para valores de pH de 1 a 5.



Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

A partir da análise dos gráficos observou-se que as soluções de DEPD preparadas nos meios com valores de pH de 1 a 5 apresentaram sinais de absorvância baixos ($< 0,05$ UA), indicando que nesses valores de pH a amina era mais estável e por consequência menos susceptível à oxidação pelo oxigênio atmosférico, quando comparada com os valores de pH 6 e 7. Este comportamento deve-se ao fato de, em meio mais ácido, a amina aromática encontrar-se, em maior fração na forma associada (protonada), assim a oxidação pelo O_2 foi menos eficiente quando comparada com os valores de pH 6 e 7, onde a fração não associada (desprotonada) é maior.

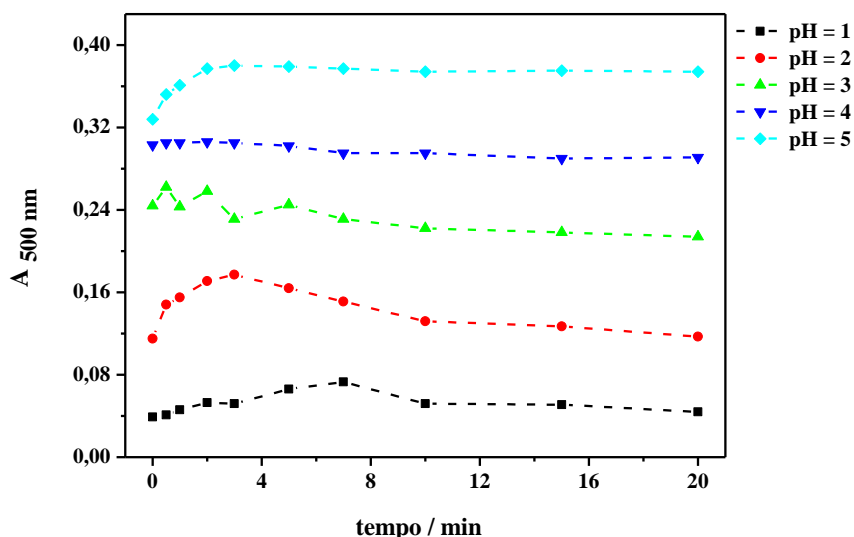
4.4 Avaliação do efeito do pH na geração do radical $\text{DEPD}^{\bullet+}$

Após definir os valores de pH onde o oxigênio atmosférico não teria uma interferência pronunciada no sinal da solução de referência (branco analítico), foi necessário determinar qual o valor de pH mais adequado para geração do radical $\text{DEPD}^{\bullet+}$. Desta forma, a geração do radical, tendo como oxidante íons Fe(III) foi realizada para os valores de pH de 1,0 a 5,0 com variação em escala unitária. Os resultados relativos a este estudo são apresentados na Figura 26.

A partir dos resultados apresentados na Figura 26 observou-se em $\text{pH} = 1,0$ uma reduzida formação do radical em função do baixo sinal de absorvância a 500 nm, isso ocorreu em função da maior extensão da protonação dos grupos aminos (bases), e desta forma, a

fração não protonada foi reduzida no meio levando a menor formação do radical. Para a solução preparada em pH = 2,0 foi observado um máximo no sinal seguido de uma redução do mesmo para tempos superiores a 5 min, no entanto o maior sinal de absorvância (0,18 UA) obtido ainda era considerado baixo.

Figura 26. Avaliação da influência do pH para geração do radical $DEPD^{*+}$. Condições: pH = 1 e 2 ($[HCl] = 0,1$ e $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente); pH = 3 a 5 (tampão $HAc/NaAc$ a $0,2 \text{ mol L}^{-1}$); $DEPD$ ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e $Fe(III)$ ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).



Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

Para os valores de pH na faixa de 3,0 a 5,0 foram observados sinais de absorvância superiores a 0,25 UA para tempos superiores a 5 min e uma estabilização do sinal analítico para os primeiros minutos após a mistura dos reagentes, com destaque para o pH = 4,0 que se manteve praticamente constante durante todo o período de avaliação.

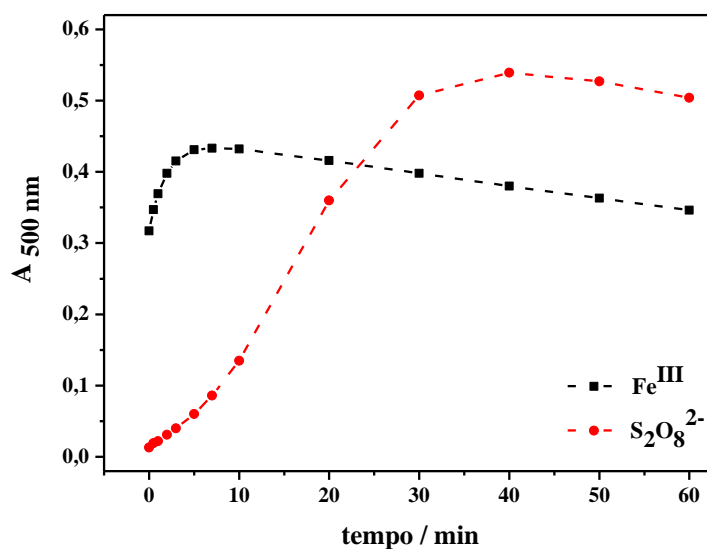
Como era esperado, o aumento do pH da solução da amina conduziu a um maior valor do sinal analítico de referência em função do aumento da fração não protonada do $DEPD$, favorecendo assim a formação do respectivo radical cátion. Desta forma, selecionou-se os valores de pH 3,0 a 5,0 para avaliação da inibição do radical $DEPD^{*+}$ frente a compostos redutores e com atividade antioxidante, afim de se definir um valor de pH.

4.5 Avaliação da geração do $DEPD^{*+}$ frente aos oxidantes $Fe(III)$ e $K_2S_2O_8$

Para avaliação do oxidante na geração do cátion radical $DEPD^{*+}$, foram testadas duas espécies capazes de oxidar a amina aromática, o $Fe(III)$ ($Fe(III) + e^- \rightleftharpoons Fe(II)$, $E^0 = 0,77 \text{ V}$) e o $K_2S_2O_8$ ($S_2O_8^{2-} + 2e^- \rightleftharpoons 2SO_4^{2-}$, $E^0 = 2,01 \text{ V}$). Estas espécies foram selecionadas em virtude

de já terem sido empregadas na geração do radical $\text{DMPD}^{\bullet+}$ em trabalhos reportados na literatura no desenvolvimento de métodos para determinação da C_{AO} (FOGLIANO, et. al., 1999; KHAN, et. al., 2007). Os resultados para esta avaliação são discriminados na Figura 27.

Figura 27. Perfil de geração do radical cátion $\text{DEPD}^{\bullet+}$ em função do oxidante. . Condições: Fe(III) ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{HCl } 0,02 \text{ mol L}^{-1}$); $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e DEPD ($2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão $\text{HAc/NaAc } 0,2 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 4$).



Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

A partir do perfil de geração do radical cátion $\text{DEPD}^{\bullet+}$ apresentado na Figura 27 foi possível observar que a cinética da reação de oxidação do DEPD com o Fe(III) foi mais favorável em relação à mesma reação com o $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ nas condições reacionais avaliadas. Próximo a 10 min já se observou a estabilização do sinal referente à formação do $\text{DEPD}^{\bullet+}$ indicando que possivelmente todo o Fe(III) reagiu com o DEPD , visto que a amina estava em excesso em relação ao cátion metálico.

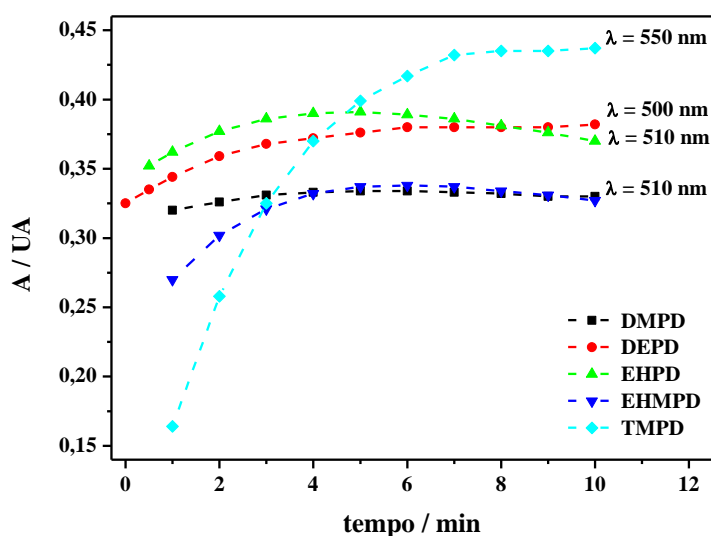
Para a geração do radical empregando $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$, a estabilização do sinal analítico foi observada após cerca de 30 min de reação. Isso pode está associado a uma possível formação de radicais provenientes do oxidante ($\text{S}_2\text{O}_8^{2-} + 2e^- \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + \text{SO}_4^{\bullet-}$ (ativação) e $\text{SO}_4^{\bullet-} + \text{OH}^- \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + \text{HO}^\bullet$ (propagação)), uma vez que o persulfato é um poderoso agente oxidante. Porém, a formação dessas espécies reativas constitui um processo lento (ZHAO et al, 2013), o que justifica o perfil cinético observado. Adicionalmente, nota-se que após 30 min o sinal analítico foi *ca.* 25% superior quando comparado ao sistema gerador contendo íons Fe(III) . Esta observação está diretamente associada ao número de elétrons transferidos para geração do cátion radical, visto que para o ânion persulfato, são transferidos dois elétrons, enquanto

para os íons ferrosos apenas um, desta forma o $S_2O_8^{2-}$ irá formar mais radical cátion $DEPD^{*+}$ no meio reacional.

Neste sentido, selecionou-se o Fe(III) como oxidante para a geração do radical em virtude do menor tempo necessário para sua formação. Esta seleção foi realizada mesmo observando-se um sinal de referência superior para geração do radical com o $S_2O_8^{2-}$ (após 30 min), contudo, empregando íons férricos a frequência analítica do procedimento seria maior. Assim, o tempo de formação do radical $DEPD^{*+}$ empregando o Fe(III) como oxidante foi fixado em 10 min.

Após definir o oxidante a ser utilizado avaliou-se o tempo de reação das demais aminas frente ao Fe(III) para a formação do radical. O resultado do estudo está expresso na Figura 28. A partir dos resultados, para a geração dos radicais $DMPD^{*+}$ e $EHPD^{*+}$ foi escolhido um intervalo de tempo de 5 minutos, para $EHMPD^{*+}$ 6 minutos e para $TMPD^{*+}$ 7 minutos. Vale apenas ressaltar que para o cátion radical $DEPD^{*+}$ não é necessário esperar exatamente 10 minutos, visto que após 5 minutos já se observou uma estabilização do sinal, no entanto esse tempo (10 minutos) foi definido em virtude de facilitar a manipulação dos reagentes quando for necessário trabalhar com obtenção de curvas analíticas, nas quais é preciso preparar todas as soluções em triplicata.

Figura 28. Avaliação do tempo de geração dos radicais $DMPD^{*+}$, $DEPD^{*+}$, $EHPD^{*+}$, $EHMPD^{*+}$ e $TMPD^{*+}$. Condições: $DMPD$, $DEPD$, $EHPD$, $EHMPD$ e $TMPD$ ($2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão $HAc/NaAc$ ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $pH = 4$) e $Fe(III)$ ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em HCl $0,02 \text{ mol L}^{-1}$).



Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

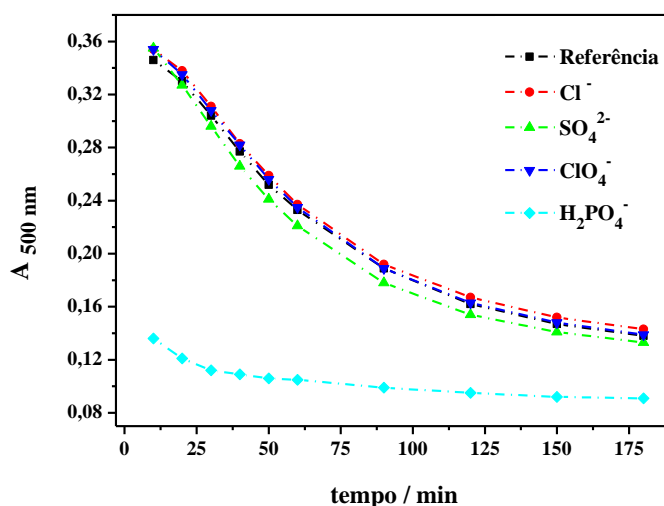
O mesmo tempo de 10 min também pode ser utilizado para as demais aminas, com exceção da amina EHPD, pois para tal a partir de 6 min já se notou uma redução do sinal

referente ao cátion radical (ver Figura 28). Essa redução do sinal também foi observada para a amina DEPD, mas para tempos maiores, este fato foi atribuído à possibilidade de dimerização que ocorre no final do processo de oxidação proposto por Wildgoose e colaboradores (2004) e Klymenko e colaboradores (2003) (Figura 24b). Apesar do mecanismo ter sido proposto em meio aprótico (DMF) acredita-se que em meio prótico o mecanismo de oxidação seja semelhante (SEO, et al., 1966), como demonstrado por outros autores (LAWRENCE, et al., 2000; LAWRENCE, DAVIS, COMPTON, 2000).

4.6 Avaliação do efeito do contra-íon na estabilização o sinal do DEPD^{•+}

Em virtude do perfil do sinal do radical DEPD^{•+}, o qual decresce com o aumento do tempo de reação, foi avaliado se alguma espécie atuando como contra-íon influenciaria na oxidação da amina aumentando a estabilidade do sinal de absorvância em função do tempo. Os íons avaliados foram Cl⁻, SO₄²⁻, ClO₄⁻ e H₂PO₄⁻. Com exceção do H₂PO₄⁻, nenhum íon influenciou (aumentando ou reduzindo) a estabilidade do sinal, como mostrado na Figura 29. No entanto o H₂PO₄⁻ quando em solução estabilizou o sinal, mas em contrapartida interferiu drasticamente na sua intensidade, reduzindo-a, possivelmente em função da complexação com íons Fe(III). Dessa forma, o uso do contra-íon em solução não foi considerado relevante, possivelmente em função da diferença de concentração dos contra-íons avaliados em relação concentração de outras espécies, como ácido acético e acetato, responsáveis pelo sistema tampão.

Figura 29. Avaliação do efeito do contra-íon na estabilidade do sinal de DEPD^{•+}. Condições: DEPD ($2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão HAc/NaAc ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$; pH = 4); Fe(III) ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em HCl $0,02 \text{ mol L}^{-1}$) e contra-íon a $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

4.7 Formação de um cátion radical ou complexo?

Em relação ao produto da reação entre as aminas aromáticas empregadas neste trabalho e o oxidante Fe(III) ainda existem algumas controversas. Fogliano e colaboradores em 1999 ao desenvolver o método do DMPD^{•+} afirmaram que o produto da oxidação entre essa amina e o Fe(III) seria o radical cátion DMPD^{•+} com máximo comprimento de onda em 505 nm. No entanto, Mehdi e Rizvi em 2013 publicaram um artigo no qual afirmam que o que acontece entre a DMPD e o íon férrico é a formação de um complexo, fato que contraria a formação do cátion radical proposto por Fogliano e colaboradores (1999).

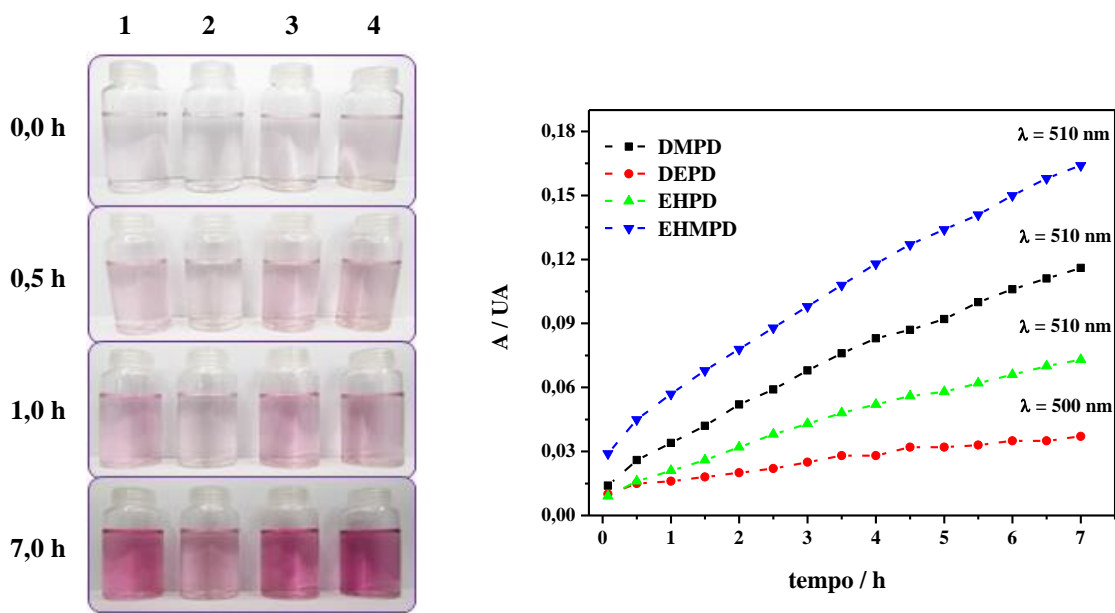
Ao estudar a oxidação da amina (DMPD), Fogliano avaliou cinco oxidantes, a fim de inferir sobre qual oxidaria a DMPD mais rapidamente. Os oxidantes avaliados foram H₂O₂, NaClO, Cu(II), AAPH ou ABAP (Figura 12a) e Fe(III), todas essas espécies quando adicionadas a solução contendo DMPD, conduziram à formação de uma espécie colorida ($\lambda_{\text{máx}} = 505 \text{ nm}$), o que invalida a possibilidade de formação de complexo, uma vez que dos oxidantes citados apenas Cu(II) e Fe(III) poderiam ser quelados. Outro oxidante avaliado foi o persulfato de potássio (K₂S₂O₈), o qual também não forma complexo com a amina aromática em questão (KHAN, et al, 2007), e conduziu a formação da espécie radicalar colorida.

Considerando o exposto acima, a proposta de Mehdi e Rizvi (2013) de que a cor da DMPD oxidada deve-se a formação de um complexo entre o íon férrico e a amina e de que a redução da coloração causada por um antioxidante deve-se à redução do Fe(III) a Fe(II), ambos complexados, não faz sentido. Talvez haja a formação do complexo em alguma extensão, contudo, esse não é o principal produto da reação.

Outra prova de que as aminas aromáticas avaliadas quando oxidadas não formam complexo com Fe(III), e sim um cátion radical é a observação da oxidação causada pelo oxigênio atmosférico. As imagens e o gráfico (Figura 30) fazem parte de um estudo realizado com as aminas DMPD, DEPD, EHPD e EHMPD a fim de avaliar a estabilidade dessas moléculas em meio tamponado (pH = 4,0) frente ao oxigênio.

Nota-se que inicialmente as aminas apresentam-se incolor (com destaque para a DEPD que foi empregada como composto modelo para otimização do método), e gradativamente a intensidade da coloração aumenta em função do tempo. Essa espécie que está aumentando de concentração gradativamente, provavelmente, não é complexo, pois na solução não há nenhum metal para complexar com a amina.

Figura 30. Observação da oxidação das aminas DMPD (1), DEPD (2), EHPD (3) e EHMPD (4) pelo oxigênio atmosférico em função do tempo de reação. Condições: Aminas ($2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão HAC/NaAc ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 4,0$).



Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

4.8 Avaliação da inibição do $\text{DEPD}^{\bullet+}$ frente às moléculas redutoras em função do pH da solução

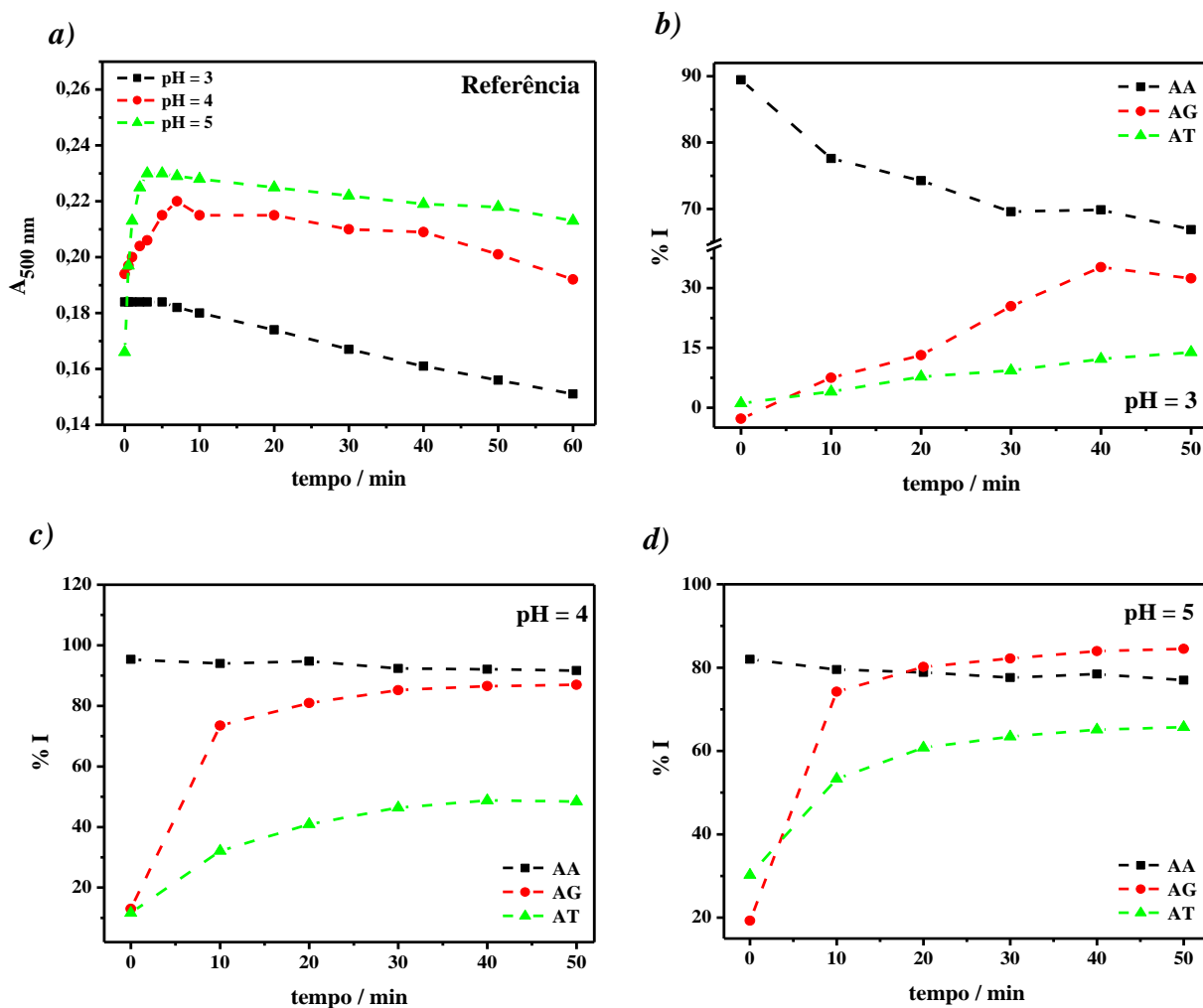
A avaliação da influência do pH (3,0; 4,0 e 5,0) da solução na formação e inibição do radical $\text{DEPD}^{\bullet+}$ foi realizada frente aos compostos com comprovada atividade antioxidante e ampla distribuição na natureza, como: ácido ascórbico ($\text{pK}_{a1} = 4,17$ e $\text{pK}_{a2} = 11,6$; hidrofílico), ácido gálico ($\text{pK}_{a1} = 4,0$; $\text{pK}_{a2} = 8,7$; $\text{pK}_{a3} = 11,4$ e $\text{pK}_{a4} > 13$, hidrofílico) e ácido tânico (pK_a 4,4 – 10, hidrofílicidade intermediária). Os resultados quanto a esta avaliação são apresentados na Figura 31.

A geração do radical $\text{DEPD}^{\bullet+}$ foi mais eficiente para maiores valores de pH, como já discutido nos estudos anteriores, existindo uma diferença positiva de aproximadamente 10% entre os sinais analíticos da solução de referência em pH 4,0 em relação ao pH 5,0. Nas condições do estudo esta diferença não influenciou de forma pronunciada nos resultados quanto à inibição do radical, visto que para estes dois valores de pH, o perfil das inibições para os três compostos avaliados foi similar.

De acordo com os resultados obtidos (Figura 31) verificou-se que as inibições para os compostos avaliados tiveram os menores valores quando o pH foi igual a 3, provavelmente em virtude do maior grau de associação das moléculas redutoras (visto serem derivados de

ácidos fracos e serem dependentes do pH quanto ao processo redox)¹, conduzindo a uma menor oxidação destas, e por consequência menor consumo do radical DEPD⁺.

Figura 31. Avaliação da influência do pH na formação e inibição (%I) do radical cátion DEPD⁺. Sendo: AA (ácido ascórbico, 7 mg L⁻¹); AG (ácido gálico, 1,5 mg L⁻¹) e AT (ácido tânico, 5,0 mg L⁻¹) e os valores de pH avaliados: a) branco analítico, b) pH =3, c) pH =4 e d) pH = 5. Condições: soluções tampão HAC/NaAc (0, 2 mol L⁻¹); DEPD (1x10⁻³ mol L⁻¹) e Fe(III)(1x10⁻⁴ mol L⁻¹).



Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

Para os valores de pH 4,0 e 5,0 observou-se um aumento do grau de inibição do radical em função do tempo para todos os compostos avaliados, sendo esse aumento mais pronunciado para o AG e AT, uma vez que a inibição do ácido ascórbico foi praticamente constante durante o intervalo de tempo avaliado (considerando a concentração em mg L⁻¹). A

¹Considerando o equilíbrio da meia reação genérica $Ox + ne^- + xH^+ \rightleftharpoons H_xRed$, o qual é pH dependente pois os íons hidrônio participam do processo redox a equação de Nernst correspondente seria: $E = E^0 - \frac{0,0592}{n} \log \left(\frac{[H_xRed]}{[Ox][H^+]^x} \right)$. Desta forma, quanto mais ácido o meio

(menor pH) maior será o potencial (dificultando a oxidação pelo radical avaliado), por consequência, para meio alcalino, o potencial diminui e o processo de oxidação seria facilitado.

inibição originada pelo AG apresentou valor percentual e aspecto similar para os valores de pH 4,0 e 5,0; ao passo que o AA apresentou maior percentual de inibição em pH 4,0 e comportamento (em função do tempo) similar nos dois valores de pH. Assim, apenas AT apresentou percentual de inibição maior em pH 5,0 (provavelmente em função de um maior grau de ionização) em relação ao pH 4,0; mas manteve o mesmo perfil.

Desta forma, selecionou-se o pH 4,0 para estudos futuros em função da diferença nos percentuais de inibição para os outros valores de pH não conduzirem a ganhos operacionais, pois para avaliação das amostras reais sempre recorre-se a uma etapa prévia de diluição, de forma que pH da amostra não deverá interferir na análise. Além disso, o valor de pH selecionado é próximo ao pH das amostras de vinho (branco ou tinto) (CABRITA, SILVA, LAUREANO, 2003).

4.9 Avaliação da concentração da solução tampão

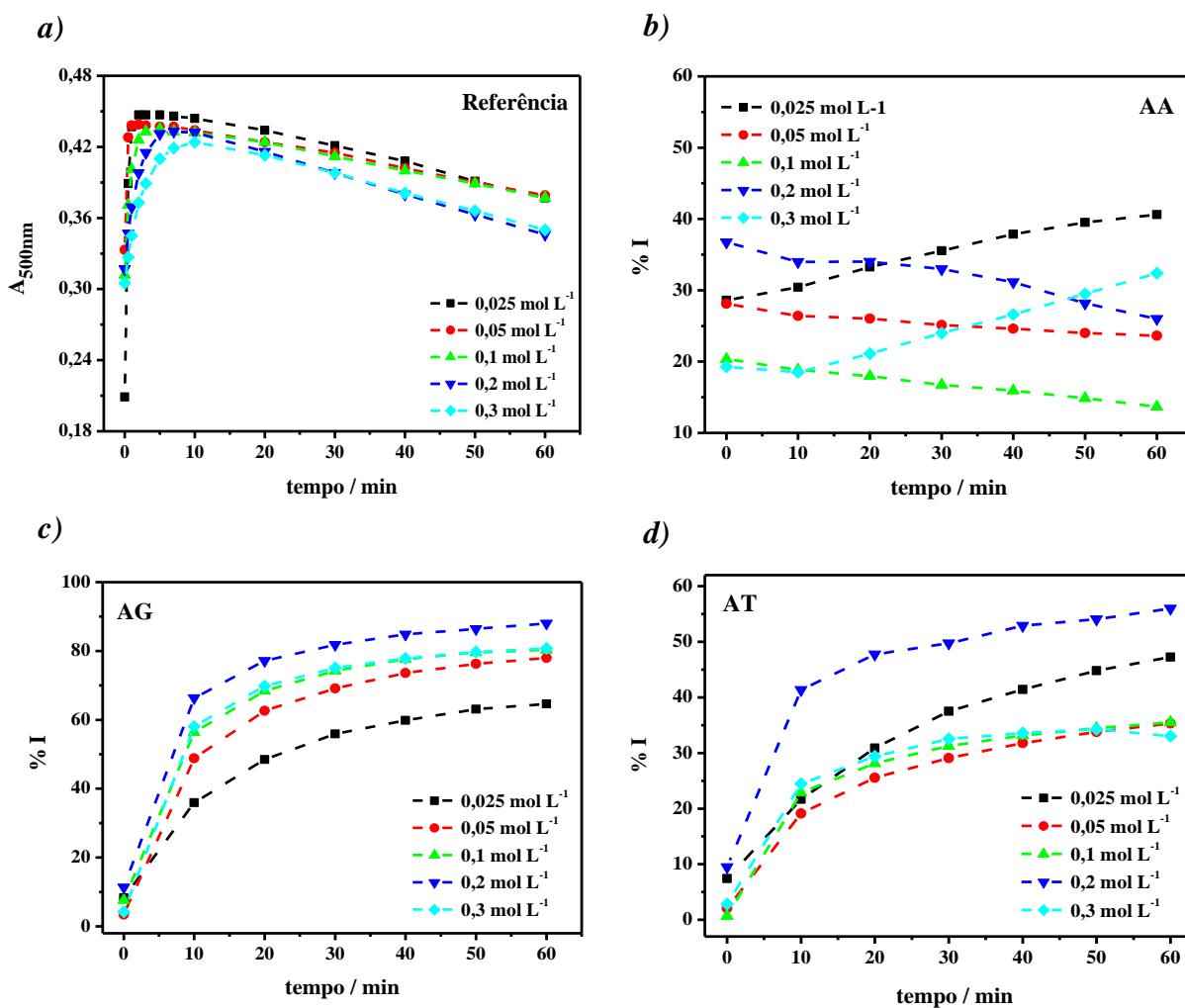
Após a seleção do valor de pH da solução tampão, foi avaliado o efeito da concentração desta solução quanto à geração e inibição do cátion radical DEPD^{*+} frente a compostos com atividade antioxidante já mencionados: ácido gálico (AG), ácido ascórbico (AA) e ácido tânico (AT). A Figura 32 apresenta os resultados relativos a este estudo.

Observando o gráfico referente ao branco (referência) nota-se que os sinais relativos à geração do radical cátion foram semelhantes para a faixa de concentrações avaliadas, indicando que a concentração da solução tampão não interferiu de forma pronunciada na geração do radical DEPD^{*+} .

Quanto à inibição do radical, foi observado que para o AA em tempo inferior a 20 min a concentração de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ da solução tampão resultou em uma maior inibição do DEPD^{*+} na presença deste composto redutor. Também para este valor de concentração da solução tampão foram observadas as mais altas taxas de inibição para os compostos fenólicos, AG e AT.

Desta forma, selecionou-se o valor de concentração do tampão igual a $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ em virtude de se observar uma alta inibição do radical DEPD^{*+} frente aos compostos fenólicos (ácido gálico e tânico) e não fenólicos (ácido ascórbico). Além disso, uma maior concentração da solução tampão implica em alta capacidade tamponante, o que foi útil no processo de diluição das amostras, eliminando o efeito de possíveis alterações do pH da solução.

Figura 32. Efeito da concentração da solução tampão em pH 4,0 (HAc/NaAc) na geração e inibição (%I) do radical cátion $DEPD^{2+}$ frente aos compostos antioxidantes: a) branco analítico, b) AA (7 mg L^{-1}), c) AG ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) e d) AT ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$). Sendo a concentração da solução tampão: 0,025; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,3 mol L^{-1} . Condições: $DEPD (1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1})$ e $Fe(III)(1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1})$.

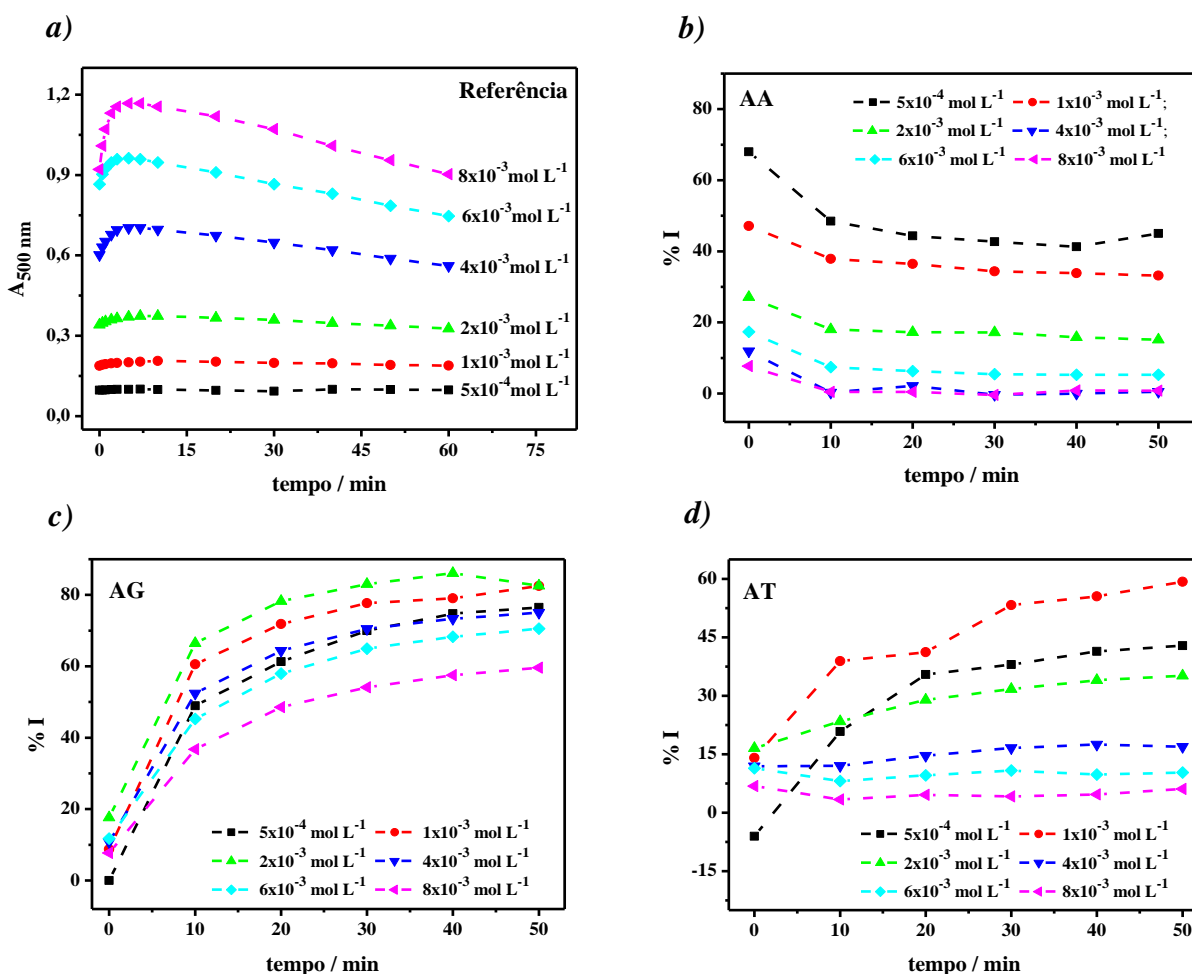


Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

4.10 Avaliação da concentração de $DEPD$

Após a definição do valor do pH e da concentração da solução tampão, foi realizada a avaliação da influência da concentração de $DEPD$ em relação a formação e inibição do radical pelas moléculas redutoras AA, AG e AT. Os resultados referentes a este estudo são apresentados na Figura 33.

Figura 33. Avaliação da concentração da amina na formação e inibição do radical $DEPD^{*+}$ frente aos compostos com atividade antioxidante: a) branco analítico, b) AA (7 mg L^{-1}), c) AG ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) e d) AT ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$). Sendo as concentrações de $DEPD$ avaliadas: 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mmol L^{-1} . Condição: a amina foi sempre mantida em excesso em relação ao Fe(III) .



Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

Como esperado, o aumento da concentração da amina ($DEPD$) conduziu a valores mais elevados do sinal da solução de referência (branco analítico), uma vez que existia em solução uma maior concentração do radical $DEPD^{*+}$. Contudo, não era interessante empregar soluções de referência com elevados valores de absorvância, em virtude de conduzir a menores valores de inibição. Por exemplo, caso se tivesse um sinal de referência (branco) de 0,8 UA e após a adição de um composto redutor este sinal fosse reduzido em 0,2 UA, a inibição calculada seria $I = 25\%$. Contudo, caso o sinal de referência fosse da ordem de 0,5 UA e após adição da solução redutora conduzisse a mesma variação de absorvância (0,2 UA); e, considerando que a proporção estequiométrica entre $DEPD^{*+}$ e o redutor fosse mantida, o percentual de inibição calculado seria $I = 40\%$. Logo, percebeu-se que não era adequado empregar altos valores de branco, pois conduziria a baixas taxas de inibição, da mesma forma

que reduzidos valores de branco levavam a altos valores de inibição para uma mesma concentração da espécie antioxidante. Desta forma, se estabeleceu como critério que os sinais do branco deveriam estar compreendidos entre 0,3 a 0,6 UA; para se trabalhar com taxas de inibição intermediárias e reduzir erros instrumentais medindo-se valores muito baixos ou elevados de absorvância.

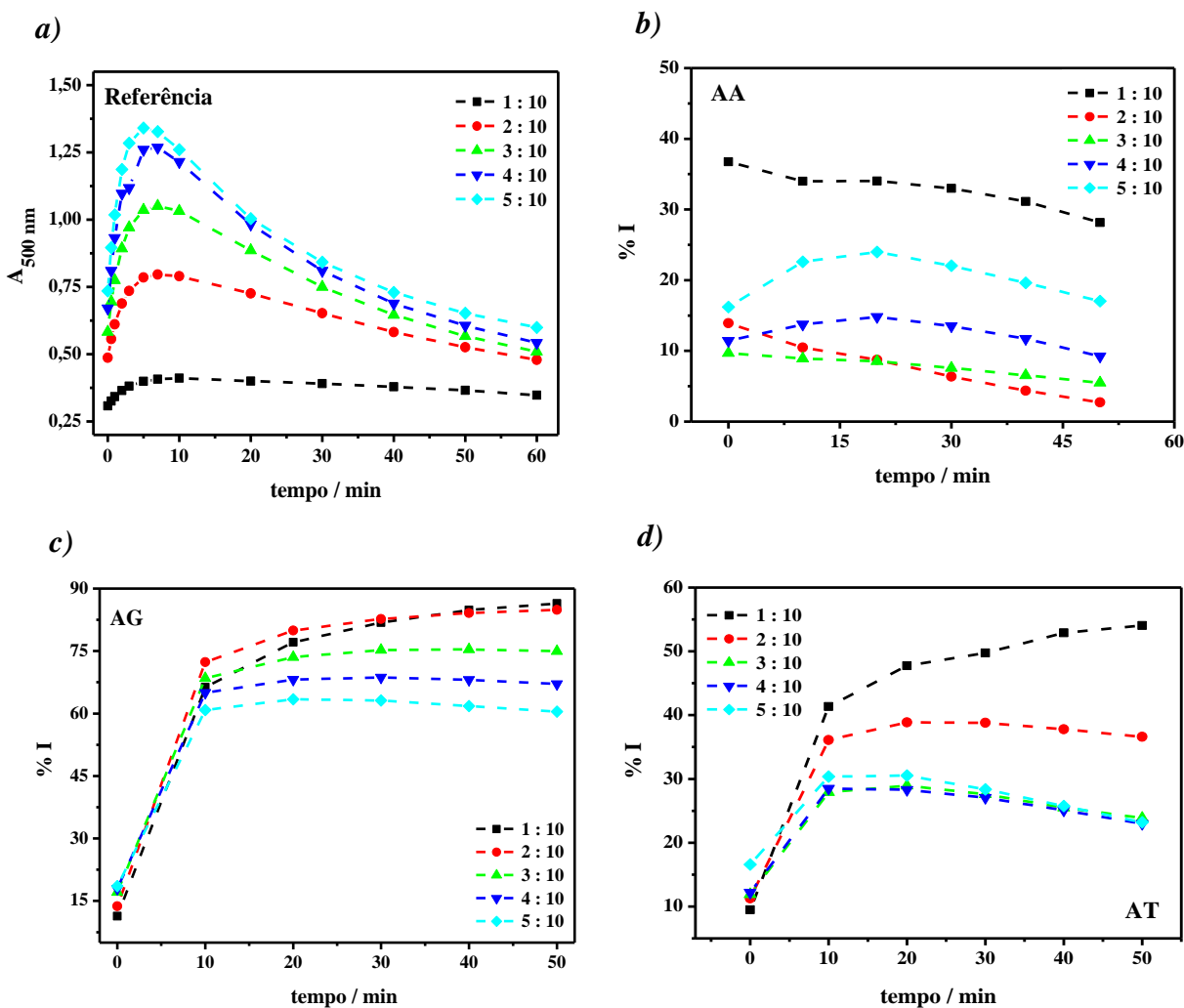
Na avaliação da inibição do radical na presença de compostos com atividade antioxidante os compostos AA e AT apresentaram os maiores valores de inibição em função das menores concentrações da amina. Este comportamento foi associado aos menores sinais de referência em função da baixa formação do $\text{DEPD}^{\bullet+}$ e consequente maior inibição. Contudo, para o AG observou-se a maior inibição quando se empregou DEPD na concentração de 1×10^{-3} e $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Para estas concentrações de DEPD foi observada uma pequena diferença (*ca.* 7%) na inibição do sinal do radical empregando-se o AG. Desta forma, selecionou-se a concentração de $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ da amina (DEPD) em virtude de se trabalhar com sinal de referência em valor intermediário da escala, apresentar boa inibição para os compostos AA e AT, além de reduzir erros instrumentais.

4.11 Avaliação da proporção de Fe(III) e DEPD

A geração e estabilização do radical cátion $\text{DEPD}^{\bullet+}$ ocorre preferencialmente quando a amina está em excesso em relação ao oxidante, no caso Fe(III). Esta condição deve ser mantida para garantir a estabilidade do radical formado em solução e ter como único oxidante no meio a espécie $\text{DEPD}^{\bullet+}$, a fim de não ter resultados equivocados quanto à atividade antioxidante da molécula que está se monitorando, ou seja, se a mesma está reagindo com o radical ou com o Fe(III). Em função disso, a proporção entre DEPD e Fe(III) foi avaliada após otimização da concentração da amina. Os resultados para este estudo são apresentados na Figura 34.

De acordo com os resultados, a única proporção avaliada que apresentou sinal da solução de referência dentro da faixa de absorvância anteriormente mencionada (0,3 a 0,6 UA) foi 1:10 (Fe(III):DEPD). Para maiores proporções de Fe(III) o sinal da solução de referência aumentou de forma proporcional à concentração de íons férricos até 10 min, sendo observado um decréscimo acentuado em seguida, sem estabilização.

Figura 34. Avaliação das proporções de Fe(III):DEPD na formação e inibição do $DEPD^{+}$ frente aos compostos com atividade antioxidante: a) branco analítico, b) AA (7 mg L^{-1}), c) AG ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) e d) AT ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$). Sendo as proporções avaliadas de Fe(III):amina iguais a: 1:10; 2:10; 3:10; 4:10 e 5:10, tendo sempre DEPD a $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.



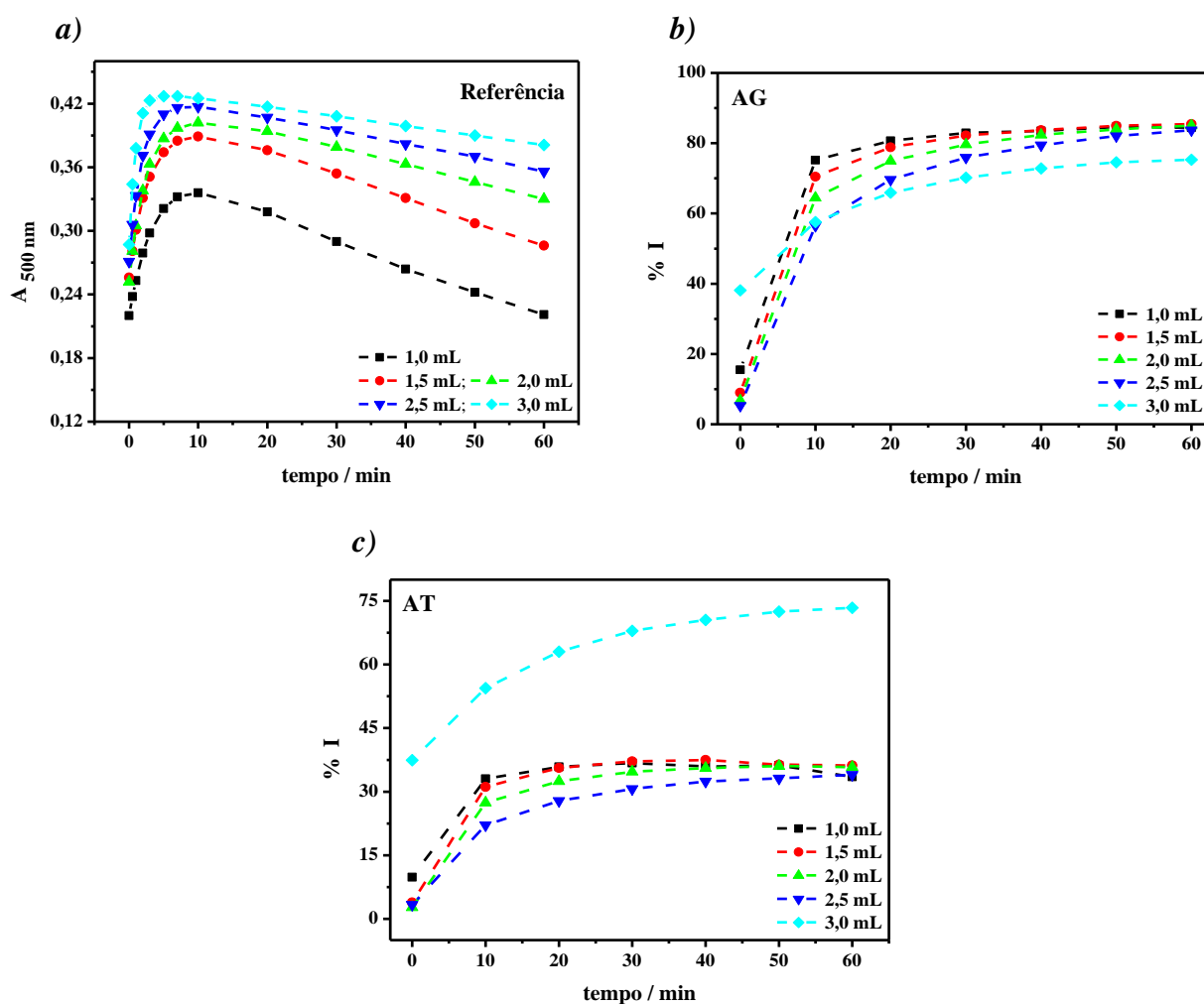
Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

Para o AA e AT a maior inibição observada foi na a proporção 1:10 (Fe(III):DEPD), enquanto que para o AG as proporções de 1:10 e 2:10 (Fe(III):DEPD) apresentaram resultados equivalentes. Desta forma, a proporção de Fe(III):DEPD em 1:10 foi selecionada para estudos futuros pois apresentava um sinal da solução de referência com reduzida interferência espectral, tinha a maior proporção da amina, garantindo o excesso do DEPD frente ao oxidante e apresentou os maiores valores de %I para os compostos com C_{AO} avaliados.

4.12 Avaliação dos volumes dos reagentes e amostra

A avaliação dos volumes das soluções de DEPD e Fe(III) e da amostra ou solução de referência foi realizada quanto à velocidade de formação e inibição do radical DEPD^{*+} frente a compostos fenólicos com atividade antioxidante. O ácido ascórbico não foi considerado quanto a este parâmetro visto que dentre os compostos avaliados apresentou uma elevada velocidade (cinética) de reação em relação aos compostos fenólicos. Logo, a variação do volume da solução de AA não conduziria a ganhos em termos cinéticos. Os resultados relativos a esses estudos são apresentados nas Figuras 35 e 36.

Figura 35. Avaliação do volume de DEPD e Fe(III) para geração e inibição do radical DEPD^{*+} frente aos compostos antioxidantes: a) branco analítico, b) AG ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) e c) AT ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$); sendo os volumes: 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; e 3,0 mL. Condição: os volumes de DEPD ($2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e Fe(III) ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) foram mantidos iguais para garantir a proporção de 1:10 (Fe(III):DEPD).



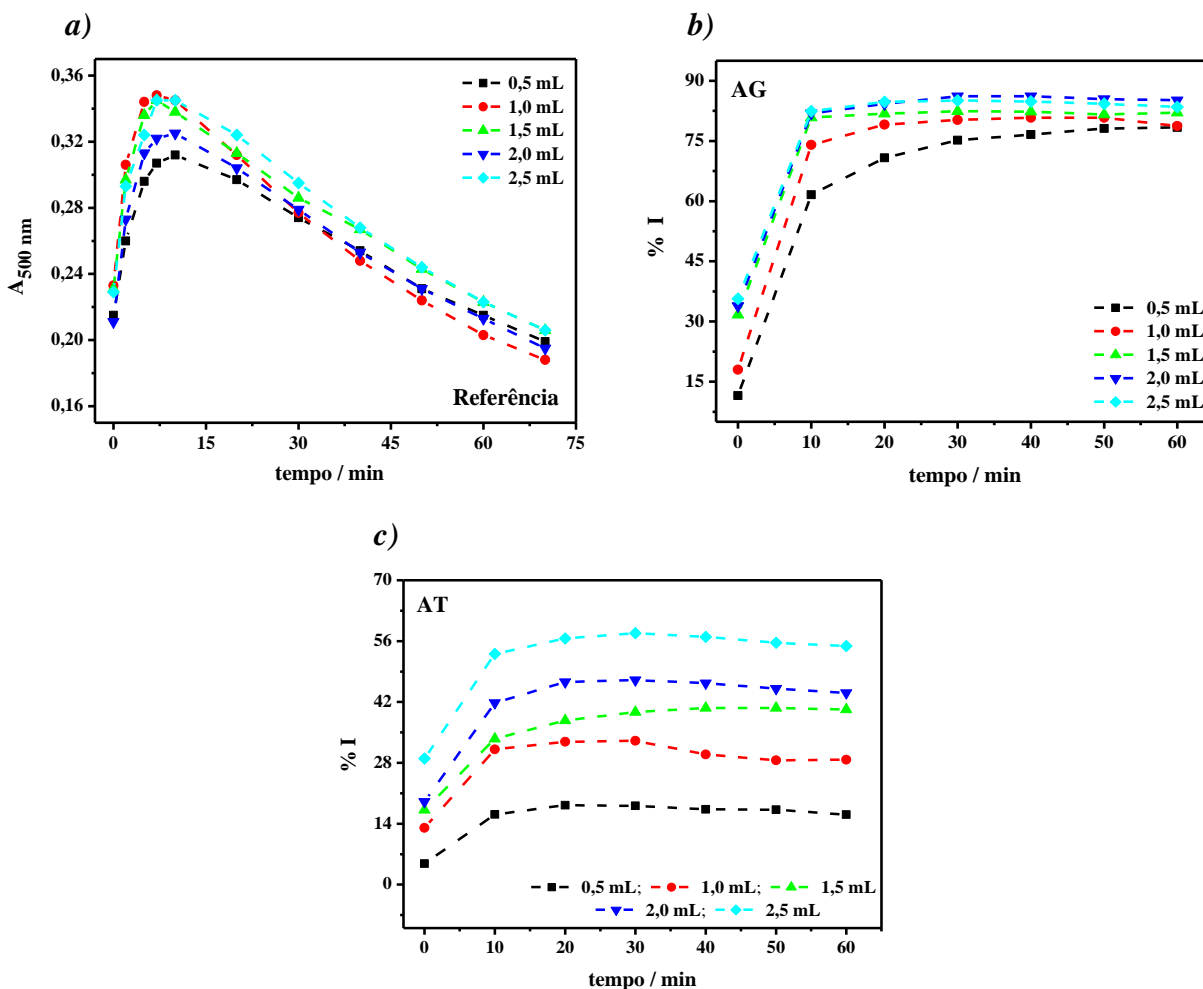
Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

Os volumes das soluções de DEPD e Fe(III) foram avaliados de forma conjunta para garantir que o excesso da amina em relação ao oxidante fosse mantido. De acordo com os

resultados (Figura 35) o aumento do volume das soluções de amina e íons Fe(III) conduziu ao aumento do sinal da solução de referência em virtude da maior da quantidade de radical $DEPD^{\bullet+}$ formado.

A inibição do radical frente ao AG mostrou comportamento similar para todos os volumes avaliados. Para o AT, somente o volume de 3,0 mL apresentou perfil distinto aos demais. Em função disso, o volume de 1,0 mL da solução de DEPD e Fe(III) foi selecionado para os experimentos futuros em função de apresentar um sinal de referência dentro da faixa de absorvância pré-estabelecida e conduzir a elevados valores de inibição para AG e moderados para o AT. Em sequência, foi avaliado o volume da solução da amostra (antioxidante), no caso, empregando as soluções de AG e AT. Estes resultados são apresentados na Figura 36.

Figura 36. Avaliação do volume dos compostos antioxidantes: a) branco analítico, b) AG ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) e c) AT ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$) para geração e inibição do radical $DEPD^{\bullet+}$. Sendo os volumes: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; e 2,5 mL. Para DEPD ($2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e Fe(III) ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).



Na avaliação do volume da amostra, empregou-se para a solução de referência (branco analítico), solução tampão no lugar da amostra. Foi observado na geração do radical $\text{DEPD}^{\bullet+}$ (Figura 36a) que a variação do volume da amostra levou a uma alteração somente de *ca.* 16% quando se comparou os volumes de 0,5 (mínimo) e 2,5 mL (máximo) para 10 min. Observando os resultados relativos à inibição do radical $\text{DEPD}^{\bullet+}$ frente aos compostos antioxidantes AG e AT, nota-se que o volume de 2,5 mL conduziu as maiores taxas de inibição para o AT, enquanto que para o AG os valores na faixa de 1,5 – 2,5 mL foram similares. Desta forma, considerando que a quantidade de amostra no meio é um fator determinante para deslocar o equilíbrio no sentido de formação dos produtos, neste caso maior inibição do radical, o volume de 2,5 mL foi selecionado para os estudos posteriores.

4.13 Avaliação do tempo de reação de compostos antioxidantes frente ao radical $\text{DEPD}^{\bullet+}$

Os compostos antioxidantes empregados neste trabalho para otimização do método apresentaram cinéticas de reação diferenciadas em função da estrutura (tamanho da molécula, número de sítios oxidáveis, número de elétrons transferidos e grau de hidro ou lipofilicidade). Foi observado que a redução do radical induzida pelo ácido ascórbico era rápida, quando comparada com os outros compostos, completando-se quase imediatamente após a adição do redutor ao meio reacional. Dessa forma, como na avaliação anterior, o AA foi excluído dessa etapa de otimização tendo seu tempo mínimo de reação com o radical estabelecido em 5 min.

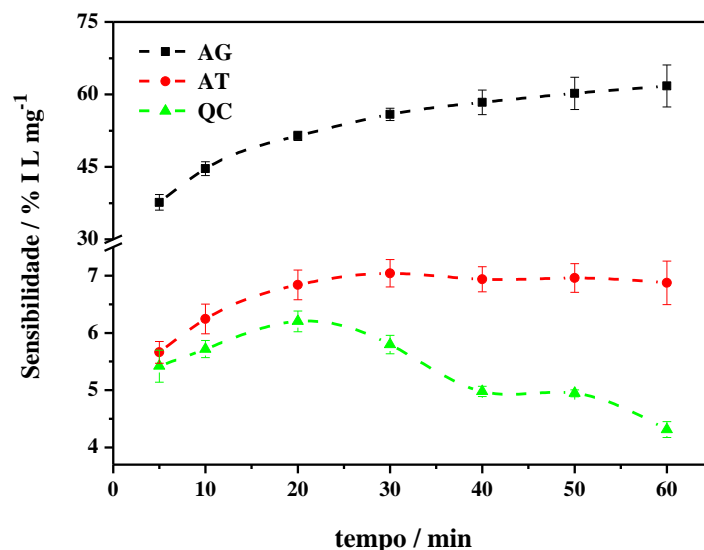
A quercetina (QC), um dos flavonóides presentes na dieta humana mais investigados por suas propriedades antioxidantes e terapêuticas, foi incluída nesta etapa do trabalho, devido ao seu caráter lipofílico, uma vez que compostos com tal natureza encontram-se presentes em muitas bebidas nas quais este método pode ser empregado e não tinham sido avaliados no desenvolvimento deste método até o momento.

Para estabelecer qual seria o tempo mínimo necessário para as espécies AG, AT e QC inibirem o radical $\text{DEPD}^{\bullet+}$ foi considerada a sensibilidade das curvas analíticas em função do tempo de reação (5 a 60 min). Os resultados relativos a este estudo são apresentados na Figura 37.

De acordo com os resultados obtidos percebeu-se que para tempos superiores a 30 minutos ocorreu estabilização do valor da sensibilidade para AG e AT e redução para a QC. Dessa forma, o tempo de 30 minutos foi selecionado para o AG e 20 minutos para o AT e QC. Com base nisso, quando o padrão da curva analítica for AG, o tempo de reação mínimo entre

o AG e o radical deve ser de 30 min, e quando for AT ou QC, o tempo de reação mínimo entre o padrão e o radical deve ser fixado em 20 min.

Figura 37. Avaliação da sensibilidade do método proposto em função do tempo de inibição para AG, AT e QC. Condições: DEPD ($2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e Fe(III) ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Cada curva analítica foi construída com no mínimo cinco pontos.



Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

4.14 Avaliação do efeito do solvente frente à inibição do radical DEPD^{•+} pelo AG

As amostras de vinho têm uma percentagem de etanol em sua composição (9 – 20% (v/v) a depender do tipo de vinho), no entanto após as diluições a quantidade de etanol remanescente torna-se desprezível permitindo que as amostras sejam analisadas sem interferência do álcool etílico. Contudo, com a intenção de expandir a aplicação do método desenvolvido para avaliação da C_{AO} em extratos de plantas e compostos sintéticos ou naturais não solúveis em água fez-se necessário avaliar o comportamento do método frente a diferentes proporções de solventes orgânicos, uma vez que as amostras citadas podem conter grande quantidade desses solventes. Nesse sentido, a sensibilidade do método foi avaliada frente a diferentes solventes variando-se a concentração percentual (v/v) na solução final.

Os solventes selecionados para o estudo foram acetona, acetonitrila, etanol, metanol, acetato de etila, dimetilformamida (DMF) e dimetilsulfóxido (DMSO), estabelecendo-se diferentes proporções tampão:solvente (100:0 – 99:1 – 97,5:2,5 – 95:5 – 90:10 – 75:25 – 50:50 – 0:100) na solução final do antioxidante. Contudo, a DEPD não foi solúvel em acetato de etila, desta forma, este solvente não foi considerado no estudo e a última proporção do

estudo, ou seja, 100% de solvente e 0% de tampão não foi possível para o solvente DMSO, uma vez que a curva analítica obtida não apresentou linearidade aceitável.

Em toda avaliação, o padrão utilizado foi o ácido gálico, sendo a faixa linear máxima obtida de 0,2 a 1,4 mg L⁻¹ (em 100% tampão) e a mínima de 0,2 a 0,6 mg L⁻¹ (em 100 % de acetonitrila). A variação da sensibilidade (coeficiente angular da curva analítica) em relação à concentração percentual (v/v) do solvente orgânico é apresentada na Figura 38 e na Tabela 12 (Anexo 1).

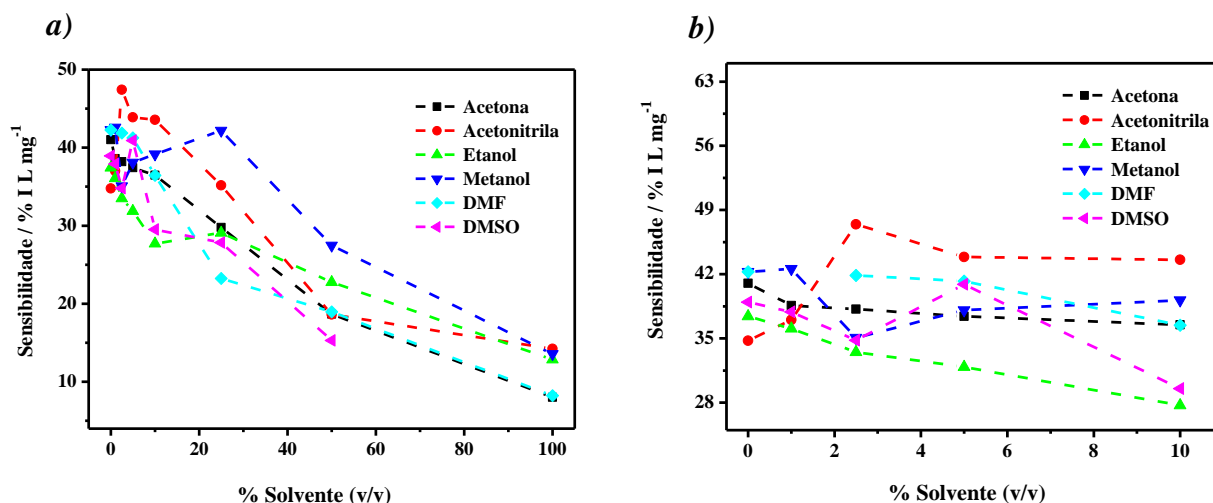
De acordo com o gráfico da Figura 38 a, nota-se em geral uma diminuição na sensibilidade do método quando a percentagem de solvente orgânico no meio aumenta. Observando a Figura 38b, a qual mostra apenas a avaliação para as proporções de 0 a 10% v/v, nota-se que acetona e DMF apresentaram a menor variação e o etanol teve a maior. A acetonitrila apresentou um aumento na sensibilidade em 2,5% de solvente, com um ligeiro decréscimo para concentrações maiores de solvente, no entanto quando a proporção do solvente atingiu 25% a redução da sensibilidade se acentuou.

Considerando que o solvente orgânico é adicionado ao meio reacional juntamente com o padrão, pode-se explicar esses resultados a partir da redução da polaridade e da hidrofobicidade do meio que contém o ácido gálico e o radical DEPD^{•+}. O radical tem natureza majoritariamente hidrofílica, mas também se deve levar em consideração sua natureza orgânica, assim ele pode apresentar interações fortes com moléculas de água, mas também com algumas moléculas orgânicas, desde que estas sejam preferencialmente polares.

Se o solvente orgânico consegue solvatar o ácido gálico e o radical DEPD^{•+} de forma mais eficiente do que a água, devido à natureza orgânica dessas espécies, pode-se ter uma esfera de solvatação que aumenta em função do incremento de concentração do solvente no meio e conseqüente diminuição da quantidade de água. Assim, a aproximação entre esse antioxidante e o radical fica dificultada, o que acaba comprometendo a reação entre estas espécies e reduzindo o sinal de inibição, conseqüentemente a sensibilidade.

Outro fator que deve ser levado em consideração é a estabilização do radical no solvente orgânico, tornando-o menos reativo, em função da estabilização através das interações existentes no processo de solvatação. Exemplo disso são as espécies denominadas radicais de Wurster, as quais são derivadas de compostos estruturalmente semelhantes à DEPD, e que são estabilizados em solventes orgânicos como tolueno, benzeno e clorofórmio (SEO, et al, 1966; STÖRLE e EYER, 1991) Assim, é possível que os dois fatores apresentados ocorram de forma conjunta levando a diminuição da sensibilidade do método, consistindo uma limitação do mesmo.

Figura 38. Variação da sensibilidade do método em função da concentração percentual (v/v) dos solventes orgânicos avaliados. Condições: DEPD ($2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão HAc/NaAc ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 4$); Fe(III) ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em HCl $0,02 \text{ mol L}^{-1}$); padrão: ácido gálico. Sendo a) avaliação de 0% a 100% de solvente orgânico e b) expansão do gráfico exposto em a) destacando a avaliação de 0% a 10% de solvente orgânico.

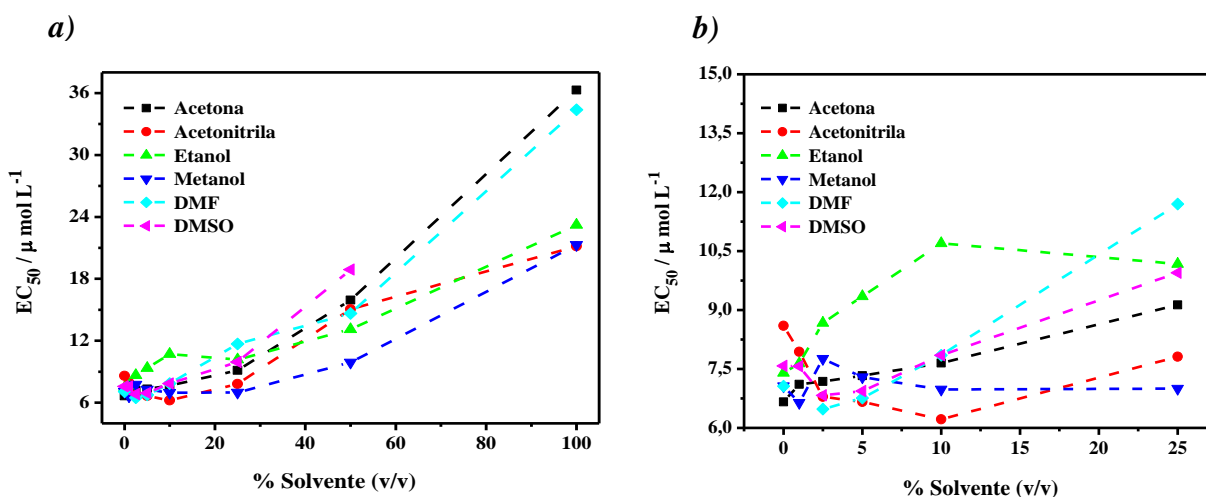


Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

Outra maneira de observar a influência do solvente na sensibilidade do método frente a compostos antioxidantes (no caso AG) foi em relação à variação de EC_{50} . Quanto maior for esse parâmetro menos eficiente é o antioxidante frente ao radical, ou menos reativo se tornou esta espécie em função de alterações do meio reacional (no caso a concentração do solvente orgânico). Assim, observa-se que para solventes como o metanol e etanol (solventes próticos) este efeito é menos pronunciado, contudo para DMF, DMSO e acetona (solventes apróticos) os valores de EC_{50} aumentam com uma tendência exponencial (ver Figura 39).

A partir dos resultados apresentados nota-se que existem restrições quanto à sensibilidade deste método, a depender do tipo e da concentração do solvente orgânico na qual os compostos ou amostra estejam solubilizados, o método pode ser muito ou pouco sensível. Assim, a depender do solvente (e sua respectiva concentração) o método até pode ser implementado, contudo a concentração do(s) anatito(s) a ser quantificada é um fator a ser considerado em função de uma possível redução na sensibilidade do método. No entanto, deve-se levar também em consideração que tal comportamento pode não ser válido para antioxidantes lipofílicos, uma vez que na avaliação realizada foi avaliado apenas o AG que é hidrofílico. A escolha pelo AG se deu em virtude deste composto e derivados (além de compostos semelhantes) estarem em maior concentração em amostras de alimentos como vinhos, chás e infusões.

Figura 39. Avaliação da variação do EC_{50} em função da concentração percentual (v/v) dos solventes orgânicos avaliados. Condições: DEPD ($2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão HAC/NaAc ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 4$); Fe(III) ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em HCl $0,02 \text{ mol L}^{-1}$); padrão: ácido gálico. Sendo a) avaliação de 0% a 100% de solvente orgânico e b) expansão do gráfico exposto em a) destacando a avaliação de 0% a 25% de solvente orgânico.



Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

4.15 Estudo eletroquímico das aminas e radicais

Para um melhor entendimento dos processos envolvidos na geração e inibição dos radicais avaliados, foram realizados estudos eletroquímicos empregando voltametria cíclica para as aminas avaliadas, uma vez que esses resultados podem ser utilizados na investigação do comportamento redox das espécies químicas (PAMUK, et al., 2013). Os dados obtidos no estudo foram os potenciais de pico anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}), as correntes de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) e a diferença entre o potencial de pico anódico e de pico catódico (ΔE_p) (para as aminas DMPD, DEPD, EHPD, EHMPD e os respectivos radicais). Os voltamogramas foram realizados em cinco velocidades de varredura ($35, 75, 100, 500$ e 1000 mV s^{-1}), com exceção da amina DEPD, para a qual só foi possível realizar três varreduras, pois a mesma foi oxidada pelo oxigênio atmosférico durante os experimentos. Todos os voltamogramas obtidos encontram-se nas Tabelas 13 a 16 no Anexo 2.

Os dados obtidos nos permitiram inferir sobre o comportamento dos processos redox das aminas aromáticas avaliadas baseando-nos em alguns testes diagnósticos propostos na literatura. No entanto, faz-se necessário um estudo eletroquímico mais detalhado com um número maior de velocidades de varredura para que se possa entender com mais clareza a questão da reversibilidade dos sistemas redox das espécies investigadas.

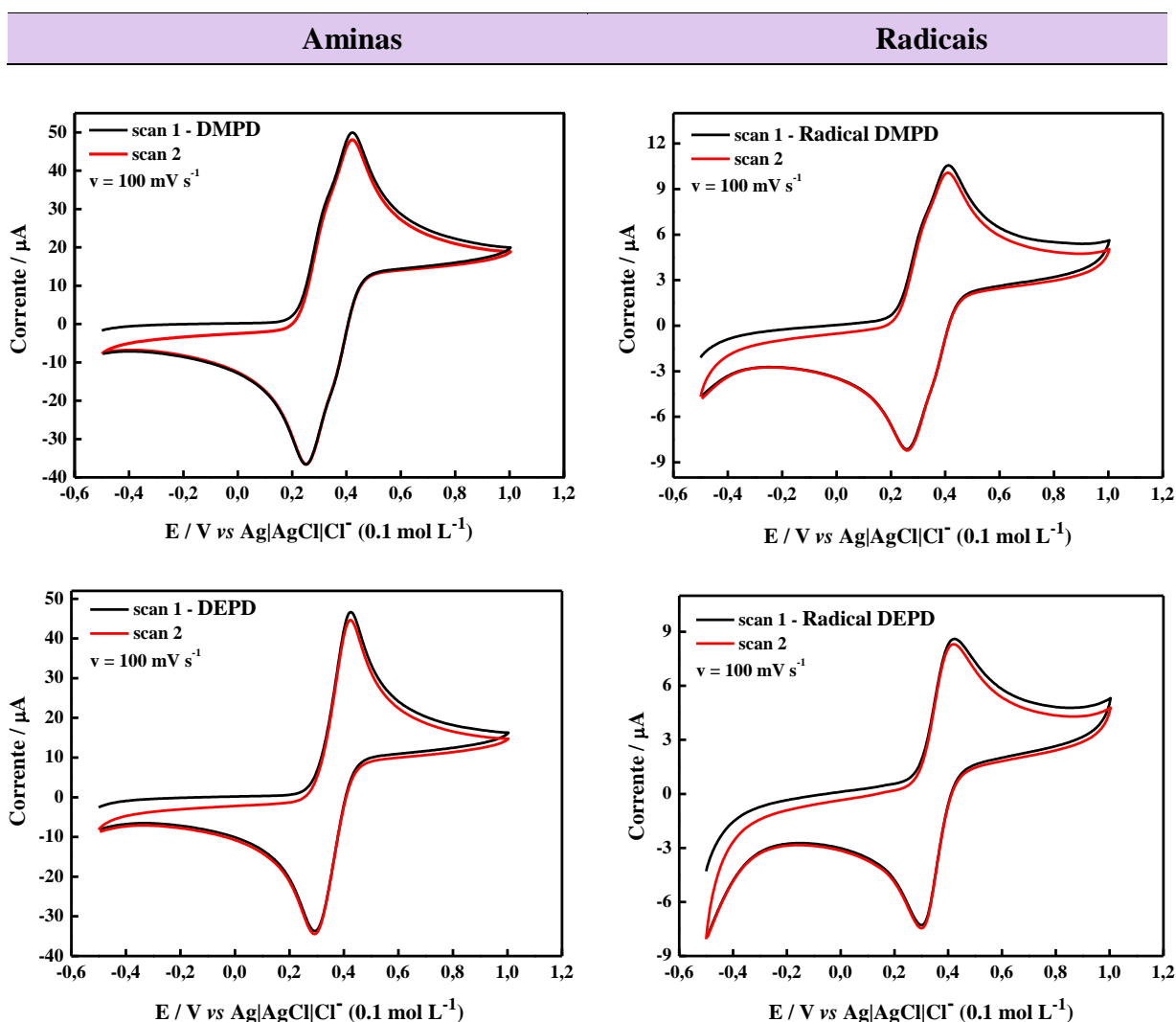
Em relação à reversibilidade para os sistemas redox das aminas e dos radicais não se pôde classifica-los como irreversíveis, uma vez que todos apresentam potenciais de pico

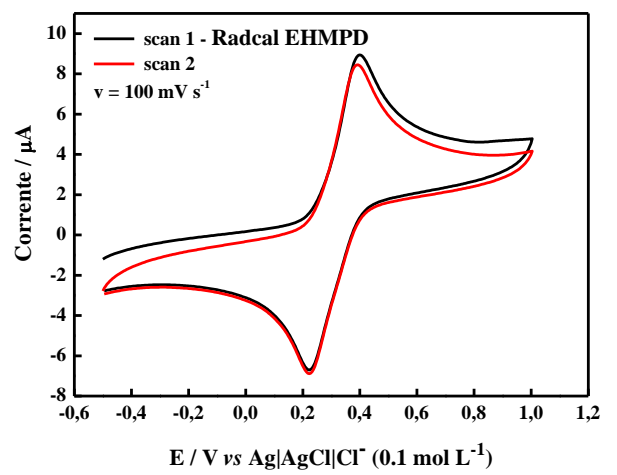
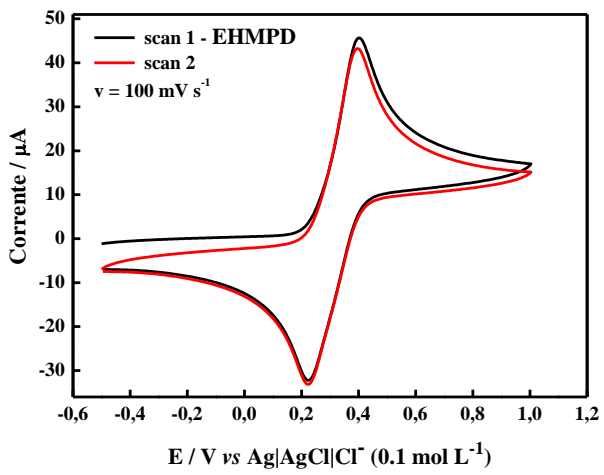
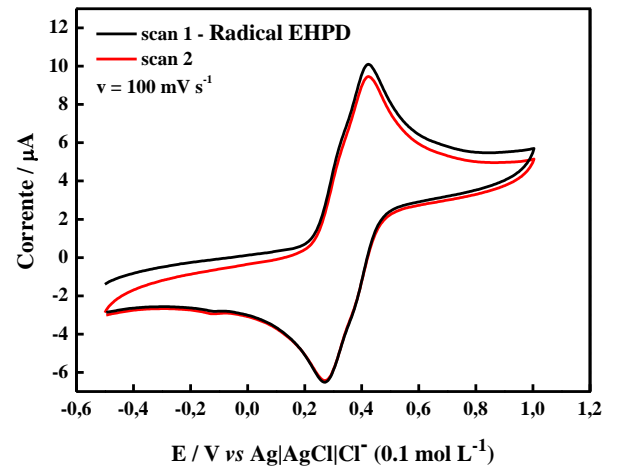
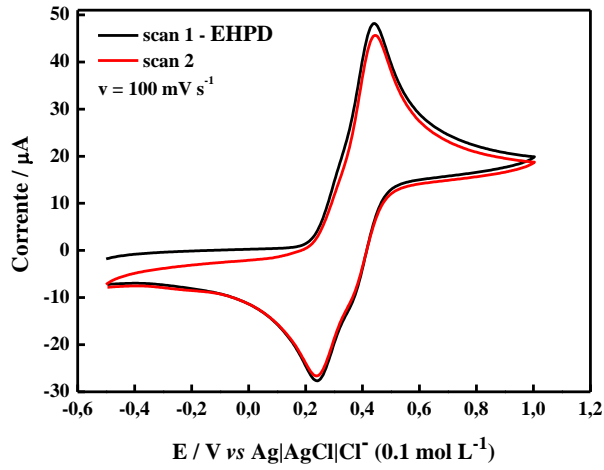
reversos como mostra a Tabela 2 e, a ausência de tal potencial de pico é um critério para a irreversibilidade, como indicado anteriormente na Tabela 1.

Também não foi possível classificar os sistemas avaliados como reversíveis, uma vez que os potenciais de pico (catódicos e anódicos) variaram com a velocidade de varredura, o que torna esse parâmetro dependente de v ; outro teste aplicado foi o cálculo de ΔE ($E_{pa} - E_{pc}$), para todas as velocidades esse valor foi maior do que o proposto na literatura, não se manteve constante, e ainda aumentou com o aumento de v .

Com base nisso e nos resultados obtidos para as cinco velocidades de varredura aplicadas, os sistemas avaliados podem ser classificados como quase-reversíveis, uma vez que o E_{pc} diminuiu com o aumento de v , ΔE_p apresentou valores superior a $59/n$ (mV) além de variar com a velocidade, e o parâmetro I_{pa}/I_{pc} apresentou valores superiores a unidade para praticamente todas as varreduras. Todos os parâmetros obtidos estão discriminados na Tabela 3.

Tabela 2. Voltamogramas cíclicos das aminas e dos radicais, em meio prótico, para uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Condições: DMPD, DEPD, EHPD e EHMPD ($2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão HAC/NaAc ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 4$); $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).





Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

Tabela 3. Dados obtidos a partir do estudo eletroquímico para as aminas em meio prótico. Condições: DMPD, DEPD, EHPD e EHMPD ($2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão HAc/NaAc ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 4$); $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).

Composto	Velocidade, mV s^{-1}	Amina						Radical					
		Epa, V	Ipa, μA	Epc, V	Ipc , μA	ΔE , mV	Ipa/Ipc	Epa, V	Ipa, μA	Epc, V	Ipc , μA	ΔE , mV	Ipa/Ipc
DMPD	35	0,419	29,59	0,256	20,00	163	1,48	0,408	6,06	0,260	4,52	148	1,34
	75	0,427	41,50	0,249	31,77	178	1,31	0,408	8,68	0,256	7,03	152	1,23
	100	0,419	48,09	0,253	36,75	166	1,31	0,408	10,08	0,256	8,30	152	1,21
	500	0,461	108,3	0,226	82,52	235	1,31	0,427	22,70	0,241	19,34	186	1,17
	1000	0,476	141,9	0,200	119,1	276	1,19	0,434	32,55	0,241	27,64	193	1,18
DEPD	35	0,434	25,37	0,283	17,87	151	1,52	0,412	5,24	0,305	4,41	107	1,188
	75	-	-	-	-	-	-	0,419	7,12	0,300	6,23	119	1,14
	100	0,423	44,80	0,290	37,8	133	1,18	0,423	8,35	0,298	7,47	125	1,12
	500	-	-	-	-	-	-	0,434	14,6	0,287	15,05	147	0,97
	1000	0,68	71,50	0,188	62,95	492	1,14	0,442	20,08	0,271	21,45	171	0,94
EHPD	35	0,442	26,47	0,241	11,93	201	2,22	0,423	5,62	0,271	3,13	152	1,80
	75	0,457	39,60	0,226	21,68	231	1,83	0,423	8,02	0,271	5,27	152	1,52
	100	0,448	45,79	0,237	26,99	211	1,70	0,423	9,51	0,268	6,48	155	1,47
	500	0,506	93,13	0,188	66,79	318	1,39	0,438	20,07	0,256	15,92	182	1,26
	1000	0,532	123,3	0,169	92,14	363	1,34	0,442	28,76	0,256	22,77	186	1,26
EHMPD	35	0,381	26,07	0,230	19,49	151	1,34	0,400	5,38	0,203	3,70	197	1,45
	75	0,396	37,66	0,222	28,22	174	1,33	0,406	6,78	0,169	5,20	237	1,31
	100	0,396	43,70	0,222	33,50	174	1,30	0,393	8,43	0,222	6,92	171	1,22
	500	0,461	81,45	0,173	67,44	288	1,21	0,604	13,21	0,113	11,63	491	1,14
	1000	0,479	106,1	0,162	93,39	317	1,14	0,608	17,91	0,120	16,55	488	1,08

Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

Adicionalmente, para inferir sobre o comportamento quase-reversível dos sistemas avaliados ou a possibilidade de alguma reação química acoplada, construiu-se uma curva relacionando I_{pc} para todos os picos catódicos dos voltamogramas em função da $v^{1/2}$, a Tabela 4 mostra o resultado desse estudo e os gráficos obtidos são representados na Tabela 17 no Anexo 3.

Tabela 4. Equações de reta para I_{pc} vs $v^{1/2}$ para as aminas e radicais.

Composto	Amina	Radical
DMPD	$I_{pc} = 3,81(\pm 0,03) v^{1/2} - 1,90(\pm 0,69)$ $r = 0,99985; n = 5$	$I_{pc} = 0,89(\pm 0,00) v^{1/2} - 0,74(\pm 0,04)$ $r = 0,99999; n = 5$
DEPD	$I_{pc} = 1,56(\pm 0,50) v^{1/2} + 14,84(\pm 9,66)$ $r = 0,95276; n = 3$	$I_{pc} = 0,66(\pm 0,01) v^{1/2} + 0,63(\pm 0,19)$ $r = 0,9996; n = 5$
EHPD	$I_{pc} = 3,12(\pm 0,08) v^{1/2} - 5,19(\pm 1,50)$ $r = 0,99899; n = 5$	$I_{pc} = 0,76(\pm 0,00) v^{1/2} - 1,29(\pm 0,11)$ $r = 0,9999; n = 5$
EHMPD	$I_{pc} = 2,84(\pm 0,04) v^{1/2} + 3,71(\pm 0,85)$ $r = 0,99961; n = 5$	$I_{pc} = 0,48(\pm 0,02) v^{1/2} + 1,26(\pm 0,51)$ $r = 0,99505; n = 5$

Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

Analisando os dados da tabela acima, nota-se que existe uma dependência linear entre I_{pc} e $v^{1/2}$, ou seja, o transporte de massa do seio da solução até a superfície do eletrodo ocorre por difusão. Essa dependência linear, aliada aos outros parâmetros já discutidos, nos sugere que o processo eletródico envolvendo os pares redox das espécies estudadas ocorre de forma quase-reversível, sem reações químicas acopladas, já que a presença destas acarretaria numa dependência não linear entre I_{pc} e $v^{1/2}$ (SOUZA, 2011). Essa avaliação não foi satisfatória para a amina DEPD, pois seus voltamogramas foram obtidos em apenas 3 velocidades de varredura e a curva de apenas três pontos não apresentou linearidade aceitável.

4.16 Estudo teórico

O principal objetivo desse estudo foi avaliar as regiões mais susceptíveis ao ataque dos compostos antioxidantes aos radicais cátions gerados a partir das aminas aromáticas, como também calcular as energias de HOMO e LUMO para essas aminas. No entanto, devido à indisponibilidade de software (em nosso laboratório) para o cálculo de descritores químico-quântico das espécies radicalares não foi possível obter os resultados pretendidos, dessa forma, os dados aqui apresentados são apenas para as aminas.

A influência dos grupos substituintes na distribuição da densidade eletrônica dos compostos químicos interfere em seus potenciais de redução, bem como na estabilidade das

espécies geradas nos processos de transferência de elétron(s). O efeito de grupos substituintes e sua posição em uma série de compostos derivados de um mesmo núcleo podem ser relacionados a seus parâmetros eletroquímicos (PAIVA, et al., 2012), pois a presença de grupos eletro-doadores dificulta o processo de redução, ao passo que a presença de grupos eletro-retiradores facilita esse processo (GOULART, et al., 1997).

Esses efeitos também podem interferir, teoricamente, nas energias de HOMO (orbital molecular ocupado de mais alta energia) e do LUMO (orbital molecular desocupado de mais baixa energia) uma vez que a primeira está associada à oxidação (capacidade de doar elétrons) e a segunda à redução (capacidade de aceitar elétrons) (ARROIO, et al., 2004a).

Sabe-se que quanto maior a energia do HOMO, maior será a quantidade de elétrons presentes e maior será seu potencial anódico (E_{pa}), ao passo que quanto menor a energia do LUMO menor será a resistência para aceitar elétrons (ARROIO, et al., 2004b), aumentando seu caráter eletrofílico, assim terá alto potencial catódico (E_{pc}). Porém, em alguns casos essa relação entre energia dos orbitais de fronteira e potenciais de redução e oxidação não é observada, no entanto ao se utilizar esses parâmetros para calcular a rigidez molecular pode-se obter melhor relação (PAIVA, et al, 2012), uma vez que quanto menor a “*dureza*” ou maior a “*maciez*”, menor a quantidade de energia necessária para a transição de um elétron do HOMO para o LUMO (ARROIO, HONÓRIO, SILVA, 2010).

Desta forma, as energias de HOMO e LUMO calculadas para as aminas estão discriminadas na Tabela 5. Observando os valores das energias para os orbitais de fronteira HOMO, pode-se sugerir que as aminas EHPD, FPD, TMPD e EHMPD eapresentam melhores contribuições destes orbitais, tendo em vista que apresentam valores de energia mais negativos, atuando melhor como doadores de elétrons. Para as estruturas DEPD e DMPD sugere-se o mais baixo caráter eletro-doador e também eletro-aceitador, uma vez que apresentam as mais baixas energias para o HOMO e as mais altas energias para o LUMO, o que as tornam mais difíceis de oxidar ou reduzir.

Tabela 5. *Descritores teóricos químico-quânticos.*

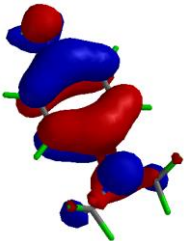
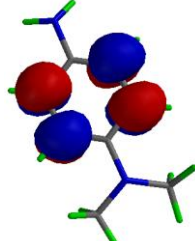
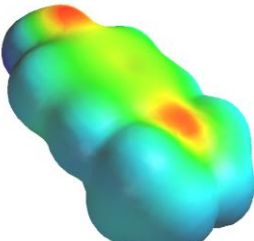
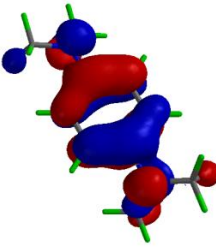
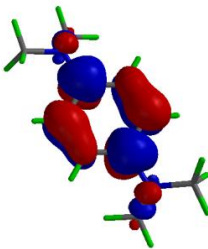
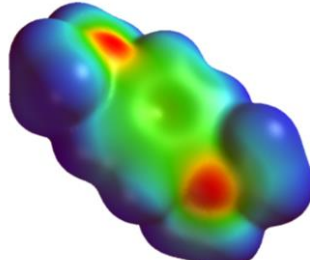
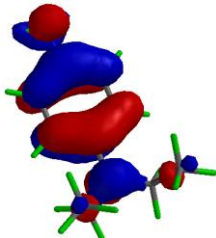
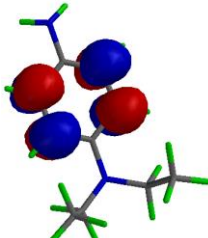
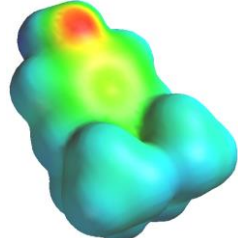
Compostos	E_{HOMO}, (eV)	E_{LUMO}, (eV)
DMPD	-7,78	0,70
TMPD	-8,04	0,57
DEPD	-7,71	0,74
EHPD	-8,34	0,51
EHMPD	-7,91	0,56
FPD	-8,17	0,41

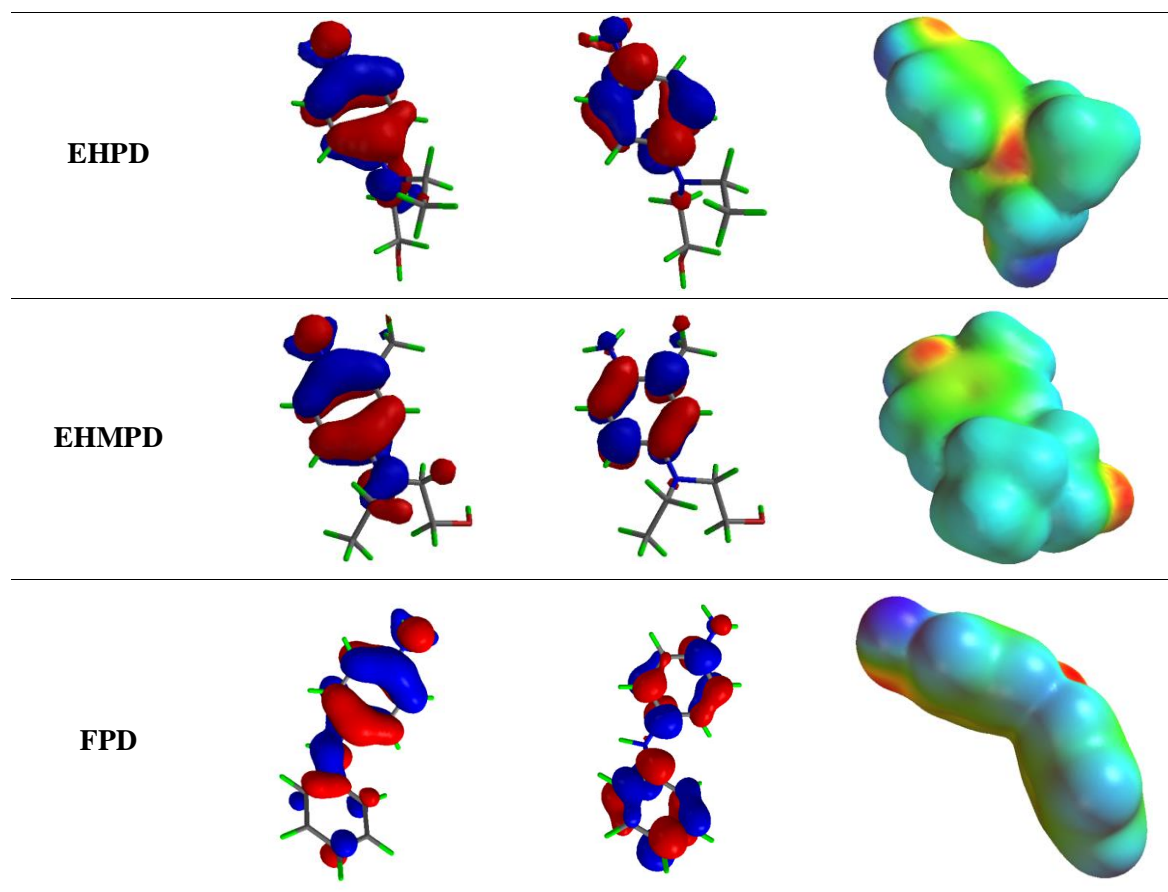
Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

O HOMO é um importante parâmetro eletrônico da estrutura molecular, uma vez que seus coeficientes representam as regiões com capacidade doadora de elétrons, os sítios de reação com um receptor eletrofílico e revela os grupos responsáveis pelo deslocamento de elétrons na estabilização de um radical livre em uma provável reação de transferência de elétrons. A representação dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO, bem como os mapas de potencial eletrostáticos são apresentados na Tabela 6.

A partir da Tabela 6 nota-se que as maiores contribuições do HOMO estão localizadas no anel aromático das aminas e que todas elas apresentam contribuições semelhantes. Em reação ao LUMO, as aminas DMPD e DEPD apresentam as maiores contribuições desse orbital localizada nos carbonos do anel aromático *orto* e *meta* em relação aos substituintes nitrogenados. Em contrapartida, as aminas TMPD, EHPD, EHMPD e FPD localizam suas contribuições em todos os carbonos pertencentes ao anel.

Tabela 6. Orbitais de fronteira HOMO e LUMO e mapas de densidade eletrônica para as estruturas calculadas.

Estruturas	HOMO	LUMO	Mapa de densidade eletrônica
DMPD			
TMPD			
DEPD			



Fonte: Elaborado pela autora, 2014

Os mapas de potencial eletrostático foram obtidos a partir da estrutura geométrica otimizada da molécula, essas superfícies têm valores numéricos classificados por cores que fornecem a posição de potenciais eletrostáticos negativos (tons avermelhados) e positivos (tons azulados). Essas regiões são importantes, pois indicam sítios ativos para determinadas reações a depender da natureza da espécie que poderá reagir com as aminas avaliadas.

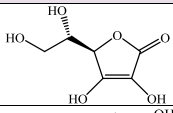
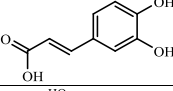
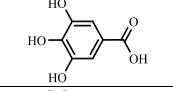
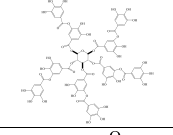
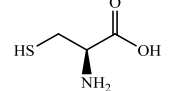
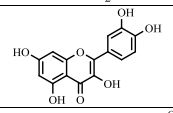
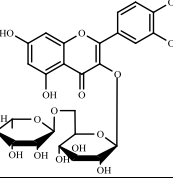
4.17 Reatividade dos radicais DMPD^{•+}, DEPD^{•+}, EHPD^{•+}, EHMPD^{•+} e TMPD^{•+} frente a diferentes compostos redutores e antioxidantes

A avaliação da reatividade dos radicais nas condições otimizadas foi realizada frente a várias espécies com capacidade antioxidante/redutora. Para tanto, foram selecionadas 17 espécies químicas de diferentes classes, como: compostos fenólicos, tiólicos, glicosilados e sais redutores. Nos estudos preliminares se observou que o radical TMPD^{•+} apresentou uma elevada inibição para ácido ascórbico, cistéina e sulfito, porém uma reduzida inibição frente a compostos fenólicos até para elevadas concentrações (ver Tabela 7).

Como, as amostras a serem analisadas apresentam em sua composição preferencialmente compostos fenólicos (vinhos, chás e infusões) esta amina não foi

considerada nos estudos subsequentes. Mas, abre-se a possibilidade do emprego deste radical derivado do TMPD para a determinação de forma seletiva de ácido ascórbico por espectrofotometria na presença de compostos fenólicos. Este método teria uma aplicação singular, pela simplicidade e capacidade de discriminação, visto a limitação das estratégias atuais para determinação de ácido ascórbico quando a amostra apresenta elevados teores de compostos fenólicos, como vinho tinto e chás (verde, preto e branco).

Tabela 7. Dados da avaliação da C_{AO} de compostos puros frente ao $TMPD^{*+}$. Condições: $TMPD$ ($2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão $HAc/NaAc$ ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $pH = 4$); $Fe(III)$ ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em HCl $0,02 \text{ mol L}^{-1}$). Onde não foram incluídos valores, considerou-se a $\%I_{máx}$ nula.

Composto	Estrutura	$C_{máxima}$ avaliada, $mg L^{-1}$	Tempo da análise, min	Tempo de $\%I_{máx}$, min	$\%I_{máx}$
Ácido ascórbico		1,0	10	2	14,7
Ácido cafeico		50	60	-	-
Ácido gálico		50	60	1	0,8
Ácido tânico		50	60	50	8,0
L- Cisteína		10	190	190	58,0
Quercetina		40	60	-	-
Rutina		40	60	-	-
Sulfito de Sódio	Na_2SO_3	10	80	80	76,2

Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

Em função da diferença estrutural dos antioxidantes/redutores avaliados alguns aspectos/propriedades são diferentes, como: grau de hidro ou lipofilicidade, solubilidade em água, complexidade estrutural, potencial redox e distribuição destas espécies nas amostras reais analisadas. Nesta avaliação foram empregados os seguintes compostos: ácido ascórbico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido gálico, ácido tânico, captopril, glutathiona, kaempferol,

L-cisteína, *L*-dopa, *N*-acetilcisteína, *N*-propilgalato, penicilamina, quercetina, rutina, sulfito de sódio e trolox (ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico).

O parâmetro de comparação dos diferentes compostos neste estudo foi o EC₅₀, que é a concentração do antioxidante/redutor capaz de inibir 50% do sinal do radical (referência). Quanto menor o EC₅₀ (μmol L⁻¹), mais eficiente foi o composto frente à sonda avaliada, que neste caso foram os cátions radicais. No entanto, o tempo de reação também deve ser levado em conta, pois foi um parâmetro importante, uma vez que reações muito demoradas acabam comprometendo a frequência analítica do método. Os resultados para este estudo, incluindo o tempo de reação de cada composto com cada sonda, são apresentados nas Tabelas 17 a 20 (Anexo 3), mas um resumo com os valores de EC₅₀ é mostrado na Figura 40.

A partir da observação da Figura 40 é possível perceber que os valores de EC₅₀ para cada antioxidante ou redutor variaram dependendo da sonda utilizada na análise.

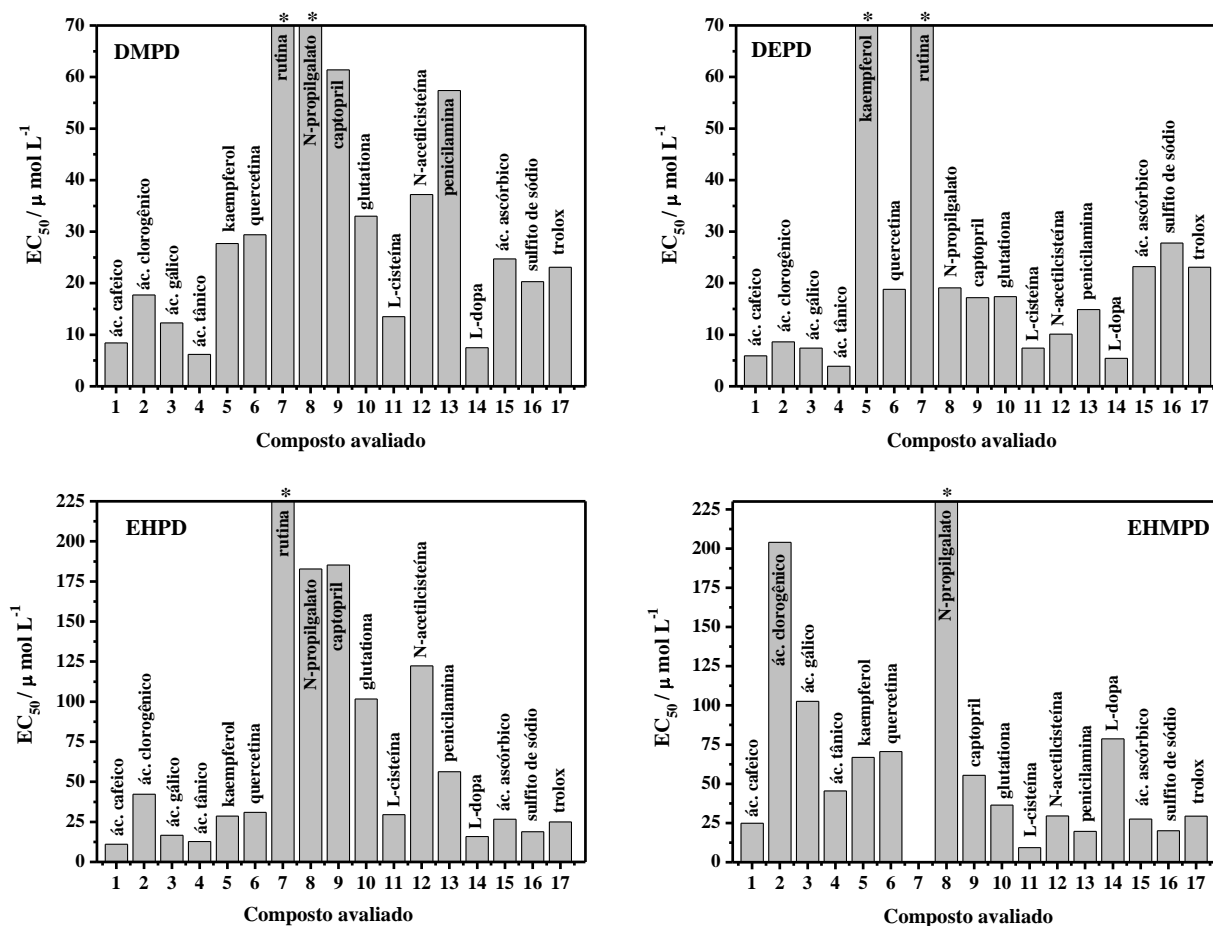
O maior valor obtido de EC₅₀ foi para o *N*-propilgalato reagindo com o EHMPD^{•+}, esse valor foi de 2940,6 μmol L⁻¹. Ao reagir com EHPD^{•+} esse composto apresentou EC₅₀ igual a 182,7 μmol L⁻¹ e reagindo com a sonda DMPD^{•+} o EC₅₀ observado foi 139,2 μmol L⁻¹, no entanto para a sonda DEPD^{•+} o EC₅₀ apresentou um valor pequeno comparado aos resultados anteriores, 19,1 μmol L⁻¹. O *N*-propilgalato é um éster do ácido gálico, onde o hidrogênio ácido do ácido gálico foi substituído por um grupo propila. Ao se comparar o EC₅₀ do ácido em questão com o do éster percebe-se a importância do hidrogênio do grupo ácido na desativação de radicais, visto que o ácido gálico mostra-se muito mais eficiente que o *N*-propilgalato na inibição de todas as sondas propostas.

Nesta avaliação os ácidos fenólicos (compostos de 1 a 5) apresentaram os melhores (menores) valores de EC₅₀ ao reagir com a sonda DEPD^{•+}, seguida da DMPD^{•+}, EHPD^{•+} e por último EHMPD^{•+}. Dentre todos eles o ácido clorogênico sempre apresentou concentração eficiente mais alta, sendo que para o EHMPD^{•+} os ácidos clorogênico e gálico reagiram de forma menos eficiente que todos os outros ácidos fenólicos avaliados.

Outro antioxidante avaliado que se mostrou pouco eficiente frente às sondas investigadas foi a rutina, isso aconteceu para todos os radicais testados, apresentando os seguintes valores de EC₅₀: 823,9; 108,1 e 1212,0 μmol L⁻¹ para as sondas DMPD^{•+}, DEPD^{•+} e EHPD^{•+}, respectivamente. A rutina reagiu discretamente com a sonda EHMPD^{•+}, para a qual uma solução de 100 mg L⁻¹ do antioxidante apresentou uma inibição de apenas 2,3%. Ao passo que a rutina apresentou EC₅₀ mais baixo para a sonda DEPD^{•+}, outro composto lipossolúvel, o kaempferol teve o EC₅₀ mais alto ao reagir com a mesma sonda, sendo esse valor igual a 101,0 μmol L⁻¹. Essas observações corroboram com a ideia de que as aminas

reagem de forma diferente com as mesmas espécies nas mesmas condições, pois possuem propriedades químicas distintas como foi mostrado nos estudos teóricos e eletroquímicos. No entanto apresentam a mesma tendência em reagir melhor com compostos hidrofílicos que lipofílicos.

Figura 40. Valores de EC_{50} para os compostos avaliados a partir da reação com as sondas espectrofotométricas propostas. Os compostos marcados com asterisco apresentaram valores de EC_{50} acima da escala estabelecida para os gráficos.



*valores reais encontram-se nas Tabelas 18 a 21 no Anexo 4.

Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

Entre os compostos tiólicos avaliados, captopril e glutatona apresentaram reatividade semelhante para as sondas $DMPD^{\bullet+}$ e $EHMPD^{\bullet+}$, sendo menos eficiente frente ao cátion radical $EHPD^{\bullet+}$ e mais eficiente ao inibir o $DEPD^{\bullet+}$. Outro antioxidante tiólico que foi menos eficiente ao reagir com o cátion radical $EHPD^{\bullet+}$ foi a *L*-cisteína, esta também apresentou melhor EC_{50} frente o $DEPD^{\bullet+}$, essa última observação também é válida para *N*-acetilcisteína, penicilamina e *L*-dopa, esta não é um composto tiólico, mas apresentou um comportamento similar ao reagir com $DEPD^{\bullet+}$.

Os compostos de números 15, 16 e 17, nomeadamente ácido ascórbico, sulfito de sódio e trolox inibiram com eficiência semelhante todos os radicais, o que indica que a estrutura química dessas sondas não interferiu no poder antioxidante/redutor desses compostos.

Em suma, a sonda $\text{DEPD}^{\bullet+}$ foi inibida de forma mais eficiente por todos os antioxidantes avaliados, uma vez que ao reagir com ela, os compostos apresentaram, em geral, menores valores de EC_{50} , a exceção foi o kaempferol que inibiu de forma mais eficiente o $\text{DMPD}^{\bullet+}$ e o sulfito de sódio que apresentou menor EC_{50} para o $\text{EHPD}^{\bullet+}$.

4.18 Figuras de mérito para o método proposto

Após a otimização das variáveis (químicas e físicas) do método espectrofotométrico proposto para determinação da C_{AO} foram estabelecidas as figuras de mérito para todas as sondas avaliadas.

Para a obtenção das figuras de mérito para a espécie modelo ($\text{DEPD}^{\bullet+}$) foram selecionadas quatro moléculas em função do tamanho da estrutura, classe (composto fenólico ou não), grau de hidro ou lipofilicidade e distribuição nos alimentos analisados. Como já demonstrado, o radical $\text{DEPD}^{\bullet+}$ foi inibido frente às moléculas com reconhecida atividade antioxidante, sendo que as moléculas selecionadas para este estudo foram AA, AG, AT e QC, uma vez que estas foram também usadas durante o desenvolvimento e otimização do método.

Para obtenção das figuras de mérito das outras sondas, foi empregado apenas o AG, com exceção da sonda $\text{EHMPD}^{\bullet+}$, para a qual o padrão foi o trolox (TR), pois a inibição do AG frente a esse cátion radical apresentou sensibilidade muito baixa (coeficiente angular igual a $2,9 \pm 0,4$).

Os limites de detecção (LOD) foram calculados em função dos sinais de absorvância e os limites de quantificação (LOQ) foram expressos considerando-os como sendo o primeiro ponto da curva analítica. O desvio padrão relativo (RSD) foi calculado para valores de concentração nos extremos da curva, visto que são as regiões com maior erro instrumental.

A Tabela 8 mostra os resultados obtidos para todas as sondas avaliadas, considerando o tempo de reação entre a sonda e o padrão utilizado, faixa linear, equação da curva, linearidade, RSD, LOD e LOQ. Como pode ser observado na Tabela 8 a faixa linear mais larga (mg L^{-1}) foi registrada ao se utilizar $\text{DEPD}^{\bullet+}$ como sonda e AA como padrão, no entanto a maior sensibilidade obtida foi para a mesma sonda utilizando como padrão o AG, dessa forma o AG foi selecionado como padrão para o método do DEPD proposto neste trabalho, além de ser amplamente distribuído nos alimentos na forma de AG ou como derivado.

Tabela 8. Figuras de mérito para compostos com atividade antioxidantes avaliados frente aos radicais cátions $DMPD^{+}$, $DEPD^{+}$, $EHPD^{+}$ e $EHMPD^{+}$.

Amina	Padrão	Tempo, min	Faixa linear, $mg L^{-1}$	Curva $\%I = aC_{AO} + b$	r	RSD, %	LOD, $mg L^{-1}$	LOQ, $mg L^{-1}$
DMPD	Ácido gálico	60	0,2 – 1,2	$\%I = 23,0(\pm 0,7)C_{AO} + 3,6(\pm 0,5)$	0,9983	0,6 – 1,0	0,0002	0,04
	Ácido gálico	30	0,1 – 1,25	$\%I = 50,4(\pm 1,2)C_{AO} + 3,0(\pm 0,8)$	0,9978	0,9 – 5,5	0,0002	0,1
	Ácido tânico	20	0,1 – 6,0	$\%I = 7,46(\pm 0,20)C_{AO} + 0,64(\pm 0,60)$	0,9997	0,7 – 2,15	0,002	0,1
DEPD	Ácido ascórbico	5	0,5 – 7,5	$\%I = 12,7(\pm 0,1)C_{AO} - 2,3(\pm 0,6)$	0,99953	1,2 – 9,2	0,001	0,5
	Quercetina	20	1,0 – 4,0	$\%I = 7,7(\pm 0,4)C_{AO} + 4,9(\pm 0,7)$	0,9967	0,9 – 1,0	0,001	1,0
EHPD	Ácido gálico	30	0,2 – 1,4	$\%I = 20,4(\pm 0,7)C_{AO} - 0,1(\pm 0,7)$	0,9999	1,0 – 1,9	0,0004	0,2
EHMPD	Trolox	30	0,5 – 5,0	$\%I = 7,6(\pm 0,1)C_{AO} + 1,0(\pm 0,3)$	0,9995	0,7 – 0,9	0,0005	0,5

Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

4.19 Análise das amostras

Para a aplicação do método proposto foram selecionadas amostras de chá, infusão e vinho (tinto e branco), estas foram utilizadas por apresentarem, em sua composição, compostos com reconhecida ação antioxidante. Essas amostras foram analisadas pelo método proposto (utilizando as sondas $\text{DMPD}^{\bullet+}$, $\text{DEPD}^{\bullet+}$, $\text{EHPD}^{\bullet+}$ e $\text{EHMPD}^{\bullet+}$) e pelos os métodos DPPH, ABTS e Folin-Ciocalteu, destacando que para comparação com a sonda $\text{DEPD}^{\bullet+}$ foi realizado também o ensaio de Folin-Denis. Os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 10 e 11.

Com o objetivo de avaliar a concordância do método proposto com os métodos comumente reportados para determinação da C_{AO} em alimentos, aos resultados obtidos foi aplicada uma análise de correlação linear para um intervalo de 95% de confiança. Essa análise avalia o grau de associação entre as variáveis X e Y, no nosso caso X foi sempre os resultados relativos ao método proposto e a variável Y corresponde aos resultados dos métodos da literatura. Quanto mais a distribuição dos valores, relativos a regressão linear das variáveis X e Y, se aproximar de uma tendência linear melhor será a correlação dos resultados e mais concordantes os métodos podem ser considerados. Para isso o coeficiente de correlação linear (r) deve ser $-1 \leq r \leq 1$, onde (-1) indica máxima correlação negativa e (+1) máxima correlação positiva. Os coeficientes angulares e lineares também são parâmetros importantes neste tipo de correlação, uma vez que uma correlação é considerada perfeita quando se tem o coeficiente angular igual à unidade e o linear próximo a um valor nulo (MILLER, MILLER, 2005).

Os resultados apresentaram correlação sempre positiva, o que indica que quanto maior a capacidade antioxidante para os métodos DPPH e ABTS, maior também a capacidade antioxidante para os métodos utilizando as sondas propostas. Da mesma forma, as correlações para FC e FD indicaram que quanto maior a concentração de fenólicos totais nas amostras maior é a capacidade antioxidante estimada pelo método proposto, para todas as sondas.

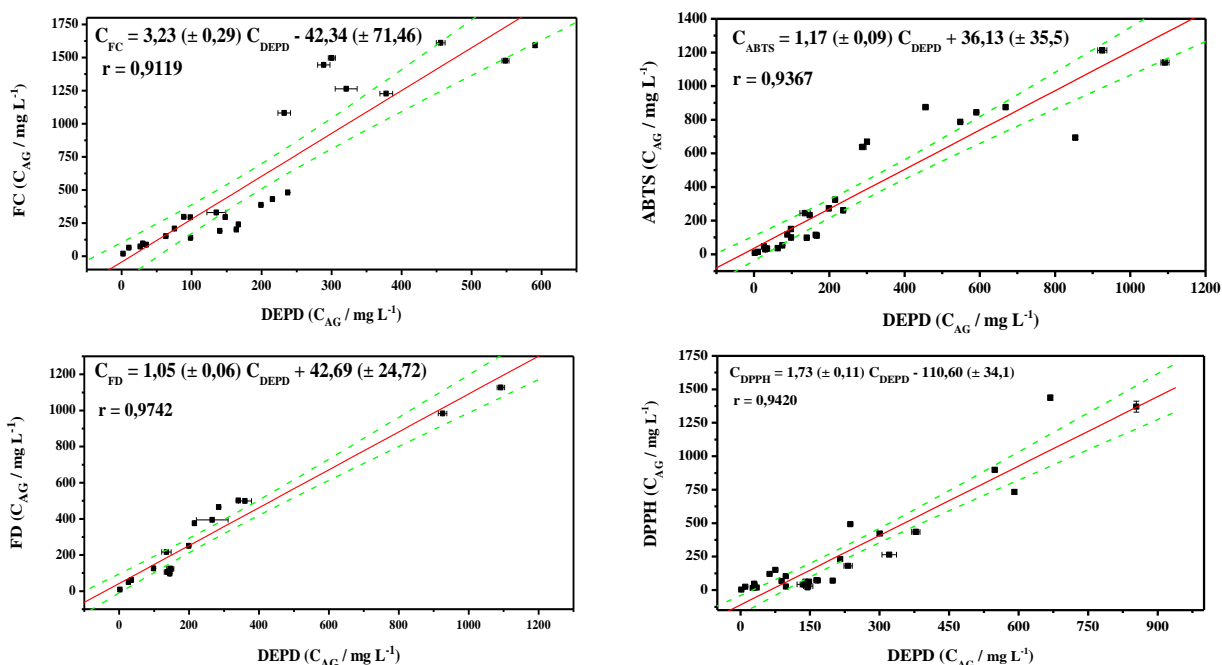
O coeficiente de correlação linear (r) obtido foi próximo à unidade ($r > 0,9000$) para a maioria dos ensaios, no entanto, as correlações entre EHMPD e ABTS ($r = 0,8797$) e EHMPD e Folin-Ciocalteu ($r = 0,8415$) apresentaram os menores coeficientes. Deve-se levar em consideração que para essa amina o padrão utilizado foi trolox, enquanto para os outros ensaios se empregou ácido gálico. A mudança na utilização do padrão pode ter influenciado esses resultados uma vez, que esses antioxidantes podem reagir de forma diferente dependendo de suas propriedades químicas, contudo a tendência foi mantida.

Os resultados obtidos na análise de correlação das amostras estão na Tabela 9.

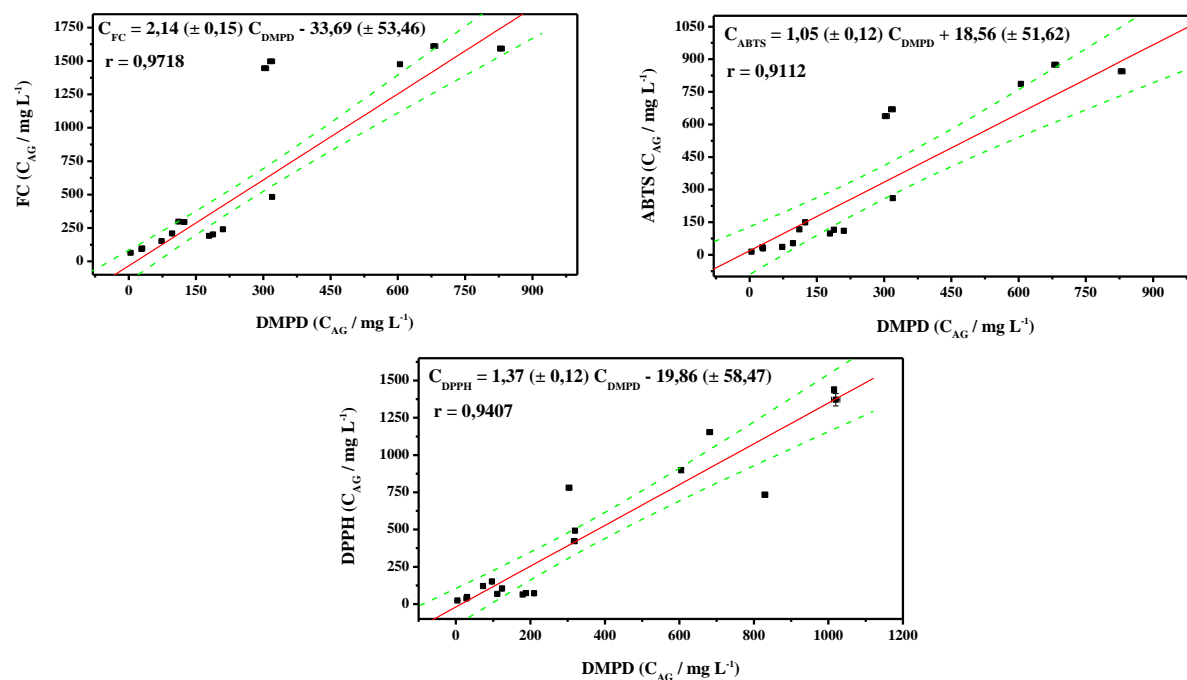
Para o método DEPD foi realizado um número maior de análises, pelo fato dessa molécula ter sido utilizada como modelo desde o início do trabalho. Durante o procedimento de avaliação, algumas amostras apresentaram-se fora do intervalo de confiança, sendo consideradas *outlier*.

Tabela 9. Análise de correlação (para um intervalo de 95% de confiança) entre o método proposto nas condições ótimas e os métodos avaliados, sendo $14 \leq N \leq 30$. As linhas laterais (pontilhadas) indicam o intervalo de 95% de confiança e a linha central a tendência de distribuição linear dos resultados.

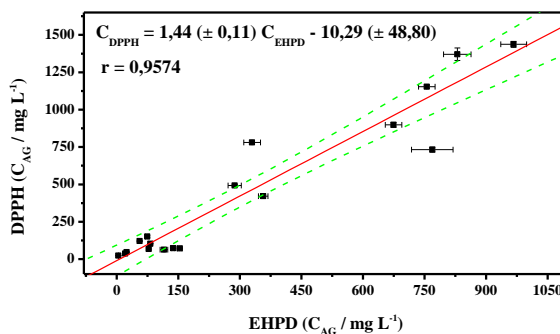
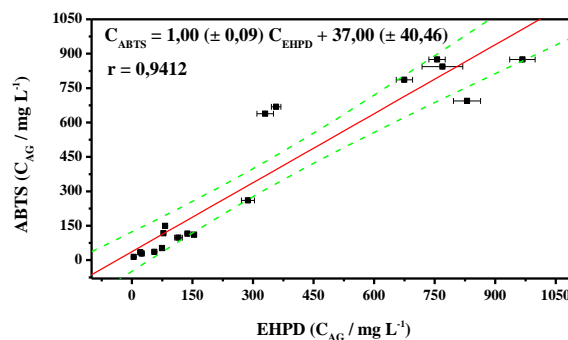
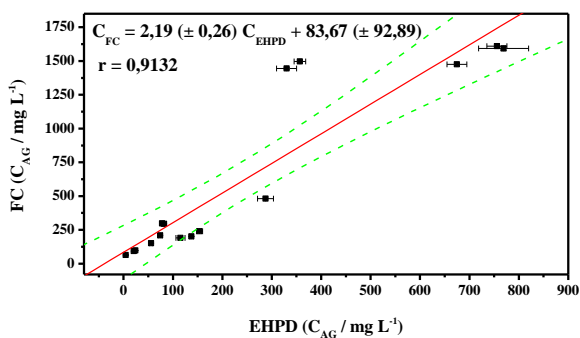
Método do DEPD (proposto)



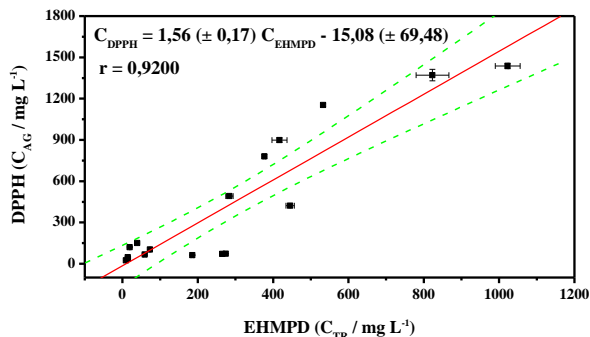
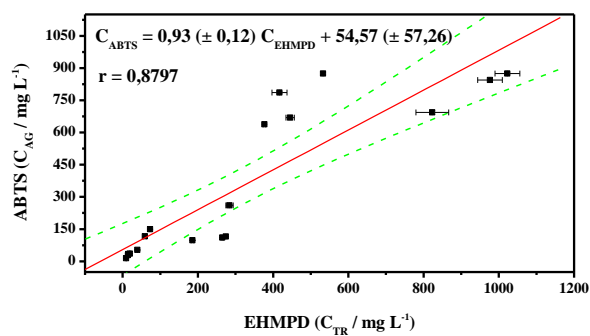
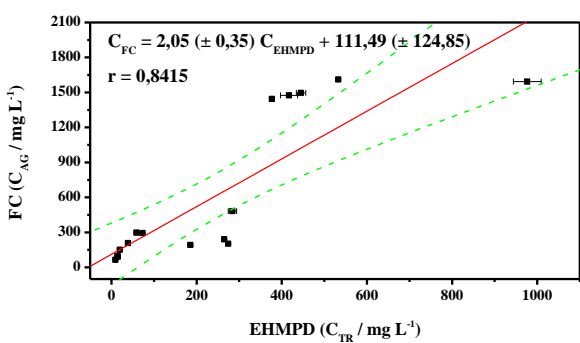
Método do DMPD (proposto)



Método do EHPD (proposto)



Método do EHMPD (proposto)



Fonte: Elaborado pela autora, 2014

Tabela 10. Determinação da capacidade antioxidante (expressos em mg L^{-1} de ácido gálico) em bebidas empregando o método proposto (DEPD), DPPH, ABTS, Folin-Denis e Folin-Ciocalteu.

Amostra	Bebida	Tipo	Concentração, mg L^{-1} de AG				
			DEPD	FD	FC	DPPH	ABTS
1	Vinho	Branco	154 ± 2	$97,0 \pm 0,1$	-	$19,3 \pm 0,8$	-
2	Vinho	Branco	146 ± 10	125 ± 3	-	$29,6 \pm 2,0$	-
3	Vinho	Branco	$137,6 \pm 8,7$	106 ± 7	-	$41,4 \pm 16,7$	-
4	Vinho	Branco	148 ± 1	119 ± 2	295 ± 1	$62,9 \pm 0,9$	232 ± 3
5	Vinho	Branco	135 ± 13	216 ± 1	330 ± 1	$42,6 \pm 1,7$	244 ± 3
6	Vinho	Branco	200 ± 2	$250 \pm 0,5$	387 ± 1	$69,7 \pm 5,2$	273 ± 3
7	Vinho	Tinto	360 ± 18	499 ± 2	-	$52,0 \pm 1,0$	-
8	Vinho	Tinto	285 ± 5	645 ± 2	-	220 ± 59	-
9	Vinho	Tinto	266 ± 45	395 ± 2	-	123 ± 27	-
10	Vinho	Tinto	341 ± 5	501 ± 2	-	146 ± 31	-
11	Vinho	Tinto	378 ± 9	800 ± 2	1227 ± 10	435 ± 20	976 ± 25
12	Vinho	Tinto	232 ± 9	700 ± 5	1082 ± 6	180 ± 1	777 ± 12
13	Vinho	Tinto	320 ± 16	805 ± 1	1263 ± 6	264 ± 1	894 ± 12
14	Infusão	Carqueja	$98,3 \pm 1,5$	126 ± 1	139 ± 1	$26,6 \pm 0,0$	100 ± 3
15	Infusão	Erva Doce	$26,6 \pm 0,4$	$50,4 \pm 1,0$	$73,6 \pm 0,2$	$15,2 \pm 0,6$	$46,4 \pm 1,0$
16	Infusão	Cidreira	$1,98 \pm 0,1$	$8,01 \pm 0,04$	$19,3 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,1$	$8,4 \pm 0,1$
17	Infusão	Camomila	$35,0 \pm 0,7$	$61,3 \pm 0,5$	$87,1 \pm 0,2$	$18,3 \pm 1,0$	$33,1 \pm 0,1$
18	Chá	Branco	1092 ± 11	1127 ± 2	1067 ± 3	625 ± 16	1142 ± 3
19	Chá	Preto	215 ± 2	376 ± 1	432 ± 2	231 ± 16	324 ± 6
20	Chá	Verde	925 ± 12	983 ± 4	1117 ± 1	694 ± 16	1213 ± 13

Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

Tabela 11. Determinação da capacidade antioxidante em bebidas empregando o método proposto (DMPD, DEPD, EHPD e EHMPD), DPPH, ABTS e Folin-Ciocalteu (FC).

Amostra	Bebida	Tipo	Concentração, mg L ⁻¹ de Trolox			Concentração, mg L ⁻¹ de AG			
			EHMPD	DEPD	EHPD	DMPD	FC	DPPH	ABTS
21	Vinho	Branco	185 ± 3	140 ± 1	115 ± 9	179 ± 1	180 ± 1	63,1 ± 1,7	98,2 ± 0,7
22	Vinho	Branco	265 ± 3	167 ± 1	154 ± 6	210 ± 1	229 ± 1	71,9 ± 2,2	110 ± 1
23	Vinho	Branco	274 ± 1	164 ± 2	138 ± 4	188 ± 1	191 ± 1	73,2 ± 1,1	115 ± 1
24	Vinho	Branco	73,0 ± 2,0	98,0 ± 1	82,2 ± 4,1	124 ± 2	284 ± 1	103 ± 1	149 ± 1
25	Vinho	Branco	59,1 ± 4,0	88,8 ± 1,0	78,2 ± 4,1	111 ± 1	287 ± 3	67,4 ± 5,3	117 ± 1
26	Vinho	Tinto	417 ± 20	548 ± 4	675 ± 20	605 ± 1	1421 ± 6	899 ± 14	786 ± 2
27	Vinho	Tinto	533 ± 1	456 ± 5	756 ± 20	681 ± 1	1556 ± 6	1153 ± 8	875 ± 5
28	Vinho	Tinto	976 ± 33	591 ± 1	769 ± 51	830 ± 8	1538 ± 14	733 ± 14	844 ± 2
29	Vinho	Tinto	445 ± 11	300 ± 4	357 ± 12	317 ± 8	1442 ± 5	421 ± 11	669 ± 1
30	Vinho	Tinto	377 ± 3	289 ± 7	330 ± 20	304 ± 8	1390 ± 6	781 ± 10	638 ± 1
31	Infusão	Cidreira	9,3 ± 0,1	10,4 ± 0,1	4,28 ± 0,11	4,2 ± 1,0	62,1 ± 2,5	24,1 ± 0,6	14,5 ± 0,1
32	Infusão	Carqueja	19,5 ± 1,1	63,1 ± 0,2	55,7 ± 3,2	73,2 ± 1,4	143 ± 2	121 ± 3	36,0 ± 0,4
33	Infusão	Hortelã	39,0 ± 0,1	75,5 ± 0,1	74,3 ± 4,2	96,9 ± 1,2	201 ± 2	151 ± 6	52,8 ± 0,4
34	Infusão	Erva Doce	14,4 ± 1,3	29,9 ± 0,2	24,2 ± 1,2	30,2 ± 0,3	91,4 ± 0,5	47,3 ± 2,7	29,0 ± 0,3
35	Infusão	Camomila	15,1 ± 1,0	30,2 ± 0,1	20,7 ± 1,1	28,8 ± 0,4	86,8 ± 0,5	37,0 ± 1,8	33,7 ± 0,2
36	Chá	Branco	1023 ± 33	669 ± 1	967 ± 32	1015 ± 1	981 ± 10	1437 ± 16	875 ± 5
37	Chá	Preto	284 ± 10	237 ± 2	287 ± 16	320 ± 1	465 ± 1	492 ± 5	260 ± 3
38	Chá	Verde	823 ± 44	854 ± 1	830 ± 34	1020 ± 11	708 ± 3	1371 ± 34	694 ± 8

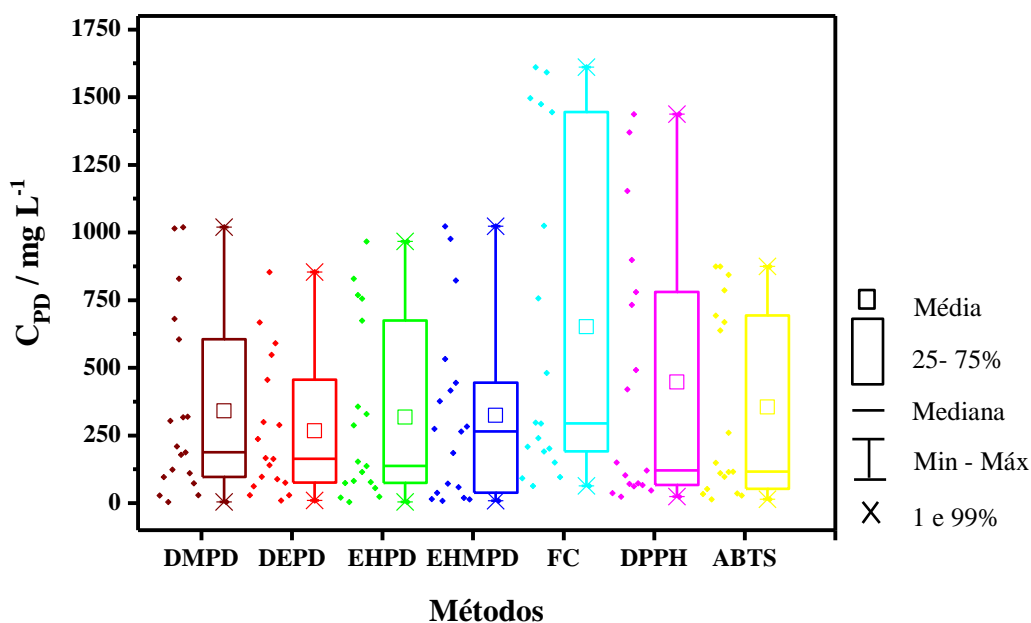
Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

Outra forma de visualizar a distribuição dos resultados é através do gráfico de caixas mostrado na Figura 41, mais conhecido como *boxplot*, esse tipo de gráfico mostra a dispersão dos resultados, o que é importante para o conjunto de amostras analisadas neste trabalho, uma vez que a concentração de compostos antioxidantes nessas amostras é bem variável, sendo maiores para vinhos tintos e chás verde e branco e bem menores para as infusões de cidreira, camomila e erva doce.

O método FC apresentou, em geral, valores maiores em relação aos outros métodos, isso pode ser reflexo da baixa seletividade do método, o qual apresenta uma série de interferentes que estão presentes na maioria das amostras analisadas, como açúcares, compostos nitrogenados e ácidos orgânicos, os quais podem facilmente reduzir o Mo(VI) a Mo(V). Mas também se deve levar em consideração o potencial de redução desse reagente, para que o processo de redução ocorra.

Todas as sondas propostas neste trabalho apresentaram uma distribuição dos resultados semelhante. Em relação ao método DPPH, nota-se que a maior parte das amostras apresentou seus resultados bem abaixo do valor médio e os valores acima da média foram muito dispersos, chegando a apresentar dispersão semelhante ao método FC, no entanto valores mais baixos foram observados.

Figura 41. Gráfico *boxplot* para os resultados das amostras obtidos pelas sondas propostas (DMPD, DEPD, EHPD e EHMPD) e os métodos FC, DPPH e ABTS. Os resultados foram expressos em equivalentes do padrão (PD) utilizado em cada método, sendo AG (mg L^{-1}) para todas as sondas, exceto EHMPD onde empregou-se TR (mg L^{-1}). Sendo $N = 18$ e os valores reais apresentados na Tabela 11.



Apesar das sondas avaliadas atuarem principalmente através do mecanismo de transferência de átomos de hidrogênio (TAH) nas condições da análise, os resultados obtidos apresentaram dispersão mais similares ao ABTS que atua por transferência de elétrons, do que ao DPPH, que atua preferencialmente por TAH. Este fato pode está associado ao fato do DPPH reagir bem com espécies hidro e lipofílicas (mas tendo maior afinidade pelas lipofílicas), características que as sondas avaliadas não possuem. Assim, este pode ter sido o motivo pelo qual o DPPH apresentou resultados maiores para algumas amostras.

Conclusões

5 CONCLUSÕES

As sondas espectrofotométricas propostas neste trabalho para a determinação da capacidade antioxidante em amostras de bebidas foram empregadas em amostras de vinhos (branco e tinto), chás e infusões de algumas ervas, apresentando resultados concordantes com métodos propostos na literatura, tanto para a determinação da C_{AO} (DPPH e ABTS) quanto para a determinação da concentração de compostos fenólicos totais (FD e FC). Os resultados obtidos para as amostras analisadas pelo método de Folin-Ciocalteu foram, em geral, superiores aos obtidos para as mesmas amostras ao se utilizar as sondas propostas. Mas isso não quer dizer que os métodos não sejam concordantes, visto que neste tipo de metodologia o que se espera é que os ensaios apresentem uma mesma tendência e correlação, o que foi observado não apenas para o FC, mas também para DPPH e ABTS e FD, para os quais as sondas propostas se mostraram mais concordantes.

Apesar de concordante com outros métodos, o ensaio aqui proposto apresenta algumas limitações mesmo nas condições otimizadas, uma delas é a instabilidade do sinal analítico do branco, uma vez que com o prosseguimento da oxidação das aminas, com Fe(III), elas podem se dimerizar levando a redução do sinal de absorvância. Isso define o tempo de geração dos radicais como um fator crucial para o sucesso do ensaio. Outra limitação é a redução da sensibilidade do método quando alguns solventes orgânicos estão presentes no meio reacional (quando AG é o padrão), contudo isso não inviabiliza a utilização do método, mas para que ele seja aplicado, a amostra deve ser previamente diluída para que a concentração de solvente (não aquoso) seja mínima. Outro fator que deve ser considerado é a oxidação da amina causada pelo oxigênio atmosférico, o que é mais intenso quando a amina utilizada é EHMPD e/ou DMPD.

Utilizando as sondas propostas nas condições otimizadas foi possível determinar a atividade antioxidante de 17 compostos puros, sendo que os compostos mais hidrofílicos apresentaram, em geral, maior atividade. Em virtude disso, na obtenção das figuras de mérito para a DEPD (composto modelo) foram selecionados quatro compostos com hidrofiliidade diferentes (AA, AG e AT e QC). A menor faixa linear foi obtida para o AG (0,10 – 1,25 mg L⁻¹) e a maior para o AA (0,5 – 7,5 mg L⁻¹), os valores de LOD variaram de 0,0002 mg L⁻¹ (para AG) a 0,002 mg L⁻¹ (para AT) e o RSD variou de 0,9 a 9,2%. Para as sondas DMPD e EHPD utilizou-se apenas AG para obtenção das figuras de mérito e para EHMPD o composto utilizado foi o trolox. As sondas apresentaram faixas lineares variáveis sendo a maior para

EHMPD ($0,5 - 5,0 \text{ mg L}^{-1}$ em equivalente de TR) e a menor foi para DMPD ($0,2 - 1,2 \text{ mg L}^{-1}$ em equivalente de AG). Os valores de RSD obtidos foram todos inferiores a 2,0%, indicando boa precisão analítica. Para todos os cátions radicais e todos os padrões, o valor considerado como LOQ foi o primeiro ponto da curva analítica.

Referências

6 REFERÊNCIAS

- ALBERTI, A. et al. The radical cation of *N,N*-diethyl-para-phenylenediamine: A possible indicator of oxidative stress in biological samples. **Research on Chemical Intermediates**, v. 26, n. 3, 253 – 267, 2000.
- ALCAÍNO, H. et al. Ácido úrico: una molécula con acciones paradójicas en la insuficiencia cardíaca. **Revista Médica de Chile**; v. 139, 505-515, 2011.
- ALI, K, et al. Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 3, 357–378, 2010.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, 2202-2210, 2010.
- ALVES, W. A. et al. Equilibria and Catalytic Properties of a Chloro-Bridged Diimine Copper(II) Complex in the *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD) Oxidation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 6, 872-883, 2004.
- AMBROSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, 233-243, 2006.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, v. 350, 103-108, 1996.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, 232-240, 2007.
- ANTOLOVICH, M. et al. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **Analyst**, v. 125, 989 - 1009, 2000.
- ANVISA. Portaria n. 519 de 26 de junho de 1998. Diário oficial, Brasília, 26 junho de 1998. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/portarias/519_98.htm>. Acesso em: junho de 2014.
- 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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, 7970-7981, 2004.
- APPEL, H. M. et al. Limitations of folin assays of foliar phenolics in ecological studies. **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, n. 4, 2001.
- ARAÚJO, R. O. et al., Avaliação biológica de *Foeniculum vulgare* (Mill.) (Umbelliferae/Apiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, 257-263, 2013.

- ARROIO, A. et al. A density functional theory study on the role of electronic properties in the antioxidant activity of the ajoene molecule. **Internet Electronic Journal of Molecular Design**, v. 3, n. 6, 308–315, 2004.
- ARROIO, A. et al. A Theoretical study on the chemopreventive activity of flavonoid compounds. **Internet Electronic Journal of Molecular Design**, v. 3, n. 12, 781–788, 2004.
- ARROIO, A.; HONÓRIO, K. M.; SILVA, A. B. F. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. **Química Nova**, v. 33, n. 3, 694 - 699, 2010.
- ARTS, M. J.T.J. et al. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. **Food Chemistry**, v. 88, 567–570, 2004.
- AUGUSTO, O. **Radicais livres: bons, maus e naturais**. São Paulo: Oficina de Textos, 2006.
- BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **The American Journal of Medicine**, v. 109, 33 – 44, 2000.
- BABIOR, B. M. Superoxide: a two-edged sword. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, 141-155, 1997.
- BAI, N. Flavonoids and Phenolic Compounds from *Rosmarinus officinalis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, 5363–5367, 2010.
- BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M. H.G.; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o que aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Química Nova**, v. 29, n. 6, 1352-1360, 2006.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2. ed. New York: Wiley, 2001.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. N.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, 113-123, 2006.
- BEHLING, E.B. et al. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 3, 285-292, 2004.
- BELTRÁN-OROZCO, M. C. et al. Ascorbic acid, phenolic content, and antioxidant capacity of red, cherry, yellow and white types of pitaya cactus fruit (*Stenocereus stellatus* Riccobono). **Agrociencia**, v. 43, n. 2, 153 – 161, 2009.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- BERGER, P. et al. Ozone and hydroxyl radicals induced oxidation of glycine. **Water Research**, v. 33, n. 2, pp 433 – 441, 1999.

- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, 123-130, maio/ago., 1999.
- BLAIR, I. A. Lipid hydroperoxide-mediated DNA damage. **Experimental Gerontology**, v. 36, 1473 – 1481, 2001.
- BORELLI, R. C. et al. Characterization of a new potential functional ingredient: coffee silverskin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, 1338–1343, 2004.
- BRAMLEY, P. M. et al. Review Vitamin E. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, 913 – 938, 2000.
- BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, 317-333, 1998.
- BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações**. Oxford University Press, 1996, v.5.
- BROINIZI, P. R. B., et al. Propriedades antioxidantes em subproduto do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.): efeito sobre a lipoperoxidação e o perfil de ácidos graxos poliinsaturados em ratos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, 2008.
- BRUICE, P. Y. Química Orgânica. 4. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006. v. 1.
- BUDEL, J. M; DUARTE, M. R; SANTOS, C. A. M. Parâmetros para análise de carqueja: comparação entre quatro espécies de *Baccharis* spp. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, 2004.
- BUETTNER, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, n. 2, 535 – 543, 1993.
- BUICO, A. et al. Oxidative stress and total antioxidant capacity in human plasma. **Redox Report**, v. 14, n. 3, 125 – 131, 2009.
- CABRITA, J. M.; SILVA, J. R.; LAUREANO, O. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. **I Seminário Internacional de Vitivinicultura**. Ensenada, México. 2003.
- CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, 749–760, 1997.
- CARLSSON, K.; MOBERG, L.; KARLBERG, B. The miniaturisation of the standard method based on the N,N'-diethyl-p-phenylenediamine (DPD) reagent for the determination of free or combined chlorine. **Water Research**, v. 33, n. 2, 375 - 380, 1999.
- CARNEIRO, J. M. T. et al. Spectrophotometric catalytic determination of Fe(III) in estuarine waters using a flow-batch system. **Analytica Chimica Acta**, v. 455, 327 – 333, 2002.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 441-449, 2007.

CHAGAS, M. P. Exploiting iminoquinone free radical production for thiol based drugs determination in pharmaceutical formulations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 9, 1646-1652, 2009.

CORRAL-AGUAYO, R. D. et al. Correlation between some nutritional components and the total antioxidant capacity measured with six different assays in eight horticultural crops. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n.22, 10498-10504, 2008.

COSTA, D. et al. Singlet oxygen scavenging activity of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Redox Report**, v. 13, n. 4, 153 - 160, 2008.

COSTA, D.; GOMES A.; LIMA, J. L.F.C.; FERNANDES, E. Singlet oxygen scavenging activity of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Redox Report**, v. 13, n. 4, 153 - 160, 2008.

COSTA, P. P.; SILVA, D. C. Uma Xícara (chá) de Química. **Revista Virtual Química**, v. 3, n. 1, 27 - 36, 2011.

DALLNER, G.; SINDELAR, P. J. Regulation of ubiquinone metabolism. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, 285–294, 2000.

DIAS, L. F. T. et al., Atividades antiúlcera e antioxidante *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, 309-314, 2009.

DO NASCIMENTO, P. C. Monitoring of free chlorine in dialysis fluids using the spectrophotometric N,N-diethyl-p-phenylenediamine (DPD) method and multivariate calibration. **Analytical Letters**, v. 35, n. 15, 2617–2630, 2002.

DOROSHOW, J.H. Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. **Cancer Research**, Baltimore, v.43, n.2, 460-472, 1983.

EGER, I. **Potencial quimioterapêutico de diferentes derivados do ácido gálico para o tratamento da infecção pelo Trypanosoma Cruzi: avaliação in vitro e in vivo**. 2011. 127 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 2010.

EL-AGAMERY, A. et al. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 430, 37–48, 2004.

ESPOSITO, F. et al. Moderate coffee consumption increases plasma glutathione but not homocysteine in healthy subjects. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 17, 595–601, 2003.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. v 1, 5. ed. Brasília, 2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1.pdf> Acesso em: abril de 2014.

- FAURÉ, M. et al. Antioxidant activities of lignans and flavonoids. **Phytochemistry**, v. 29, n. 12, 3773-3775, 1990.
- FIORE, A. et al. Antioxidant activity of pasteurized and sterilized commercial red orange juices. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 49, 1129 – 1135, 2005.
- FOGLIANO, V. et al. Method for Measuring Antioxidant Activity and Its Application to Monitoring the Antioxidant Capacity of Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 47, 1035–1040, 1999.
- FOLIN, O.; DENIS, W. A colorimetric method for determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 22, 305 - 308, 1915.
- FOLIN, O.; DENIS, W. On phosphotungstic-phosphosmolybdic compounds as color reagents. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 12, 239 - 243, 1912.
- FOLIN, O.; MACALLUM, A. B. On the determination of ammonia in urine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 11, 523 - 525, 1912.
- FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 73, n. 2, 627 - 650, 1927.
- FOOT, C. S.; DENNY, R. W. Chemistry of singlet oxygen. XII. Electronic effects on rate and products of the reaction with olefins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, n. 20, 5162 – 5167, 1971.
- FRANÇA, B. K. et. al. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 20, n. 5, 199 – 206, 2013
- FRANKEL, E. N. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. **Food Chemistry**, v. 57, n. 1, 51-55, 1996.
- FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, v. 43, 228–265, 2004.
- FREI, B. et al. Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 87, 4879-4883, 1990.
- FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, 171 - 178, 2006.
- GARCIA, V. S. G. **Efeito de flavonoides na captação de HOCl produzidos por neutrófilos ativados e modulação do factor de transcrição NF-KB em células THP-1: análise da relação estrutura atividade**. 2010. 214 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Química e Bioquímica, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010.
- GHISELLI, A. et al. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, 1106–1114, 2000.

- GLAZER, A. N. Fluorescence-based assay for reactive oxygen species: a protective role for creatinine. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 2, 2487-2491, 1988.
- GLISZCZYNSKA-SWIGŁO, A. Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays, **Food Chemistry**, v. 96, 131–136, 2006.
- GOMES, E. C.; NEGRELLE R. R. B. *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf: aspectos botânicos e ecológicos. **Visão Acadêmica**, v. 4, n. 2, 137-144, 2003.
- GONÇALVES, R. S. et al. Antioxidant properties of essential oils from *Mentha* species evidenced by electrochemical methods. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.4, 372-382, 2009.
- GOULART, M. O. F. et al. Trypanocidal activity and redox potential of heterocyclic- and 2-hydroxy-naphthoquinones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, n. 15, 2043-2048, 1997.
- GREER, A. Christopher Foote's discovery of the role of singlet oxygen [$^1\text{O}_2(^1\Delta\text{g})$] in photosensitized oxidation reactions. **Accounts of Chemical Research**, v. 39, n. 11, 797 - 804, 2006.
- GREFF, R.; PEAT, R.; PETER, L. M.; PLETCHER, D.; ROBINSON, J. **Instrumental Methods in Electrochemistry**, New York, John Wiley & Sons LTD., 1985.
- GUEDES, J. R. O. **Efeitos sobre a saúde do consumo moderado de vinho tinto**. 2013. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.
- GUINAZI, M. et al. Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. **Química Nova**, v. 32, n. 8, 2098-2103, 2009.
- GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. A Historical Look to the Future, Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000. **Annals New York Academy of Sciences**, New York, 136 – 147, 2000.
- HALLIWELL, B. Antioxidants and Human Disease: A General Introduction. **Nutrition Reviews**, v. 55, n. 1, S44- S52, 1997.
- HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 16, 33- 50, 1996.
- HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. *The Lancet*. v.355, 1179, 2000.
- HALLIWELL, B. Vitamin C: poison, prophylactic or panacea? *Trends in Biochemical Sciences*, v. 24, 255 – 259, 1999.

HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LÖLINGER, J., ARUOMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7, p.601-617, 1995.

HALLIWELL, B.; CROSS, E. C. Oxygen-derived Species: Their Relation to Human Disease and Environmental Stress. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, Suplemento 10, 5 – 12, 1994.

HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2001.

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

HUANG, G-J. et al. Inhibition of reactive nitrogen species in vitro and ex vivo by thioredoxin h2 from sweet potato ‘Tainong 57’ storage roots. **Food Chemistry**, v. 131, 552–557, 2012.

HUBER, P. C.; ALMEIDA W. P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, 1170 - 1179, 2008.

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

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

KHAN, I. U. et al. Evaluation of antioxidant activity using an improved DMPD radical cation decolorization assay. **Acta Chimica Slovenica**, v. 54, 295–300, 2007.

KLYMENKO, O. V. et al. The electrochemical oxidation of N,N-diethyl-p-phenylenediamine in DMF and analytical applications. Part I: Mechanistic study. **Electroanalysis**, v. 15, n. 11, 949 – 960, 2003.

KRAINEV, A. G.; BIGELOW, D. J. Comparison of 2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH) and 2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile) (AMVN) as free radical initiators: a spin-trapping study. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, 747 – 754, 1996.

KRISHNA, A. G. G. et al. Evaluation of the antiradical and antioxidant properties of extracts from Indian red chili and black pepper by in vitro models. **Bulgarian Chemical Communications**, v. 42, n. 1, 62–69, 2010.

KUBAN, V.; DASGUPTA, P. K.; MARX, J. N. Nitroprusside and methylene blue methods for silicone membrane differentiated flow injection determination of sulfide in water and wastewater. **Analytical Chemistry**, v. 64, 36 – 43, 1992.

KUZNETSOV, A. V.; GNAIGER, E. Oxygraph assay of cytochrome c oxidase activity: chemical background correction. **Mitochondrial Physiology Network**, v. 6, 1 – 4, 2010. Disponível em: <http://www.bioblast.at/images/0/0b/MiPNet06.06_ChemicalBackground.pdf>. Acesso em abril de 2014.

- LAWRENCE, N. S. et al. Selective determination of thiols: a novel electroanalytical approach. **Analyst**, v. 125, 661 – 663, 2000.
- LAWRENCE, N. S.; DAVIS, J.; COMPTON, R. G., Analytical strategies for the detection of sulfide: a review. *Talanta*, 52, 771 – 784, 2000.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. C.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**, 2. ed. São Paulo: Sarvier , 1995.
- LÖNN, M. E.; DENNIS, J. M.; STOCKER, R. Actions of “antioxidants” in the protection against atherosclerosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, 863–884, 2012.
- MAEDA, T. et al. Antioxidation capacities of extracts from green, purple, and white asparagus spears related to polyphenol concentration. **HortScience**, v. 40, n. 5, 1221 – 1224, 2005.
- MAGALHÃES, L. M. et al. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, 1–19, 2008.
- MASUCHI, M. H. et al. Quantificação de TBHQ (terc-butil-hidroquinona) e avaliação da estabilidade oxidativa em óleos de girassol comerciais. **Química Nova**, v. 31, n. 5, 1053-1057, 2008.
- MATTOS, T. C. G. **Mecanismos da ação antioxidante dos ácidos caféico e tânico em sistemas contendo íons ferro**. 2009. 206 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília.
- MEHDI, M. M.; RIZVI, S. I. N,N-Dimethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride-based method for the measurement of plasma oxidative capacity during human aging. **Analytical Biochemistry**, v. 436, 165 - 167, 2013.
- MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 5. ed. England: Pearson, 2005.
- MOLNÁR-PERL, I.; FÜZFAI, Z. Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1073, 201–227, 2005.
- MORAES, V.; LOCATELLI, C. Vinho: uma revisão sobre a composição química e benefícios à saúde. **Evidência**, v. 10, n. 1-2, 57-68, 2010
- MORALES, F. J.; BABEL, M-B. Antiradical efficiency of Maillard reaction mixtures in a hydrophilic media, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, 2788 – 2792, 2002.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis, of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, 95 – 111, 2004.
- NAGENDRAPPA, G. An appreciation of free radical chemistry 3, free radicals in diseases and health. **Resonance**, v. 10, 65-74, 2005.

NIETO, F. J. et al. Uric acid and serum antioxidant capacity: a reaction to atherosclerosis? **Atherosclerosis**, v. 148, 131–139, 2000.

NIJVELDT, R.J et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 74, 418-425, 2001.

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

OLIVEIRA, B. P. **Teor e composição química do óleo essencial em amostras comerciais de camomila (*Matricaria chamomilla L.*)**, 2012, 52 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

PACHECO, W. F. et al. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, 516 - 537, 2013.

PAIVA, Y. G. **Estudos bioeletroquímicos dos adutos de Morita-Baylis-Hillman-potenciais agentes leishmanicidas**. 2011, 179 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro e Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

PAIVA, Y. G. et al. Correlation between electrochemical and theoretical studies on the leishmanicidal activity of twelve Morita-Baylis-Hillman adducts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 5, 894 - 904, 2012.

PALACE, V. P. et al. Antioxidant potentials of vitamin a and carotenoids and their relevance to heart disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, 746–761, 1999.

PAMUK, D. et al. Redox pathways of aliskiren based on experimental and computational approach and its voltammetric determination. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 8, 1276 - 1286, 2013.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to Spectroscopy**. 3. ed. Canada: Brooks / Cole, Thomson Learning, 2001.

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

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, 1.035-1.042, 2000.

PRADO, C. C. et al. Avaliação do teor de polifenóis da *Camellia sinensis* (chá verde). **Revista Eletrônica de Farmácia**, Suplemento 2, n.2, 164-167, ISSN 1808-0804, 2005.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for Determination os Antioxidant Capacity and Phenolicsin Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, 4290-4302, 2005.

- RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, 755-760, 2006.
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, 1231–1237, 1999.
- RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 21, n. 3, 133 – 149, 2005.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. CORADIN, L. (Org.); POMBO, V. B. (Org.). **Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos**. Brasília: MMA/SBF, 2008.
- RODRÍGUEZ-NOGALES, J. M; VILA-CRESPO, J.; GOMÉZ, 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**, v. 129, 1800–1805, 2011.
- ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, 235–254, 2005.
- RONSEIN, G. E. et. al. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, 563-568, 2006.
- ROVER JÚNIOR, et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, 112-119, 2001.
- RUFINO, M. S. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **EMBRAPA, Comunicado Técnico**, ISSN 1679-6535, 2007.
- SANTIAGO, C. M. et al. Utilização do óxido nítrico como terapêutica: implicações para a enfermagem. **Revista latino-americana de enfermagem**, v. 8, n. 6, 76 - 82, 2000.
- SCALFI, L. et al. Antioxidant activity and general fruit characteristics in different ecotypes of corbarini small tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, 1363–1366, 2000.
- SEO, E. T. et al. Anodic oxidation pathways of aromatic amines. Electrochemical and electron paramagnetic resonance studies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 88, n. 15, 3498 – 3503, 1966.
- 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**, v. 113, 1201-1205, 2009.

- SILVA, D. G. H., et al. Oxidative stress in sickle cell disease: An overview of erythrocyte redox metabolism and current antioxidant therapeutic strategies. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, 1101–1109, 2013.
- SILVA, M. A. L. et al. Avaliação da composição química de *Cymbopogon citratus* Stapf cultivado em ambientes com diferentes níveis de poluição e a influência na composição do chá. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 32, n. 1, 67-72, 2010
- SILVERTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.
- SKOOG, D. A. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2006.
- SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, jan./mar., 2005.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, 71-81, jan./abr., 2002.
- SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 351-355, 2007.
- SOUZA, G. G. et al. A uva roxa, *Vitis vinífera* L. (Vitaceae) – seus sucos e vinhos na prevenção de doenças vasculares. **Natureza on-line**, v. 4, n. 2, p. 80-86, 2006.
- SOUZA, P. H. N. **Estudos Eletroquímicos de Complexos de Cu(II) de Antibióticos da Classe das Fluorquinolonas**. 2011. 119 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- STORLE, C; EYER, P. Formation and reactions of the wurster's blue radical cation during the reaction of N,N,N',N'-tetramethyl-p- phenylenediamine with oxyhemoglobin. **Chemico-Biological Interactions**, v. 78, 321 - 331, 1991.
- THERIAUL, A. et al. Tocotrienol: A Review of Its Therapeutic Potential. **Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 5, 309–319, 1999.
- THOMAS, S. R.; STOCKER, R. Molecular action of vitamin e in lipoprotein oxidation: Implications for atherosclerosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, n. 12, 1795–1805, 2000.
- VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, 44–84, 2007.
- VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, 1– 40, 2006.

- VARGAS, P. N.; HOELZEL, S. C.; ROSA, C. S. Determinação do teor de polifenóis totais e atividade antioxidante em sucos de uva comerciais. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n.1, 11 - 15, 2008.
- VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, 1323-1338, 2007.
- VERDE, V. et al. Use of N,N-dimethyl-p-phenylenediamine to evaluate the oxidative status of human plasma. **Free Radical Research**, v. 36, n. 8, 869 – 873, 2002.
- VINSON, J. A.; DABBAGH, Y. A. Tea phenols: antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. **Nutrition Research**, v. 18, n. 6, 1067 - 1075, 1998.
- WANG, H; PROVAN, G. J.; HELLIWELL, K. Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, 152 – 160, 2000.
- WEIJL, N. I.; CLETON, F. J.; OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treatment Reviews**, London, v.23, n.4, 209-240, 1997.
- WEISBURGER, J. H. Tea and health: a historical perspective. **Cancer Letters**, v. 114, 315 – 317, 1997.
- WILDGOOSE, G. G. et al. Electrochemical determination of sulfide at high temperatures via its electrochemically initiated reaction with diethyl-p-phenylenediamine in dimethylformamide. **Electroanalysis**, v. 16, n. 5, 337 – 344, 2004.
- WIMALASENA, K.; WIMALASENA, D. S. N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylenediamine: a facile electron donor and chromophoric substrate for dopamine β -monooxygenase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 175, n. 3, 920 – 927, 1991.
- WOODALL, A. A. et al. Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1336, 33–42, 1997.
- WOODALL, A. A.; BRITTON, G.; JACKSON, M. J. Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: Relationship between carotenoid structure and protective ability. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1336, 575–586, 1997.
- YOSHIDA, Y.; NIKI, E.; NOGUCHI, N. Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 123, 63 – 75, 2003.
- ZHAO, D. et al. Effect and mechanism of persulfate activated by different methods for PAHs removal in soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 254– 255, 228– 235, 2013.

Anexos

7 ANEXOS

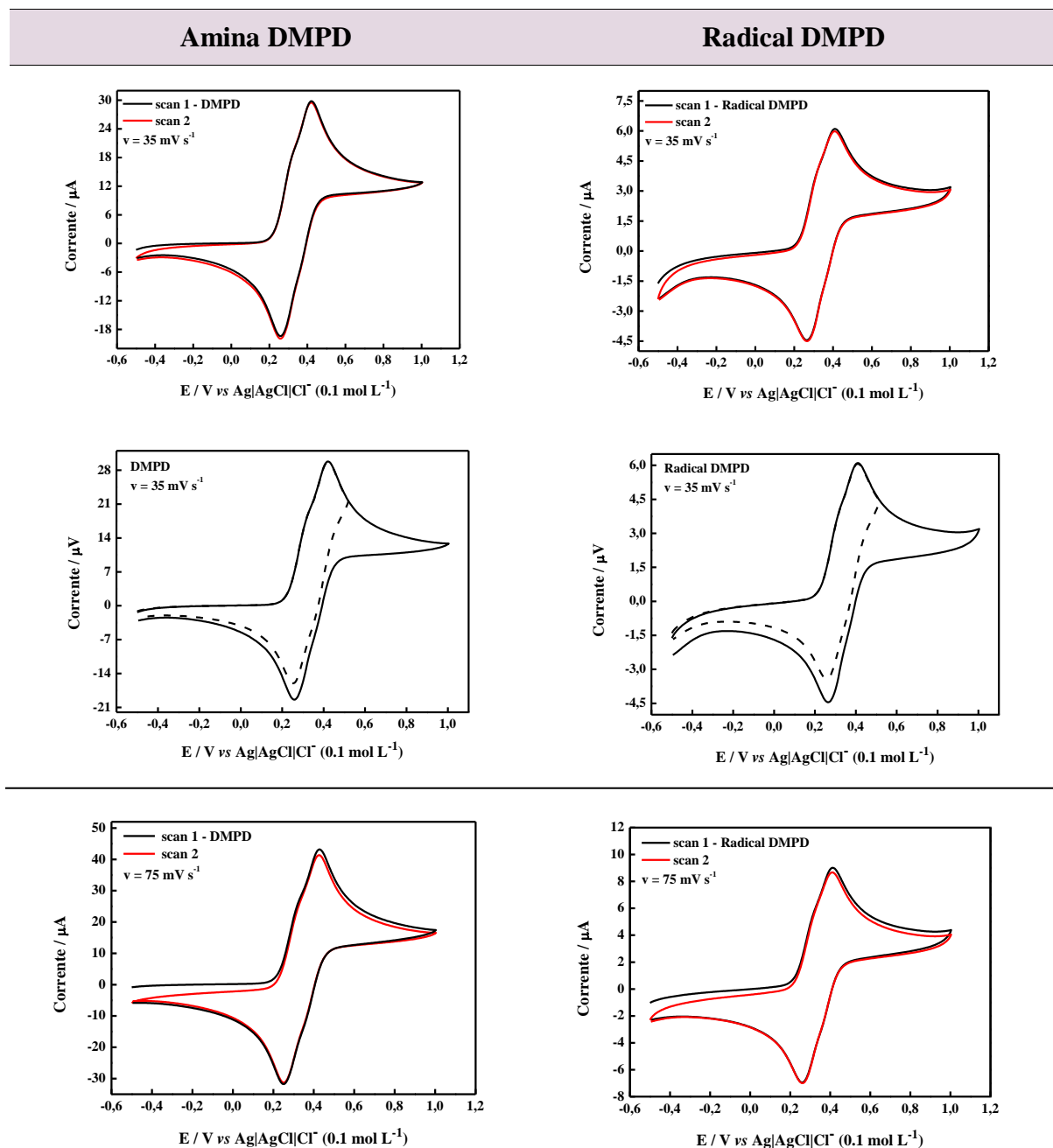
7.1 Anexo1: Avaliação do efeito do solvente sobre a sonda DEPD⁺⁺Tabela 12. Avaliação do efeito do solvente sobre a sensibilidade e o EC₅₀ do método proposto para a sonda DEPD⁺⁺.

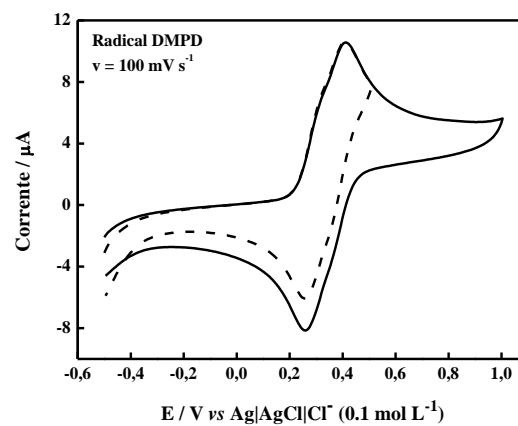
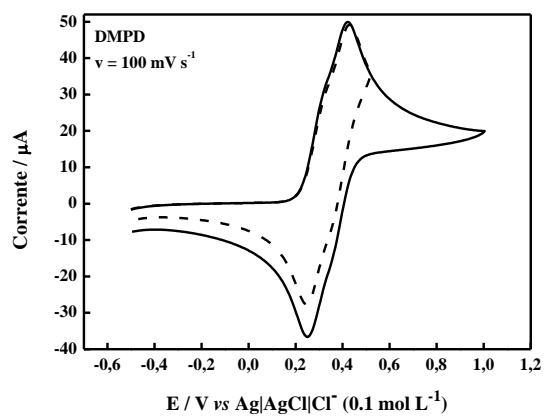
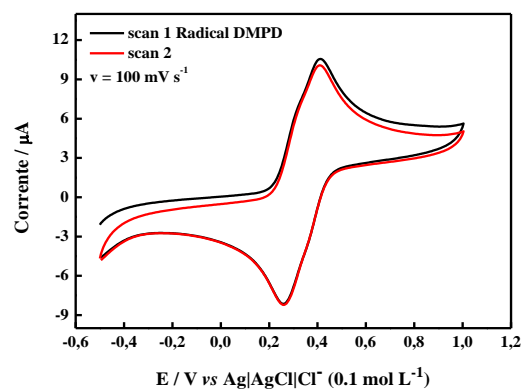
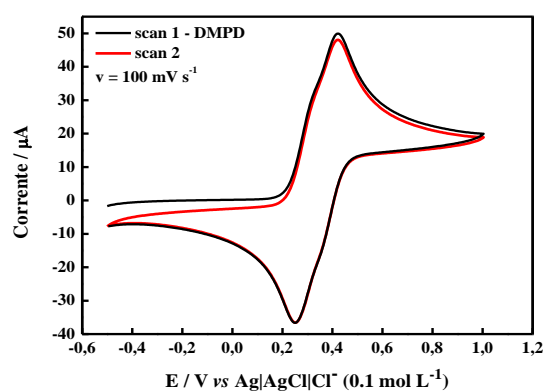
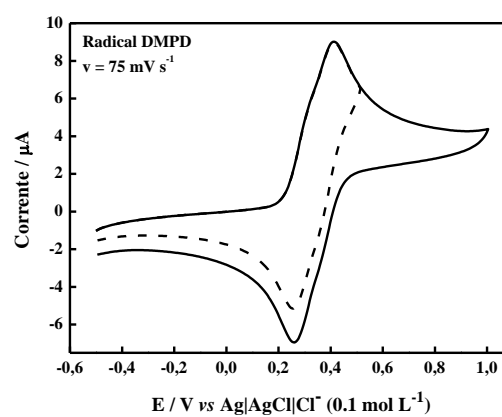
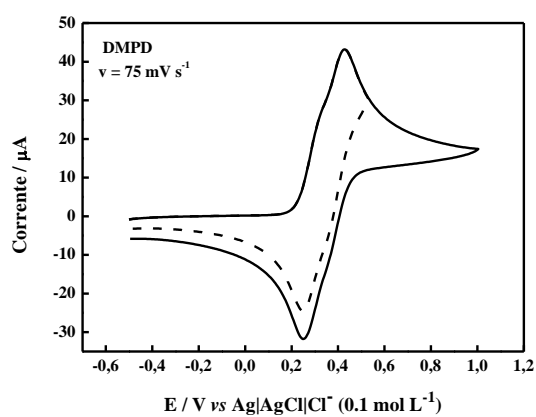
Solvente	% (v/v)	Faixa linear (mg L ⁻¹)	Curva (%I = aC + b)		r	EC ₅₀ (μmol L ⁻¹)
			a	b		
Acetona	100	0,2 – 1,4	8,00	0,63	0,9957	36,28
	50	0,2 – 1,4	18,67	-0,64	0,9986	15,94
	25	0,3 – 1,0	29,77	3,74	0,9991	9,13
	10	0,2 – 1,0	36,48	2,53	0,9970	7,65
	5	0,2 – 1,2	37,42	3,31	0,9967	7,33
	2,5	0,2 – 1,2	38,20	1,51	0,9983	7,18
	1	0,2 – 1,2	38,59	3,29	0,9959	7,11
	0	0,2 – 1,2	41,02	3,50	0,9967	6,66
Acetonitrila	100	0,2 – 0,6	14,22	-1,19	0,9980	21,16
	50	0,2 – 0,8	18,62	2,31	0,9980	15,06
	25	0,2 – 0,8	35,16	3,27	0,9997	7,81
	10	0,2 – 0,8	43,57	3,93	0,9994	6,22
	5	0,2 – 0,8	43,88	0,26	0,9990	6,66
	2,5	0,2 – 0,8	47,43	-4,78	0,9993	6,79
	1	0,2 – 0,8	37,01	0,01	0,9997	7,94
	0	0,2 – 0,8	34,76	-0,90	0,9992	8,6
Etanol	100	0,2 – 1,2	12,85	-0,76	0,9995	23,22
	50	0,2 – 1,4	22,75	-0,75	0,9998	13,11
	25	0,2 – 1,2	29,09	-0,35	0,9991	10,17
	10	0,2 – 1,4	27,70	-0,42	0,9997	10,70
	5	0,2 – 1,4	31,88	-0,73	0,9998	9,35
	2,5	0,2 – 1,4	33,50	0,58	0,9977	8,67
	1	0,4 – 1,2	36,08	3,11	0,9982	7,64
	0	0,2 – 1,4	37,42	2,95	0,9996	7,40
Metanol	100	0,4 – 0,8	13,58	0,78	0,9860	21,30
	50	0,2 – 0,8	27,47	3,67	0,9991	9,91
	25	0,2 – 0,8	42,18	-0,26	0,9983	7,00
	10	0,2 – 0,8	39,17	3,51	0,9993	6,98
	5	0,2 – 0,8	38,09	2,78	0,9961	7,29
	2,5	0,2 – 0,8	35,07	3,71	0,9977	7,76
	1	0,2 – 0,8	42,58	1,91	0,9990	6,64
	0	0,2 – 0,8	42,27	-0,78	0,9990	7,06
DMF	100	0,2 – 0,7	8,23	1,87	0,9884	34,38
	50	0,2 – 0,8	18,96	2,76	0,9972	14,65
	25	0,2 – 0,8	23,25	3,72	0,9971	11,70
	10	0,2 – 0,8	36,45	1,33	0,9992	7,85
	5	0,2 – 0,7	41,25	2,56	0,9989	6,76
	2,5	0,2 – 0,8	41,88	3,81	0,9984	6,48
	0	0,2 – 0,8	42,27	-0,78	0,9990	7,06
DMSO	50	0,2 – 0,8	15,29	0,87	0,9944	18,89
	25	0,2 – 0,8	27,84	2,87	0,9958	9,95
	10	0,3 – 0,8	29,52	10,58	0,9995	7,85
	5	0,2 – 0,8	40,90	1,70	0,9997	6,94
	2,5	0,2 – 0,6	43,43	-0,47	0,9995	6,83
	1	0,2 – 0,8	37,90	1,22	0,9984	7,57
	0	0,2 – 0,8	38,95	-0,22	0,9982	7,58

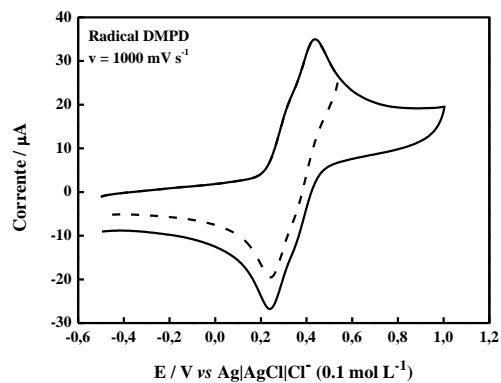
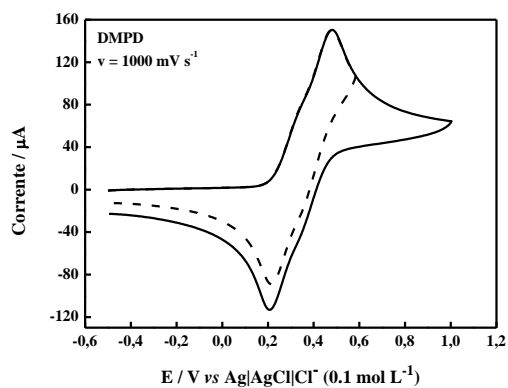
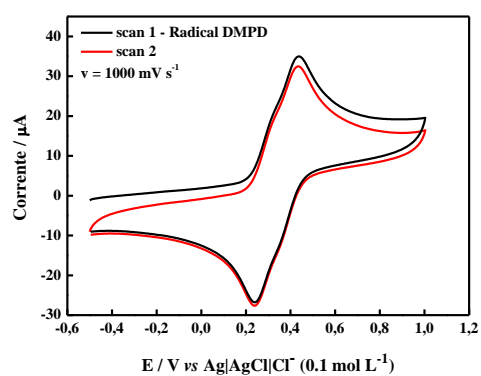
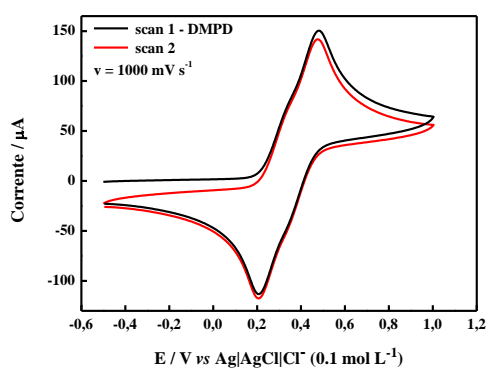
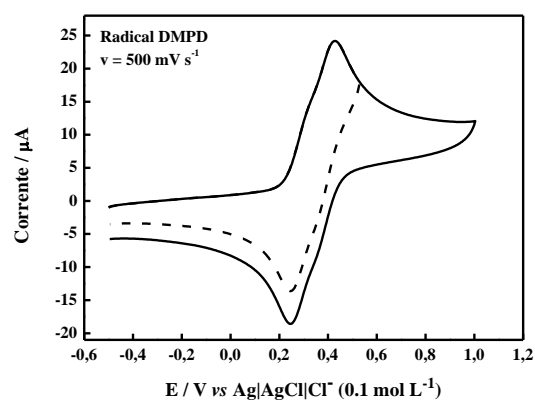
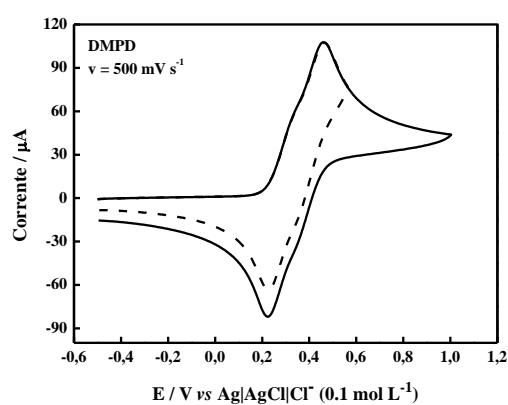
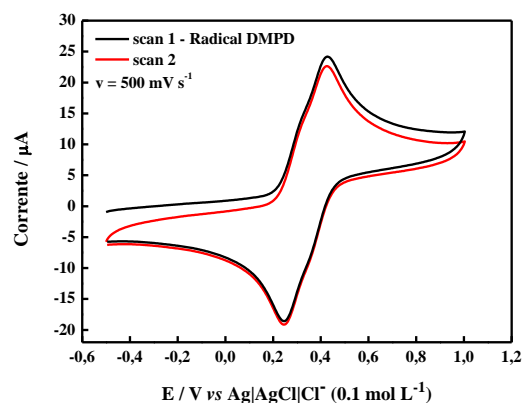
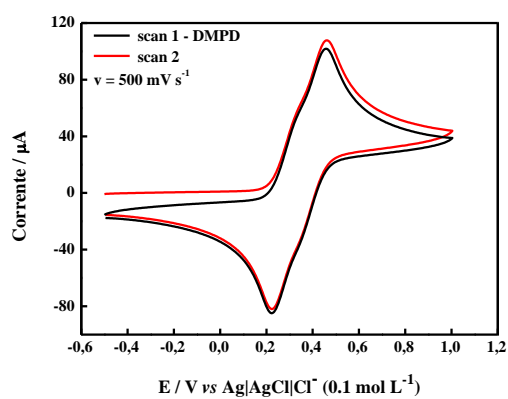
Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

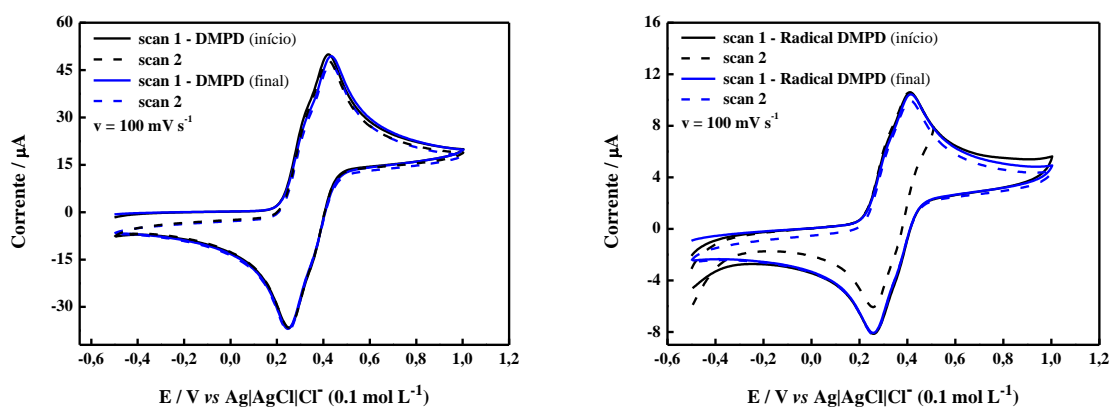
7.2 Anexo 2: Voltamogramas cíclicos de todas as aminas e cátions radicais

Tabela 13. Voltamogramas cíclicos da amina DMPD e cátion radical DMPD^{•+}. Condições: DMPD (2×10^{-3} mol L⁻¹), K₂S₂O₈ (2×10^{-4} mol L⁻¹) e $v = 35, 75, 100, 500$ e 1000 mV s⁻¹.



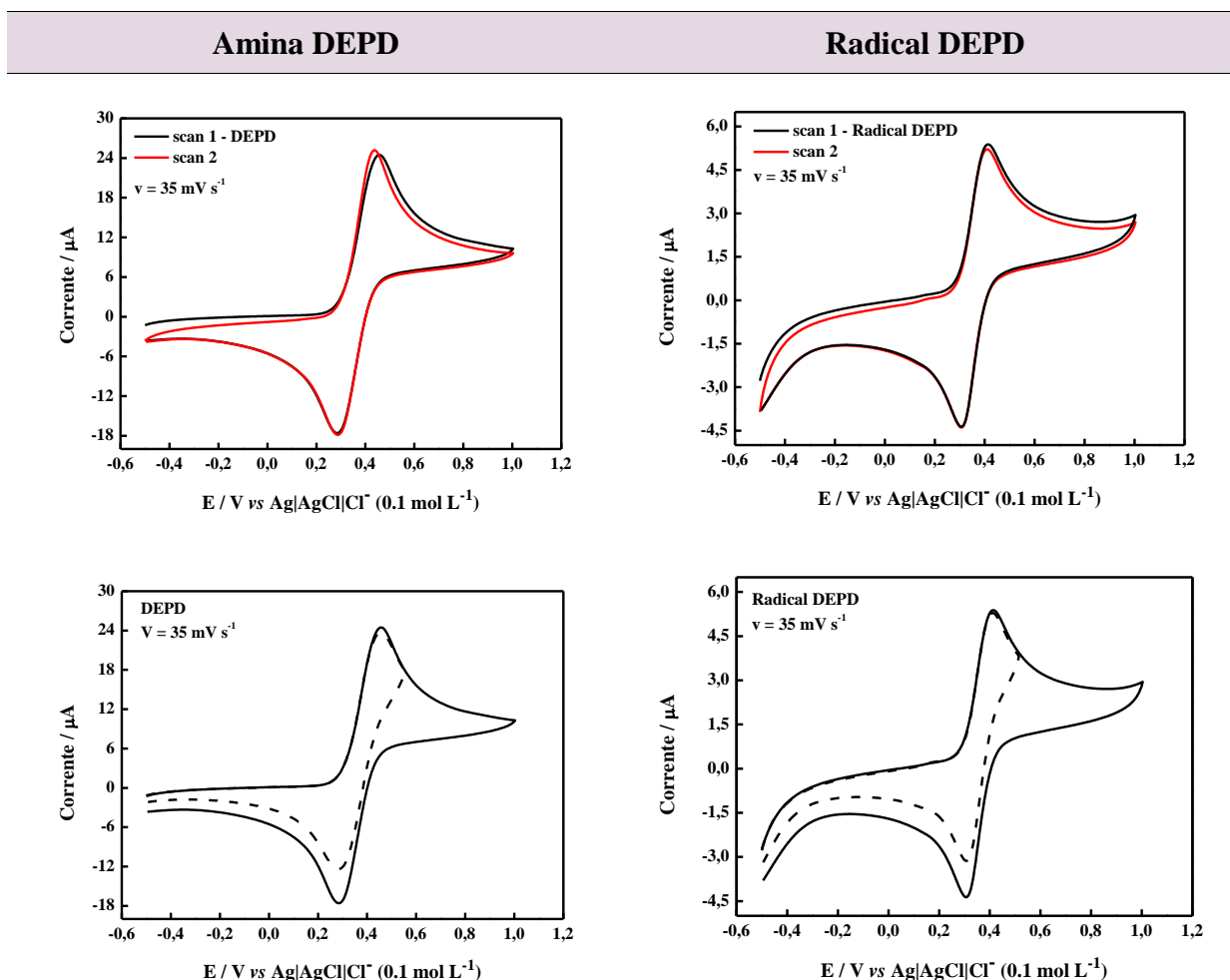




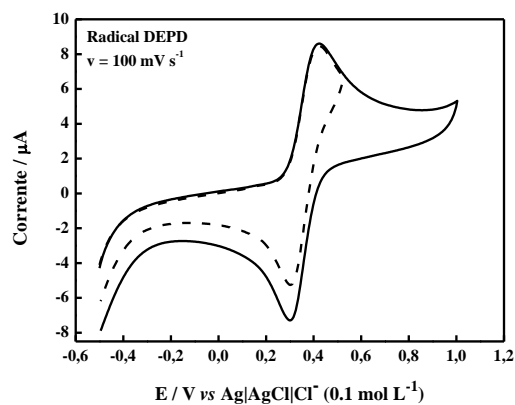
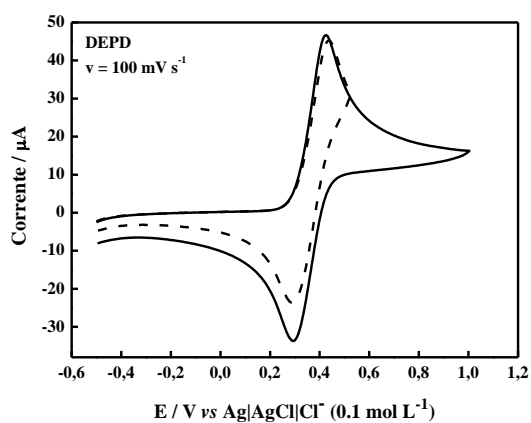
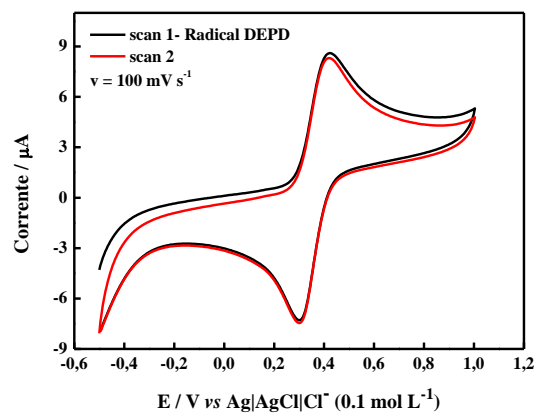
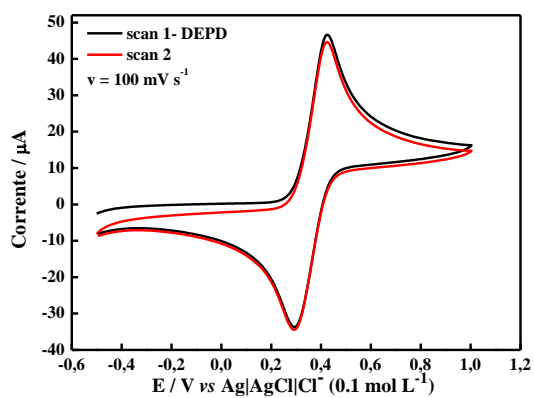
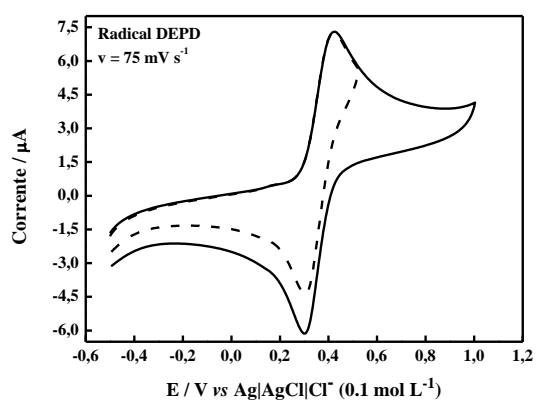
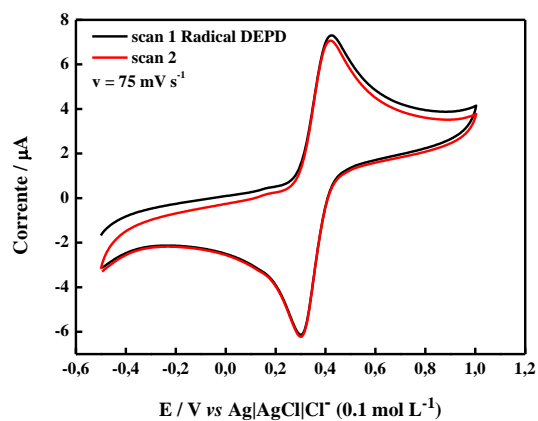


Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

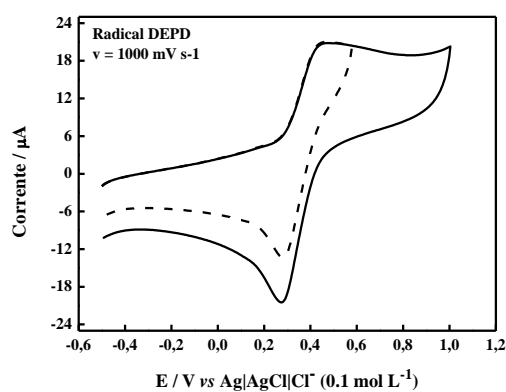
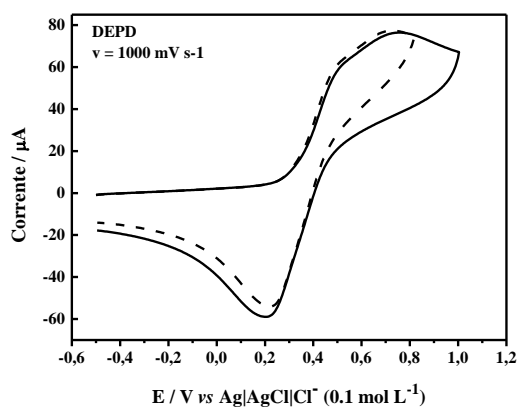
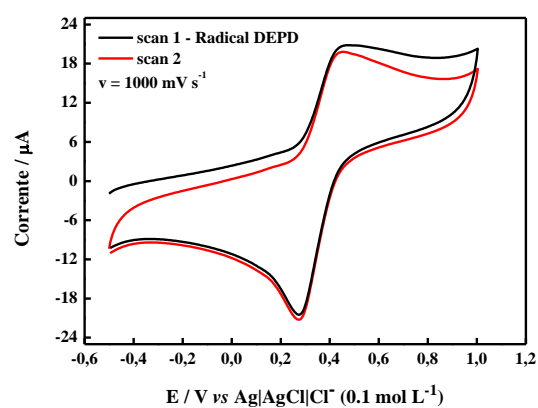
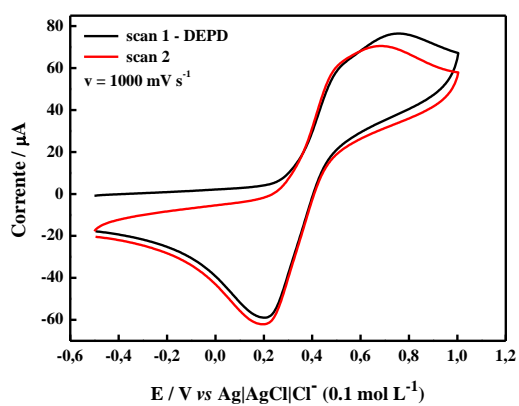
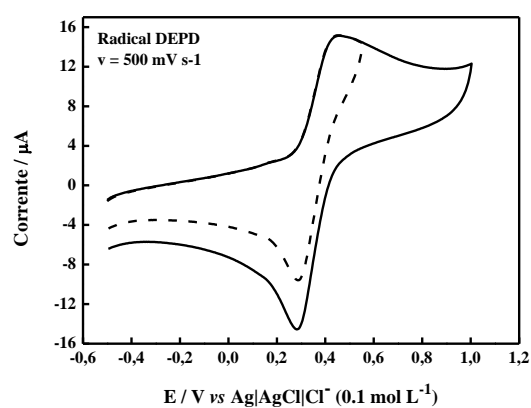
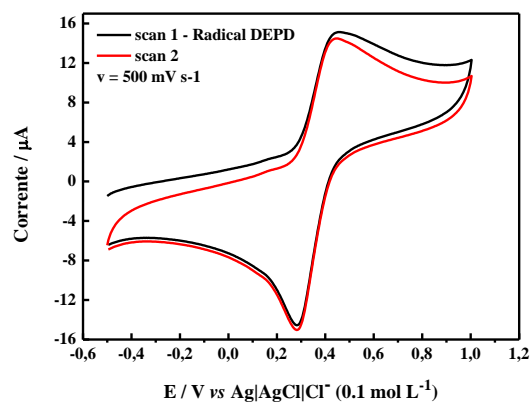
Tabela 14. Voltamogramas cíclicos da amina DEPD e cátion radical DEPD^{•+}. Condições: DEPD (2×10^{-3} mol L⁻¹), K₂S₂O₈ (2×10^{-4} mol L⁻¹) e $v = 35, 75, 100, 500$ e 1000 mV s⁻¹.



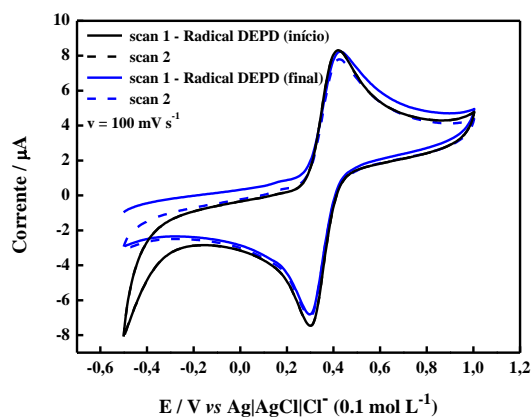
O composto foi oxidado pelo O_2 atmosférico.



O composto foi oxidado pelo O_2 atmosférico.



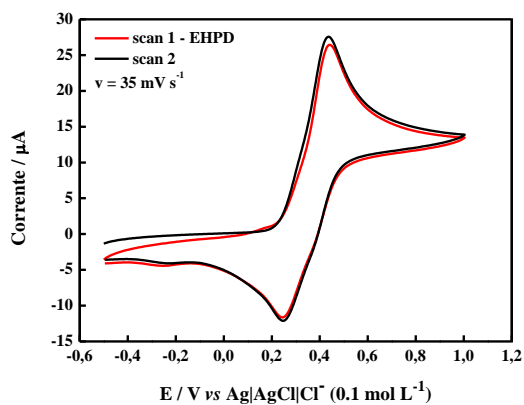
O composto foi oxidado pelo O_2 atmosférico.



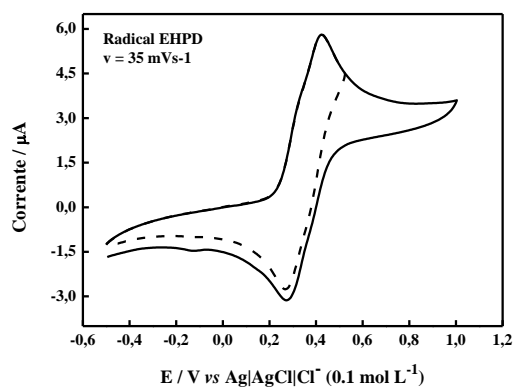
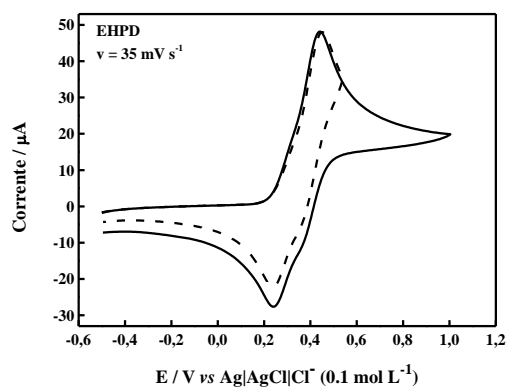
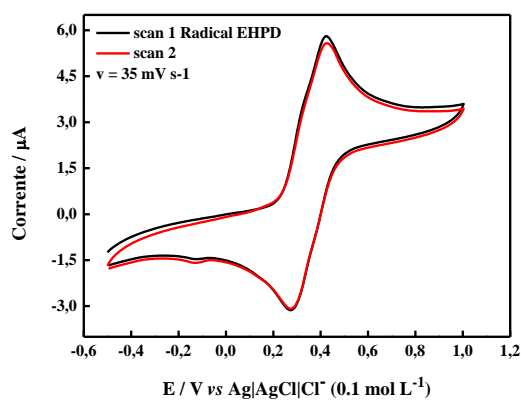
Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

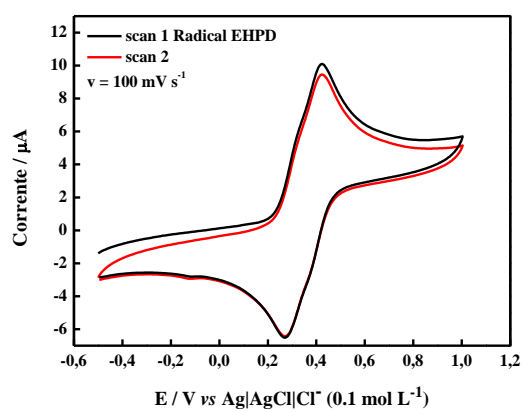
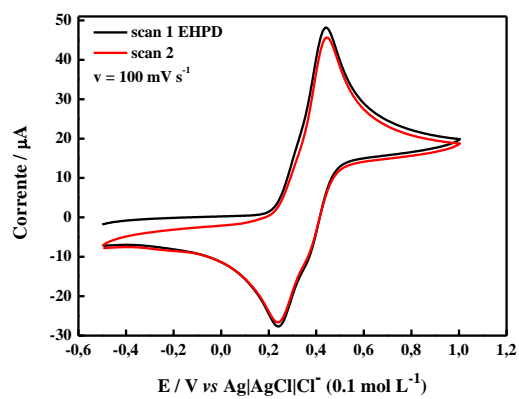
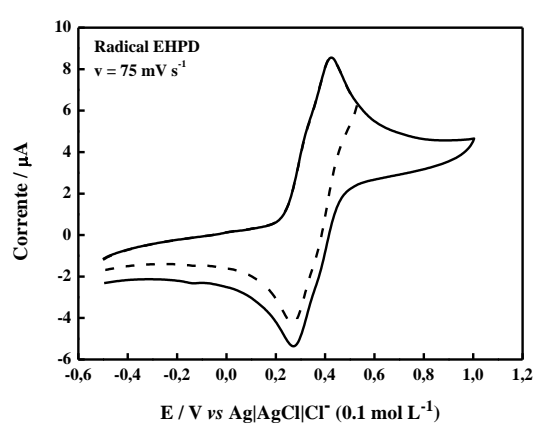
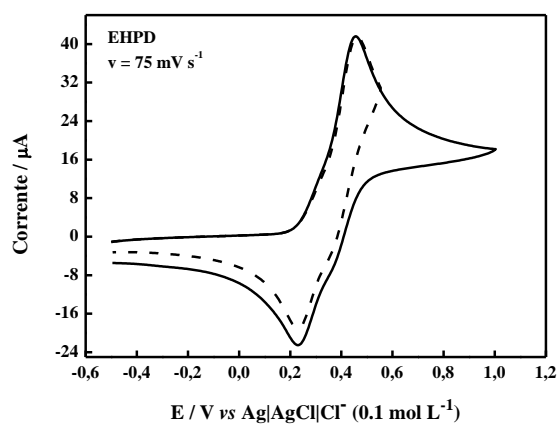
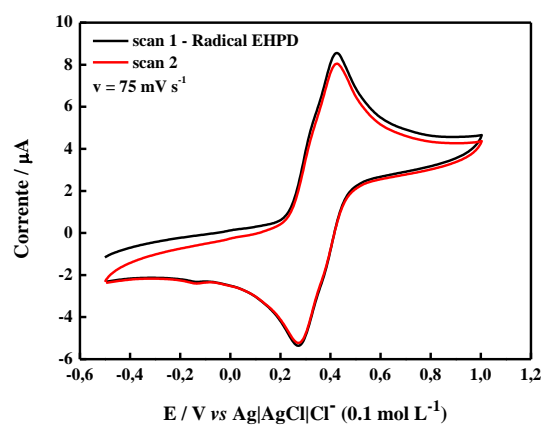
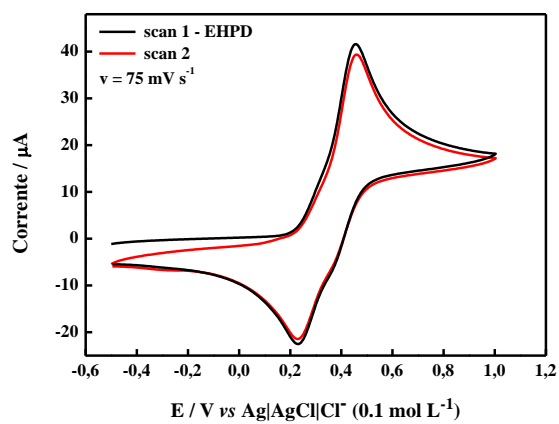
Tabela 15. Voltamogramas cíclicos da amina EHPD e cátion radical EHPD⁺. Condições: EHPD ($2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), $K_2S_2O_8$ ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e $v = 35, 75, 100, 500$ e 1000 mV s^{-1} .

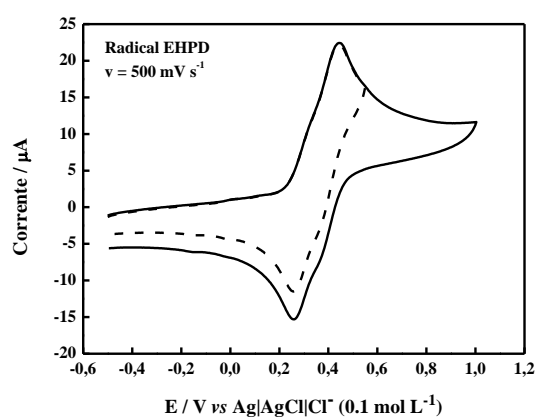
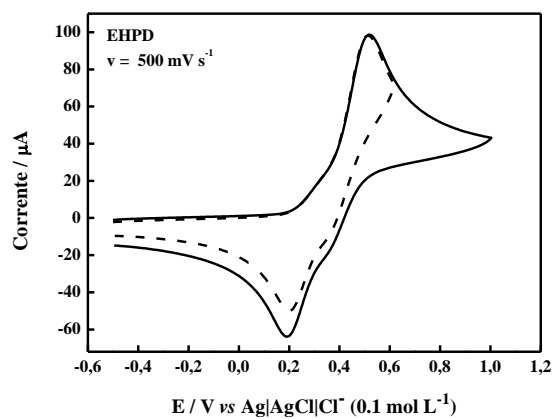
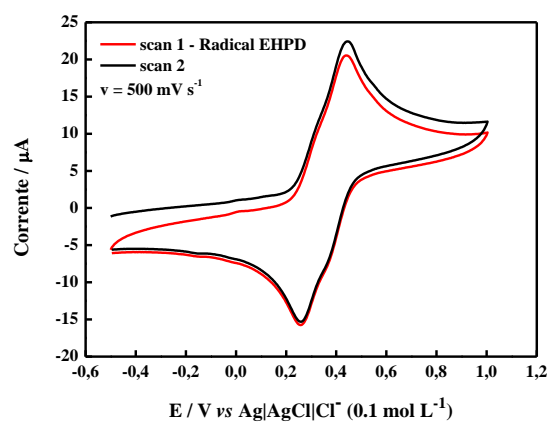
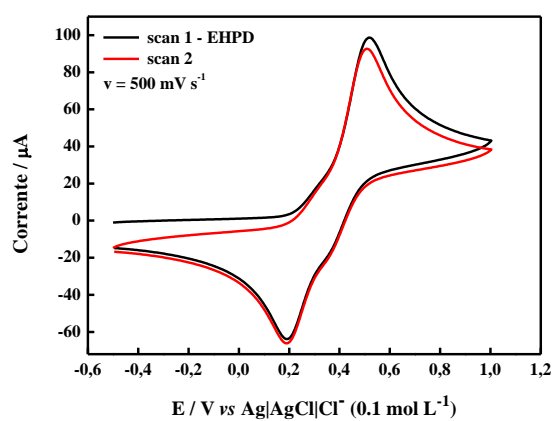
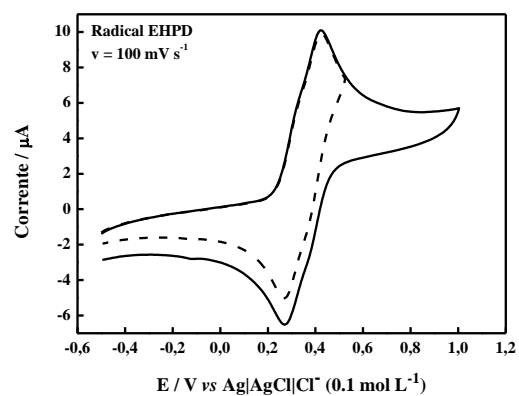
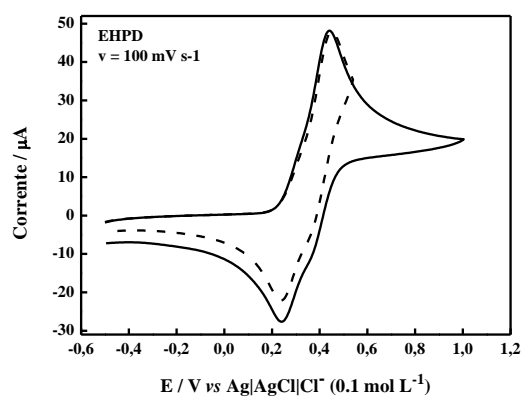
Amina EHPD

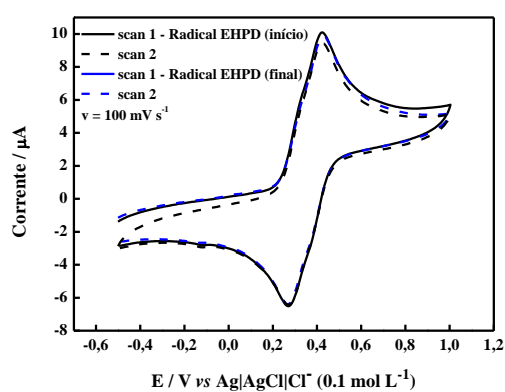
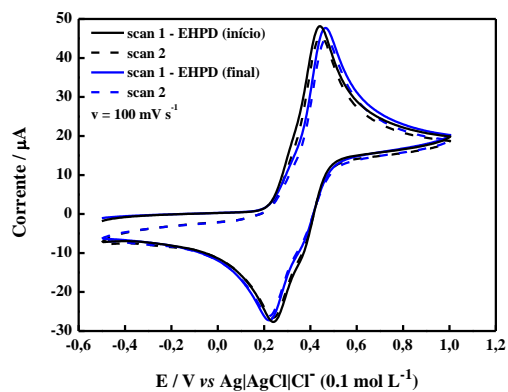
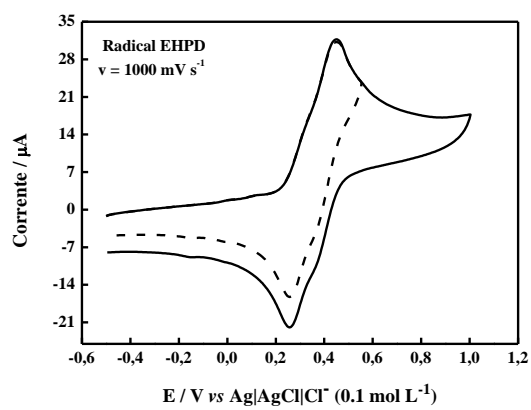
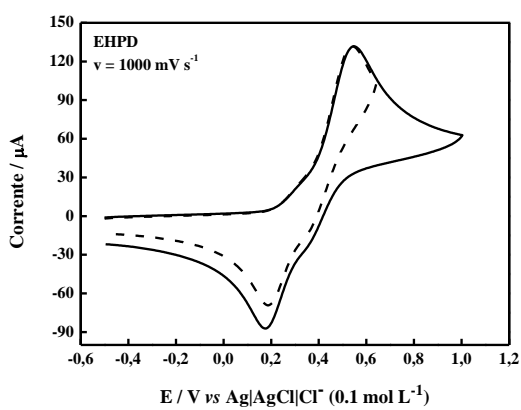
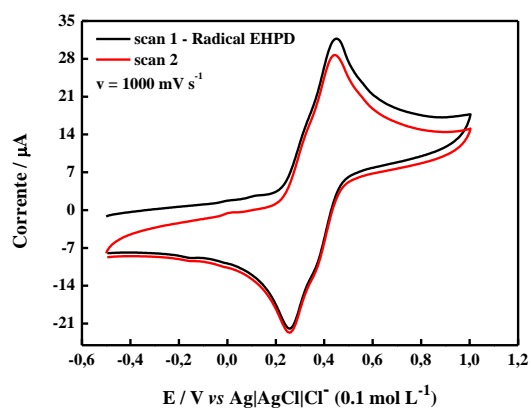
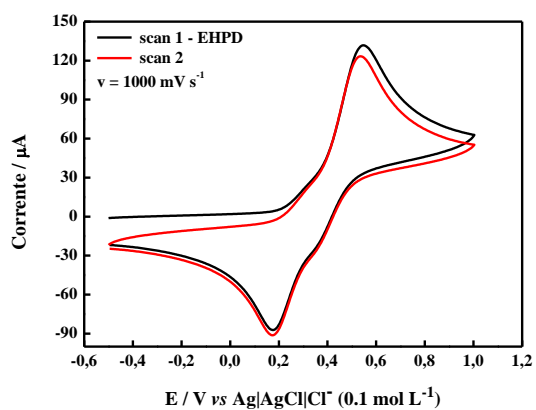


Radical EHPD



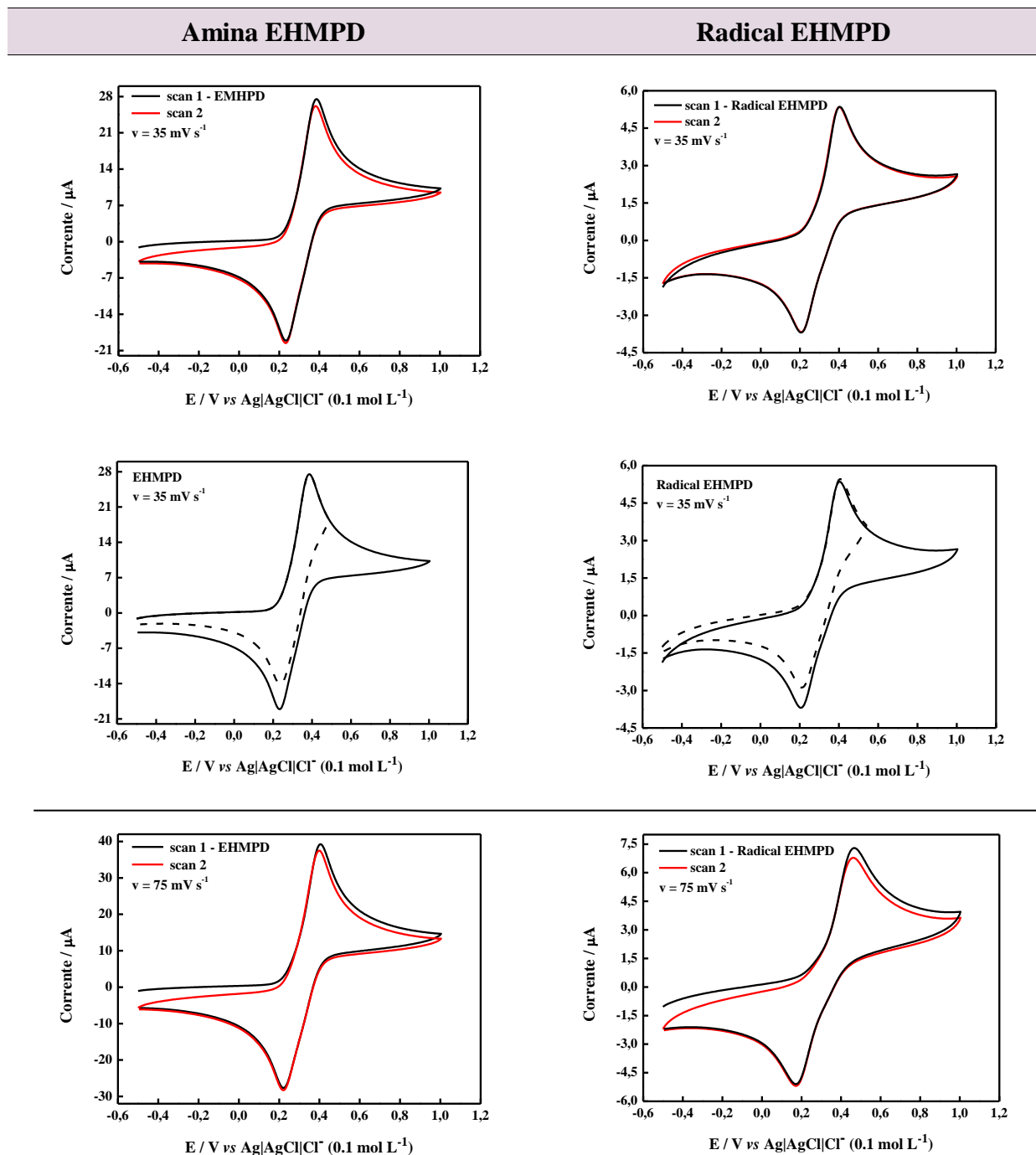


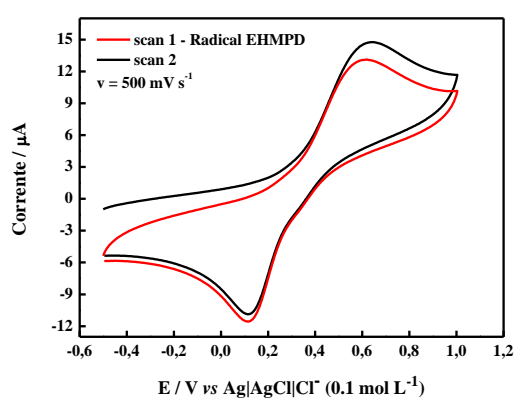
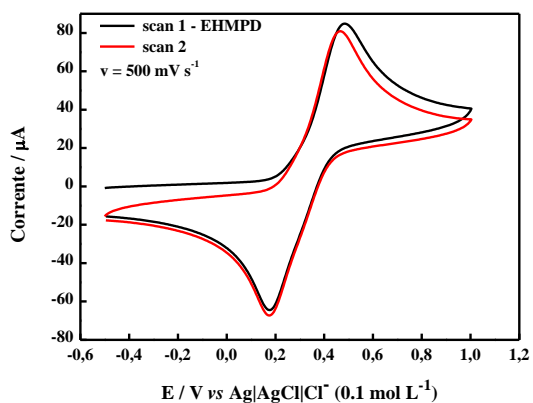
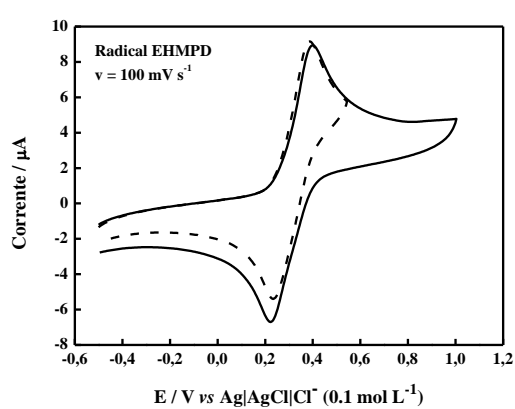
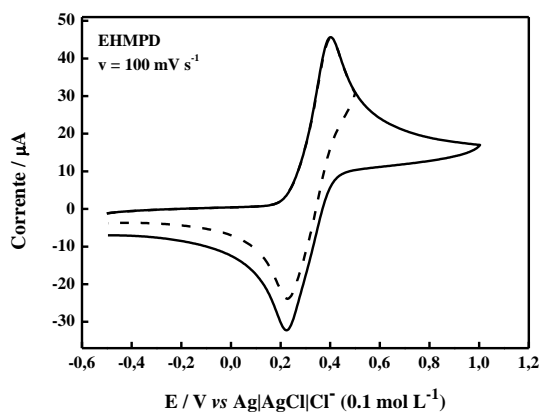
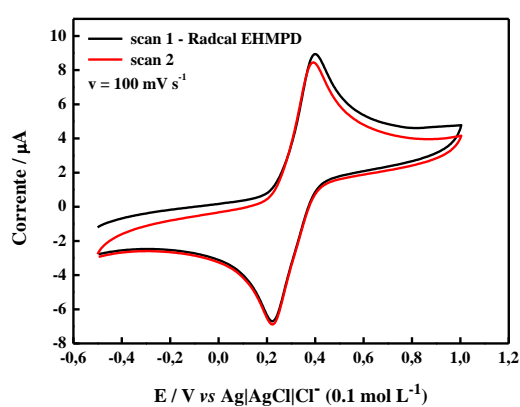
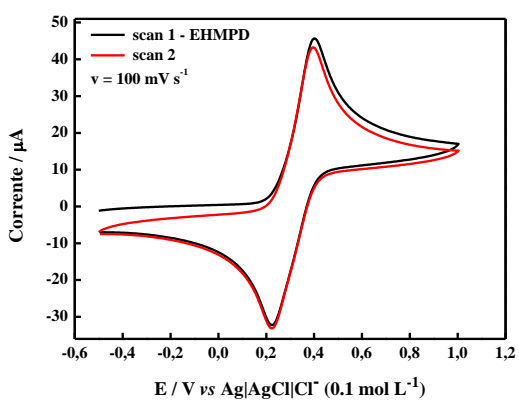
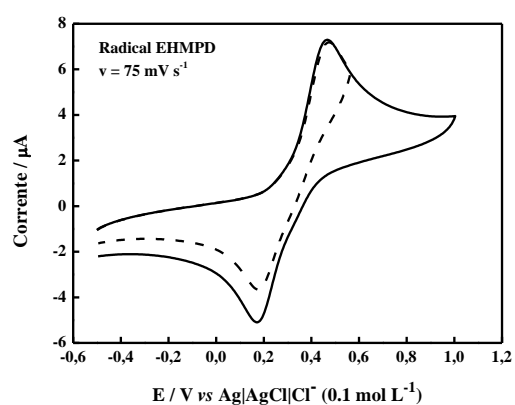
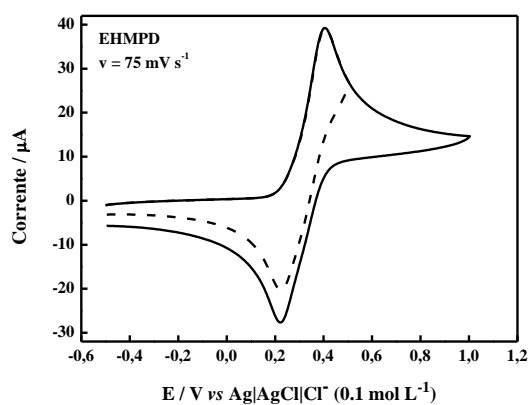


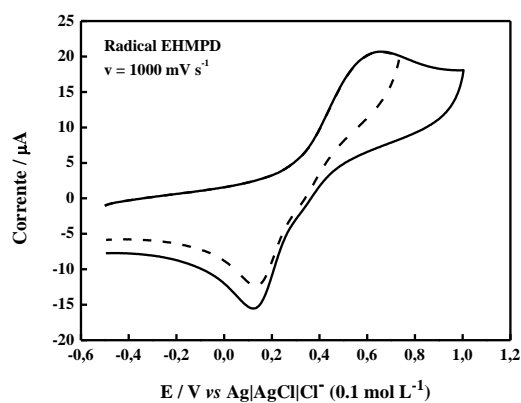
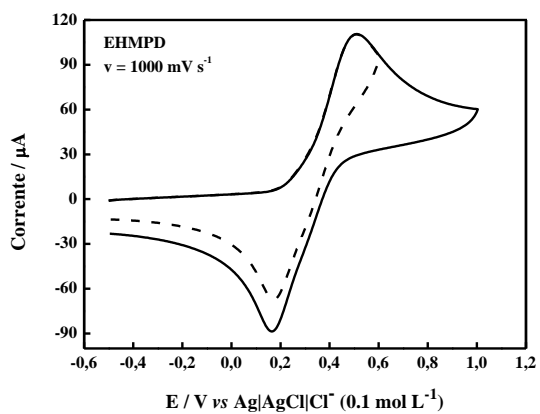
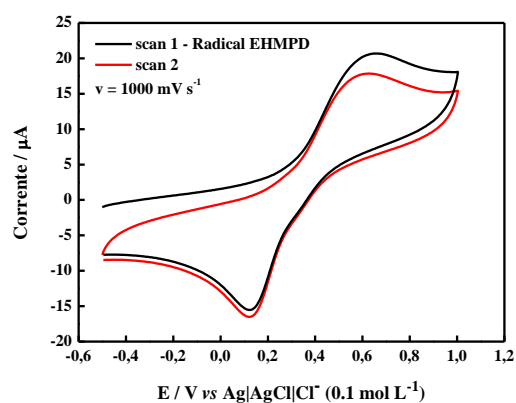
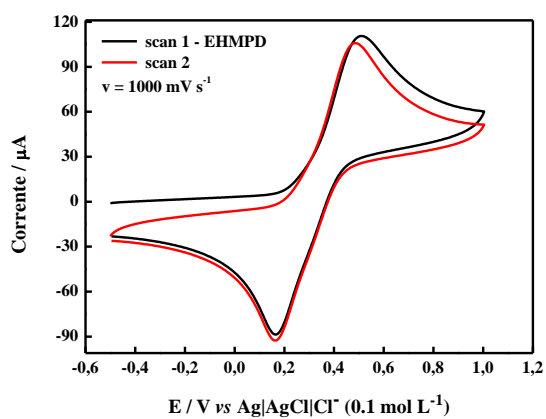
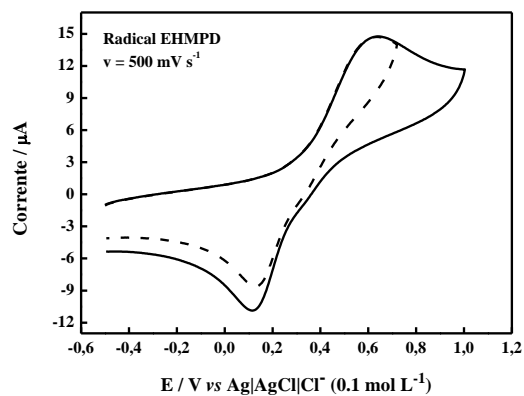
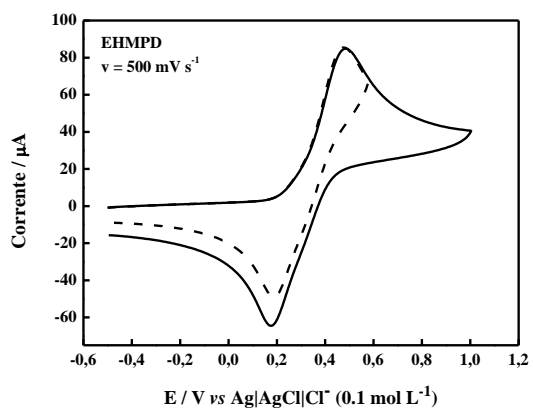


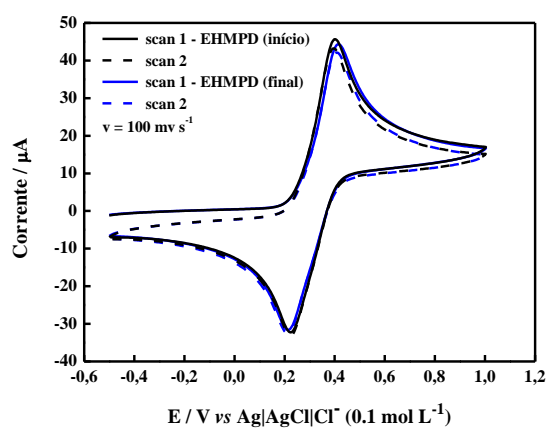
Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

Tabela 16. Voltamogramas cíclicos da amina EHMPD e cátion radical EHMPD⁺. Condições: EHMPD (2×10^{-3} mol L⁻¹), K₂S₂O₈ (2×10^{-4} mol L⁻¹) e $v = 35, 75, 100, 500$ e 1000 mV s⁻¹.





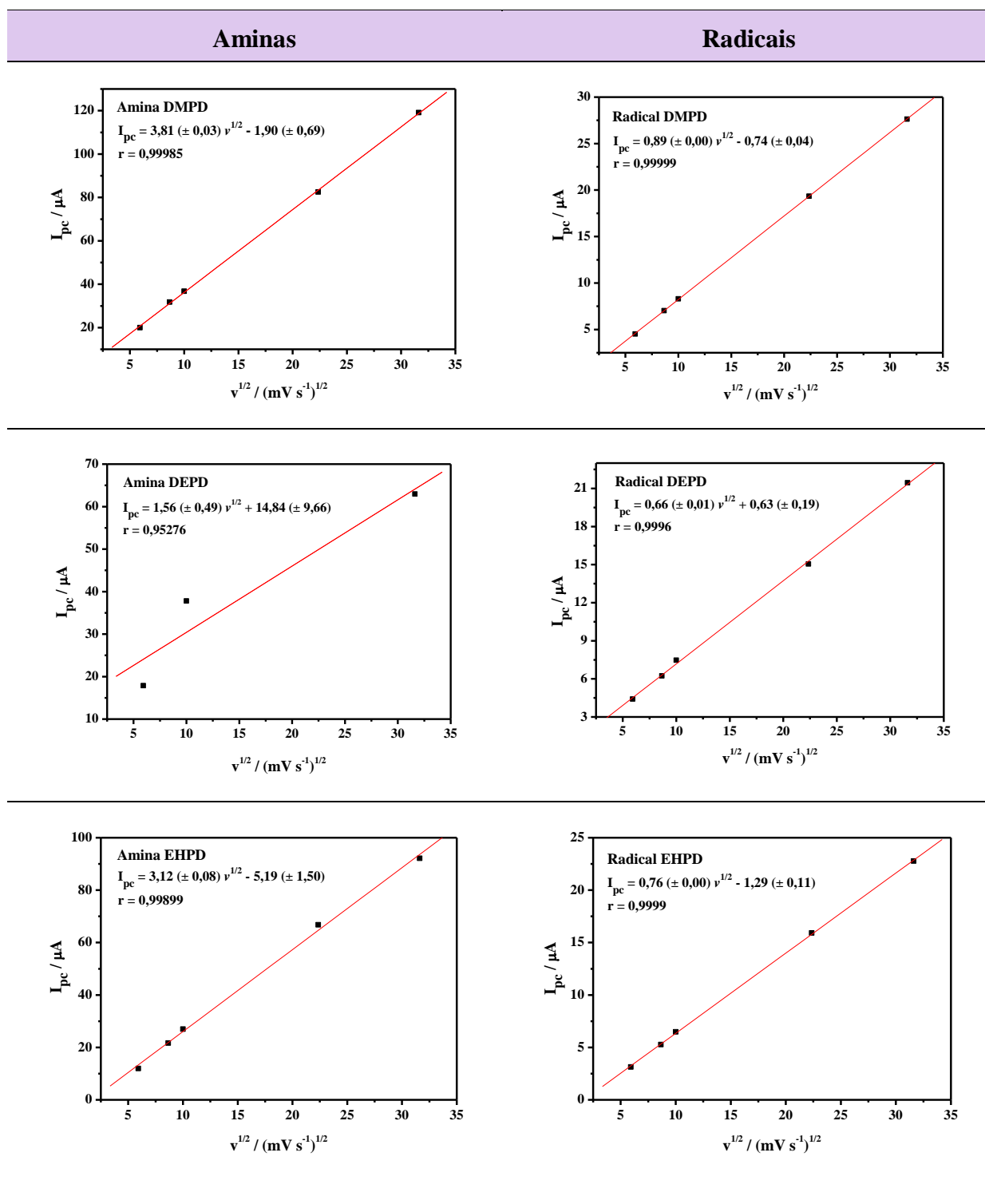


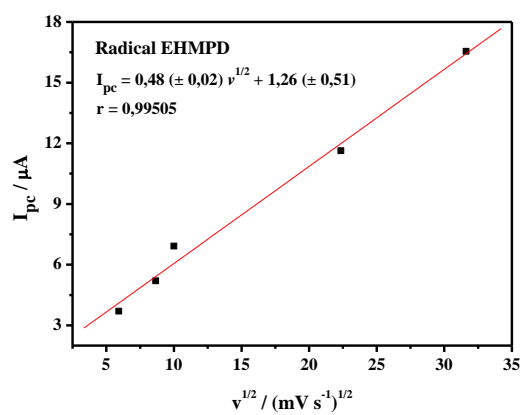
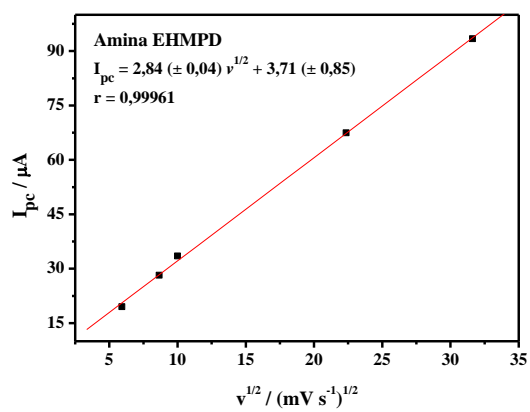


Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

7.3 Anexo 3: Gráficos da corrente de pico catódico (I_{pc}) em função da $v^{1/2}$.

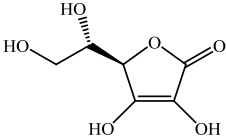
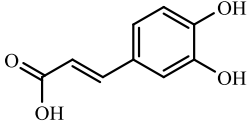
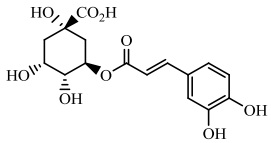
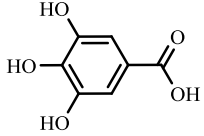
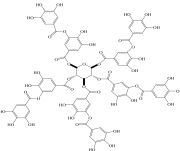
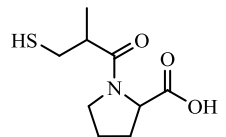
Tabela 17. Gráficos da corrente de pico catódico (I_{pc}) em função da $v^{1/2}$.

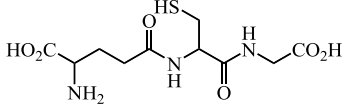
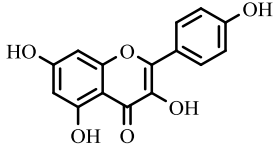
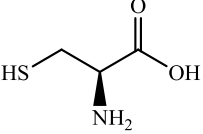
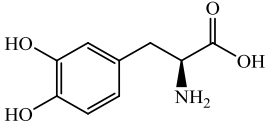
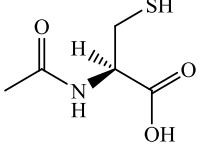
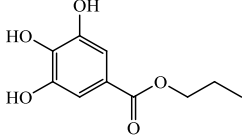
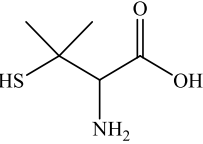


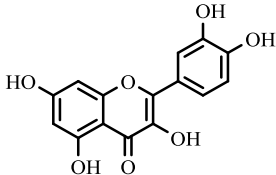
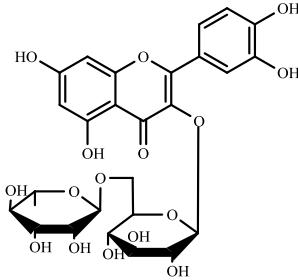
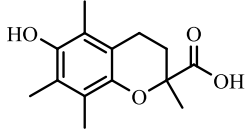


7.4 Anexo 4: Avaliação da reatividade das sondas propostas frente a compostos antioxidantes/redutores

Tabela 18. Avaliação da reatividade da sonda $DMPD^{2+}$ frente a compostos com atividade antioxidante. Condições: $DMPD$ ($2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e $Fe(III)$ ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).

Antioxidante	Estrutura	Tempo de $I_{\text{máx}}$, min	Faixa linear, mg L^{-1}	Curva $\%I = a C_{AO} + b$	r	EC_{50} , mg L^{-1}	EC_{50} , $\mu\text{mol L}^{-1}$	Caráter
Ácido ascórbico		3	0,2 – 2,0	$\%I = 11,5 (\pm 0,2) C_{AO} + 0,04 (\pm 0,2)$	0,9992	4,4*	24,7	hidrofílico
Ácido cafeico		50	0,1 – 1,0	$\%I = 32,0 (\pm 0,6) C_{AO} + 1,4 (\pm 0,4)$	0,9993	1,5*	8,4	lipofílico
Ácido clorogênico		90	0,4 – 2,7	$\%I = 8,0 (\pm 0,1) C_{AO} + 0,3 (\pm 0,2)$	0,9991	6,3*	17,7	lipofílico
Ácido gálico		60	0,2 – 1,2	$\%I = 23,05 (\pm 0,7) C_{AO} + 3,6 (\pm 0,5)$	0,9983	2,0*	11,8	hidrofílico
Ácido tânico		70	1,0 – 7,0	$\%I = 4,6 (\pm 0,2) C_{AO} + 1,0 (\pm 0,7)$	0,9968	10,6*	6,2	hidrofílico
Captopril		210	4,0 – 8,0	$\%I = 2,6 (\pm 0,2) C_{AO} + 15,3 (\pm 1,3)$	0,9962	13,3*	61,4	hidrofílico

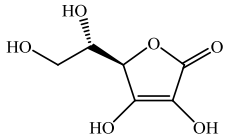
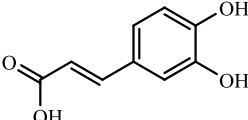
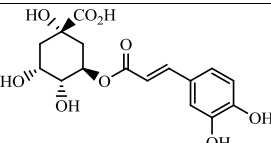
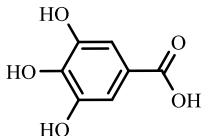
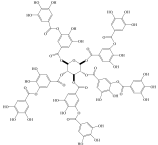
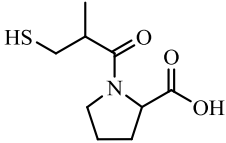
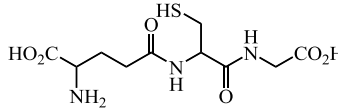
Glutaciona		110	0,5 – 7,0	%I = 4,8 (± 0,1) C _{AO} - 1,6 (± 0,5)	0,9978	10,1*	33,0	hidrofílico
Kaempferol		50	1,0 – 6,0	%I = 6,5 (± 0,05) C _{AO} + 1,8 (± 0,2)	0,9992	7,9*	27,7	lipofílico
L- Cisteína		80	0,3 – 1,8	%I = 25,6 (± 0,2) C _{AO} + 8,2 (± 0,3)	0,9971	1,6	13,5	hidrofílico
L-Dopa		180	0,4 – 1,6	%I = 30,0 (± 0,4) C _{AO} + 5,5 (± 0,4)	0,9984	1,5	7,5	hidrofílico
N- Acetil cisteína		110	1,2 – 3,2	%I = 7,2 (± 0,3) C _{AO} - 6,0 (± 0,6)	0,9970	6,1*	37,2	hidrofílico
N- propil galato		80	2,5 – 18,0	%I = 1,5 (± 0,1) C _{AO} + 5,7 (± 0,6)	0,9976	29,5*	139,2	lipofílico
Penicilamina		10	0,6 – 1,8	%I = 6,0 (± 0,2) C _{AO} - 1,4 (± 0,3)	0,9979	8,6*	57,4	hidrofílico

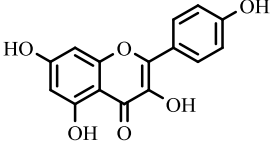
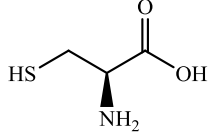
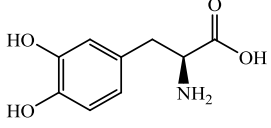
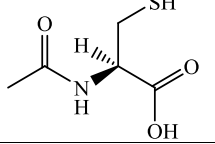
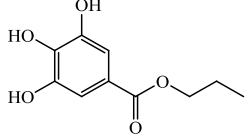
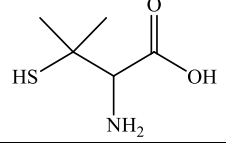
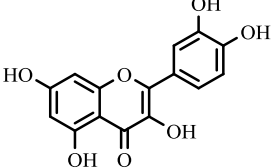
Quercetina		20	0,5 – 7,0	$\%I = 5,02 (\pm 0,1) C_{AO} + 5,6 (\pm 0,5)$	0,9988	8,9*	29,4	lipofílico
Rutina		180	20,0 – 60,0	$\%I = 0,1 (\pm 0,05) C_{AO} - 0,3 (\pm 0,2)$	0,9945	503,0*	823,9	lipofílico
Sulfito de Sódio	Na_2SO_3	10	1,5 – 3,5	$\%I = 18,2 (\pm 0,4) C_{AO} + 3,5 (\pm 1,2)$	0,9991	2,6	20,3	hidrofílico
Trolox		10	1,0 – 6,0	$\%I = 8,6 (\pm 0,1) C_{AO} + 0,3 (\pm 0,3)$	0,9997	5,8	23,1	lipofílico

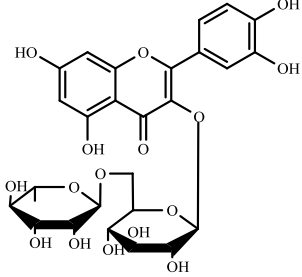
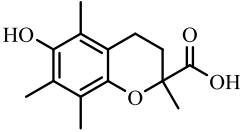
*Valores extrapolados

Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

Tabela 19. Avaliação da reatividade da sonda DEPD⁺ frente a compostos com atividade antioxidante. Condições: DEPD ($2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e Fe(III) ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).

Antioxidante	Estrutura	Tempo de I _{máx} , min	Faixa linear, mg L ⁻¹	Curva %I = a C _{AO} + b	r	EC ₅₀ , mg L ⁻¹	EC ₅₀ , μmol L ⁻¹	Caráter
Ácido ascórbico		5	0,5 – 7,5	%I = 12,7 (± 0,1) C _{AO} - 2,3 (± 0,6)	0,9995	4,1	23,3	hidrofílico
Ácido cafeico		20	0,2 – 1,2	%I = 45,0 (± 1,3) C _{AO} + 2,2 (± 1,0)	0,9983	1,1	5,9	lipofílico
Ácido clorogênico		40	0,2 – 2,0	%I = 15,7 (± 0,8) C _{AO} + 2,4 (± 0,9)	0,9954	3,0*	8,6	lipofílico
Ácido gálico		30	0,2 – 1,4	%I = 50,1 (± 1,5) C _{AO} + 3,2 (± 1,0)	0,9962	0,9	5,5	hidrofílico
Ácido tânico		20	0,1 – 6,0	%I = 7,5 (± 0,2) C _{AO} + 0,64 (± 0,6)	0,9997	6,6*	3,9	hidrofílico
Captopril		30	0,2 – 1,8	%I = 13,2 (± 0,5) C _{AO} + 0,9 (± 0,6)	0,9976	3,7*	17,2	hidrofílico
Glutationa		20	1,0 – 6,0	%I = 9,6 (± 0,2) C _{AO} - 1,6 (± 0,7)	0,9997	5,4	17,4	hidrofílico

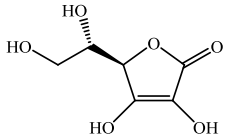
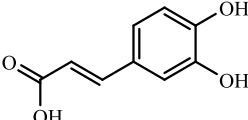
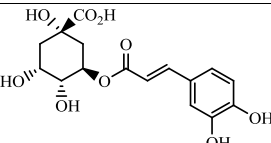
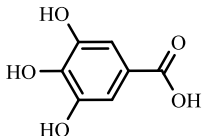
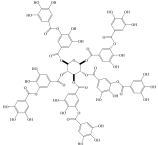
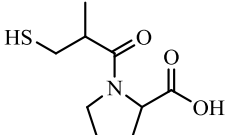
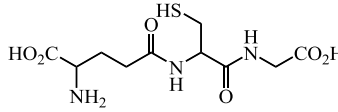
Kaempferol		20	4,0 – 30,0	%I = 1,76 (± 0,04) C _{AO} + 0,8 (± 0,7)	0,9979	28,9	101,0	lipofílico
L- Cisteína		30	0,2 – 1,2	%I = 60,0 (± 1,6) C _{AO} - 3,6 (± 1,2)	0,9986	0,9	7,4	hidrofílico
L-Dopa		200	0,2 – 1,4	%I = 43,6 (± 2,4) C _{AO} + 3,6 (± 2,0)	0,9956	1,1	5,4	hidrofílico
N- Acetil cisteína		30	0,4 – 1,6	%I = 31,3 (± 1,6) C _{AO} - 1,4 (± 1,8)	0,9960	1,6	10,1	hidrofílico
N- propil galato		50	0,2 – 1,2	%I = 12,0 (± 0,2) C _{AO} + 1,2 (± 0,1)	0,9997	4,0*	19,1	lipofílico
Penicilamina		40	0,2 – 1,8	%I = 22,3 (± 0,3) C _{AO} + 0,4 (± 0,3)	0,9997	2,2*	14,9	hidrofílico
Quercetina		20	1,0 – 4,0	%I = 7,7 (± 0,4) C _{AO} + 4,9 (± 0,7)	0,9976	5,8*	19,2	lipofílico

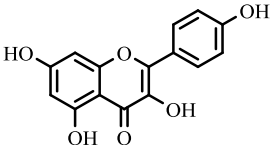
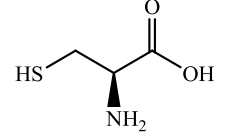
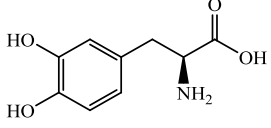
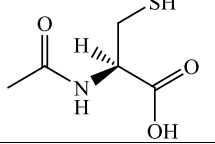
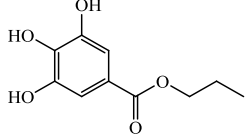
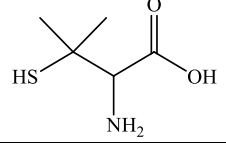
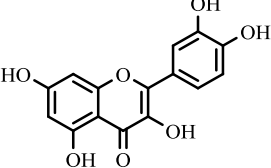
Rutina		180	20,0 – 50,0	%I = 0,5 (± 0,03) C _{AO} + 15,0 (± 1,1)	0,9966	66,0*	108,1	lipofílico
Sulfito de Sódio	Na ₂ SO ₃	5	2,0 – 5,0	%I = 18,0 (± 0,3) C _{AO} - 13,3 (± 1,0)	0,9996	3,5	27,8	hidrofílico
Trolox		5	2,0 – 10,0	%I = 10,2 (± 0,2) C _{AO} - 8,8 (± 0,9)	0,9997	5,8	23,1	lipofílico

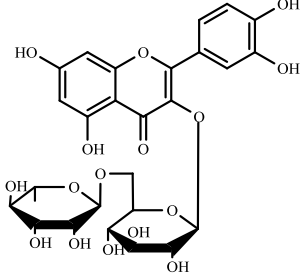
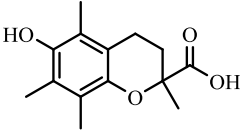
*Valores extrapolados

Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

Tabela 20. Avaliação da reatividade da sonda EHPD⁺ frente a compostos com atividade antioxidante. Condições: EHPD (2×10^{-3} mol L⁻¹) e Fe(III) (2×10^{-4} mol L⁻¹).

Antioxidante	Estrutura	Tempo de I _{máx} , min	Faixa linear, mg L ⁻¹	Curva %I = a C _{AO} + b	r	EC ₅₀ , mg L ⁻¹	EC ₅₀ , μmol L ⁻¹	Caráter
Ácido ascórbico		1	0,25 – 2,0	%I = 10,8 (± 0,2) C _{AO} - 0,7 (± 0,3)	0,9988	4,7*	26,6	hidrofílico
Ácido cafeico		25	0,1 – 1,2	%I = 24,8 (± 0,4) C _{AO} + 0,5 (± 0,3)	0,9996	2,0*	11,1	lipofílico
Ácido clorogênico		50	0,4 – 3,0	%I = 3,1 (± 0,1) C _{AO} + 3,5 (± 0,1)	0,9976	15,0*	42,3	lipofílico
Ácido gálico		30	0,2 – 1,4	%I = 20,4 (± 0,7) C _{AO} - 0,09 (± 0,7)	0,9999	2,5*	14,4	hidrofílico
Ácido tânico		20	2,5 – 15,0	%I = 2,0 (± 0,03) C _{AO} + 5,5 (± 0,4)	0,9986	21,7*	12,8	hidrofílico
Captopril		140	1,0 – 15,0	%I = 1,2 (± 0,1) C _{AO} + 1,7 (± 0,9)	0,9960	40,2*	185,2	hidrofílico
Glutationa		40	2,0 – 8,0	%I = 1,6 (± 0,03) C _{AO} + 0,02 (± 0,2)	0,9988	31,2*	101,6	hidrofílico

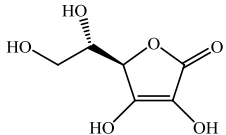
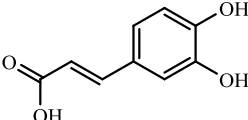
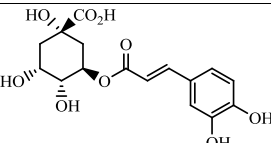
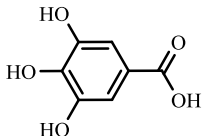
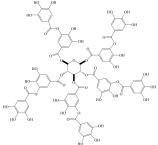
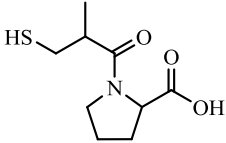
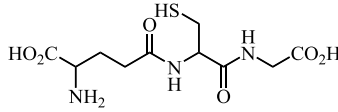
Kaempferol		20	1,0 – 6,0	%I = 5,8 (± 0,1) C _{AO} + 2,6 (± 0,5)	0,9988	8,2*	28,6	lipofílico
L- Cisteína		60	0,5 – 2,0	%I = 12,6 (± 0,4) C _{AO} + 4,9 (± 0,6)	0,9975	3,6	29,5	hidrofílico
L-Dopa		90	0,2 – 1,8	%I = 16,2 (± 0,3) C _{AO} - 0,3 (± 0,3)	0,9988	3,1	15,8	hidrofílico
N- Acetil cisteína		50	0,8 – 4,0	%I = 2,5 (± 0,1) C _{AO} + 0,1 (± 0,2)	0,9966	20,0*	122,3	hidrofílico
N- propil galato		50	2,5 – 10,0	%I = 1,3 (± 0,04) C _{AO} - 0,4 (± 0,3)	0,9987	38,8*	182,7	lipofílico
Penicilamina		40	0,4 – 1,8	%I = 6,2 (± 0,2) C _{AO} - 2,1 (± 0,2)	0,9979	8,4*	56,3	hidrofílico
Quercetina		7	0,5 – 7,0	%I = 4,9 (± 0,03) C _{AO} + 4,2 (± 0,1)	0,9985	9,3*	30,9	lipofílico

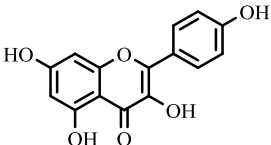
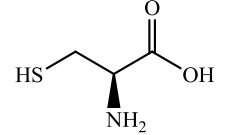
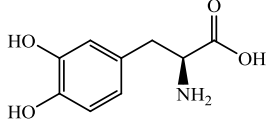
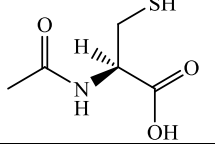
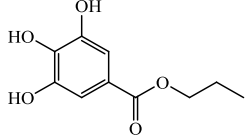
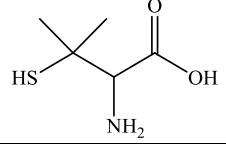
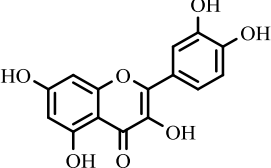
Rutina		1	30,0 – 110,0	$\%I = 0,07 (\pm 0,002) C_{AO} - 1,8 (\pm 0,2)$	0,9974	740,0*	1212,0	lipofílico
Sulfito de Sódio	Na_2SO_3	8	0,5 – 3,0	$\%I = 19,8 (\pm 0,6) C_{AO} + 2,8 (\pm 1,2)$	0,9982	2,4	18,9	hidrofílico
Trolox		6	1,0 – 7,0	$\%I = 8,0 (\pm 0,2) C_{AO} + 0,04 (\pm 1,1)$	0,9976	6,2	25,0	lipofílico

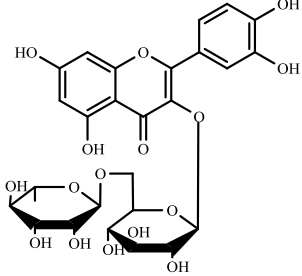
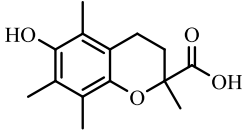
*Valores extrapolados

Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

Tabela 21. Avaliação da reatividade da sonda EHMPD⁺ frente a compostos com atividade antioxidante. Condições: EHMPD (2×10^{-3} mol L⁻¹) e Fe(III) (2×10^{-4} mol L⁻¹).

Antioxidante	Estrutura	Tempo de I _{máx} , min	Faixa linear, mg L ⁻¹	Curva %I = a C _{AO} + b	r	EC ₅₀ , mg L ⁻¹	EC ₅₀ , μmol L ⁻¹	Caráter
Ácido ascórbico		1	0,25 – 1,5	%I = 10,3 (± 0,2) C _{AO} + 0,19 (± 0,2)	0,9990	4,8*	27,5	hidrofílico
Ácido cafeico		40	0,1 – 1,4	%I = 11,4 (± 0,2) C _{AO} - 1,0 (± 0,1)	0,9992	4,5*	24,8	lipofílico
Ácido clorogênico		110	3,0 – 12,0	%I = 0,7 (± 0,1) C _{AO} - 0,6 (± 0,8)	0,9951	72,3*	204,0	lipofílico
Ácido gálico		35	0,3 – 1,8	%I = 2,9 (± 0,4) C _{AO} - 0,1 (± 0,4)	0,9987	17,5*	102,6	hidrofílico
Ácido tânico		35	5,0 – 30,0	%I = 0,7 (± 0,2) C _{AO} - 1,0 (± 0,3)	0,9990	77,23*	45,5	hidrofílico
Captopril		50	3,0 – 7,0	%I = 3,4 (± 0,4) C _{AO} + 9,5 (± 2,1)	0,9991	12,0*	55,4	hidrofílico
Glutathiona		20	1,0 – 6,0	%I = 4,1 (± 0,2) C _{AO} + 4,4 (± 0,7)	0,9981	11,2*	36,4	hidrofílico

Kaempferol		30	1,0 – 6,0	%I = 2,5 (± 0,1) C _{AO} + 1,8 (± 0,4)	0,9968	19,1*	66,8	lipofílico
L- Cisteína		50	0,2 – 1,6	%I = 44,6 (± 0,9) C _{AO} - 0,2 (± 0,9)	0,9987	1,1	9,3	hidrofílico
L-Dopa		80	0,4 – 2,8	%I = 3,2 (± 0,3) C _{AO} + 0,4 (± 0,6)	0,9976	15,5	78,6	hidrofílico
N- Acetil cisteína		40	0,8 – 2,8	%I = 9,5 (± 0,2) C _{AO} + 4,2 (± 0,4)	0,9989	4,8*	29,5	hidrofílico
N- propil galato * (acetonirila)		15	10,0 – 250,0	%I = 0,08 (± 0,0) C _{AO} + 0,08 (± 0,4)	0,9975	624,0*	2940,6	lipofílico
Penicilamina		30	0,4 – 1,4	%I = 16,4 (± 0,4) C _{AO} + 2,0 (± 0,3)	0,9990	2,9*	19,7	hidrofílico
Quercetina		50	0,5 – 7,0	%I = 2,3 (± 0,06) C _{AO} + 0,5 (± 0,3)	0,9978	21,3*	70,6	lipofílico

Rutina		-	-	-	-	-	-	lipofílico
Sulfito de Sódio	Na_2SO_3	7	0,5 – 3,5	$\%I = 20,2 (\pm 0,1) C_{\text{AO}} - 1,4 (\pm 0,2)$	0,9996	2,5	20,1	hidrofílico
Trolox		30	0,5 – 5,0	$\%I = 7,6 (\pm 0,1) C_{\text{AO}} + 1,0 (\pm 0,3)$	0,9995	6,4	25,7	lipofílico

*Valores extrapolados

Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

