



**Universidade Federal da Bahia**  
**Instituto de Química**  
**Programa de Pós-Graduação em Química**



**Desenvolvimento de Sistema de Análise por Injeção  
Sequencial para Determinação Espectrofotométrica da  
Capacidade Antioxidante em Bebidas Empregando o  
Radical Derivado do N-fenil-1,4-fenilenodiamino**

**Leandro de Moura França**

**Salvador, BA - Fevereiro, 2011**

Sistema de Bibliotecas – IQ/UFBA

França, Leandro de Moura .

Desenvolvimento de sistema de análise por injeção seqüencial para determinação espectrofotométrica da capacidade antioxidante em bebidas empregando o radical derivado do N-fenil-1, 4-fenilenodiamino / Leandro de Moura França. - 2012.

104 f. : il.

Orientador: Profª. Drª. Maria das Graças Andrade Korn.

**Leandro de Moura França**

Desenvolvimento de Sistema de Análise por Injeção  
Sequencial para Determinação Espectrofotométrica da  
Capacidade Antioxidante em Bebidas Empregando o  
Radical Derivado do N-fenil-1,4-fenilenodiamino

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia como parte da avaliação para obtenção do título de Mestrado em Química na área de concentração de Química Analítica.

Orientadora: Dra Maria das Graças Andrade Korn

Co-Orientador: Dr Josué Carinhanha Caldas Santos

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho àqueles os quais não estão mais presentes, em especial ao companheiro de GPQA Msc. Mauro Guida.*

## AGRADECIMENTOS

Venho primeiramente agradecer à boa energia que rege este mundo que vivemos, a qual nos fornece bons sentimentos e permite viver em harmonia com todos aqueles que nos cercam.

Agradeço aos meus pais, Aliomar e Celina, pois se cheguei até aqui foi por causa deles, não esquecendo de minha mãezinha Edênia, que também teve muito a ver com isto. Aos meus irmãos, Pedro e Lu, por tudo o que somos. E às minhas grandiosas famílias de Moura e França pela unidade que permite sermos tão próximos.

Àqueles os quais somente não são familiares pela falta do laço sanguíneo, Ailton, Gilka e Nelson, obrigado pelo suporte em todos os momentos. À Daiane e Elis pela boa nova convivência, e a Sara pelo grande envolvimento e presença nos mais diversos momentos.

Aos meu amigos, presentes e “ausentes”, os quais sempre me apoiaram em todas as barras, inclusive na fase de transição... um especial “*HAIL to*” TOG!

À minha Orientadora Maria “Gal” Korn, a quem serei eternamente grato, pelo suporte, incentivo, dedicação e, principalmente, por permitir este engrandecimento na formação profissional. E ao Co-orientador Josué Carinhonha, por todo o suporte que me foi ofertado durante o decorrer desta jornada e também pelos momentos lúdicos, será para mim mais um exemplo de profissional. Obrigado por tudo mesmo!

Ao professor Dr. Mauro Korn pela estrutura cedida para desenvolvimento do trabalho (SonoFia), discussões e ajuda em todos os âmbitos durante o desenvolvimento do trabalho. Aos professores que também contribuíram com os materiais para desenvolvimento; Prof<sup>a</sup> Marília Ferreira Goulart (DPPH e ABTS), Prof<sup>a</sup> Ana Maria Queijeiro López (quercetina) e ao Prof. Jorge M. David (reagentes e compostos derivados do hidroxicinâmico). v

Aos companheir@s de GPQA (UFBA) e SonoFia (UNEB), com destaque para Wdson, Rodolfo, Eduardo e Vitória pelas ajudas pontuais e providenciais na bancada, além dos momentos de descontração.

E, finalmente, ao CNPq pela bolsa concedida, e ao Programa de Pós-Graduação em Química (UFBA).

**EPÍGRAFE**

*“Na vida real não lidamos com deuses, mas com humanos tão comuns quanto nós mesmos. São homens e mulheres cheios de contradições, que são estáveis e inconstantes, fortes e fracos, famosos e infames.”*

Nelson Mandela

## RESUMO

Neste trabalho foi proposto um sistema de análises por injeção sequencial (SIA) para determinação espectrofotométrica da capacidade antioxidante em amostras de bebidas, a partir da geração “*in situ*” do radical derivado do reagente N-fenil-1,4-fenilenodiamino (NFFD<sup>•+</sup>). O radical NFFD<sup>•+</sup> foi produzido em linha pela oxidação do NFFD empregando o Fe<sup>3+</sup> como oxidante. Na otimização do sistema SIA foram avaliados os seguintes parâmetros: ordem de aspiração dos reagentes e amostra, estabilidade da solução de NFFD, pH da amostra, proporção NFFD/Fe<sup>3+</sup>, volumes das soluções dos reagentes e amostra e tempo de interrupção do fluxo. O ácido gálico foi empregado como padrão de calibração para os ensaios. Após as etapas de otimização univariada do método proposto obteve-se faixa linear de 10 a 40 mg L<sup>-1</sup>, com limites de detecção (3σ) de 1,0 mg L<sup>-1</sup> e quantificação (10σ) de 3,3 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Para avaliar o método proposto, foram realizados testes de reatividade do radical NFFD<sup>•+</sup> frente a compostos fenólicos, tiólicos e de outra natureza. A redução do sinal analítico frente a inibição do radical derivado do NFFD foi mais pronunciada para ácido ascórbico, ácido tânico e cisteína, nesta ordem. A capacidade antioxidante com o radical derivado do NFFD foi avaliada em amostras de vinhos e chás, e os resultados foram concordantes com os métodos de referência (Folin-Denis, ABTS e DPPH), de acordo com o coeficiente de correlação, além do ensaio com radical DMPD<sup>•+</sup>, baseado no teste *t*. Assim a amina NFFD por ser utilizada para avaliação da atividade antioxidante em amostras de bebidas. Adicionalmente, as amostras de vinhos foram submetidas a testes de estabilidade temporal e avaliação do efeito do processo de ozonização em relação à variação da capacidade antioxidante.

Palavras chave: atividade antioxidante; N-fenil-1,4-fenilenodiamino; radical; SIA; vinhos; infusões e chás.

## ABSTRACT

In this work was proposed a sequential injection system for spectrophotometric determination of antioxidant capacity in beverage samples with “*in situ*” radical generation from *N*-phenyl-1,4-phenylenediamine (NFFD<sup>•+</sup>). The radical NFFD<sup>•+</sup> was produced by on line oxidation of NFFD employing Fe<sup>3+</sup> as oxidant. The optimization of SIA system evaluated: aspiration order of reagents and sample, stability of the NFFD solution, sample pH, NFFD/Fe<sup>3+</sup> proportion, reagents and sample volumes and stopped flow time. The gallic acid was used as standard of antioxidant compound for proposed sequential injection method. After chemical and physical univariate optimization the linear range obtained in gallic acid concentration was from 10 to 40 mg L<sup>-1</sup>, with detection (3σ) and quantification (10σ) limits of 1.0 and 3.3 mg L<sup>-1</sup>, respectively. To evaluate selective of radical, studies of reactivity were performed with NFFD<sup>•+</sup> and phenolic and thiol molecules and others compounds. The reducing capacity of NFFD<sup>•+</sup> radical was observed preferentially for ascorbic acid, tannic acid and cysteine in this order. The antioxidant capacity with NFFD<sup>•+</sup> radical was measured in samples of wines, infusions and teas. The results were agreement with the references methods (Folin-Denis, ABTS and DPPH), in accord with correlation coefficient, and additionally with the radical DMPD<sup>•+</sup>, based on *t* test. This way, the SIA spectrophotometric method exploring the radical NFFD<sup>•+</sup> can be employed for the antioxidant capacity measured. Additionally, temporal stability and the ozonization effect in wine samples were evaluated using antioxidant capacity as parameter .

**Keywords:** Antioxidant capacity; *N*-phenyl-1,4-phenylenediamine; radical; SIA; wines; teas infusions.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> – <i>Estrutura do Trolox e Tocoferol</i> .....	25
<b>Figura 1.2</b> – <i>Estrutura do AAPH e ABAP</i> .....	26
<b>Figura 1.3</b> – <i>Reação de redução do FRAP</i> .....	27
<b>Figura 1.4</b> – <i>Estruturas químicas da Batocuproína e Neocuproína</i> . ....	29
<b>Figura 1.5</b> – <i>Estrutura molecular e reação de sequestro do ABTS<sup>•+</sup></i> .....	31
<b>Figura 1.6</b> – <i>Estrutura molecular e reação de sequestro do DPPH</i> .....	33
<b>Figura 1.7</b> – <i>Formação e mecanismo de atuação do radical DMPD<sup>•+</sup></i> .....	35
<b>Figura 1.8</b> - <i>Diagramas esquemáticos típicos de sistemas em fluxo</i> .....	42
<b>Figura 3.1</b> - <i>Diagrama SIA para a determinação espectrofotométrica da capacidade antioxidante</i> .....	57
<b>Figura 4.1</b> – <i>Formação e mecanismo de atuação do radical NFFD<sup>•+</sup></i> .....	65
<b>Figura 4.2</b> – <i>Perfis da geração dos sinais analíticos relativos ao radical NFFD<sup>•+</sup> frente a diferentes oxidantes em função do tempo</i> .....	66
<b>Figura 4.3</b> – <i>Perfis dos sinais analíticos relativos à inibição do radical NFFD<sup>•+</sup> frente a compostos com atividade antioxidante</i> .....	68
<b>Figura 4.4</b> – <i>Avaliação da estabilidade temporal da solução de NFFD</i> . ....	71
<b>Figura 4.5</b> – <i>Avaliação do efeito do pH na solução de referência em função da concentração do tampão</i> .....	72
<b>Figura 4.6</b> – <i>Avaliação do efeito da concentração final de HCl na solução de Fe<sup>3+</sup></i> .....	74

<b>Figura 4.7</b> – Avaliação da concentração de NFFD e Proporção da concentração $Fe^{3+}$ /NFFD .....	75
<b>Figura 4.8</b> – Avaliação dos volumes das soluções de NFFD e $Fe^{3+}$ e Avaliação do volume da amostra/tampão .....	76
<b>Figura 4.9</b> – Avaliação da vazão da solução transportadora e Avaliação do comprimento da bobina reacional .....	78
<b>Figura 4.10</b> – Avaliação do tempo de interrupção do fluxo .....	79
<b>Figura 4.11</b> – Perfil de dispersão das zonas de reagentes e amostras nas condições otimizadas do sistema SIA .....	80
<b>Figura 4.12</b> – Registro dos sinais analíticos para determinação espectrofotométrica da capacidade antioxidante empregando o sistema SIA proposto nas condições otimizadas.....	81
<b>Figura 4.13</b> – Avaliação da estabilidade temporal das amostras de vinho branco e tinto nas condições otimizadas do sistema proposto.....	92
<b>Figura 4.14</b> – Avaliação da capacidade antioxidante de amostras de vinho submetidas ao processo de ozonização .....	94

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.1</b> – <i>Comparação De Métodos Para Avaliar A Capacidade Antioxidante</i> .....	37
<b>Tabela 1.2</b> – Métodos em fluxo destinados à determinação da capacidade antioxidante e/ou (poli)fenóis totais. ....	47
<b>Tabela 3.1</b> – <i>Etapas envolvidas na determinação da capacidade antioxidante empregando o sistema SIA proposto</i> .....	58
<b>Tabela 4.1</b> – <i>Avaliação da reatividade do NFFD*+ frente a compostos antioxidantes</i> . ....	83
<b>Tabela 4.2</b> – <i>Valores ótimos dos parâmetros químicos e físicos avaliados no sistema SIA proposto</i> . ....	85
<b>Tabela 4.14</b> – <i>Determinação da capacidade antioxidante em bebidas empregando o método proposto</i> . ....	91

**LISTA DE ABREVIATURAS**

- AA – Ácido ascórbico
- AAPH – 2,2'-azobis-2-metil-propanimidamida-dicloridrato
- ABAP – 2,2'-azobis-(2-amidinopropane)dicloridrato
- ABTS – 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico
- AG – Ácido gálico
- AT – Ácido tânico
- B-PE – B-ficoeritrina
- DMPD - N-N-dimetil-*p*-fenilenodiamina
- DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
- CL – quimiluminescência
- CUPRAC – Ensaio para potencial antioxidante total utilizando  $\text{Cu}^{2+}$  como oxidante
- FI – injeção em fluxo
- FIA – análise por injeção em fluxo
- FC - Fenólicos Totais pelo Reagente de Folin-Ciocalteu
- FRAP - Poder Antioxidante de Redução do Ferro
- HCA – Composto antioxidante
- MCFA – Análise de fluxo com multicomutação
- MFA – Multicomutação na análise em fluxo
- ORAC – Capacidade da absorvância do radical oxigênio (“oxygen radical absorbance capacity”)
- ROS - Espécies reativas de oxigênio
- RNS – Espécies reativas de nitrogênio
- SIA - análise por injeção sequencial
- TRAP - Parâmetro Antioxidante de Aprisionamento Total do Radical
- Trolox - ácido 6 hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
- TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazina
- UV-Vis – Ultravioleta e visível
- NFFD – N-fenil-1,4-fenilenodiamino

**SUMÁRIO**

CAPÍTULO 1 .....	17
1. INTRODUÇÃO .....	18
1.1 Atividade Antioxidante .....	19
1.2 Métodos Analíticos para Determinação da Atividade Antioxidante	22
1.2.1 Capacidade de Absorvância do Radical Oxigênio (ORAC) .....	24
1.2.2 Parâmetro Antioxidante da Captura Total do Radical (TRAP) .	26
1.2.3. Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP).....	27
1.2.4 Ensaio de Redução do Cobre (CUPRAC).....	28
1.2.5 Fenólicos Totais pelo Reagente de Folin-Ciocalteu (FC).....	29
1.2.6 Capacidade Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC ou ABTS•+) .....	31
1.2.7 Ensaio de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) .....	33
1.2.8 Ensaio de DMPD (N,N-dimetil-p-fenilenodiamina).....	35
1.2.9 Comparação entre Métodos para Análise da Atividade Antioxidante.....	36
1.3 Sistemas de Análises em Fluxo .....	37
1.3.1 Sistemas de Análises por Injeção Sequencial (SIA) .....	40
1.3.2 Sistemas de Análises por Injeção em Fluxo para Avaliação da Atividade Antioxidante .....	43
CAPÍTULO 2 .....	49

2. OBJETIVOS .....	50
2.1 Objetivo Geral .....	50
2.2. Objetivos Específicos .....	50
CAPÍTULO 3 .....	52
3. EXPERIMENTAL.....	53
3.1 Reagentes e Soluções .....	53
3.2 Equipamentos .....	56
3.3 Procedimentos .....	57
CAPÍTULO 4 .....	63
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
4.1 Estudos Cinéticos.....	64
4.2 Ordem de Aspiração dos Reagentes e Amostra .....	69
4.3 Efeito do pH da Solução de NFFD .....	70
4.4 Avaliação da Estabilidade da Solução de NFFD .....	70
4.5 Avaliação do Efeito do pH da Amostra .....	71
4.6 Avaliação da Concentração de HCl na Solução Estoque de $\text{Fe}^{3+}$ ..	73
4.7 Avaliação da Concentração de NFFD e Proporção de NFFD/ $\text{Fe}^{3+}$ ..	74
4.8 Avaliação dos Volumes dos Reagentes e Amostra .....	76
4.9 Avaliação da Vazão da Solução Transportadora e do Comprimento da Bobina de Reação ( $B_R$ ) .....	77
4.10 Avaliação do Tempo de Interrupção do Fluxo .....	78

4.11 Coeficiente de Dispersão ( <i>D</i> ) e Grau de Penetração entre Zonas ( <i>P</i> ).....	80
4.12 Figuras de Mérito .....	81
4.13 Avaliação de Reatividade do NFFD <sup>•+</sup> Frente a Compostos com Atividade Antioxidantes .....	82
4.14 Resumo dos Parâmetros Otimizados.....	85
4.15 Análise da Capacidade Antioxidante em Bebidas .....	85
4.16 Análise Temporal da Estabilidade de Amostra de Vinho.....	92
4.17 Avaliação da Atividade Antioxidante de Amostras de Vinhos Submetidas ao Processo de Ozonização .....	93
CAPÍTULO 5 .....	96
5 CONCLUSÕES .....	97
5.1 Perspectivas Futuras.....	98
REFERÊNCIAS.....	99

# CAPÍTULO 1



## INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da exposição a fatores de risco para saúde (dieta inadequada, poluição, fumo, consumo de álcool, exercícios físicos realizados de forma extrema, exposição à radiação ultravioleta e outras ondas curtas), a incidência de doenças crônicas associadas ao estresse, como hipertensão, envelhecimento precoce, distúrbios nervosos e até mesmo o câncer, vêm se tornando comuns na sociedade contemporânea. Diante disto, uma boa alimentação suprida de compostos com atividades antioxidantes é de grande valia para auxiliar, em parte, a manutenção da saúde (OLIVEIRA *et al.* 2009).

Uma dieta balanceada pode ser caracterizada pela ingestão de alimentos que possuem compostos com atividade antioxidante como vitaminas (C, E e A), produtos naturais (carotenóides, tióis, furanóides, flavonóides e outros polifenóis) e produtos sintéticos (N-acetilcisteína) (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Compostos como estes auxiliam na eliminação dos agentes oxidantes presentes no organismo, ou seja, as espécies reativas oriundas dos processos metabólicos, normal ou patológico, ou proveniente de fontes exógenas físicas ou químicas, pois os componentes celulares não são totalmente protegidos pelos antioxidantes endógenos (CERQUEIRA *et al.*, 2007) .

Portanto, torna-se fundamental a identificação e caracterização de bebidas, alimentos e medicamentos capazes de fornecer compostos ou classes de substâncias que apresentem atividade antioxidante para suprir nutricionalmente as carências individuais, fornecendo conhecimentos sobre estes alimentos funcionais, facilitando sua inserção na dieta e auxiliando o organismo na prevenção de doenças associadas ao estresse oxidativo. Para quantificação da atividade antioxidante, o desenvolvimento de um método

simples, rápido e de baixo custo é importante, com isto, o N-fenil-1,4-fenilenodiamino (NFFD) é uma amina que pode ser utilizada para avaliar a capacidade antioxidante em um sistema de análise por injeção sequencial.

Uma variedade de métodos analíticos estão disponíveis para determinação da atividade antioxidante, os quais diferem entre si em relação às reações e padrões utilizados para calibração. Isto incorreu em uma falta de padronização para avaliação da atividade antioxidante frente às distintas áreas de aplicação (fisiológica, farmacológica, nutricional e agroquímica) as quais desenvolvem os métodos de acordo com suas amostras e intenções de resultados (MAGALHÃES *et al.*, 2008).

## 1.1 Atividade Antioxidante

Estudos epidemiológicos mostraram, consistentemente, que a ingestão de frutas e vegetais, bem como grãos, está fortemente associada à redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas (LIU, FELICE, 2007) como inflamações, doenças cardiovasculares, câncer e distúrbios relacionados com envelhecimento (HUANG *et al.*, 2005). Associado a estas doenças crônicas, o estresse redox pode ser caracterizado pelo desequilíbrio da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e a remoção destas espécies por parte dos sistemas químicos e enzimático torna-se a defesa antioxidante do organismo (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

A oxidação de uma substância pode ser definida, atualmente, como conversão desta substância química em um derivado com número menor de elétrons, em outras palavras, é a perda de um ou mais elétrons para outra substância e o processo inverso pode ser considerado como redução (DAVID *et al.*, 2010). A auto-oxidação ocorre amplamente em alimentos que contém

gorduras, óleos ou lipídios o que ocasiona deterioração do alimento e concomitante perda de nutrientes, odor desagradável e formação de substâncias tóxicas potenciais (SHAHIDI, HO, 2007).

Nos sistemas biológicos, os radicais livres são átomos ou moléculas produzidos continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas desempenhando funções relevantes ao metabolismo. Contudo, o excesso destas espécies reativas apresenta efeitos deletérios, provocando alterações na estrutura e funções celulares, estando assim envolvidos em patologias (DAVID *et al.*, 2010). Além destes, pró-oxidantes são substâncias endógenas ou exógenas que possuem a capacidade de oxidar moléculas alvo, induzindo danos oxidativos (CERQUEIRA *et al.*, 2007; MAGALHÃES *et al.*, 2008).

Em nível bioquímico, para minimizar a ação dos oxidantes, os antioxidantes contemplam enzimas ou substâncias orgânicas capazes de neutralizar os efeitos danosos da oxidação nos tecidos animais; esta habilidade de sequestrar espécies reativas, como os radicais livres pode ser obtida de fontes externas como os alimentos, que fornecem substâncias as quais diminuem significativamente o efeito adverso de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na função fisiológica normal dos humanos. Estes adjuvantes oriundos de fontes externas auxiliam os antioxidantes endógenos, já que estes são insuficientes para esta tarefa, reduzindo assim ações degenerativas através do distúrbio conhecido como estresse oxidativo (DAVID *et al.*, 2010; HUANG, 2005).

Halliwell e colaboradores (1995), definiram antioxidantes biológicos como “*moléculas que, quando presentes em pequenas concentrações, comparada*

com as biomoléculas que supostamente devem proteger, podem prevenir ou reduzir a extensão da destruição oxidativa destas biomoléculas". De acordo com esta definição, nem toda espécie com características redutoras são antioxidantes, quer dizer, somente os compostos que são capazes de proteger alvos biológicos se adequam a este critério, e esta proteção deve ser baseada em alguns mecanismos de ação: (i) inibição da geração e capacidade sequestrante contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (do inglês, "reactive oxygen ou nitrogen species" - ROS e RNS, respectivamente); (ii) capacidade redutora; (iii) capacidade de complexar íons metálicos; (iv) apresentar atividade semelhante a enzimas com capacidade antioxidante e (v) inibição da enzima oxidativa (MAGALHÃES *et al.*, 2008).

A proteção antioxidante de sistemas biológicos contra os danos oriundos da ação de radicais livres é vital para integridade das estruturas celulares e macromoléculas. Com o envelhecimento celular, ocorre um declínio do sistema imune frente a espécies reativas de oxigênio e nitrogênio além de processos que conduzem à elevação do estresse oxidativo podem agravar este decaimento; reduzindo a proteção contra os danos causados pelas ROS e RNS, onde se pode incluir radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), oxigênio singlete ( $^1O^2$ ), ânion hipoclorito ( $OCl^-$ ), ânion peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) e radical óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) (MAGALHÃES *et al.*, 2009a; SHAHIDI, HO, 2007).

Carotenóides e compostos (poli)fenólicos são antioxidantes majoritários na dieta. Carotenóides são pigmentos naturais lipossolúveis que fornecem uma coloração brilhante às plantas e animais e atuam como antioxidante – a cadeia principal de polienos consiste no modelo de duplas ligações conjugadas, o que

confere afinidade por ROS e RNS, usualmente os radicais livres (SHAHIDI; HO, 2007).

Compostos fenólicos possuem um ou mais anéis aromáticos, sendo o número de grupos hidroxilas variável e geralmente são categorizados como ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos, cumarinas ou taninos (LIU, FELICE, 2007). Os flavonóides (quercetina, por exemplo) são polifenóis mais abundantes e estão presentes em frutas, vegetais folhosos, raízes, bulbos, ervas, pimentas, legumes, chás, cafés, cacau, chocolate, vinhos, entre outros. Quase todos os flavonóides possuem diversas propriedades biológicas e químicas em comum: (i) capacidade antioxidante; (ii) habilidade de sequestrar ROS; (iii) capacidade de sequestrar eletrófilos; (iv) habilidade de inibir nitroação; (v) habilidade de quelar metais; e (vi) capacidade de modular a atividade enzimática celular (SHAHIDI; HO, 2007).

## **1.2 Métodos Analíticos para Determinação da Atividade Antioxidante**

Com a diversidade de tipos de radicais livres e suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, há dificuldade e falta de consenso sobre a existência de um método simples e universal que permita avaliar a atividade antioxidante de forma precisa e quantitativa nos diferentes sistemas de interesse. Diante disto, a busca por novos métodos através da variedade de sistemas geradores de radicais livres é uma vertente na busca por testes mais rápidos e eficientes, proporcionando atualmente uma variedade de métodos para avaliar a atividade de antioxidantes naturais (DAVID *et al.*, 2010).

Muitos protocolos e diretrizes têm sido estabelecidos para determinação da atividade antioxidante visando proporcionar ordem e concordância devido às divergências dos resultados em muitos ensaios, e isto pode ser aperfeiçoado

se metodologias mais seletivas forem utilizadas, sendo capazes de definir quais produtos são formados e inibidos pelos antioxidantes (DAVID *et al.*, 2010).

Uma grande variedade de compostos (poli)fenólicos existem em plantas e muitos destes possuem capacidade antioxidante. Em amostras reais, há uma grande dificuldade de quantificar individualmente os compostos antioxidantes, com isto a maioria dos métodos existentes fornece a concentração total dos componentes antioxidantes em plantas ou amostras biológicas, sendo este tipo de ensaio comumente designado como avaliação da capacidade antioxidante “total” (PRIOR, WU, 2007), devido ao sinergismo ocasionado pelos compostos presentes.

Os métodos analíticos “*in vitro*” para a determinação da capacidade antioxidante possuem duas abordagens. Os métodos competitivos: em que a espécie alvo (composto que representa a biomolécula que deveria ser atacada *in vivo*) e o antioxidante competem pela espécie reativa (radical ou não-radical); e a avaliação da capacidade antioxidante, neste caso, é verificada através de uma sonda analítica, composto responsável por facilitar a quantificação através de seu consumo pelas espécies reativas remanescentes; Para os métodos não competitivos, supostos compostos antioxidantes interagem com espécies reativas sem a presença de qualquer outra molécula alvo concorrente, e a sonda para monitorar a reação é a espécie reativa (MAGALHÃES *et al.*, 2008).

Entre os ensaios para avaliação da capacidade antioxidante, podem-se citar os ensaios de sequestro de radicais, os quais ocorrem por meio de mecanismos baseados em transferência de átomos de hidrogênio ou elétrons. Os ensaios capacidade de absorção do oxigênio radical (do inglês, “*oxygen*

*radical absorbance capacity*" - ORAC), parâmetro antioxidante para captura total de radical (TRAP) e clareamento da crocina (do inglês, "*bleaching of crocin*") são os principais métodos utilizados baseados em transferência do átomo de hidrogênio. Os ensaios capacidade de antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) (baseado nas sondas ABTS<sup>•+</sup> ou DPPH<sup>•</sup>), fenólicos totais (Folin-Ciocalteu), poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), ensaio para potencial antioxidante total utilizando Cu<sup>II</sup> como oxidante (CUPRAC), e ensaios sequestrantes de radical de ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup> representam os métodos baseados em transferência de elétrons. (HUANG, *et al.*, 2005; PRIOR; *et al.*, 2005; SHAHIDI, ZHONG, 2007).

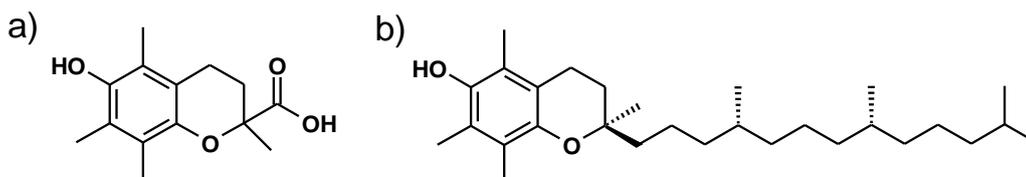
Há ainda o método quimioluminescente (CL), modificação mais sensível do TRAP, em que o ensaio é baseado na reação de radicais oxidantes com compostos marcadores que produz espécies em estados excitados as quais emitem quimioluminescência (PRIOR *et al.*, 2005). Já o método eletroquímico, baseia-se nas propriedades eletroquímicas de compostos puros, alimentos e amostras biológicas, sendo utilizadas para avaliação da sua capacidade redutora/antioxidante, uma vez que o valor relativo ao potencial de oxidação tem relação com a capacidade antioxidante esperada (MAGALHÃES *et al.*, 2008). Em seguida, serão relatadas os princípios e as principais características dos métodos previamente citados.

### **1.2.1 Capacidade de Absorvância do Radical Oxigênio (ORAC)**

O ensaio ORAC é uma medida de inibição antioxidante induzida por oxidação através do radical peroxil. Verificando a atividade antioxidante por meio da cadeia radical clássica, quer dizer, pela transferência do átomo de hidrogênio. O método tem como princípio básico a reação do radical peroxil

com uma sonda fluorescente, formando no fim um produto não fluorescente, com monitoramento por espectrofluorimetria. A capacidade antioxidante de uma determinada substância ou amostra é relacionada à taxa de redução da fluorescência através do tempo (PRIOR, 2005).

Inicialmente utilizava-se a B-ficoeritrina (B-PE, proteína fluorescente) como sonda espectrofluorimétrica, mas a B-PE apresentou alguns aspectos negativos como: 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 perda da fluorescência intrínseca, mesmo sem adição do radical gerado (HUANG, 2005). Atualmente, utiliza-se como sondas a fluoresceína ou diclorofluoresceína, por serem mais estáveis e menos reativas, e os valores são usualmente reportados como equivalentes de trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromana-2-carboxílico), análogo hidrossolúvel do tocoferol - figura 1.1) (PRIOR, 2005).



**Figura 1.1** – Estrutura do (a) Trolox e (b) Tocoferol (vitamina E), respectivamente. (vitamina E).

Este ensaio ainda pode ser aplicado a compostos antioxidantes hidro-ou lipofílicos, utilizando fonte geradora de radical peroxil e solvente(s) adequados (MAGALHÃES *et al.*, 2008). Assume-se que os mecanismos antioxidantes e proteção da B-PE pelo antioxidante mimetizam substratos biológicos. Entretanto, pequenas variações de temperatura nos poços externos das microplacas podem afetar a reprodutibilidade do ensaio (PRIOR *et al.*, 2005).

### 1.2.2 Parâmetro Antioxidante da Captura Total do Radical (TRAP)

O método TRAP foi inicialmente introduzido por Wayner e colaboradores para monitorar as condições antioxidantes do plasma humano (MAGALHÃES *et al.*, 2008). O método TRAP caracteriza-se por monitorar a capacidade dos compostos com atividade antioxidante em interferir na reação entre o radical peroxil gerado pelo AAPH (2,2'-azobis-2-metil-propanimidamida dicloridrato) ou ABAP (2,2'-azobis-2-amidinopropane dicloridrato), (Figura 1.2) e a sonda fluorescente R-ficoeritrina (R-PE), que pode ter sua oxidação acompanhada por espectrofluorimetria, ou espectrofotometricamente, monitorando a formação do radical derivado do ABTS (2,2'-azinobis(3- etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico) com resultados usualmente expressos em equivalentes de trolox (PRIOR, 2005; HUANG, 2005).

Na fase de inibição (fase *lag*), quando se adiciona uma amostra com atividade antioxidante ou o padrão não se observa alteração do sinal analítico, visto que os antioxidantes são consumidos ao invés da sonda. Esta etapa é utilizada como referência para determinar a capacidade antioxidante da amostra ou padrão (PRIOR, 2005; HUANG, 2005).

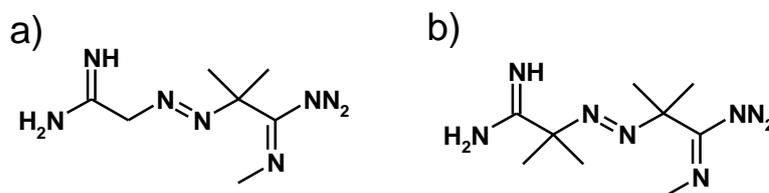


Figura 1.2 – Estrutura do (a) AAPH e (b) ABAP

O ensaio TRAP é mais frequentemente utilizado para medidas e avaliação *in vivo* da capacidade antioxidante no soro ou plasma, pois este método mensura antioxidantes não-enzimáticos (como, glutatona, ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol e  $\beta$ -caroteno). O ensaio se baseia na 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 *lag*) 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, 2005). Contudo, o maior problema no ensaio TRAP é monitorar com precisão os diferentes pontos finais das curvas cinéticas associadas às reações empregadas, dificultando a expressão dos resultados por diferentes laboratórios (PRIOR *et al.*, 2008).

### 1.2.3. Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP)

Este ensaio foi originalmente desenvolvido para mensurar o poder redutor no plasma, mas posteriormente foi adaptado e utilizado para medir a capacidade antioxidante em extratos vegetais (PRIOR *et al.*, 2005). A reação é baseada na redução do complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) férrico, de  $[Fe^{3+}-(TPTZ)_2]^{3+}$  para  $[Fe^{2+}-(TPTZ)_2]^{2+}$  (Figura 1.3), o qual apresenta coloração azul intensa ( $\lambda_{max} = 593 \text{ nm}$ ) em meio ácido (pH 3,6) (MAGALHÃES *et al.*, 2008).

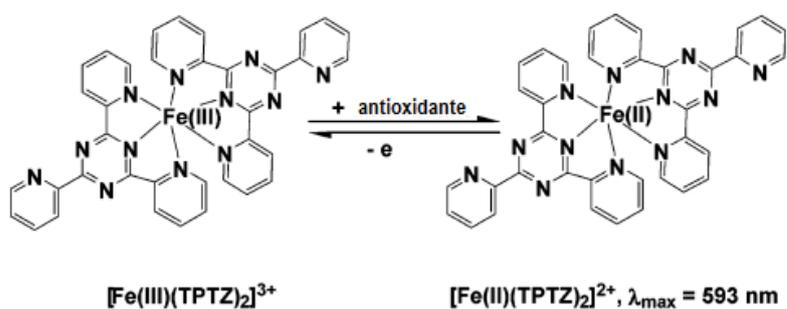


Figura 1.3 – Reação de redução do FRAP

Pulido e colaboradores (2000) mensuraram valores de FRAP para diversos compostos (poli)fenólicos em meio aquoso e metanólico. Contudo, o

sinal relativo à absorvância do complexo reduzido ( $A_{593\text{ nm}}$ ) não estabilizou após 4 min, como preconiza o método. Ao contrário disto, aumentou lentamente após algumas horas, para os seguintes compostos avaliados ácido caféico, ácido tânico, ácido ferrúlico e quercetina, além do ácido ascórbico, requerendo assim um longo tempo para análise, pois um único ponto de absorção pode não representar uma reação concluída (HUANG, 2005).

Mesmo assim o ensaio FRAP pode ser considerado simples, rápido, de baixo custo e robusto, além de não requisitar equipamento específico, podendo utilizar métodos automáticos, semiautomáticos ou manuais (PRIOR *et al.*, 2005). O potencial redox do sal de  $\text{Fe}^{3+}$  (~0,70 V) é comparável ao do  $\text{ABTS}^{++}$  (0,68 V). Portanto, essencialmente, não há muita diferença entre os métodos TEAC e FRAP, exceto pelo TEAC ser desenvolvido em meio neutro (HUANG *et al.*, 2005).

#### **1.2.4 Ensaio de Redução do Cobre (CUPRAC)**

Este ensaio baseia-se inicialmente na formação de um complexo entre  $\text{Cu}^{2+}$  com os ligantes cromogênicos batocuproína (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina -  $\lambda_{\text{max}} = 490\text{ nm}$ ) ou neocuproína (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina -  $\lambda_{\text{max}} = 450\text{ nm}$ ) na proporção de 2:1 (Figura 1.4), ligante em relação ao metal. Em seguida, na presença de compostos com atividade antioxidante (agentes redutores) o íon complexado  $\text{Cu}^{2+}$  é reduzido a  $\text{Cu}^+$ , alterando a cor do complexo. Este ensaio permite medir a ação total de compostos com atividade antioxidante em uma determinada amostra (HUANG, 2005; PRIOR, 2005).

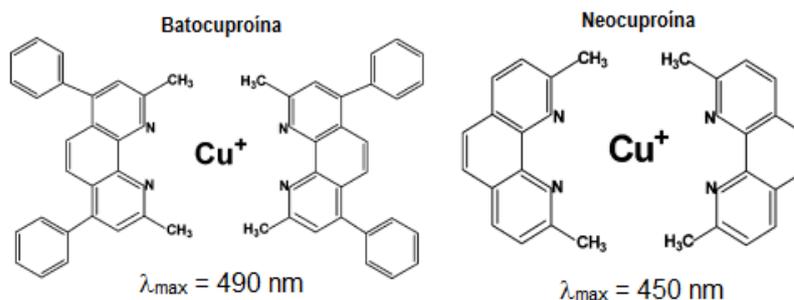


Figura 1.4 – Estruturas químicas da Batocuproína e Neocuproína.

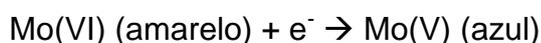
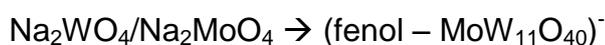
O emprego do complexo de  $\text{Cu}^{2+}$  tem vantagem sobre os complexos de  $\text{Fe}^{3+}$  para ensaios de atividade antioxidante em todas as classes de substâncias, incluindo tióis, pois apresenta pouca interferência dos radicais reativos e a cinética de redução do  $\text{Cu}^{2+}$  é mais rápida que a do  $\text{Fe}^{3+}$ . O  $\text{Cu}^{2+}$ , livre ou em complexo com fenantrolina possui baixo potencial redox em relação ao  $\text{Fe}^{3+}$ , o que torna sua reação mais seletiva; açúcares e ácido cítrico são interferentes para o FRAP, mas não são oxidados no CUPRAC. Soluções preparadas por diluição de padrão de ácido úrico são utilizadas para converter absorvância em equivalentes de ácido úrico.

Em geral, os valores mensurados para polifenóis são comparáveis ao de TEAC empregando o radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ; além disto o CUPRAC é rápido, ocorrendo em minutos para ácido ascórbico, ácido úrico, ácido gálico e quercetina, mas requer de 30 a 60 min para moléculas mais complexas (PRIOR, 2005).

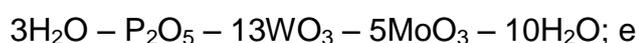
### 1.2.5 Fenólicos Totais pelo Reagente de Folin-Ciocalteu (FC)

O método de Folin-Ciocalteu foi desenvolvido em 1927 a partir de metodologia empregada para análise de tirosina. Este método é baseado na oxidação de compostos fenólicos pelo reagente de FC, o qual é constituído principalmente por uma mistura de molibdato e tungstato. A redução destes

compostos leva à formação de produto de cor azul com  $\lambda_{\text{máx}} \approx 750 \text{ nm}$  (HUANG, 2005). O processo químico associado ao ensaio de FC baseia-se na transferência de elétrons de compostos fenólicos ou outras espécies redutoras para o  $\text{Mo}^{5+}$  em meio alcalino, e, geralmente, o ácido gálico é utilizado como composto padrão de referência, sendo o resultado expresso como equivalente de ácido gálico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (MAGALHÃES *et al.*, 2008). O esquema da reação para formação do produto colorido é (PRIOR *et al.*, 2005):



O método FC é simples, sensível e preciso, mas a reação demonstrou-se lenta em meio ácido, levando a falta de especificidade (PRIOR *et al.*, 2005). Singleton e Rossi (1965) melhoraram o método com os reagentes heteropoliânion molibdico-tungsto-fosfórico:



Boa correlação linear foi observada entre o ensaio de FC e outros métodos para medir a capacidade antioxidante baseados em transferência de elétrons. Uma comparação dos resultados obtidos entre o ensaio TEAC e o FC para amostras de vinhos tintos, cervejas, infusões de ervas e chás e apresentou uma boa correlação ( $r > 0,9$ ) para o teor de fenólicos totais e atividade antioxidante (MAGALHÃES *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2005). Mesmo assim, o método de FC sofre com o número de substâncias interferentes [particularmente açúcares, aminas aromáticas, dióxido de enxofre, ácido ascórbico, ácidos orgânicos e  $\text{Fe}^{2+}$ ] e a correção para substâncias interferentes deverá ser feita, com o intuito de evitar valores superestimados (PRIOR, 2005).

### 1.2.6 Capacidade Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC ou ABTS<sup>•+</sup>)

O ensaio de TEAC foi inicialmente reportado por Mille e colaboradores (1993) sendo baseado na habilidade sequestrante do radical cátion ABTS<sup>•+</sup> (ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico). No ensaio o ABTS é oxidado através de reação química, eletroquímica ou enzimática levando a formação da espécie reativa ABTS<sup>•+</sup> (Figura 1.5). Para geração do radical ABTS<sup>•+</sup> por reação química emprega-se o radical peroxil, persulfato de potássio ou outro oxidante na oxidação do ABTS para do ABTS<sup>•+</sup>, que possui coloração verde intensa ( $\lambda_{\max} = 734 \text{ nm}$ ). A avaliação da capacidade antioxidante é mensurada através da habilidade dos compostos ou amostras avaliadas de reduzir a coloração da solução do radical ABTS<sup>•+</sup>, reagindo diretamente com o radical levando a formação de ABTS de cor verde clara ou incolor. A amostra a ser testada deverá ser adicionada ao meio reacional depois da formação do radical; os resultados dos testes são expressos em equivalente de Trolox (MAGALHÃES, 2009b; PRIOR, 2005).

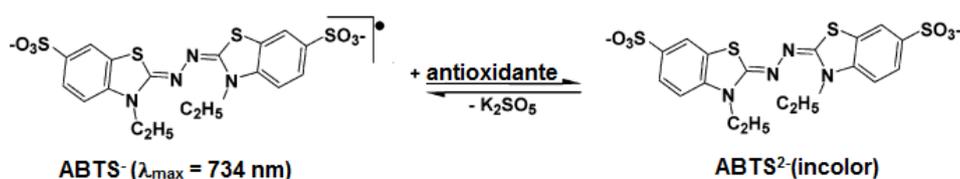


Figura 1.5 – Estrutura molecular e reação de sequestro do ABTS<sup>•+</sup>

A ordem de adição dos reagentes e amostra constitui uma das principais críticas a este ensaio, pois os compostos com atividade antioxidante podem reagir com o oxidante (responsável pela geração do radical ABTS<sup>•+</sup>), levando assim a superestimação da capacidade antioxidante. Outro aspecto importante a ser considerado é o comprimento de onda de medida do radical ABTS<sup>•+</sup>. A medida a 734 nm, é preferencial a 415 nm (o radical ABTS<sup>•+</sup> apresenta dois

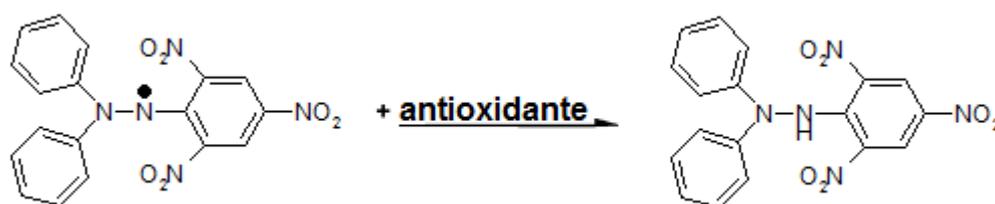
máximos de absorção) pois evita a interferência de outros compostos absorventes em menores valores de comprimentos de onda, além de minimizar efeitos da turbidez da amostra. Além disto, o ensaio espectrofotométrico é tecnicamente simples, que justifica o amplo emprego deste método e suas aplicações para triagens e determinações rotineiras (MAGALHÃES, 2008).

O radical ABTS<sup>•+</sup> reage rapidamente com compostos com atividade antioxidante, de 1 a 30 min, mas para verificar o ponto final da reação, nos casos de uma reação com cinética mais lenta, utiliza-se o maior tempo, o que torna o método TEAC inadequado. Pois, os resultados obtidos para amostras são relacionados a padrões de compostos antioxidantes que apresentam diferentes comportamentos cinéticos, o que torna o resultado por este método dependente do tempo de análise. Pode ser utilizado em uma ampla faixa de pH podendo auxiliar em estudos de interferência do pH sobre mecanismo de atividade antioxidante; em pH ácido há uma maior facilidade para transferência de elétrons, demonstrando assim uma maior versatilidade para o TEAC (MAGALHÃES *et al.*, 2008; PRIOR *et al.*, 2005).

Além disto, apresenta solubilidade em soluções de natureza aquosa e orgânica e não sofre efeito da força iônica do meio. Logo, o ensaio empregando o radical ABTS<sup>•+</sup> pode ser utilizado em múltiplos meios para determinar capacidade antioxidante de espécies com características hidro- e lipofílicas em diferentes amostras. Mas, mesmo assim não o torna representativo em relação à biomoléculas por não ter sido encontrado em algum sistema biológico. Por fim, o ensaio TEAC, por sua rápida reação, pode ser automatizado e adaptado a microplacas e sistemas de análises por injeção em fluxo (MAGALHÃES *et al.*, 2008; PRIOR *et al.*, 2005).

### 1.2.7 Ensaio de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

O DPPH<sup>•</sup> é um dos poucos e comercialmente disponíveis radical orgânico nitro gerado, possuindo absorção máxima na região do UV-Vis em 515 nm (HUANG, 2005). A capacidade sequestrante do radical DPPH<sup>•</sup> é geralmente avaliada em meio orgânico (metanol ou etanol) através do monitoramento do decréscimo da absorvância (515 nm) pela adição de um composto ou amostra com atividade antioxidante, até que o sinal se mantenha constante (MAGALHÃES, 2008). O ensaio baseia-se na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH<sup>•</sup>, reduzindo-o à respectiva hidrazina (Figura 1.6); mudando a coloração de violeta para amarelo pálido (MAGALHÃES, 2009b).



**Figura 1.6** – Estrutura molecular e reação de sequestro do DPPH<sup>•</sup>

A acessibilidade estérica ao radical DPPH<sup>•</sup> é o fator determinante da reação com compostos com atividade antioxidante. Logo, pequenas moléculas tem maior acesso ao sítio do radical DPPH<sup>•</sup> o que leva, relativamente, a uma maior atividade antioxidante (MAGALHÃES, 2008). Em função de estudos cinéticos da reação entre compostos fenólicos e o radical DPPH<sup>•</sup>, Foti e colaboradores (2004) sugeriram que a reação de fato comporta-se como transferência de elétrons. Observou-se que a etapa determinante para esta reação consiste em uma rápida transferência de elétrons do ânion fenóxido para o DPPH<sup>•</sup> já que a abstração do átomo de H do fenol associado (ArOH) pelo DPPH<sup>•</sup> mostrou ser uma rota reacional desfavorável, pelo fato desta

ocorrer lentamente em solventes polares que admitam ligações de hidrogênio, como metanol e etanol (HUANG, 2005). O emprego de métodos baseados na reação do DPPH<sup>•</sup> com compostos ou amostras que apresentam atividade antioxidante tem sido publicado.

Contudo em função da cinética que um determinado composto ou classe de compostos possa apresentar frente a reação com o radical DPPH<sup>•</sup> foi sugerida uma classificação em função da velocidade da reação em atingir o estado estacionário (*steady state*), podendo esta ser rápida, intermediária ou lenta (MUNOZ, 2010), ou seja, a coloração pode ser por ambas reações com os radicais, por transferência de átomos de H ou transferência de elétron, e o impedimento estérico será o determinante para a reação (PRIOR *et al.*, 2005).

Os testes com DPPH<sup>•</sup> são simples e rápidos, necessitando apenas de espectrofotômetro UV-Vis para execução. Mas a interpretação dos resultados pode ser prejudicada, pois podem haver compostos teste que sobreponham o espectro do DDPH em 515 nm (ex. carotenoides) (PRIOR *et al.*, 2005). O ensaio DPPH<sup>•</sup> não é adequado para mensurar a capacidade antioxidante no plasma, pois as proteínas precipitam no meio reacional alcoólico, além disto, o ensaio consome bastante tempo de análise, podendo levar de 20 min a 6 h. Mesmo assim, o radical DPPH<sup>•</sup> é estável, comercialmente disponível, e não necessita ser gerado antes do ensaio, o que confere a propriedade de ser um método espectrofotométrico fácil e útil no que se refere a “*screening*” (rastreamento)/análise da capacidade antioxidante de compostos puros a misturas complexas (MAGALHÃES *et al.*, 2008).

### 1.2.8 Ensaio de DMPD (N,N-dimetil-p-fenilenodiamina)

Abordagens baseadas na geração de radicais cátions têm sido introduzidas para mensurar a atividade antioxidante total em fluidos humanos, extratos alimentícios e compostos puros. A produção do cátion radical derivado do DMPD ( $\text{DMPD}^{+\cdot}$ ) forma a base de métodos espectrofotométricos que foram aplicados previamente para avaliar a capacidade antioxidante em amostras de vinhos e estado oxidativo do plasma humano. Este ensaio é baseado na geração do cátion radical  $\text{DMPD}^{+\cdot}$  de coloração violeta ( $\lambda_{\text{máx}} = 520 \text{ nm}$ ) e a extensão da descoloração com a adição de amostra com atividade antioxidante (Figura 1.7) (KHAN *et al.*, 2007).

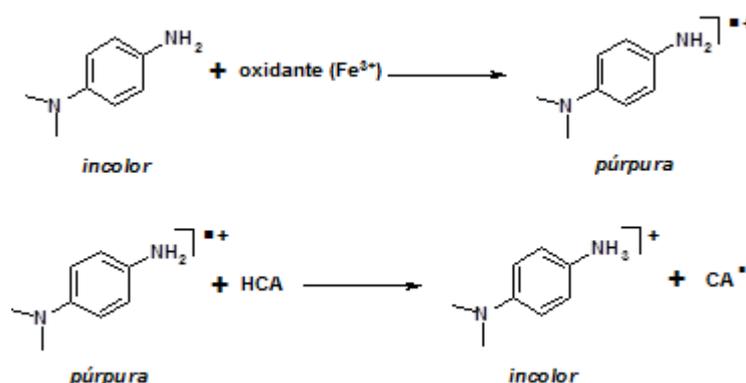


Figura 1.7 – Formação e mecanismo de atuação do radical  $\text{DMPD}^{+\cdot}$ .

Fogliano e colaboradores (1999) verificaram que os resultados referentes à capacidade antioxidante de vinhos (expressos em equivalentes de Trolox) empregando o ensaio do radical  $\text{DMPD}^{+\cdot}$  foram comparáveis ao ABTS, proposto por Miller e Rice-Evans (1997), além de parâmetros como sensibilidade e reprodutibilidade, mesmo apresentando-se menos sensível. Semelhante ao ensaio com radical  $\text{DPPH}^{\cdot}$ , o método baseado no sequestro do radical  $\text{DMPD}^{+\cdot}$ , utilizando Trolox como padrão, foi prático e simples para avaliar características dos vinhos de mesa da Ilha da Madeira (PAIXÃO *et al.*, 2007). O ensaio com o radical  $\text{DMPD}^{+\cdot}$  demonstrou-se adequado para análise

em larga escala de extratos aquosos alimentícios, porém apresenta baixa sensibilidade e reprodutibilidade quando aplicado a antioxidantes lipofílicos, como  $\alpha$ -tocoferol e BHT, ou quando metanol é empregado como solvente (FOGLIANO *et al.*, 1999).

### **1.2.9 Comparação entre Métodos para Análise da Atividade Antioxidante**

Até o presente momento, uma grande variedade de métodos para determinação da atividade antioxidante está disponível. Os ensaios diferem entre si em termos de mecanismos de reação, oxidantes e espécies alvo/sonda, condições de reação, e a forma de expressão dos resultados. Mesmo considerando um único ensaio, diferentes padrões de compostos antioxidantes, solventes, tempos de reação e pH são frequentemente aplicados, principalmente devido ao largo espectro de áreas em que estes métodos são realizados em que pode-se incluir fisiologia, farmacologia, nutrição e agroquímica (MAGALHÃES *et al.*, 2008).

A grande variedade de métodos é vantajoso no sentido de selecionar aqueles que são comumente aceitos, validados e padronizados, com um grande conjunto de dados comparáveis disponíveis em literatura. Contudo, os esforços realizados, nos últimos anos, para padronização dos métodos analíticos e fornecimento de guias válidos, são da mais elevada importância para fornecer alguma ordem para este campo, e deve ser perseguida pelos pesquisadores (MAGALHÃES *et al.*, 2008).

A Tabela 1.1 apresenta uma comparação entre os métodos mais difundidos para análise da capacidade antioxidante e os principais pontos relacionados à aplicação dos mesmos.

**Tabela 1.1 – Comparação De Métodos Para Avaliar A Capacidade Antioxidante**

Ensaio antioxidante	Simplicidade	Instrumentação requerida	Relevância Biológica	Mecanismo	Ponto Final	Quantificação	ACO <sup>c</sup> Lipofílica e hidrofílica
ORAC	++ <sup>a</sup>	+	+++	HAT	Tempo fixo	AUC <sup>d</sup>	+++
TRAP	--- <sup>b</sup>	-- especializada	+++	HAT	Fase lag	IC <sub>50</sub>	--
FRAP	+++	+++	--	SET	Tempo	ΔSA <sup>e</sup>	---
CUPRAC	+++	+++		SET	Tempo	ΔSA	---
TEAC	+	+	-	SET	Tempo	ΔSA	+++
DPPH	+	+	-	SET/HAT	IC <sub>50</sub>	ΔSA	-
DMPD	+	+	-	SET/HAT	Tempo	IC	+
NFFD	+	+	++	SET/HAT	Tempo	IC	+

<sup>a</sup>+, + +, + + + = desejável a muito desejável; <sup>b</sup>-, - -, - - - = pouco desejável à muito indesejável; <sup>c</sup>ACO: avaliação da capacidade antioxidante; <sup>d</sup>AUC: área sob a curva; <sup>e</sup>ΔSA: variação do sinal analítico (adaptada de PRIOR *et al.*, 2005).

### 1.3 Sistemas de Análises em Fluxo

A exploração da dispersão controlada em tubos estreitos gerou ampla atividade de investigação, métodos analíticos e soluções para problemas reais. As técnicas analíticas em fluxo, foram inicialmente descritas por Skeggs em 1957. Independentemente, Ruzicka e Hansen, e Stewart, desenvolveram o conceito de análise por injeção em fluxo (do inglês, “*flow injection analysis*”, FIA) em 1975, o que foi uma notável transformação e a implementação de uma ferramenta para ensaios em série, sendo de imediato aceito como reforço para análise instrumental. Posteriormente, a utilidade das técnicas em fluxo, especificamente para processos analíticos automatizados, recebeu um maior ímpeto com a definição de Ruzicka e Marshall para análise por injeção sequencial (do inglês, “*sequential injection analysis*”, SIA) (IVASKA, RUZICKA, 1993; MARSHALL, 2003).

A automação dos métodos analíticos surgiu com a necessidade de aumentar o número de análises de rotina laboratorial, de modo a responder de uma forma mais rápida e eficaz, com menor dependência do analista, acarretando em menor custo operacional. Os sistemas analíticos automáticos

comercializados contemplam as áreas de controle de processos industriais (farmacêuticos e alimentícios) e a monitorização (ambiental, por exemplo), pois havendo a necessidade de efetuar um grande número de medidas rotineiras, a automatização pode reduzir drasticamente o tempo de análise e o custo pessoal (PRIOR, 2005).

De acordo com as indicações da IUPAC (do inglês, "*International Union of Pure and Applied Chemistry*") de 1994, um sistema químico automatizado constitui uma coleção de módulos e instrumentos analíticos configurados para automatizar uma análise completa, desde a inserção da amostra até a obtenção da informação. Quanto à classificação preconizada pela IUPAC os sistemas podem ser classificados como *mecanizados*, os quais não possuem capacidade de decisão e determinadas ações são realizadas sequencialmente e repetidas sem intervenção humana. Os sistemas *automáticos ou automatizados* se caracterizam por serem controlados ou regulados por dispositivos de retroalimentação (combinação de sensores e atuadores que podem alterar a tarefa determinada), desta forma, possuindo independência de atuação. Os sistemas em fluxo (FI) constituem um método de análise contínuo, pois as amostras são introduzidas, consecutivamente, em um fluxo de líquido. Desde o ponto de introdução ao de detecção sofrem dispersão e eventualmente reação, resultando nos sinais analíticos monitorados e registrados para cada amostra (KINGSTON, KINGSTON, 1994).

Nos sistemas de análises por injeção em fluxo (FIA), as amostras são aspiradas de forma intermitente, de seus recipientes individuais, para o tubo do analisador em fluxo (amostragem). Em seguida são bombeadas e tornam-se parte da corrente contínua do fluido carreador e, em determinados pontos,

reagentes são adicionados em quantidades fixas. O produto da reação flui até o detector, onde o sinal analítico é medido continuamente; usualmente a propriedade medida é relacionada diretamente com a concentração (RUZICKA, HANSEN, 1975).

Em seu trabalho clássico, Skeggs introduziu a técnica de análise em fluxo contínuo segmentado (do inglês, “*segmented continuous flow analysis*” – SCFA), com o fluxo carreador segmentado por bolhas de ar. Os segmentos de ar tinham por objetivo reduzir a dispersão longitudinal da amostra durante o percurso analítico, fator que propicia um maior tempo de residência da amostra no fluxo, favorecendo o uso de reações relativamente lentas (PASQUINI, OLIVEIRA, 1985).

A análise em fluxo monossegmentado (do inglês, “*monosegmented flow analysis*” – MSFA) inicialmente descrita em 1985, baseia-se na introdução da amostra entre duas bolhas de ar ou gás inerte no sistema em fluxo. Este processo gera um monossegmento reproduzível da amostra, tendo a mistura por convecção restrita dentro do segmento, resultando numa baixa dispersão da amostra durante o transporte para o detector, mesmo com longos tempos de residência (PASQUINI, 1999).

Válvulas solenoide atuando como comutadores independentes foram introduzidas na análise em fluxo com multicomutação (do inglês, “*multicommutation in flow analysis*” – MCFA), e permite que a adição de amostras e reagentes no caminho analítico sejam realizadas pelas válvulas nele posicionadas, a fim de proporcionar inserção de pequenas porções de amostras e reagentes de forma alternada. Enquanto são transportados para o detector, ocorre uma dispersão mútua nas interfaces dos líquidos,

proporcionando que melhor mistura, permitindo o desenvolvimento da reação química e do derivado a ser medido (REIS, *et al.*, 1994).

O desenvolvimento de sistemas em fluxo que empregam o conceito de multi-impulsão não requer o uso de outros dispositivos para inserção, seleção de soluções e bombeamento. As micro-bombas são bombas de diafragma controladas por uma solenoide que, através de uma mola interna mantém o diafragma fechado ou aberto, e o seu acionamento leva à impulsão do líquido contido na câmara, gerando um pulso de volume fixo correspondente ao volume interno (os dispositivos comercializados podem ser de 3, 8, 25 e 50  $\mu\text{L}$ ). O emprego destes dispositivos possibilita uma configuração do sistema de fluxo mais simples, considerando que as operações em uma análise química em fluxo, tais como amostragem, adição de reagentes, mistura de soluções e transporte da zona reacional são efetuados pelo mesmo componente (LAPA *et al.*, 2002).

### **1.3.1 Sistemas de Análises por Injeção Sequencial (SIA)**

Em 1990, Ruzicka e Marshall introduziram o conceito de análise por injeção sequencial (SIA) como segunda geração das análises por injeção em fluxo. O SIA consiste em uma válvula de seleção multiporta controlada por computador e um sistema de bombeamento bidirecional das soluções, embora a bomba seja de canal único. Alíquotas das amostras e reagentes são aspiradas sequencialmente para a bobina de armazenamento conectada à porta central da válvula. Em seguida esta alíquota zona da amostra é endereçada ao detector, passando pela bobina de reação, onde as sobreposições das zonas ocorrem por uma combinação de efeitos de

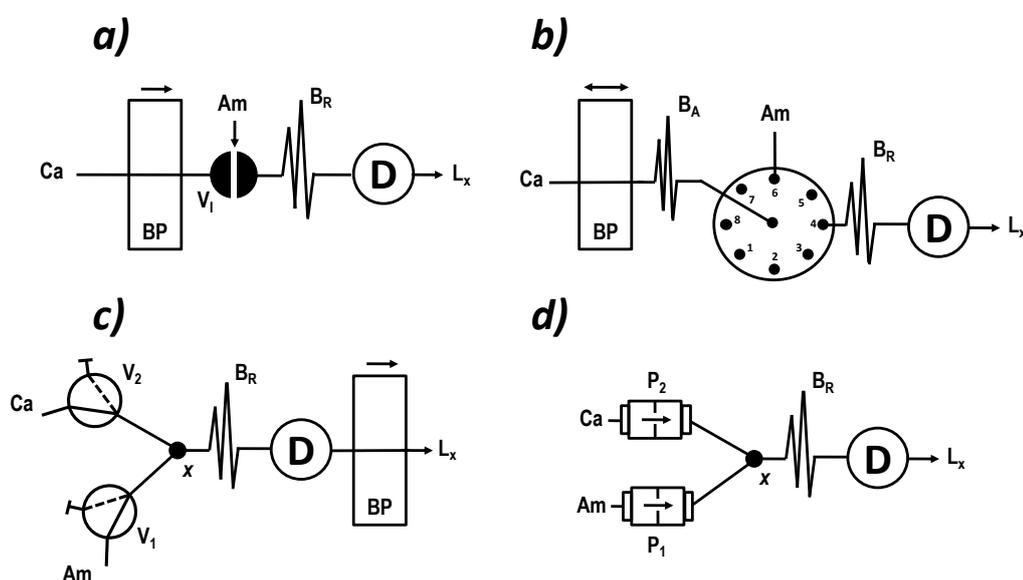
dispersão - difusão e convecção (IVASKA, RUZICKA, 1993; MASINI, 2008; MIYAMOTO *et al.*, 2006).

O SIA foi concebido no sentido de simplificar mecanicamente o sistema FIA, facilitando a implementação dos métodos de fluxo no monitoramento “*on-line*” de processos industriais, para manipulação de amostras e processos de pré-tratamento, pois a automação no sistema SIA proporciona vantagens como versatilidade, robustez, estabilidade por longos períodos, economia de amostras e reagentes, produção reduzida de resíduos e baixa necessidade de reconfiguração (ECONOMOU, 2005; MASINI, 2008; PINTO *et al.*, 2005). Em relação ao método FIA, além de a válvula seletora possuir valor elevado, há uma redução dos números de determinação em torno de 30 – 50 %, pois o tempo necessário para a análise de uma determinada amostra é resultado não só do tempo de reação e medida, mas como também do tempo consumido na aspiração de diferentes soluções (PRIOR, 2005). Os mais amplos estudos sobre aplicação do SIA nos campos farmacêutico, ambiental, alimentício e de bioprocessamento, demonstraram que a natureza química das espécies estudadas é diversificada e o detector mais frequentemente empregado é o UV-Vis, embora a versatilidade propicie que o sistema SIA possa ser acoplado a vários outros instrumentos analíticos (PASAMONTE, CALLAO, 2006).

Nos sistemas FIA, a adição dos reagentes pode ser feita por confluência, mas nos sistemas SIA somente ocorre mistura pelos processos de dispersão, fazendo com que o tempo de residência no sistema e o grau de sobreposição das zonas de reagentes e amostra definam a extensão da reação. Volumes e concentrações dos reagentes devem permitir excesso de reagente em relação à quantidade estequiométrica na zona de reação; além disso, diâmetro,

comprimento e geometria do reator também influenciam na sobreposição das zonas (MASINI, 2008).

Uma vez projetado, o sistema SIA em contraste ao FIA, não requer ser fisicamente reconfigurado, mesmo que os parâmetros essenciais como vazão do carregador, volumes de amostras e reagentes, tempo de reação tenham que ser reconfigurados, pois todas as mudanças podem ser realizadas computacionalmente. Pelo fato de única bomba propelir o carregador, a frequência de amostragem do SIA é sempre menor que a correspondente ao FIA, devido ao tempo de residência das soluções no percurso analítico, pois zona da amostra sempre é aspirada para a bobina de armazenamento (IVASKA, RUZICKA, 1993), a Figura 1.8 apresenta diagramas esquemáticos de sistemas FI.



**Figura 1.8** - Diagramas esquemáticos típicos de sistemas em fluxo. (a) Sistema de análise por injeção em fluxo (b) Análise por injeção seqüencial (c) Multicomutação e (d) Multi-impulsão. **Ca** = solução transportadora, **Am** = amostra, **BP** = sistema de propulsão, **V<sub>1</sub>** = válvula injetora, **B<sub>R</sub>** = bobina reacional/mistura, **x** = confluência, **V<sub>1</sub>** e **V<sub>2</sub>** = válvulas solenoide, **P<sub>1</sub>** e **P<sub>2</sub>** = micro-bombas solenoide, **B<sub>A</sub>** = bobina de armazenamento, **D** = detector, **L<sub>x</sub>** = descarte.

No funcionamento do sistema SIA, o computador serve para o interfaceamento da bomba (aspira e propõe os reagentes) com a válvula

seletora. Durante a aspiração, a bobina de armazenamento protege o líquido carregador de contaminação e a bobina de reação permite a interpenetração das soluções para desenvolvimento da reação. Por fim, o detector é posicionado ao fim do processo analítico, podendo assim verificar o sinal analítico referente ao produto formado (PRIOR, 2005).

### **1.3.2 Sistemas de Análises por Injeção em Fluxo para Avaliação da Atividade Antioxidante**

Usualmente, os métodos para análise da atividade antioxidante utilizam o tempo como parâmetro fundamental para determinação do fim da reação do antioxidante com a sonda analítica. Métodos FI, por meio da automação, possibilitam que erros humanos relacionados à manipulação das amostras sejam minorados, possibilitando assim uma melhor reprodutibilidade dos resultados. A seguir, serão apresentados alguns métodos para avaliação da atividade antioxidante com sistemas FI.

Um método para avaliação quase simultânea da capacidade antioxidante de alguns compostos contra o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e óxido nítrico (NO) combinando os sistemas SIA e FIA com detecção por quimiluminescência (CL) foi proposto por Myamoto e colaboradores (2007). Dois sistemas SIA foram utilizados para geração das espécies reativas  $O_2^-$  e NO, as quais eram encaminhadas para o sistema FIA, de forma sequencial, reagindo com o luminol para gerar o sinal relativo a quimiluminescência de cada espécie. Para avaliação da atividade antioxidante dos diferentes compostos, estes eram misturados em linha com as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e em função do “sequestro” pelos compostos com atividade antioxidante, ocorria redução do sinal analítico. Desta forma, era possível estabelecer uma relação entre capacidade antioxidante frente a diferentes padrões de calibração com

$O_2^-$  e NO, empregando ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, trolox, C-PTIO [2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido] e superóxido dismutase. As amostras avaliadas foram suplementos multivitamínicos que continham ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol e retinol (MIYAMOTO *et al.*, 2007). Assim o método proposto permitiu verificar, na mesma amostra, atividade antioxidante contra ROS e RNS, quase-simultaneamente, avaliando assim duas variáveis com respostas distintas em única amostra.

Buratti e colaboradores (2008), com o intuito de determinar compostos fenólicos totais e poder antioxidante de infusões de diversos chás, desenvolveram um sistema FIA com uma célula eletroquímica tubular contendo um eletrodo de carbono de baixo custo (grafite de lápis). Na etapa de calibração utilizou trolox e ácido caféico, para a determinação da capacidade antioxidante e fenólica total, respectivamente. As amostras foram preparadas pesando-se inicialmente 2 g de material vegetal (conteúdo dos sachês). Em seguida, foram adicionados 200 mL de água fervente e o sistema permaneceu em ebulição por 4 min. Após este tempo, resfriou-se à temperatura ambiente e a solução final foi filtrada. Mesmo considerando as distintas amostras, os resultados para poder antioxidante e fenólicos totais empregando o método eletroquímico apresentaram boa correlação com os ensaios de DPPH<sup>•</sup> ( $r = 0,92$ ) e Folin-Ciocalteu ( $r = 0,97$ ) (BURATTI *et al.*, 2008).

Por meio de um sistema FIA Milardovic e colaboradores (2007) desenvolveram um método para determinação da capacidade antioxidante total em bebidas alcólicas (aguardentes e vinhos) produzindo o radical ABTS<sup>•+</sup> por via enzimática empregando glicose oxidase e peroxidase. A inibição do sinal analítico frente a compostos com atividade antioxidante foi efetuada por

biamperometria empregando trolox como padrão e expressos como TEAC. Os resultados obtidos foram equivalentes aos de TEAC realizados de forma convencional com um bom coeficiente de correlação linear entre os métodos ( $r = 0,997$ ) (MILARDOVIC, *et al.*, 2007).

Nalewajko-Sieliwoniuk e colaboradores (2010) desenvolveram um sistema em fluxo para a determinação de compostos fenólicos totais contidos em bebidas (sucos, chás, vinhos tinto e branco) com detecção por quimiluminescência, baseada na reação com  $Mn^{6+}$  em presença de formaldeído. O método foi desenvolvido para estimar o conteúdo de compostos fenólicos totais expressos em equivalentes de ácido gálico ( $mg L^{-1}$ ) na bebida analisada. Os resultados foram comparáveis com os métodos de FC ( $r = 0,925$ ) e DPPH $\cdot$  ( $r = 0,974$ ), para amostras de sucos de frutas, chás e vinhos, o método proposto demonstrou ser sensível, rápido, simples, robusto e seletivo, principalmente pelo alto fator de diluição que permitiu a eliminação do efeito de matriz (NALEWAJKO-SIELIWONIUK, *et al.*, 2010).

Em condições otimizadas, estudos utilizando SIA, explorando a geração “*in situ*” do radical DMPD $^{*+}$ , possibilitaram a determinação espectrofotométrica da atividade antioxidante em amostras de bebidas (vinhos, chás e cafés), com a geração “*in situ*” do radical, sendo os resultados comparáveis ao método FC, expressos em  $mg L^{-1}$  de ácido gálico. Os estudos cinéticos indicaram que a solução de DMPD não era estável, quando preparada segundo o protocolo de Fogliano e colaboradores (1999), mas, quando a solução de DMPD foi preparada em tampão acetato  $0,1 mol L^{-1}$  com pH ajustado para 4,0 mostrou-se estável. Após otimização do método, compostos fenólicos e o ácido ascórbico

apresentaram maior capacidade de inibição do radical  $\text{DMPD}^{+\cdot}$  (SANTOS, 2008).

A Tabela 1.2 apresenta uma revisão de métodos FI utilizados para avaliação da atividade antioxidante como também métodos para polifenólicos totais e capacidade sequestrante, abordando as sondas, padrões de calibração e detecção para os métodos.

Tabela 1.2 – Métodos em fluxo destinados à determinação da capacidade antioxidante e/ou (poli)fenóis totais.

Entrada	Amostra	Objetivo <sup>1</sup>	Sonda de detecção	Padrão de Calibração	Deteção <sup>2</sup>	Sistema <sup>3</sup>	Referência
1	Bebidas diversas	AA	DPPH	Ácido ascórbico	EPR	FIA	Ukeda <i>et al.</i> , 2002
2	Vinhos	PT	4-AAP/ Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-</sup>	Ácido gálico	ESP	FIA	Schoonen, Sales, 2002
3	Vinhos	AA	KMnO <sub>4</sub>	Compostos fenólicos	QUI	FIA	Costin <i>et al.</i> , 2003
4	Bebidas	AA	ABTS	Trolox	DAD	FIA	Pelligrini <i>et al.</i> , 2003
5	Vinhos	AA	ABTS	Trolox	ESP	SIA	Pinto <i>et al.</i> , 2005
		CS	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Ácido homovanílico		FLU		
6	Bebidas e alimentos	AA	ABTS	Ácido ascórbico	ESP	SIA	Lima <i>et al.</i> , 2005
7	Extratos de alimentos	AA	Tereftalato/Co <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	FLU	FIA	Tang <i>et al.</i> , 2005
8	Formulações Farmacêuticas Extratos de chás	AA	Luminol e Lucigenina	Ácido Ascórbico	QUI	MUP	Meneses <i>et al.</i> , 2005
9	Bebidas diversas	AA	ABTS	Trolox	ELE	FIA	Ivekovic <i>et al.</i> , 2005
10	Bebidas Diversas	PT	-	Quercetina	ELE	FIA	Volikakis, Efstathiou, 2005
11	Bebidas diversas	AA	DPPH	Ácido ascórbico	ESP	MSFIA	Magalhães <i>et al.</i> , 2006a
13	Bebidas diversas	AA	Folin-Ciocalteu	Ácido gálico	ESP	MSFIA	Magalhães <i>et al.</i> , 2006b
13	Suplementos de vitaminas	AA	<sup>1</sup> O <sub>2</sub> – oxigênio singleto	Ácido ascórbico	QUI	SIA	Miyamoto <i>et al.</i> , 2006
14	Fármaco	AA	ABTS	Trolox	ESP	SIA	Garcia <i>et al.</i> , 2006
15	Extratos de plantas	AA	Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-</sup> / Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>4-</sup>	Ácido ascórbico	POT	FIA	Shpigun <i>et al.</i> , 2006
16	Mel e própolis	AA	-	Galangina	ELE	FIA	Buratti <i>et al.</i> , 2007
17	Bebidas diversas	AA	ABTS	Trolox	ELE	FIA	Milardovic <i>et al.</i> , 2007
18	Antiinflamatórios	CS	Luminol/HClO	Antiinflamatórios	QUI	MSFIA	Magalhães <i>et al.</i> , 2007a
19	Bebidas diversas	AA	ABTS	Trolox	ESP	MSFIA	Magalhães <i>et al.</i> , 2007b
		PT	Reag. Folin-Ciocalteu	Ácido gálico			
20	Compostos diversos	CS	Luminol/ONOO <sup>-</sup>	Substâncias redutoras	QUI	MUP	Ribeiro <i>et al.</i> , 2007
21	Vinhos	AA	ABTS	Trolox	ELE	FIA	Milardovic <i>et al.</i> , 2007

Entrada	Amostra	Objetivo <sup>1</sup>	Sonda de detecção	Padrão de calibração	Detecção <sup>2</sup>	Sistema <sup>3</sup>	Referência
22	Suplementos Vitaminicos	AA	-	Ácido ascórbico	QUI	SIA-FIA	Miyamoto <i>et al.</i> , 2007
23	Extratos de plantas Formulações farmacêuticas	AA	Luminol/I <sub>2</sub>	Ácido caféico	QUI	FIA	Nalewajko-Sieliwoniuk <i>et al.</i> , 2008.
24	Óleo de oliva	AA	Luminol/ <i>p</i> --iodofenol	Ácido gálico	QUI	FIA	Miniotti, Georgiou, 2008
25	Chás	AA	-	Trolox Ácido caféico	ELE	FIA	Buratti <i>et al.</i> , 2008
26	Bebidas diversas	PT	Reagente Folin-Denis	Ácido Tânico	ESP	MUP	Infante <i>et al.</i> , 2008
27	Cúrcuma	AA	DPPH	Ácido ascórbico Quercetina	ESP	FIA	Thongchai <i>et al.</i> , 2009
28	Bebidas diversas	AA	Mn (IV)	Ácido Gálico	QUI	FIA	Nalewajko-Sieliqoniuk <i>et al.</i> , 2010
29	Vegetais	AA	Luminol	Ácido ascórbico Ácido úrico	QUI	FIA	Nie <i>et al.</i> , 2010

<sup>1</sup> AA – atividade antioxidante; CS, capacidade *scavenging*; PT – (poli)fenóis totais // <sup>2</sup> POT – potenciométrica; ESP – espectrofotométrica; FLU – fluorimétrica; EPR - ressonância paramagnética eletrônica, ELE – eletroquímica; QUI – quimioluminescente // <sup>3</sup> FIA – análise por injeção em fluxo, SIA – análise por injeção seqüencial, MSFIA – análise por injeção em fluxo com multiseringa, MUP – multi-impulsão (atualizada de SANTOS, 2008).

# CAPÍTULO 2

---

---

## OBJETIVOS

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um sistema de análise por injeção sequencial (SIA) para a determinação espectrofotométrica da capacidade antioxidante em bebidas empregando a geração *in situ* do radical N-fenil-*p*-fenilenodiamino (NFFD<sup>•+</sup>).

### 2.2. Objetivos Específicos

*i)* Avaliar a amina aromática N-fenil-*p*-fenilenodiamino (NFFD) como sonda espectrofotométrica para determinação da capacidade antioxidante em bebidas;

*ii)* Otimizar o sistema de análise por injeção sequencial (SIA) desenvolvido quanto aos parâmetros físicos (ordem de aspiração, volume dos reagentes e amostra, vazão da solução carregadora e comprimento da bobina de mistura) e químicos (oxidante, concentração dos reagentes, proporção entre NFFD e oxidante, pH das soluções reagentes e amostra), empregando modelo univariado;

*iii)* Avaliar a capacidade de inibição do radical gerado no sistema SIA frente a diferentes substâncias (compostos fenólicos, sulfurados e sulfito);

*iv)* Determinar a capacidade antioxidante de bebidas (vinhos e chás) empregando o sistema de análise por injeção sequencial proposto;

*v)* Comparar estatisticamente os resultados obtidos empregando o sistema SIA proposto quanto ao teor de compostos fenólicos totais (método de Folin-Denis) e capacidade antioxidante de acordo com métodos estabelecidos pela literatura baseados nos radicais ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup> e DMPD<sup>•+</sup>;

**vi)** Realizar uma avaliação da estabilidade de vinhos (tinto e branco) considerando os valores relativos a capacidade antioxidante ( $\text{mg L}^{-1}$  em ácido gálico) em função do tempo e temperatura da amostra após exposição às condições ambientes.

**vii)** Realizar uma avaliação da capacidade antioxidante de vinhos após exposição das amostras ao processo de ozonização em diferentes intervalos de tempo.

# CAPÍTULO 3

---

---

## EXPERIMENTAL

### 3. EXPERIMENTAL

#### 3.1 Reagentes e Soluções

Foram utilizados reagentes de grau analítico de pureza em todos os ensaios realizados. As soluções preparadas para o desenvolvimento do trabalho descrito utilizaram como solvente majoritário água purificada (condutividade  $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) obtidas a partir de purificador EasyPure RF 1051 (EUA).

A solução estoque de referência de ácido gálico  $1000,0 \text{ mg L}^{-1}$  foi preparada solubilizando-se  $0,050 \text{ g}$  de ácido gálico (Sigma) em  $50 \text{ mL}$  de uma solução tampão acetato ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}/\text{CH}_3\text{COONa}$ )  $0,025 \text{ mol L}^{-1}$  com valor de pH ajustado para  $4,0 \pm 0,1$ . As soluções de trabalho foram preparadas de acordo com a diluição adequada da solução estoque empregando uma solução  $0,025 \text{ mol L}^{-1}$  de tampão acetato com pH ajustado para  $4,0 \pm 0,1$ .

A solução de *N*-fenil-*p*-fenilenodiamino (NFFD)  $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada diariamente dissolvendo-se  $18,5 \text{ mg}$  de NFFD ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{NHC}_6\text{H}_4\text{NH}_2$ , Aldrich) em  $10 \text{ mL}$  de acetona, em seguida foi diluída em tampão acetato (pH  $4,0 \pm 0,1$ ) até  $50 \text{ mL}$ . Esta solução foi armazenada em frasco âmbar. A solução estoque de  $\text{Fe}^{3+}$   $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada solubilizando-se  $27,0 \text{ mg}$  de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$  (Sigma) em  $50 \text{ mL}$  de  $\text{HCl}$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ . A solução de trabalho de  $\text{Fe}^{3+}$   $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada pela diluição adequada da solução estoque em água, ajustando assim também a concentração final de  $\text{HCl}$  para  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ . Em todos os estudos empregando-se o sistema SIA se utilizou água como solução transportadora.

As soluções estoque de compostos fenólicos, compostos tiólicos e outras substâncias ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) para a avaliação da reação com o radical NFFD<sup>•+</sup> foram preparadas de forma usual a partir de reagentes de grau analítico de pureza. Os compostos avaliados foram: cisteína (Ferosa), glutathione (Sigma), *N*-acetil-L-cisteína (Galena), penicilamina (Galena), ácido ascórbico (Synth), ácido tânico (Merck), ácido cinâmico (ACROS Organics), ácido *o*-hidroxicinâmico (ACROS Organics), ácido *m*-hidroxicinâmico (ACROS Organics), ácido *p*-hidroxicinâmico (ACROS Organics), guaicol (Carlos Erba), quercetina (Sigma), ácido caféico (Sigma), resorcinol (Merck), hematoxilina (Sigma), captopril (Galena) e  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (Merck). As soluções estoque para os compostos ácido cinâmico, ácido *o*-hidroxicinâmico, ácido *m*-hidroxicinâmico, ácido *p*-hidroxicinâmico foram preparadas em acetona 20% (v/v); ácido caféico e quercetina em acetona 50% (v/v), enquanto o guaicol em etanol 5% (v/v). As soluções de trabalho foram diluídas em tampão acetato  $0,025 \text{ mol L}^{-1}$  com pH ajustada para  $4,0 \pm 0,1$ .

O reagente de Folin-Denis foi preparado pesando-se 10 g de  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Merck), 0,25 g de  $\text{H}_3\text{MoO}_4$  (Merck) e acrescentando 5 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  em um balão de fundo redondo de 250 mL. A esta mistura adicionou-se 100 mL de água e o sistema foi colocado em refluxo a  $110 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 h. Em seguida, retirou-se o balão do sistema de aquecimento, deixando-o atingir a temperatura ambiente, sendo o volume final ajustado para 200 mL com água (HORWITZ, 2002; FOLIN, DENIS, 1915; FOLIN, CIOCALTEU, 1927). A solução  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ( $75 \text{ g L}^{-1}$ ) empregada para alcalinizar o meio foi preparada a partir da dissolução de 7,5 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Synth) em 100 mL de água.

A solução estoque do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH<sup>•</sup>) 600  $\mu\text{mol L}^{-1}$  foi preparada pela dissolução de 11,83 mg de DPPH<sup>•</sup> ( $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$ , Sigma) em 50 mL de metanol (SHARMA, BHAT, 2009).

A solução estoque do radical derivado do ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS<sup>•+</sup>) 5  $\text{mmol L}^{-1}$  foi preparada pela dissolução de 26 mg de ABTS ( $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_4$ , Sigma) e 4 mg de  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  (Merck) em 10 mL de água. Após 16 h de incubação ao abrigo da luz, a solução foi diluída para 25 mL com tampão fosfato 0,05  $\text{mol L}^{-1}$  com pH ajustado para  $7,4 \pm 0,1$  (ARTS *et. al.*, 2004).

A solução de DMPD  $2,5 \times 10^{-3}$   $\text{mol L}^{-1}$  foi preparada dissolvendo-se 29,30 mg de DMPD ( $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{SO}_4$ , Aldrich) em 50 mL de uma solução tampão acetato 0,05  $\text{mol L}^{-1}$  (pH  $4,0 \pm 0,1$ ) e armazenada em frasco âmbar. A solução estoque de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$   $2,5 \times 10^{-3}$   $\text{mol L}^{-1}$  foi preparada dissolvendo-se 28,8 mg de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  (Fluka) em 50 mL em água. A solução de trabalho de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  a  $2,5 \times 10^{-4}$   $\text{mol L}^{-1}$  foi preparada pela diluição da solução estoque em uma solução 0,025  $\text{mol L}^{-1}$  de NaOH (Sinth). Foi empregada água como solução transportadora nos procedimentos no sistema SIA (SANTOS, 2008).

Para a estimativa dos coeficientes de dispersão ( $D$ ) e grau de penetração entre zonas ( $P$ ) das soluções de amostra e reagentes no sistema de análise por injeção sequencial proposto uma solução de azul de bromotimol (ABT) foi preparada a partir da diluição em água de solução estoque de ABT (0,5  $\text{g L}^{-1}$ ) preparada em etanol 40% (v/v).

As amostras de vinhos (brancos e tintos) e chás analisadas foram adquiridas no comércio local. Após abertas ou preparadas (chá), as amostras eram acondicionadas em refrigerador a 4 °C por no máximo 48 h.

### 3.2 Equipamentos

Foi empregado um espectrofotômetro Femto 700 (São Paulo, Brasil) equipado com uma cela de fluxo de vidro com 10 mm de caminho ótico e volume de 120 µL. Um potenciômetro Digimed DM21 (São Paulo, Brasil) equipado com eletrodo combinado de vidro foi empregado nas medidas de pH.

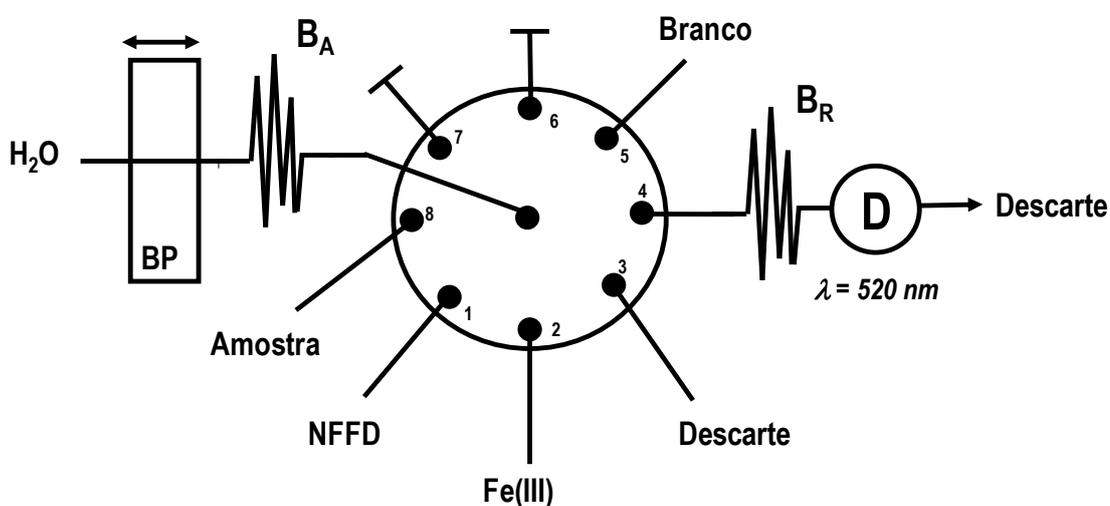
Uma válvula multiposição de oito vias modelo Cheminert™ 25C-3188EMH (VCI, Valco Instruments) foi empregada para gerenciar as soluções associadas aos diferentes canais do sistema em fluxo. Uma bomba peristáltica Gilson Minipuls 3 (Villiers-Le-Bell, França) foi utilizada na aspiração/propulsão dos fluídos. Tubos de propulsão de Tygon® e de transmissão de PTFE (0,8 mm *d.*) foram empregados no sistema em fluxo.

Um microcomputador Pentium I equipado com uma interface PCL 711S da marca Advantech (Taipei, Taiwan) foi empregado para controle da vazão, sentido de rotação da bomba peristáltica, controle da válvula multiposição e aquisição de dados. Um programa escrito na linguagem QuickBasic 4.5 foi desenvolvido para controle do sistema de propulsão e direcionamento das vias da válvula multiposição.

Para retirar o CO<sub>2</sub> dissolvido nas amostras de vinho foi empregado banho ultra-sônico (40 kHz e 90 W) Aquasonic 75D (VWR, EUA). Os estudos cinéticos foram realizados empregando-se espectrofotômetro Cary 100 (Varian) usando-se cubetas de quartzo com 10 mm de caminho óptico.

### 3.3 Procedimentos

Um diagrama esquemático do sistema de análise por injeção seqüencial (SIA) empregado está ilustrado na Figura 3.1. Na Tabela 3.1 são apresentados os passos empregados na determinação espectrofotométrica da capacidade antioxidante pelo sistema SIA proposto. Inicialmente, todas as linhas eram preenchidas com as respectivas soluções e o excedente era encaminhado ao descarte pela via 3 da válvula multiposição.



**Figura 3.1** - Diagrama SIA para a determinação espectrofotométrica da capacidade antioxidante. BP = bomba peristáltica, BR = bobina de reação (115 cm), BA = bobina de armazenamento (300 cm) e D = detector.

Alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  da amostra ou solução de referência, 100  $\mu\text{L}$  da solução de NFFD e 100  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{Fe}^{3+}$ , nesta ordem, eram aspiradas para bobina de armazenamento (BA). Após a aspiração havia interrupção do fluxo por 90 s. Em seguida, estas alíquotas eram direcionadas para bobina de reação (BR) e consecutivamente para a detecção espectrofotométrica (D) a 520 nm.

**Tabela 3.1** – Etapas envolvidas na determinação da capacidade antioxidante empregando o sistema SIA proposto..

Entrada	Etapa	Posição	Vazão, mL min <sup>-1</sup>	Tempo, s
1	Aspiração da amostra	8 ou 5	1,2	10,0
2	Aspiração da solução NFFD	1	1,2	5,0
3	Aspiração da solução Fe <sup>III</sup>	2	1,2	5,0
4	Interrupção de fluxo	4	0,0	90
5	Bombeamento para a célula de medida	4	2,5	60

Os estudos cinéticos a 520 nm foram realizados a partir da adaptação do protocolo de Fogliano e colaboradores (1999). Misturou-se 1,0 mL de NFFD (0,2 mol L<sup>-1</sup>) e 200 µL de Fe<sup>3+</sup> (0,05 mol L<sup>-1</sup>) em um balão de 100 mL, avolumando-se com tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup> ajustado para pH 4,0 ± 0,1. Imediatamente após a aferição do balão a solução resultante era colocada em uma cubeta de vidro e transferida para realização da medida dos sinais no espectrofotômetro. Alternativamente, empregou-se solução de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> a 0,05 mol L<sup>-1</sup> como oxidante em substituição a solução de F<sup>3+</sup>. A esta condição foi atribuído tempo zero, os dados subsequentes foram obtidos sem que a cubeta fosse retirada do espectrofotômetro, para tempos compreendidos entre 0,5 a 15 min. Soluções aquosas de ácido gálico (30 mg L<sup>-1</sup>), ácido tânico (30 mg L<sup>-1</sup>) e ácido ascórbico (5 mg L<sup>-1</sup>) foram empregadas na avaliação da cinética de reação com o radical formado, sendo adicionadas na cubeta de leitura.

Antes que as amostras de vinhos fossem diluídas, estas eram sonicadas para eliminar o CO<sub>2</sub> dissolvido. Adicionava-se cerca de 10 mL de amostra em um béquer de 50 mL e sonicava-se por 2 min em um banho ultra-sônico com o nível da solução mantido igual ao nível de água do banho.

As amostras de chá foram preparadas a partir da extração dos compostos por infusão, como segue: cada sachê de um determinado tipo de chá ou infusão foi transferido para um béquer de 250 mL e em seguida adicionou-se

100 mL de água aquecida (~ 90 °C). O sistema foi deixado em repouso por 10 min. Após o tempo de extração, o sachê de chá era retirado da solução e aguardou-se a solução (chá ou infusão) esfriar a temperatura ambiente. Assim realizou-se o preparo da infusão de modo a reproduzir o método de preparo dos chás determinado em suas embalagens. Por fim, as amostras eram diluídas e, em seguida, analisadas no sistema SIA. Pesou-se individualmente os sachês para verificação do seu conteúdo e foi calculada a massa média.

A inibição do sinal analítico (%I) pela presença de substâncias antioxidantes frente ao radical NFFD<sup>•+</sup> foi calculada a partir da equação: %I =  $(1 - A_{\text{amostra}}/A_{\text{referência}}) \times 100$ , onde  $A_{\text{amostra}}$  corresponde a absorvância após a adição da amostra ou padrão a solução contendo o radical NFFD<sup>•+</sup> e  $A_{\text{referência}}$  a absorvância relativa ao branco analítico (Fogliano *et al.*, 1999).

O método de Folin-Denis foi empregado como referência para avaliação da concentração de (poli)fenóis totais. Em um balão volumétrico de 5,00 mL adicionou-se 1,0 mL do reagente de Folin-Denis, 1,0 mL da solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 75 g L<sup>-1</sup>, 1,0 mL da solução padrão ou da amostra previamente diluída e aferiu-se com água. Aguardou-se 30 min após a mistura dos reagentes e procedeu-se a leitura em 760 nm empregando-se cubetas de vidro com 1 cm de caminho óptico. A curva analítica foi construída empregando-se ácido gálico como padrão de calibração.

Os métodos a partir da reação de descoloração com os radicais DPPH<sup>•+</sup> e ABTS<sup>•+</sup> foram empregados para avaliação da capacidade antioxidante das amostras analisadas. Quanto aos procedimentos relativos ao método com DPPH procedeu-se da seguinte forma: em um balão volumétrico de 5,00 mL adicionou-se 0,42 mL da solução estoque do radical DPPH, 1,0 mL da solução

padrão ou da amostra previamente diluída e aferiu-se com água. Aguardou-se 30 min após a mistura dos reagentes e procedeu-se a leitura em 517 nm empregando-se cubetas de vidro com 1 cm de caminho óptico. Para o método empregando o radical ABTS<sup>•+</sup> procedeu-se de forma similar, sendo que em um balão volumétrico de 5,00 mL adicionou-se 0,22 mL da solução estoque do radical ABTS<sup>•+</sup>, 1,0 mL da solução padrão ou da amostra previamente diluída e aferiu-se com água. Aguardou-se 10 min após a mistura dos reagentes e procedeu-se a leitura em 734 nm empregando-se cubetas de vidro com 1 cm de caminho óptico. A curva analítica para ambos os procedimentos empregando DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup> foi construída empregando-se ácido gálico como padrão de calibração.

O método empregando o radical DMPD<sup>•+</sup> foi de acordo com sistema de análise por injeção sequencial (SIA) descrito por Santos (2008). Desta forma, alíquotas de 110 µL da amostra ou solução de referência, 140 µL da solução de DMPD e 140 µL da solução de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, nesta ordem, foram aspiradas para bobina de armazenamento. Após a aspiração da amostra e soluções dos reagentes ocorria a interrupção do fluxo por 120 s. Em seguida, esta mistura era direcionada para a bobina de reação e depois para detecção espectrofotométrica a 520 nm. De forma semelhante aos outros procedimentos empregou-se ácido gálico como padrão de calibração.

Seguido das análises das amostras no sistema SIA para NFFD, as mesmas foram submetidas a dois testes: análise da estabilidade temporal e avaliação ao processo de ozonização. Para análise da estabilidade temporal, amostras de vinhos (tinto e branco) foram avaliadas por um período máximo de de 5 h, verificando a diminuição do sinal analítico frente ao radical NFFD<sup>•+</sup>. As

amostras foram armazenadas de duas formas, uma resfriada à temperatura de 15°C em banho termostático (TE184 - Tecnal) e a outra foi mantida à temperatura ambiente (25 °C), durante todo o tempo do teste. No intervalo de 0 – 5 h, as amostras foram analisadas à cada 1 h.

O ensaio com ozonização (Ozonizer, HLO-100) da amostra procedeu, inicialmente, realizando a análise inicial de verificação do equivalente em ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de ácido gálico da amostra de vinho. Em seguida, 30 mL da amostra foi inserida em recipiente, que proporcionasse borbulhamento com ozônio, e realizou-se um ciclo de 10 min de ozonização a 100%. Após esta primeira etapa verificou-se a inibição do sinal analítico nos tempos de 30 e 60 min depois do início do ciclo de ozonização. Seguida da tomada da alíquota da amostra em 60 min, repetiu-se o teste.

Para verificar taxa de ozonização do equipamento Ozonizer (HLO-100) a 100% de geração de  $\text{O}_3$  por 10 min, padronizou-se inicialmente a solução de tiosulfato com  $\text{KIO}_3/\text{I}^-$  em meio ácido (10 mL de HCl 36%), ficando esta molaridade de  $0,1003 \pm 0,0004 \text{ M}$ . Em seguida ozonizou-se massa de 1,01 g de  $\text{KIO}_3$  por 10 min a 100% de geração de  $\text{O}_3$ ; em seguida titulou-se o triiodeto formado com a solução de tiosulfato  $0,1003 \text{ M}$ , verificando o resultado de  $7,46 \pm 1,95 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{O}_3$ .

O coeficiente de dispersão ( $D$ ) foi estimado segundo a equação,  $D = A^0/A^{max}$ , onde  $A^0$  corresponde ao sinal no estado estacionário e  $A^{max}$  ao sinal máximo nas condições de análise (RUZICKA, HANSEN, 1988). O grau de penetração entre zonas ( $P$ ) foi calculado segundo a equação:  $P = 2L_s/(L_a + L_r)$ , onde  $L_s$  corresponde à largura na base do pico da zona sobreposta,  $L_a$  e  $L_r$  corresponde à largura na base do pico da zona da amostra e reagente,

respectivamente (GUBELI *et al.*, 1991). Os cálculos dos valores de  $D$  e  $P$  foram realizados através da injeção de solução de azul de bromotimol diluída em água ( $\lambda_{\text{máx}} = 428 \text{ nm}$ ) nas condições otimizadas do sistema SIA proposto.

Os cálculos relativos aos limites de detecção ( $3\sigma$ ) e de quantificação ( $10\sigma$ ) foram realizados de acordo com as seguintes equações,  $\text{LOD} = C_{\text{branco}} + 3s_b/a_c$  e  $\text{LOQ} = C_{\text{branco}} + 10s_b/a_c$ , onde  $C_{\text{branco}}$  = 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 correspondente. O desvio padrão relativo (RSD) foi calculado de acordo com a equação:  $\text{RSD} = (s_p/x_p) \times 100$ , onde  $s_p$  equivale ao desvio padrão referente a um determinado padrão analítico e  $x_p$  corresponde ao valor médio encontrado para este padrão ( $N = 10$ ) (MILLER, MILLER, 2002).

# CAPÍTULO 4

---

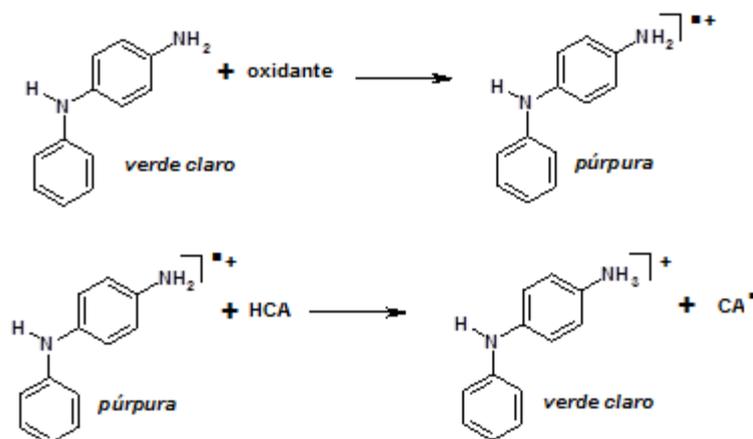
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Estudos Cinéticos

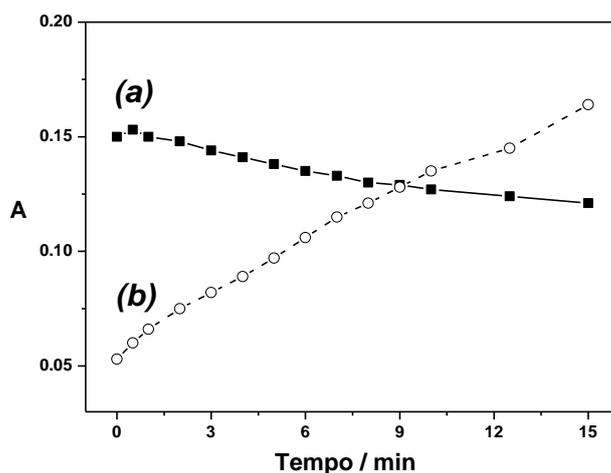
Antes de se proceder aos estudos cinéticos para avaliar a formação do radical NFFD<sup>•+</sup> realizou-se uma investigação sobre o melhor solvente orgânico para solubilização do NFFD. O NFFD demonstrou-se insolúvel em água e em soluções muito ácidas (pH entre 1 e 2,5), mas solúvel em etanol. Contudo, foi observada precipitação após adição de água para diluição da solução estoque preparada em etanol. Em acetona o NFFD apresentou-se solúvel, contudo para soluções aquosas com concentrações de acetona inferiores a 20% (v/v) de forma semelhante ao meio etanólico, ocorria precipitação. Desta forma, a preparação das soluções de NFFD foi realizada em acetona 20% (v/v). Nos testes iniciais a diluição da solução estoque foi realizada empregando tampão acetato com pH ajustado para 4,0.

Os estudos cinéticos para a formação do radical NFFD<sup>•+</sup> foram realizados adaptando-se o protocolo de Fogliano e colaboradores (1999), com o intuito de avaliar a geração do radical frente a diferentes oxidantes e sua inibição após reação com alguns compostos com atividade antioxidante em função do tempo. De acordo com este protocolo experimental, o radical NFFD<sup>•+</sup>, na presença de compostos antioxidantes (HCA), reage via transferência de átomos de hidrogênio levando à formação do cátion NFFD<sup>+</sup>, de cor verde claro. A redução da intensidade da coloração da solução contendo o radical NFFD<sup>•+</sup> era proporcional à concentração do composto antioxidante (HCA) avaliado. A Figura 4.1 apresenta as reações referentes às etapas de formação e inibição do radical cátion NFFD<sup>•+</sup>.



**Figura 4.1** – Formação e mecanismo de atuação do radical NFFD<sup>•+</sup> (adaptado de Fogliano et al., 1999).

O primeiro parâmetro reacional avaliado foi a formação do radical NFFD<sup>•+</sup> frente a diferentes oxidantes em função do tempo de reação. Agentes oxidantes como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Cu<sup>2+</sup>, NaOCl, ABAT (2,2'-azobis(2-aminodipropano)) e Fe<sup>3+</sup> foram empregados para oxidação do DMPD, sendo que os íons férricos apresentaram a melhor desempenho para a produção do radical correspondente. A maioria dos trabalhos descritos na literatura que fazem uso do radical DMPD<sup>•+</sup> empregam Fe<sup>3+</sup> como oxidante para geração do radical. Contudo Asghar e colaboradores (2007) substituíram o Fe<sup>3+</sup> por Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> como oxidante, e perceberam que após 3 h a mistura mantinha o sinal constante por alguns horas, se estocada a 4 °C. Desta forma para avaliação da formação do radical NFFD<sup>•+</sup> foram selecionados os oxidantes o Fe<sup>3+</sup> e Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, sendo que a amina sempre era mantida em excesso em relação as espécies oxidantes. A Figura 4.2 apresenta os resultados referentes ao estudo cinético quanto à geração do radical NFFD<sup>•+</sup>.



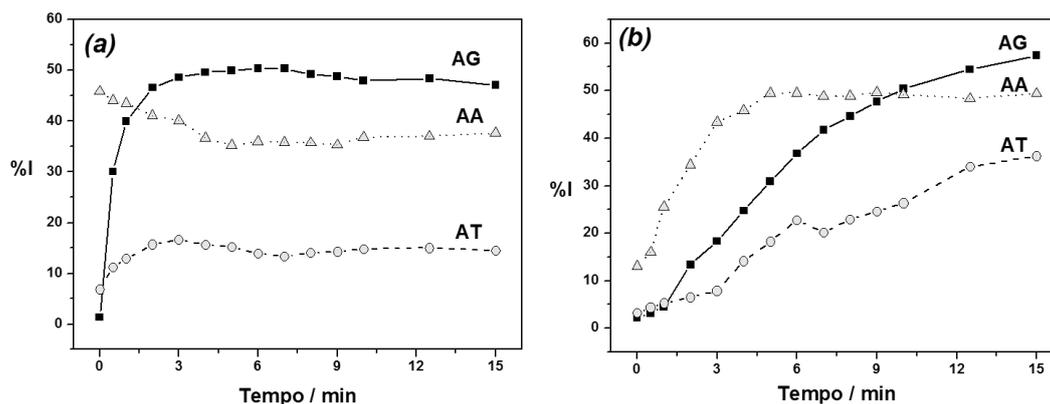
**Figura 4.2** – Perfis da geração dos sinais analíticos (520 nm) relativos ao radical NFFD\*+ frente a diferentes oxidantes em função do tempo. (a) Fe<sup>III</sup> e (b) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>. Condições: 1,0x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> NFFD, 1,0x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> Fe<sup>III</sup> e 1,0x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 4.2 observou-se que a geração do radical NFFD\*+ empregando Fe<sup>3+</sup> (curva a) foi mais rápida quando comparada com o emprego do Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (curva b). Apesar de uma rápida formação do radical NFFD\*+ com o uso de Fe<sup>3+</sup>, o sinal medido em 520 nm foi decaindo com o tempo. O sinal analítico monitorado se mostrou estável pelo período de 3 min após a mistura dos reagentes, com uma redução menor que 5% do sinal inicial. Contudo após 3 min foi observado decaimento do sinal de aproximadamente 18% em relação ao sinal inicial, para o intervalo de tempo de 4 a 15 min. Este resultado mostrou-se concordante como o reportado por Santos (2008) em relação à geração do radical DMPD\*+ empregando Fe<sup>3+</sup>, onde foi observada uma rápida formação do radical e posterior redução do sinal analítico após 5 min de reação. Esta instabilidade no processo de formação do radical DMPD\*+ foi apontada por Lachman e colaboradores (2007) afirmando que o radical formado era instável nas condições ambientes, ocorrendo variações acentuadas no sinal de referência, o que para o autor tornava inviável o emprego deste procedimento. Rivero-Pérez e colaboradores

(2002) fizeram um estudo cinético da formação do radical  $\text{DMPD}^{\bullet+}$  durante 48 h e concluíram que o sinal analítico referente ao radical manteve-se estável somente durante 18 a 21 h após sua formação, o que limitava consideravelmente o emprego deste radical.

A reação do NFFD com íons  $\text{Fe}^{3+}$  apresentou uma cinética mais favorável (foi mais rápida) em relação ao  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ . O sinal referente à formação do radical  $\text{NFFD}^{\bullet+}$  empregando  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  mostrou um aumento linear em função do tempo de reação. Sendo que após 9 min já era maior que para o sistema empregando íons  $\text{Fe}^{3+}$  como oxidante. Este comportamento diferenciado empregando o  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  (2,01 V) como oxidante em relação ao  $\text{Fe}^{3+}$  (0,77 V) pode estar associado ao potencial padrão de redução e o número de elétrons transferidos por mol de oxidante.

O efeito da adição de substâncias com atividade antioxidante foi avaliado frente à inibição do sinal analítico relativo ao radical  $\text{NFFD}^{\bullet+}$  (Figura 4.3). Observou-se que adições de ácido gálico (AG), ácido ascórbico (AA) e ácido tânico (AT), compostos bastante difundidos para avaliação da atividade antioxidante e presentes em diversos alimentos (OLIVEIRA *et al.*, 2009), levaram a inibição do sinal independente do oxidante empregado,  $\text{Fe}^{3+}$  (Figura 4.3a) ou  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  (Figura 4.3b) para geração do  $\text{NFFD}^{\bullet+}$ .



**Figura 4.3** – Perfis dos sinais analíticos (520 nm) relativos à inibição do radical  $\text{NFFD}^{\bullet+}$  frente a compostos com atividade antioxidante. (a)  $\text{Fe}^{\text{III}}$  e (b)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  como oxidante. Sendo: AG = ácido gálico, AA = ácido ascórbico e AT = ácido tânico. Condições:  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  NFFD;  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$   $\text{Fe}^{\text{III}}$ ;  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ;  $30 \text{ mg L}^{-1}$  AG,  $5 \text{ mg L}^{-1}$  AA,  $30 \text{ mg L}^{-1}$  AT.

A inibição do radical  $\text{NFFD}^{\bullet+}$  quando se empregando  $\text{Fe}^{3+}$  como oxidante se mostrou mais rápida para os três compostos avaliados quando comparou-se com o sistema empregando  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  como oxidante para geração do radical. O tempo para se atingir a estabilização do percentual de inibição também foi menor para o sistema empregando íons férricos para geração do radical. Este resultado pode estar associado à mais rápida formação do  $\text{NFFD}^{\bullet+}$  (quando se emprega  $\text{Fe}^{3+}$ ) e por conseqüência a concentração inicial do radical cátion foi maior o que favoreceu a reação e, por conseqüência, inibição do radical com redução da coloração púrpura.

A cinética mais lenta de formação do radical cátion  $\text{NFFD}^{\bullet+}$  empregando  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  como oxidante em relação ao  $\text{Fe}^{3+}$  mostrou ser uma grave limitação para implementação deste procedimento em sistemas de análise em fluxo. Principalmente em sistemas SIA, que apresentam restrições quanto ao grau de mistura entre os reagentes (MASINI, 2008). Além disto, a redução do sinal analítico frente a compostos com atividade antioxidante foi maior quando se empregou  $\text{Fe}^{3+}$  para geração do radical cátion. Desta forma, para os estudos

subsequentes realizados em sistema SIA selecionou-se  $\text{Fe}^{3+}$  como oxidante para geração “*in situ*” do radical cátion NFFD $^{\bullet+}$ .

#### **, 4.2 Ordem de Aspiração dos Reagentes e Amostra**

No sistema SIA, a sequência de aspiração das soluções envolvidas na reação podem significativamente influenciar a forma e a intensidade do sinal obtido, desde que isto determine o nível de interdispersão das soluções (PINTO *et al.*, 2005). Em função das características da reação e considerando que as soluções do oxidante ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e da amostra não poderiam apresentar interface de mistura, pois ocorreria oxidação dos compostos com atividade antioxidante presentes na amostra, somente duas ordens de aspiração foram avaliadas. Outras ordens não foram avaliadas para não permitir uma interface entre o  $\text{Fe}^{3+}$  e a amostra, pois isto possibilitaria uma possível complexação do  $\text{Fe}^{3+}$ , deixando-o menos disponível para possibilitar a geração do radical NFFD $^{\bullet+}$ , ocasionando assim um menor sinal de referência. O ácido gálico foi selecionado como padrão de comparação e calibração para o desenvolvimento do procedimento SIA, em virtude de ser um composto fenólico e apresentar derivados amplamente encontrados nos alimentos (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Com base nos estudos anteriores foram avaliadas duas ordens de aspiração: amostra/NFFD/ $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ /NFFD/amostra empregando-se 100  $\mu\text{L}$  para todas as soluções. A primeira ordem de aspiração apresentou inibição do sinal mais acentuada, sendo *ca.* 8% maior que a segunda. Desta forma, a ordem de aspiração amostra/NFFD/ $\text{Fe}^{3+}$  foi selecionada para os estudos futuros.

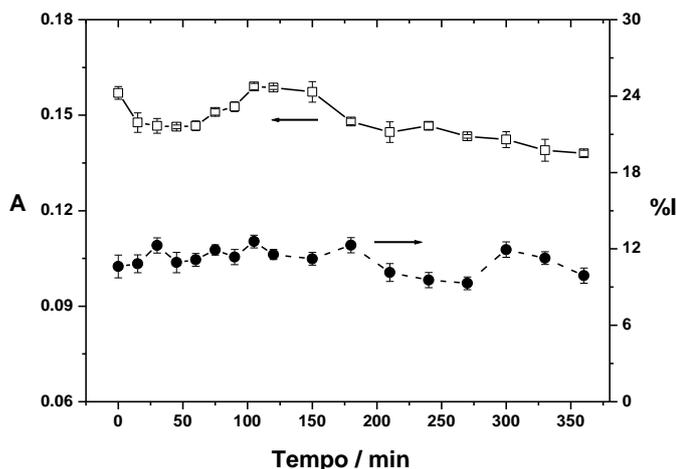
### 4.3 Efeito do pH da Solução de NFFD

Foram realizados estudos para avaliação do pH da solução tamponante da solução de NFFD. Foram avaliados soluções com HCl com pH 1,0; 2,5 e tampão acetato nos valores de pH 3,5; 4,0 e 5,0 e o tampão fosfato nos valores de pH 6,0 e 7,0. Nos testes realizados nos valores de pH de 1,0 e 2,5 ocorreu precipitação do NFFD, evidenciado por uma turbidez na solução preparada. Nos valores mais elevados de pH (5,0; 6,0 e 7,0) a solução não apresentou-se estável devido ao aparecimento de uma coloração púrpura, sendo evidenciada em pH 7,0, ou seja, ocorreu oxidação da solução de NFFD antes da mistura de reagentes, e proporcionava altos valores de referência.

Para os valores de 3,5 e 4,0 a solução permaneceu estável sem alteração aparente. Diante disto decidiu-se trabalhar em pH 4,0, pois este valor está mais próximo do ótimo de tamponamento (valor de pH 4,7), permitindo maior capacidade tamponante.

### 4.4 Avaliação da Estabilidade da Solução de NFFD

A avaliação da estabilidade temporal da solução de NFFD preparada em tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0) foi realizada registrando-se o sinal de referência gerado no sistema SIA proposto em função do tempo de preparo da solução da amina aromática (Figura 4.4). O desvio padrão relativo (RSD) calculado considerando todas as medidas relativas ao sinal de referência que corresponde ao radical NFFD<sup>•+</sup> na ausência das espécies com atividade antioxidante foi inferior a 2,5% para todas as medidas durante os 360 min de avaliação. Este resultado indicou que a solução de NFFD manteve-se estável quanto à geração do radical NFFD<sup>•+</sup> (sinal de referência) durante o período de avaliação (Figura 4.4).



**Figura 4.4** – Avaliação da estabilidade temporal da solução de NFFD. Efeito sobre o sinal de referência no sistema SIA proposto (□) e efeito da estabilidade da solução de NFFD quanto a inibição de uma solução de ácido gálico  $30 \text{ mg L}^{-1}$  (●). Condições: NFFD  $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{Fe}^{\text{III}}$   $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $80 \mu\text{L}$  da amostra ou água e  $40 \mu\text{L}$  de NFFD e  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\Phi_{\text{carregador}} = 2,5 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $B_R = 115 \text{ cm}$  e tempo de interrupção de fluxo de  $60 \text{ s}$  ( $N = 3$ ).

Em outro estudo, a influência da estabilidade temporal da solução de DFFD foi avaliada em relação à inibição do radical gerado, empregando-se ácido gálico como padrão. Neste estudo, para cada tempo avaliado era obtido um novo sinal do branco, e desta forma foi calculado o percentual de inibição relativo àquele determinado tempo (Figura 4.4). O desvio padrão relativo (RSD) para os valores de inibição do NFFD<sup>•+</sup> nos 360 min de avaliação foi inferior a 1,1%, indicando uma boa estabilidade da solução NFFD e capacidade de repetição dos resultados com uma baixa variação da porcentagem de inibição.

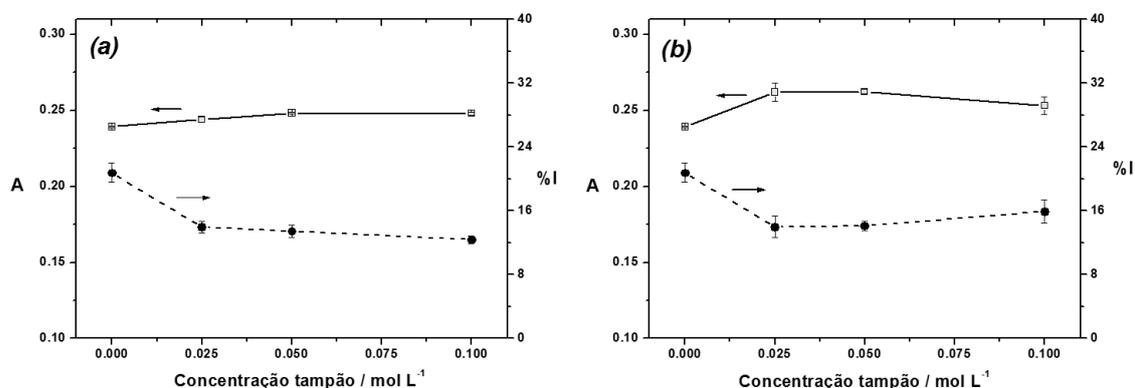
#### 4.5 Avaliação do Efeito do pH da Amostra

Neste estudo foi avaliada a influência do pH da amostra e da concentração da solução tampão utilizada na preparação/diluição dos padrões e da amostra. Os valores de pH avaliados foram 3,5; 4,0 e 5,0 para tampão acetato e 6,0 e 7,0 para tampão fosfato. Para valores de pH superiores a 7,0 observou-se oxidação da solução de ácido gálico (Carvalho *et al.*, 2004), variando a coloração da solução de incolor para verde, ocasionada pela mudança da banda de absorção ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) para um maior comprimento de onda

(deslocamento batocrômico), o que pode ser evidenciada pela dissociação dos grupos fenólicos presentes na molécula (MIGUÉZ, *et al.*, 2006).

Mudança batocrômica : é o deslocamento da banda de absorção para um comprimento de onda maior devido a efeitos de substituição

Quando as soluções de ácido gálico tiveram os valores de pH ajustados na faixa de 5,0 a 7,0; não foi observada inibição apreciável do sinal analítico relativo ao consumo de NFFD<sup>•+</sup> (< 3%). Além disto, valores elevados de pH poderiam conduzir à precipitação de íons férricos na forma de Fe(OH)<sub>3(s)</sub> ( $K_{ps} = 2 \times 10^{-39}$ ) o que torna mais viável o emprego de Fe<sup>III</sup> como oxidante em meio ácido. Neste sentido, a otimização deste parâmetro foi realizada com as soluções ajustadas para valores de pH 3,5 e 4,0 (Figura 4.5).



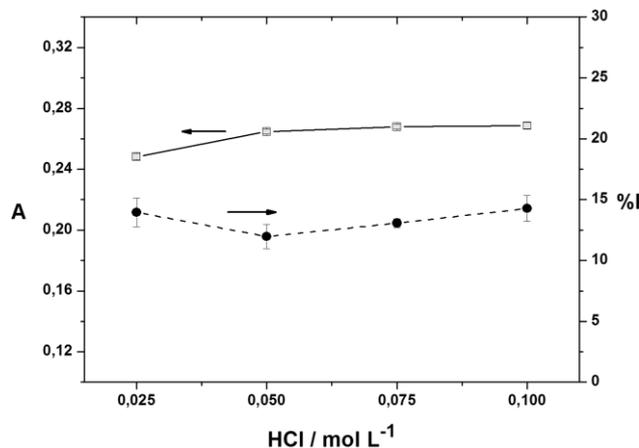
**Figura 4.5** – Avaliação do efeito do pH na solução de referência em função da concentração do tampão. Sendo: (a) pH 3,5 (b) 4,0 ( $N = 3$ ). Condições: Ácido gálico  $30 \text{ mg L}^{-1}$ , NFFD  $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , Fe<sup>III</sup>  $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $200 \text{ } \mu\text{L}$  da amostra/tampão e  $100 \text{ } \mu\text{L}$  de NFFD e Fe<sup>III</sup>,  $\Phi_{\text{carregador}} = 2,5 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $B_R = 115 \text{ cm}$  e tempo de interrupção de fluxo de 90 s.

A concentração da solução tampão acetato foi avaliada em pH 3,5 e 4,0 como apresentado na Figura 4.5. O comportamento para ambos os valores de pH foi semelhante em relação à geração do radical cátion NFFD<sup>•+</sup>, assim como, quanto à inibição deste frente ao ácido gálico.

De acordo com os resultados obtidos e apresentados na Figura 4.5 as amostras e as soluções de referência foram diluídas em tampão acetato com o pH ajustado para 4,0. Este valor de pH foi selecionado por apresentar uma maior capacidade tamponante em  $\text{pH} = 4,7$  do que para  $\text{pH} = 3,5$  e as amostras analisadas apresentarem-se com pH próximo a 4,0. A concentração do tampão acetato selecionada foi de  $0,025 \text{ mol L}^{-1}$  em virtude de não se observar diferença significativa (para um nível de confiança de 95%) entre as outras concentrações avaliadas. Para condição na ausência do tampão foi observada a maior inibição, este comportamento foi verificado para os dois valores de pH avaliados. Esta redução pode estar associada a mudança da força iônica do meio, alterado a reação do radical com o ácido gálico, já que para formação do  $\text{NFFD}^{\bullet+}$  não foi observada diferença. Não foi selecionada uma concentração maior para a solução tampão em função da elevada diluição a que são submetidas as amostra (pelo menos 10 vezes). Logo, a concentração de  $0,025 \text{ mol L}^{-1}$  era mais que suficiente para ajustar, quando necessário, o pH do meio.

#### **4.6 Avaliação da Concentração de HCl na Solução Estoque de $\text{Fe}^{3+}$**

Com o intuito de evitar a precipitação de íons férricos em solução, avaliou-se a concentração final de HCl na solução do oxidante na faixa de  $0,025$  a  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (Figura 4.6).



**Figura 4.6** – Avaliação do efeito da concentração final de HCl na solução de Fe<sup>III</sup> ( $N = 3$ ). Condições: Ácido gálico  $30 \text{ mg L}^{-1}$ , NFFD  $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , Fe<sup>III</sup>  $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $200 \mu\text{L}$  da amostra/tampão e  $100 \mu\text{L}$  de NFFD e Fe<sup>III</sup>,  $\Phi_{\text{carregador}} = 2,5 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $B_R = 115 \text{ cm}$  e tempo de interrupção de fluxo de 90 s.

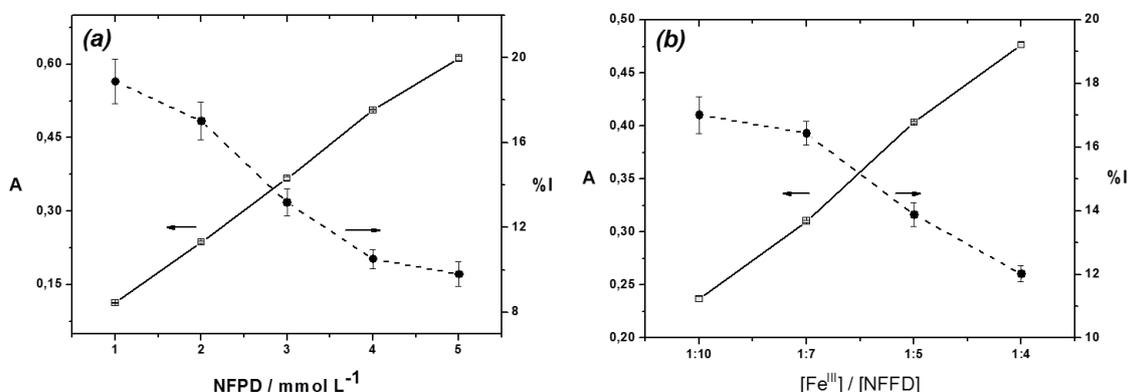
Os resultados apresentados não demonstraram diferenças significativas para um nível de confiança de 95% em relação às concentrações de HCl avaliadas. Desta forma, a concentração final da solução de Fe<sup>3+</sup> foi fixada em  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ . Esta concentração foi selecionada visando evitar a precipitação de Fe(OH)<sub>3(s)</sub> que, em função da concentração de Fe<sup>3+</sup> igual a  $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  ocorreria a partir de pH próximo a 2,2. Desta forma, selecionou-se a concentração de HCl de 0,05 e não  $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ , já que para geração ou inibição do radical estas concentrações não levariam a diferenças significativas. Também foram realizados testes com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nas concentrações de 0,001; 0,025 e  $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ , na solução de trabalho de Fe<sup>3+</sup>, mas não foi evidenciada a inibição do sinal analítico frente a reação com os compostos antioxidantes.

#### 4.7 Avaliação da Concentração de NFFD e Proporção de NFFD/Fe<sup>3+</sup>

A magnitude do sinal do branco indicava a extensão da formação do radical NFFD<sup>•+</sup>, e quanto maior a formação do radical mais rápida era a reação com o composto antioxidante. Neste sentido, os parâmetros otimizados levavam em conta o sinal de referência e a diminuição do sinal causada pelo

ácido gálico. A Figura 4.7 apresenta os resultados referentes à otimização da concentração de NFFD e da proporção entre  $\text{Fe}^{3+}$  e a amina aromática.

Com o aumento da concentração de NFFD observou-se um aumento linear do sinal de referência (Figura 4.7a), todavia o comportamento em relação à redução do sinal analítico para o ácido gálico foi antagônico, pois foi observada redução da inibição. O valor do decaimento da inibição do sinal produzida pelo ácido gálico a partir de  $4 \text{ mmol L}^{-1}$  de NFFD foi praticamente constante. No entanto, com o aumento da concentração de NFFD o sinal de referência aumentava, enquanto a variação de absorvância em relação à inibição continuava constante, desta forma, reduzindo o valor do %I calculado. Considerando os resultados obtidos, selecionou-se a concentração de  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  de NFFD que apresentou 17% de inibição do sinal analítico.



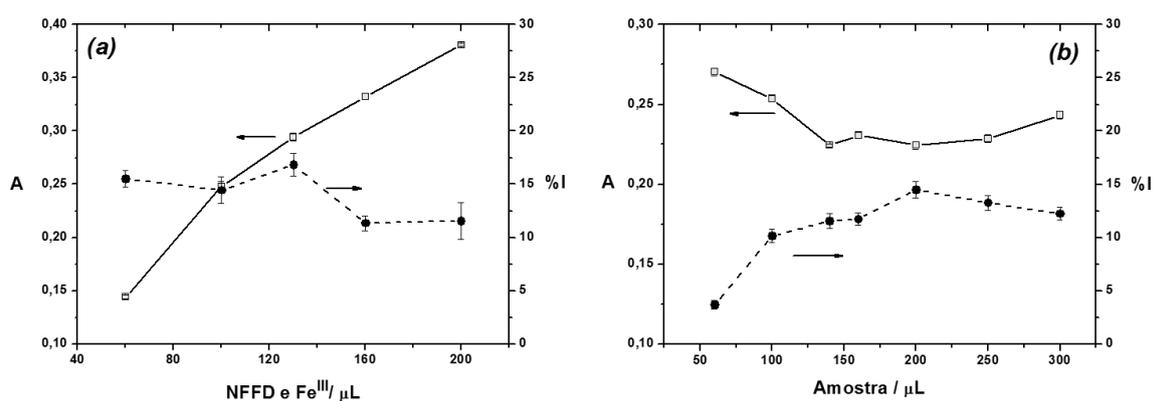
**Figura 4.7** – (a) Avaliação da concentração de NFFD e (b) Proporção da concentração  $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{NFFD}$  ( $N = 3$ ). Condições:  $200 \mu\text{L}$  da amostra/tampão e  $100 \mu\text{L}$  de NFFD e  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\Phi_{\text{carregador}} = 2,5 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $B_R = 115 \text{ cm}$  e tempo de interrupção de fluxo de 60 s.

A proporção entre o NFFD e o  $\text{Fe}^{3+}$  foi avaliada visando à obter redução do sinal analítico e garantir que o oxidante (no caso  $\text{Fe}^{3+}$ ) estivesse em baixas concentrações para não atuar sobre os compostos antioxidantes. Desta forma, os experimentos foram conduzidos sempre com excesso de NFFD e

empregando-se volumes iguais para os reagentes (Figura 4.7b). Foi observado que com o aumento da proporção do oxidante em relação ao NFFD ocorria aumento do sinal de referência, o que era esperado já que tinham uma maior quantidade do agente oxidante. Todavia, foi observada redução linear da inibição do sinal analítico pelo ácido gálico, de forma semelhante ao estudo da concentração de NFFD. Assim, para garantir o maior excesso de NFFD em relação ao oxidante e a maior redução do sinal analítico foi selecionada a proporção molar de 1:10 do  $\text{Fe}^{3+}$  em relação ao NFFD.

#### 4.8 Avaliação dos Volumes dos Reagentes e Amostra

Na otimização dos volumes dos reagentes  $\text{Fe}^{3+}$  e NFFD os valores das alíquotas avaliados foram mantidos iguais visando garantir sempre o excesso do NFFD em relação ao oxidante na proporção molar de 10:1 (NFFD/ $\text{Fe}^{3+}$ ). Em seguida foi avaliado o volume da amostra (ácido gálico), de modo a se obter um valor que promovesse a máxima redução do sinal. Os resultados para avaliação dos volumes dos reagentes e amostra (ácido gálico) estão apresentados na Figura 4.8.



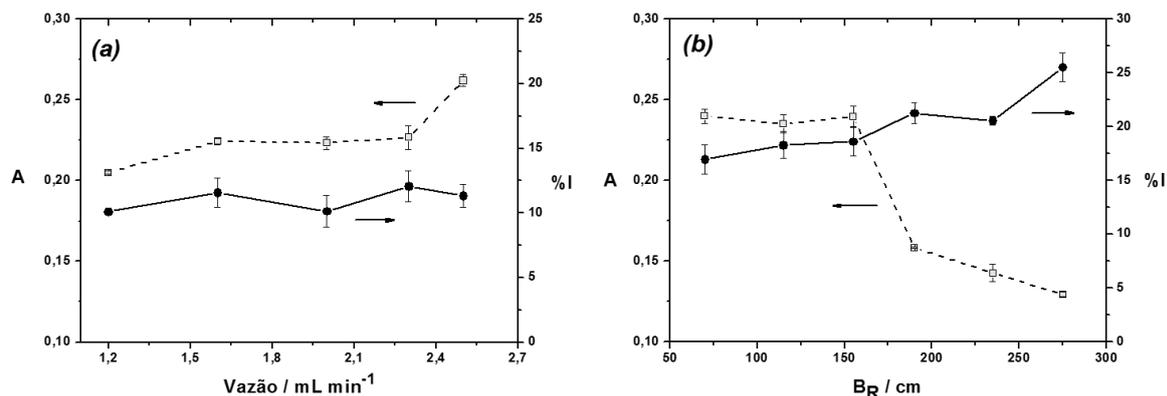
**Figura 4.8** – (a) Avaliação dos volumes das soluções de NFFD e  $\text{Fe}^{3+}$  e (b) Avaliação do volume da amostra/tampão ( $N = 3$ ). Condições: Ácido gálico  $30 \text{ mg L}^{-1}$ , NFFD  $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$   $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\Phi_{\text{carregador}} = 2,5 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $B_R = 115 \text{ cm}$  e tempo de interrupção de fluxo de 90 s.

Verificou-se que o aumento dos volumes de NFFD e  $\text{Fe}^{3+}$  conduziu ao aumento do sinal de referência (Figura 4.8a), visto que uma maior quantidade do radical  $\text{NFFD}^{*+}$  era produzida. Para os volumes de 130  $\mu\text{L}$  da solução de NFFD e  $\text{Fe}^{3+}$  foi obtida a maior redução do sinal analítico, e um sinal de valor intermediário para o sinal de referência. Desta forma, o volume de 130  $\mu\text{L}$  foi selecionado para as soluções de  $\text{Fe}^{3+}$  e NFFD visando os estudos posteriores.

Na avaliação do volume da amostra (ácido gálico 30  $\text{mg L}^{-1}$ ), observou-se que o aumento do volume implicava em redução do sinal de referência até o volume de 140  $\mu\text{L}$  da amostra, provavelmente em função do aumento da dispersão da zona contendo o radical  $\text{NFFD}^{*+}$  (Figura 4.8b). Para volumes superiores a 140  $\mu\text{L}$  não foi observada diferença significativa para 95% de confiança empregando teste *t*. Em relação à inibição do sinal analítico observou-se aumento até o volume de 200  $\mu\text{L}$ . Para volumes superiores a 200  $\mu\text{L}$  foi observada estabilização em relação a inibição do sinal de referência (Figura 4.8b). Desta forma para os experimentos subsequentes selecionou-se o volume de 200  $\mu\text{L}$  de amostra.

#### **4.9 Avaliação da Vazão da Solução Transportadora e do Comprimento da Bobina de Reação ( $B_R$ )**

A vazão da solução transportadora ( $\text{H}_2\text{O}$ ) foi avaliada no intervalo de 1,2 a 2,5  $\text{mL min}^{-1}$  e os resultados são apresentados na Figura 4.9a. Os sinais relativos ao sinal de referência foram semelhantes com exceção da vazão de 2,5  $\text{mL min}^{-1}$  que apresentou um aumento de aproximadamente 13% em relação a média dos outros valores de vazão avaliados.



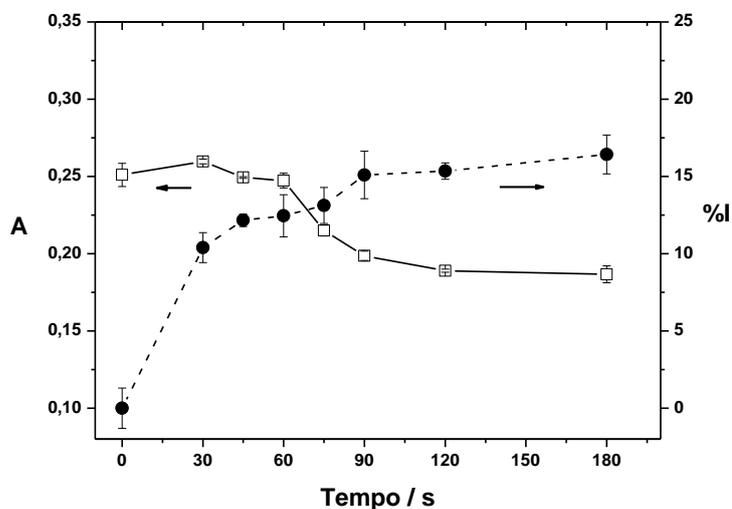
**Figura 4.9** – (a) Avaliação da vazão da solução transportadora (H<sub>2</sub>O) e (b) Avaliação do comprimento da bobina reacional, B<sub>R</sub> (N = 3). Condições: Ácido gálico 30 mg L<sup>-1</sup>, NFFD 2,0x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>, Fe<sup>3+</sup> 2,0x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>, 200 µL da amostra/tampão e 130 µL de NFFD e Fe<sup>3+</sup> e tempo de interrupção de fluxo de 90 s.

O comprimento da bobina reacional (B<sub>R</sub>) foi avaliado de 70 a 275 cm conforme ilustrado na Figura 4.9b. Foi verificado que com o aumento do comprimento da bobina para valores superiores a 155 cm ocorreu uma redução acentuada do sinal de referência (~39%) referente à formação do radical cátion NFFD<sup>•+</sup>. Este fato foi atribuído ao aumento do tempo de residência, que proporcionou um estado estacionário, ocasionando uma falta do efeito da formação do produto, aumentando o efeito dispersor das interfaces amostra-reagentes, proporcionando uma queda na resposta. Quanto à inibição do sinal analítico pela solução de ácido gálico foi observada uma reduzida variação entre os valores de bobina avaliados com exceção de B<sub>R</sub> igual a 275 cm. Em função destes resultados optou-se pela seleção de comprimento da bobina reacional igual a 115 cm, em virtude de apresentar uma inibição do sinal analítico superior (7,4%) em relação ao valor de 75 cm de B<sub>R</sub>.

#### 4.10 Avaliação do Tempo de Interrupção do Fluxo

A avaliação do tempo de interrupção do fluxo após a aspiração dos reagentes e amostra era um parâmetro importante a ser avaliado, pois está associado à taxa de geração do radical NFFD<sup>•+</sup> e, em paralelo, à extensão da

inibição do radical pelo ácido gálico. A Figura 4.10 apresenta os resultados obtidos para a avaliação do tempo de interrupção do fluxo.



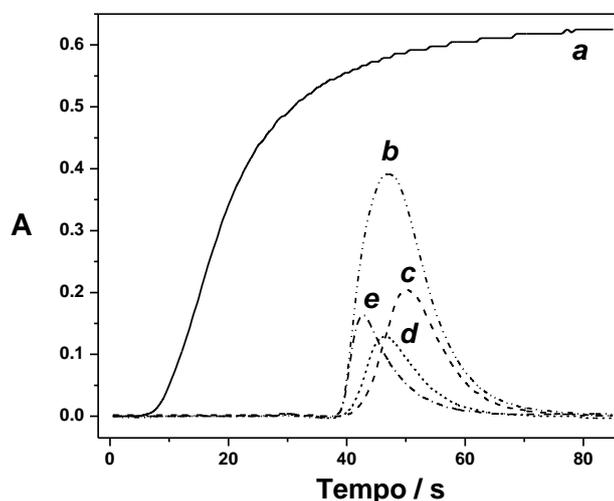
**Figura 4.10** – Avaliação do tempo de interrupção do fluxo ( $N = 3$ ). Condições: Ácido gálico  $30 \text{ mg L}^{-1}$ , NFFD  $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$   $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $200 \mu\text{L}$  da amostra/tampão e  $130 \mu\text{L}$  de NFFD e  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\Phi_{\text{carregador}} = 2,5 \text{ mL min}^{-1}$  e  $B_R = 115 \text{ cm}$ .

O sinal de referência apresentou uma redução de 10,3% após 75 s de interrupção do fluxo em relação a 60 s, e de 16,5% quando comparado com 90 s de interrupção de fluxo. Contudo, quanto à inibição do radical NFFD<sup>•+</sup> pela solução de ácido gálico observou-se um aumento de aproximadamente 29% quando se comparou os tempos de interrupção de fluxo de 60 e 90 s. Para avaliar a influência efetiva dos dois tempos de interrupção de fluxo, 60 s (um maior sinal de branco) e 90 s (maior inibição) foram construídas duas curvas analíticas. A partir da comparação dos coeficientes angulares (sensibilidade) destas curvas analíticas para a mesma faixa de concentração ( $10 - 40 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi observado um aumento de aproximadamente 28% na sensibilidade quando empregou-se o tempo de interrupção de fluxo de 90 s em comparação com 60 s. O aumento percentual da sensibilidade apresentou valor próximo ao encontrado para o aumento de inibição (~29%) verificada para a solução  $30 \text{ mg}$

L<sup>-1</sup> de ácido gálico no tempo de 90 s. Desta forma, o tempo de 90 s de interrupção de fluxo foi selecionado para os estudos futuros.

#### 4.11 Coeficiente de Dispersão ( $D$ ) e Grau de Penetração entre Zonas ( $P$ )

Consecutivo à otimização das condições experimentais realizou-se a estimativa dos coeficientes de dispersão ( $D$ ) e o grau de penetração entre as zonas ( $P$ ) de reagentes e amostras. A Figura 4.11 apresenta o perfil de dispersão de cada reagente e amostra, bem como as zonas de penetração.



**Figura 4.11** – Perfil de dispersão das zonas de reagentes e amostras nas condições otimizadas do sistema SIA proposto, sendo: (a) estado estacionário, (b) zona reacional total (amostra + NFFD + Fe<sup>III</sup>), (c) amostra, (d) NFFD e (e) Fe<sup>3+</sup>. O valor da absorbância correspondente ao estado estacionário foi de 0,625.

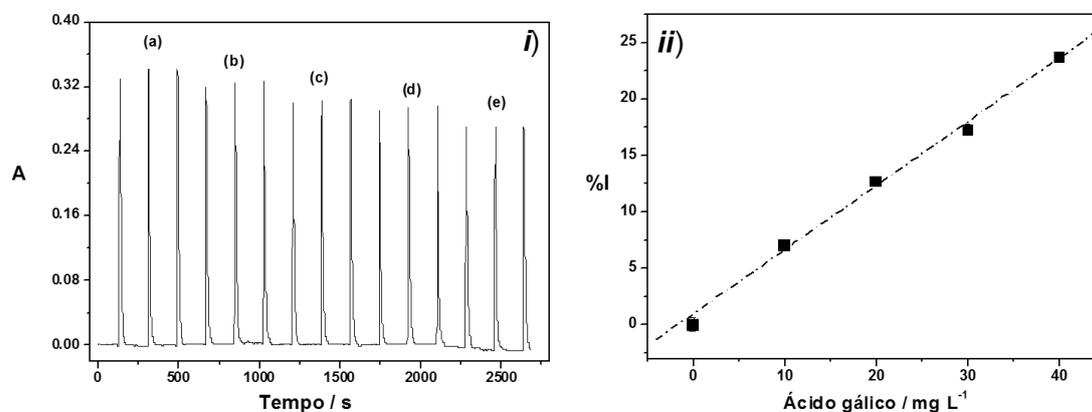
Os coeficientes de dispersão calculados foram  $D_{NFFD} = 4,84$ ;  $D_{Fe^{III}} = 3,78$ ;  $D_{amostra} = 3,04$ . Pelos valores dos coeficientes de dispersão calculados observou-se que as zonas correspondentes ao NFFD, Fe<sup>3+</sup> e amostra sofreram dispersão média ( $D = 2-10$ ), comum à configuração e condições do sistema desenvolvido (GUBELI *et al.*, 1991; RUZICKA, HANSEN, 1988).

O valor do grau de penetração calculado entre as zonas de amostra e reagentes atingiu valores de  $P$  próximos de 1,0 indicando uma sobreposição

quase que completa entre as zonas de reagentes e amostras (GUBELI *et al.*, 1991). O grau de penetração calculado entre as zonas do NFFD e  $\text{Fe}^{3+}$  foi  $P_{\text{NFFD-Fe}^{3+}} = 0,879$ , indicando uma bom grau de interpenetração entre as zonas, o que levou a uma mistura mais eficiente. Para as zonas de solução correspondente a amostra e ao NFFD foi obtido  $P_{\text{NFFD-amostra}} = 0,812$ , indicando também uma boa mistura entre as zonas, o que contribuiu para uma reação mais efetiva entre os compostos antioxidantes e o radical  $\text{NFFD}^{\bullet+}$  formado.

#### 4.12 Figuras de Mérito

Nas condições otimizadas o sistema proposto possibilitou a determinação de 21 amostras por hora. A faixa linear de trabalho foi 10 - 40  $\text{mg L}^{-1}$  de ácido gálico, respondendo à equação  $\%I = 0,53[\text{Ácido Gálico}](\text{mg L}^{-1}) + 0,59$  ( $r = 0,998$ ), como pode ser visualizado na Figura 4.12.



**Figura 4.12** – (i) Registro dos sinais analíticos para determinação espectrofotométrica da capacidade antioxidante empregando o sistema SIA proposto nas condições otimizadas: (a) Sinal de referência; (b) 10; (c) 20; (d) 30; (e) 40  $\text{mg L}^{-1}$  e (ii) Curva analítica ( $N = 3$ ).

O procedimento em fluxo proposto apresentou boa precisão, com desvio padrão relativo inferior a 2,5% em todas as medidas. O limite de detecção ( $3\sigma$ ) calculado para ácido gálico foi estimado em  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ , enquanto o limite de quantificação ( $10\sigma$ ) em  $3,33 \text{ mg L}^{-1}$ .

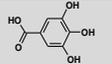
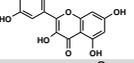
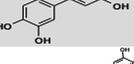
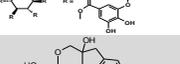
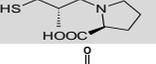
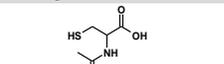
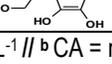
O método de Folin-Denis utilizado para determinação de (poli)fenóis totais apresentou faixa linear de trabalho de 0,5 a 3,0 mg L<sup>-1</sup> (ácido gálico), respondendo a equação  $A = 0,08[\text{Ácido Gálico}](\text{mg L}^{-1}) + 0,02$ ;  $r = 0,999$ . Este procedimento apresentou boa precisão, com desvio padrão relativo inferior a 2,9% em todas as medidas. Os métodos do DPPH e ABTS foram empregados como métodos comparativos para avaliação da capacidade antioxidante. O método de inibição do radical DPPH<sup>•</sup> apresentou faixa de trabalho de 0,2 a 1,0 mg L<sup>-1</sup> (ácido gálico) respondendo a equação  $\%I = 57,6[\text{Ácido Gálico}](\text{mg L}^{-1}) + 2,4$ ;  $r = 0,999$  com desvio padrão relativo inferior a 3,7%. O método de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> apresentou faixa de trabalho de 0,1 a 1,0 mg L<sup>-1</sup> (ácido gálico) respondendo a equação  $\%I = 83,1[\text{Ácido gálico}](\text{mg L}^{-1}) + 2,0$ ;  $r = 0,998$  com desvio padrão relativo inferior a 3,2%. Para o método SIA empregando o radical DMPD<sup>•+</sup> (SANTOS, 2008) foi observada faixa de trabalho de 5 a 55 mg L<sup>-1</sup> (ácido gálico) respondendo a equação  $\%I = 0,81[\text{Ácido Gálico}](\text{mg L}^{-1}) + 1,2$ ;  $r = 0,9993$  com desvio padrão relativo inferior a 2,3%.

#### **4.13 Avaliação de Reatividade do NFFD<sup>•+</sup> Frente a Compostos com Atividade Antioxidantes**

A reatividade do radical NFFD<sup>•+</sup> foi avaliada frente a 19 substâncias orgânicas e uma substância inorgânica (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) nas condições otimizadas. A Tabela 4.1 apresenta os resultados para as substâncias que produziram inibição do sinal em relação ao radical cátion NFFD<sup>•+</sup>.

Ácido ascórbico, ácido tânico e cisteína apresentaram maiores valores de inibição do sinal analítico. Seguindo a estas substâncias os compostos fenólicos, ácidos caféico e gálico, e os tíolicos captopril e glutathione, apresentaram uma inibição equivalente frente ao radical NFFD<sup>•+</sup>.

Tabela 4.1 – Avaliação da reatividade do NFFD\*+ frente a compostos antioxidantes (N = 3).

Substâncias	Estrutura	Faixa Linear		mmol L <sup>-1</sup>		mg L <sup>-1</sup>		EC <sub>50</sub> mmol L <sup>-1</sup>
		mmol L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	Equação	r	Equação	r	
<b>Comp. Fenólicos</b>								
Ácido Gálico		0,06 – 0,23	5 - 40	%I = 84,5 [CA] – 0,5	0,9985	%I = 0,5[CA] – 0,5	0,9987	0,59 <sup>d</sup>
Quercertina		0,03 – 0,16	5 - 50	%I = 87,5 [CA] – 0,07	0,9997	%I = 0,29[CA] – 0,07	0,9998	0,57 <sup>d</sup>
Ácido Caféico		0,06 – 0,28	5 - 50	%I = 90,1 [CA] – 0,1	0,9982	%I = 0,5[CA] – 0,01	0,9982	0,55 <sup>d</sup>
Ácido Tânico		0,015 – 0,044	25 - 75	%I = 372 [CA] – 0,26	0,9959	%I = 0,22[CA] – 0,29	0,9960	0,13 <sup>d</sup>
Hematoxilina		0,07 – 0,33	20 - 100	%I = 25,9 [CA] – 0,45	0,9963	%I = 0,09[CA] – 0,44	0,9963	1,91 <sup>d</sup>
<b>Comp. Tiólicos</b>								
Captopril		0,05 – 0,19	10 - 40	%I = 80,7 [CA] – 1	0,9957	%I = 0,37[CA] – 0,97	0,9961	0,61 <sup>d</sup>
Cisteína		0,04 – 0,25	2,5 - 35	%I = 156[CA] – 0,08	0,9989	%I = 1,1[CA] – 0,08	0,9989	0,32 <sup>d</sup>
Glutathiona		0,03 – 0,32	10 - 100	%I = 76[CA] – 2,6	0,9964	%I = 0,25[CA] – 2,6	0,9962	0,62 <sup>d</sup>
N-acetilcisteína		0,06 – 0,046	10 - 75	%I = 58 [CA] – 2,5	0,9998	%I = 0,36[CA] – 2,5	0,9998	0,82 <sup>d</sup>
Penicilamina		0,07 – 0,027	5 - 40	%I = 55[CA] – 0,03	0,9995	%I = 0,38[CA] – 0,02	0,9995	0,91 <sup>d</sup>
<b>Outros Compostos</b>								
Sulfito de Sódio	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	0,08 – 0,60	10 - 75	%I = 18[CA] – 2,5	0,9984	%I = 0,14[CA] – 2,5	0,9983	1,35 <sup>d</sup>
Ácido Ascórbico		0,01 - 0,14	2,5 - 25	%I = 407[CA] – 0,6	0,9980	%I = 2,3[CA] – 0,6	0,9978	0,12

<sup>a</sup> concentrações em mmol L<sup>-1</sup> // <sup>b</sup> CA = respectivo composto antioxidante // <sup>c</sup> EC<sub>50</sub> = concentração necessária para redução do sinal em 50% // <sup>d</sup> valor extrapolado

As moléculas fenólicas que não apresentaram inibição do sinal analítico em relação ao radical NFFD<sup>•+</sup> foram o ácido cinâmico e seus derivados orto-, meta- e para-hidroxilados, além do guaiacol. O ácido úrico também não apresentou inibição de sinal analítico frente ao NFFD<sup>•+</sup> nas condições otimizadas do sistema SIA proposto. Estas substâncias avaliadas não inibiram o sinal analítico até a concentração de 400 mg L<sup>-1</sup>. O composto fenólico resorcinol, na concentração de 400 mg L<sup>-1</sup> inibiu apenas 2,3%, o que iria ocasionar o uso de concentrações elevadas para se observar uma maior inibição, desta forma não se realizou estudos adicionais com este composto.

Em função das moléculas avaliadas, o radical NFFD<sup>•+</sup> mostrou inibição por moléculas fenólicas que apresentaram hidroxilas vizinhas (*o*-hidroxilas) o que facilita o processo de oxidação por parte do radical. Para outras moléculas fenólicas que não apresentaram este padrão de substituição não se observou inibição ou esta foi reduzida (resorcinol). Este fato pode estar associado a uma menor reatividade do radical NFFD<sup>•+</sup>, pois considerando o derivado DMPD<sup>•+</sup> observou-se inibição por compostos fenólicos como guaiacol. Em relação aos compostos tiólicos, em geral, os potenciais padrão de redução destas espécies são menores quando comparados com compostos fenólicos, desta forma, a inibição do radical NFFD<sup>•+</sup> foi mais eficiente para estes compostos quando comparado com as moléculas fenólicas.

Isto permitiu avaliar a reatividade do radical NFFD<sup>•+</sup> frente a diversos compostos, e estas diferentes reatividades permitem a análise da capacidade antioxidante por meios distintos, fornecendo uma maior versatilidade ao método frente a este parâmetro.

#### 4.14 Resumo dos Parâmetros Otimizados

Uma sinopse dos parâmetros químicos e físicos otimizados no sistema de análise por injeção sequencial proposto é apresentada na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2** – Valores ótimos dos parâmetros químicos e físicos avaliados no sistema SIA proposto.

Parâmetro	Faixa Avaliada	Valor Selecionado
<i>Concentração dos reagentes, mmol L<sup>-1</sup></i>		
NFFD	1 – 5	2
Fe <sup>3+</sup>	0,1 – 0,5	0,2
<i>Volume, µL</i>		
NFFD	60 – 200	130
Fe <sup>3+</sup>	60 – 200	130
Amostra	60 - 300	200
<i>pH da Amostra</i>		
pH	1,0 – 7,0	4,0
<i>Concentração da solução tampão, mol L<sup>-1</sup></i>		
Concentração	0,025 – 0,1	0,025
<i>[HCl] na solução Fe<sup>3+</sup>, mol L<sup>-1</sup></i>		
Concentração	0,025 – 0,1	0,05
<i>Bobina reacional, cm</i>		
B <sub>R</sub>	70 - 275	115
<i>Vazão, mL min<sup>-1</sup></i>		
Solução transportadora (H <sub>2</sub> O)	1,2 – 2,5	2,5
<i>Interrupção de fluxo, s</i>		
Tempo	0 - 180	90

As condições otimizadas foram empregadas no sistema SIA proposto para determinação espectrofotométrica da capacidade antioxidante em amostras de bebidas de diferentes tipos.

#### 4.15 Análise da Capacidade Antioxidante em Bebidas

Observou-se que o radical NFFD<sup>•+</sup> conseguiu atuar sobre uma variedade de substâncias, principalmente em relação a compostos fenólicos (Tabela 4.3). Este fato tornou o método mais versátil, visto que nas amostras analisadas houveram outras substâncias com capacidade redutora, além dos compostos fenólicos.

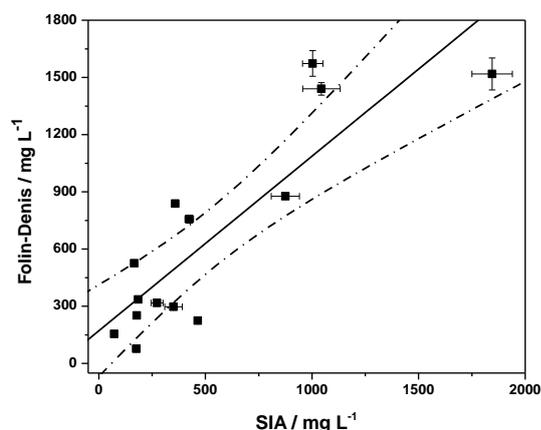
O reagente de Folin-Denis (de forma semelhante ao reagente de Folin-Ciocalteu) é comumente usado para determinação de compostos fenólicos totais. Contudo, este reagente consegue reagir com uma grande variedade de substâncias (PRIOR *et al.*, 2005; IKAWA *et al.*, 2003), logo sua seletividade para uma determinada classe de compostos não é garantida, assim tem sido sugerido o emprego deste método para determinação da capacidade antioxidante, do que para determinação de compostos fenólicos totais (MAGALHÃES *et al.*, 2006; PRIOR *et al.*, 2005).

O ensaio de avaliação da atividade antioxidante por meio do método sequestrante com o DPPH<sup>\*</sup> (metanol e etanol) é verificado usualmente em meio orgânico, o que permite avaliação de substâncias lipofílicas. Semelhante a este há os ensaios sequestrante dos radicais ABTS<sup>•+</sup> e DMPD<sup>•+</sup>, os quais também podem verificar capacidade antioxidante de compostos hidro- e lipofílicos.

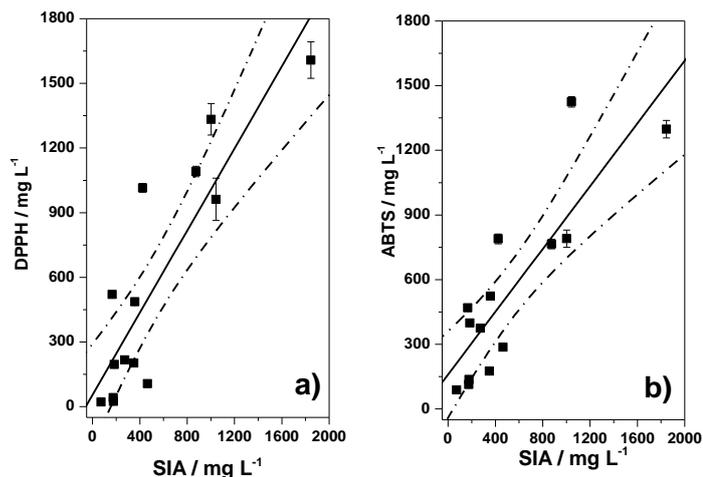
O procedimento proposto empregando análise por injeção sequencial foi aplicado na determinação espectrofotométrica da capacidade antioxidante de bebidas. A Tabela 4.3 apresenta as características das amostras analisadas e os resultados obtidos para determinação da capacidade antioxidante empregando o sistema SIA proposto e os métodos de comparação (Folin-Denis, DPPH, ABTS e DMPD).

Os resultados obtidos com o método proposto foram confrontados com os dados oriundos do método de Folin-Denis, DPPH, ABTS e DMPD (Figuras 4.13 e 4.14). Esta comparação foi realizada em relação aos resultados obtidos para todas as amostras analisadas. A partir da análise de correlação dos resultados verificou-se que o método proposto apresenta melhor correlação com o método do DPPH, Folin-Denis e ABTS, nesta ordem.

O método de Folin-Denis tem como princípio uma reação de transferência de elétrons enquanto que para o método proposto (SIA-NFFD) o mecanismo atuante seria por transferência de próton, contudo se observou uma boa correlação entre estes métodos, sendo:  $C_{\text{Folin-Denis}} = 0,91C_{\text{SIA}} + 172$ ,  $r = 0,863$  (Figura 4.13). Este fato pode estar associado ao emprego do mesmo padrão de calibração (ácido gálico) para ambos os métodos, visto que normalmente se emprega Trolox para métodos que usam de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio, como os radicais livres DPPH, ABTS e o método proposto. Outro fator a se considerar consiste no fato das amostras analisadas apresentam compostos fenólicos ativos quanto à ROS e RNS (HUANG *et al.*, 2005; PRIOR *et al.*, 2005).



**Figura 4.13** – Gráfico de correlação dos resultados obtidos pelo método SIA proposto com o método de Folin-Denis



**Figura 4.14** – Gráfico de correlação dos resultados obtidos pelo método SIA proposto com os resultados do método do (a) DPPH e (b) ABTS.

Apesar dos radicais  $\text{NFFD}^{++}$ ,  $\text{ABTS}^{++}$  e  $\text{DPPH}^{\bullet}$  atuarem pelo mesmo mecanismo (transferência de próton) não existem evidências que a interação (inibição) entre os diferentes compostos com características redutores em uma determinada amostra seja similar, visto que em função das diferenças estruturais dos radicais avaliados aspectos quanto à cinética reacional, efeitos estéricos e potencial redox sejam distintos. Todavia, tem-se observado uma relação linear com relação aos valores obtidos para estes diferentes métodos (Figura 4.14) com amostras distintas (BARROS NETO *et al.*, 2007). Nesta comparação, o método SIA empregando o radical  $\text{NFFD}^{++}$  mostrou melhor correlação com os resultados obtidos para o método empregando o radical  $\text{DPPH}^{\bullet}$  ( $C_{\text{DPPH}} = 0,95C_{\text{SIA}} + 55$ ,  $r = 0,875$ ) quando comparado com os resultados para o  $\text{ABTS}^{++}$  ( $C_{\text{ABTS}} = 0,72C_{\text{SIA}} + 160$ ,  $r = 0,852$ ). Este fato pode estar associado à semelhança estrutural entre as moléculas e o maior grau de lipofilicidade que ambas apresentam. Contudo, enquanto não houver uma padronização quanto a aspectos metodológicos (pH, faixa de concentração do

reagente, força iônica, solvente, tempo de reação, natureza do padrão de calibração, entre outros) toda comparação dos resultados entre estes métodos ainda pode estar estritamente dependente aos parâmetros experimentais escolhidos.

A comparação dos resultados para o método com o radical DMPD<sup>•+</sup> foi realizada somente com amostras de vinho (Tabela 4.14). Nesta comparação os resultados obtidos pelo procedimento SIA proposto são estatisticamente concordantes para 95% de confiabilidade para as amostras de vinhos (branco e tinto) com os resultados relativos ao método empregando DMPD, a partir da aplicação do teste *t* pareado. Considerando o universo amostral ( $N = 6$ ), o valor de *t* calculado para o método SIA proposto e o método do DMPD foi  $t_{\text{DMPD}} = 0,44$ ; enquanto o valor tabelado para o mesmo intervalo de confiança (95%) corresponde a 2,57 ( $N - 1 = 5$ ). A comparação é permitida pois o teste *t* avalia médias populacionais para dados pareados, ou seja, moléculas semelhantes foram utilizadas em um mesmo sistema (SIA), e a avaliação da atividade antioxidante foi relacionada às mesma substâncias frente a sonda gerada (BARROS NETO *et al.*, 2007).

As amostras de vinhos são tradicionalmente ricas em compostos (poli)fenólicos e já foi comprovado que o método de Folin-Ciocalteu (fenólicos totais), e também houve quantificação pelos métodos DPPH, ABTS e DMPD, e foram concordantes, quando comparou-se capacidade antioxidante (Trolox) e a concentração de compostos fenólicos totais (FOGLIANO *et al.*, 1999). Adicionalmente, a presença de sulfitos e ácido ascórbico comum aos vinhos seria computada de forma semelhante para todos os métodos (MAGALHÃES *et al.*, 2006a; FOGLIANO *et al.*, 1999). Os resultados encontrados são

concordantes aos reportados na literatura (INFANTE *et al.*, 2008; MAGALHÃES *et al.*, 2007b; SCHOONEN,SALES, 2002).

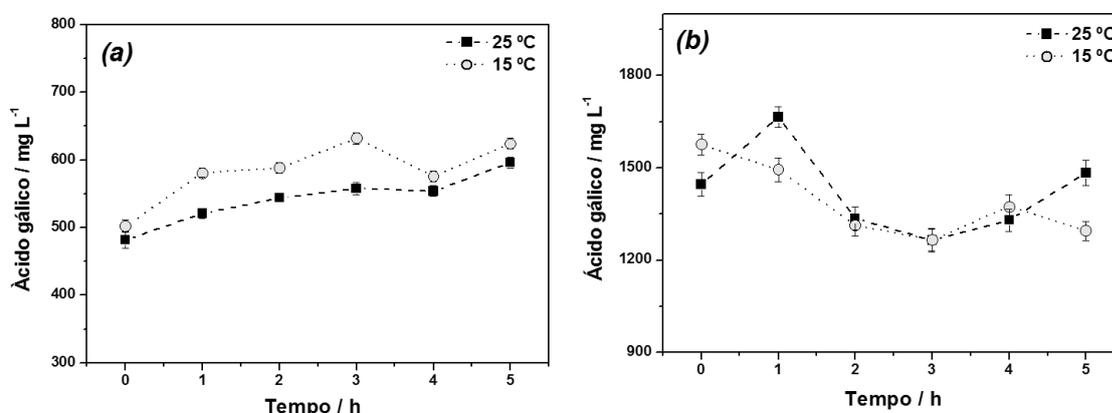
**Tabela 4.14** – Determinação da capacidade antioxidante (expressos em mg L<sup>-1</sup> de ácido gálico) em bebidas empregando o método proposto (N = 3).

Amostra	Bebida	Características das amostras				Ácido Gálico, mg L <sup>-1</sup>				
		Tipo	Teor Alcoólico <sup>a</sup> , %	Massa <sup>b</sup> , g	Diluição	SIA-NFFD	Fenólicos Totais <sup>c</sup>	DPPH	ABTS	DMPD <sup>d</sup>
1	Vinho	Branco	11	-	1:50	184 ± 9	336 ± 8	196 ± 6	399 ± 6	308 ± 12
2	Vinho	Branco	12	-	1:50	273 ± 28	318 ± 10	217 ± 5	375 ± 5	335 ± 9
3	Vinho	Branco	13	-	1:50	464 ± 10	225 ± 7	107 ± 7	287 ± 8	252 ± 10
4	Vinho	Tinto	12	-	1:125	1845 ± 195	1518 ± 84	1608 ± 85	1298 ± 41	1452 ± 22
5	Vinho	Tinto	11	-	1:125	1044 ± 88	1440 ± 33	962 ± 98	1425 ± 24	1256 ± 17
6	Vinho	Tinto	13	-	1:125	1003 ± 48	1573 ± 67	1333 ± 73	790 ± 40	962 ± 14
7	Infusão	Boldo ( <i>Pneumus boldus</i> )	-	1,4	1:10	166 ± 15	526 ± 10	521 ± 12	469 ± 10	-
8	Chá	Verde ( <i>Camelia sinenses</i> )	-	1,7	1:40	875 ± 66	877 ± 14	1091 ± 24	765 ± 22	-
9	Infusão	Carqueja ( <i>B. genistelloides</i> )	-	1,3	1:10	178 ± 6	252 ± 17	24 ± 2	137 ± 11	-
10	Chá	Preto ( <i>Camelia sinenses</i> )	-	2,6	1:20	424 ± 20	757 ± 20	1015 ± 20	789 ± 23	-
11	Infusão	Hortelã ( <i>Mentha piperita</i> )	-	1,3	1:20	350 ± 41	297 ± 14	202 ± 8	175 ± 6	-
12	Infusão	Camomila ( <i>Matricaria recutia</i> )	-	1,3	1:10	176 ± 17	77 ± 5	42 ± 6	113 ± 5	-
13	Infusão	Mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> )	-	1,9	1:40	358 ± 13	839 ± 15	487 ± 9	523 ± 12	-
14	Infusão	Erva Doce ( <i>Pimpinella anisum</i> )	-	2,2	1:10	72 ± 12	155 ± 7	22 ± 3	88 ± 3	-

<sup>a</sup> declarado pelo fabricante // <sup>b</sup> massa média por sachê de chá (N = 3) // <sup>c</sup> Folin-Denis // <sup>d</sup> realizado em sistema SIA (SANTOS, 2008).

#### 4.16 Análise Temporal da Estabilidade de Amostra de Vinho

A análise temporal da estabilidade foi realizada com amostras de vinho (tinto e branco) com concentração alcoólica de aproximadamente 10% (v/v). Duas amostras, uma de vinho tinto e outra de vinho branco foram mantidas em recipientes distintos, cada qual com temperatura controlada, sendo 15 °C em banho termostático, e a outra à temperatura ambiente do laboratório (25 °C). Durante intervalos de 1 h, as amostras foram avaliadas quanto ao valor relativo à atividade antioxidante expresso em ácido gálico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) por um período de 5 h. O tempo máximo de 5 h foi selecionado de acordo com o tempo relativo ao estudo de estabilidade da solução de NFFD. Os resultados para este estudos são apresentados na Figura 4.13.



**Figura 4.15** – Avaliação da estabilidade temporal das amostras de vinho (a) branco e (b) tinto nas condições otimizadas do sistema proposto ( $N = 3$ ).

Diante dos resultados obtidos, se observou que a amostra de vinho branco foi mais suscetível ao efeito do tempo de exposição às condições ambientes (condições de consumo) em função da temperatura de armazenamento, e os produtos de degradação podem ter gerado compostos

que permitissem a variação da atividade antioxidante do mesmo, ou seja, permitam um aumento da capacidade antioxidante. Para a menor temperatura avaliada (15 °C) foram verificados sistematicamente maiores valores em relação à capacidade antioxidante expressa em ácido gálico (mg L<sup>-1</sup>) quando comparada com a temperatura ambiente (25 °C). Para o vinho tinto não foi observada diferença significativa (para um nível de confiança de 95%) entre os valores reportados quanto à capacidade antioxidante (ácido gálico, mg L<sup>-1</sup>) para as diferentes temperaturas avaliadas empregando teste *t* pareado.

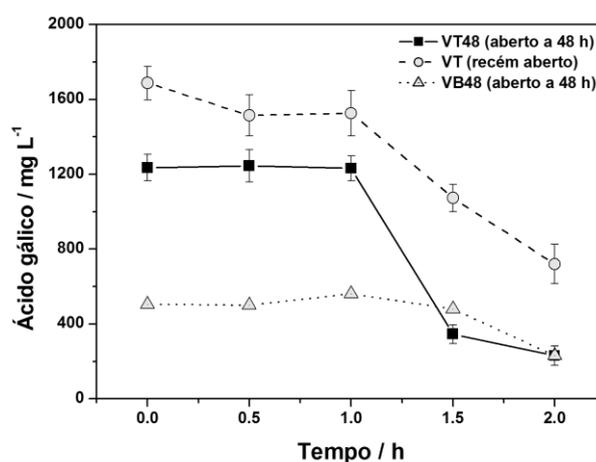
Este estudo indicou que o vinho branco em relação ao vinho tinto foi mais sensível às condições ambientes (luz, umidade, oxigênio atmosférico, entre outros), possivelmente pela menor quantidade de compostos antioxidantes em sua composição. Desta forma, uma garrafa de vinho branco após aberta teria uma menor estabilidade quanto aos compostos que apresentam atividade antioxidante. Este comportamento pode estar associado a menor concentração de compostos fenólicos normalmente encontradas nos vinhos brancos (FOGLIANO *et al.*, 1999), além de que há presença de sulfito em sua composição, que pode atuar como composto antioxidante. Contudo, a partir deste estudo não se pode inferir em possíveis alterações das amostras de quanto às propriedades organolépticas (sabor e odor) em função do tempo de exposição e temperatura de armazenamento.

#### **4.17 Avaliação da Atividade Antioxidante de Amostras de Vinhos Submetidas ao Processo de Ozonização**

Os processos avançados de oxidação utilizam o alto poder de oxidação dos radicais livres para decompor substâncias orgânicas, principalmente em amostras líquidas. O método por ozonização é o mais popular, para

tratamento de água, por possuir alto poder oxidante do  $O_3$ , rápida taxa de reação e por não deixar resíduos (CHIANG *et al.*, 2006). Estas características permitiram verificar o efeito oxidante da ozonização sobre amostras de vinhos.

As amostras de vinho (tinto e branco) analisadas foram inicialmente ozonizadas (tempo zero) e depois após 1 h. Em ambos os experimentos o tempo de exposição foi de 10 min. Após a ozonização, as amostras de vinho foram analisadas após 20 e 50 min para verificar o sinal analítico frente inibição do radical  $NFFD^{*+}$ . Foram avaliadas duas amostras de vinho tinto, uma recém aberta e outra aberta a 48 h, por fim, uma amostra de vinho branco aberta a 48 h. As amostras analisadas que estavam abertas a 48 h estavam armazenadas e fechadas sob refrigeração.



**Figura 4.16** – Avaliação da capacidade antioxidante (ácido gálico,  $mg L^{-1}$ ) de amostras de vinho submetidas ao processo de ozonização empregando o método proposto ( $N = 3$ ). Sendo **VT** – amostra de vinho tinto recém aberto, **VT48** – amostra de vinho tinto aberta a 48 h e **VB48** – amostra de vinho branco aberta a 48 h.

O processo de ozonização das amostras de vinho levou a redução significativa dos compostos que apresentam atividade antioxidante após exposição de 1 h das amostras de vinho ao  $O_3$ . Para tempos inferiores a 1 h não houve diferença significativa entre os resultados para todas as amostras analisadas. O decaimento mais efetivo foi observado para amostra de vinho

tinto aberta a 48 h, onde a redução foi de 81% em relação ao valor inicial, já para o vinho tinto recém aberto observou-se um decaimento de 57%. Estes resultados foram atribuídos a maior quantidade de compostos fenólicos presentes no vinho recém aberto quando comparado ao vinho tinto aberto a um maior tempo. Para o vinho branco aberto a 48 h foi observada uma redução de 54% em relação à concentração inicial quando submetido ao processo de ozonização. Estes resultados indicam que a presença de oxidantes externos conduz à diminuição drástica da atividade antioxidante das amostras avaliadas, o que leva à perda de qualidade do alimento, principalmente quando comparado a avaliação da estabilidade do vinho em função do tempo e da temperatura, visto que a degradação frente ao  $O_2$  do ambiente foi em menor proporção quando comparado com o  $O_3$ , devido ao poder oxidante deste diretamente ( $O_3$ ) e indiretamente (radicais  $HO^*$ ) (GARCIA, *et al.*, 2010).

Desta forma, o uso do  $O_3$  pode ser uma alternativa para estudos de degradação acelerada de alimentos, visto que atualmente tem-se empregado o  $O_3$  visando o preparo de amostras de alimentos como um auxiliar no processo de decomposição de matéria orgânica mostra-se uma alternativa promissora (SANTOS, 2009). Pois, a ozonização demonstrou-se efetiva na degradação de matéria orgânica no tratamento de águas residuais de vinícolas. A degradação de compostos aromáticos e polifenólicos foi consideravelmente rápida, que são eficientemente removidos em meio ácido; além disto a reação do ozônio com a matéria orgânica natural propicia a formação do peróxido de oxigênio, o que aumenta a capacidade oxidante do processo de ozonização (LUCAS *et al.*, 2009).

# CAPÍTULO 5

---

---

# CONCLUSÕES

## 5 CONCLUSÕES

O método proposto possibilitou a determinação espectrofotométrica da capacidade antioxidante de amostras de bebidas (vinhos e chás) explorando a geração *in situ* do radical NFFD<sup>•+</sup> em sistema SIA, o que permite afirmar que o NFFD pode ser inserido como nova estratégia para avaliação da atividade antioxidante.

O método apresenta uma característica hidro- e lipofílica, o que permite quantificação da atividade antioxidante em distintas amostras. Reatividades distintas, frente a diferentes compostos (20 substâncias), entre estes fenólicos, tiólicos, vitaminas, entre outros, com ácido ascórbico, ácido tânico e cisteína apresentando maior reatividade. Além disto, segue os preceitos da química verde, pois em 1 h realiza 21 determinações, gerando 2,1 mL de resíduos de NFFD ( $4,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) e  $\text{Fe}^{3+}$  ( $4,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ).

Com o método otimizado no sistema SIA, analisou-se 14 amostras de bebidas (vinhos e chás), e o mesmo apresentou-se melhor correlação com o método do DPPH, Folin-Denis e ABTS, nesta ordem; e concordante com o método DMPD empregando o teste *t* pareado (95% de confiança). Os resultados variaram de  $72 \pm 12 \text{ mg L}^{-1}$  para uma amostra de chá (erva doce) a  $1845 \pm 195 \text{ mg L}^{-1}$  para uma amostra de vinho tinto expressos em equivalente de ácido gálico ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

O emprego do sistema SIA permitiu a avaliação temporal da estabilidade de amostras de vinhos (branco e tinto), além da avaliação do efeito da ozonização nas nestas amostras.

## 5.1 Perspectivas Futuras

Considerando a tendência de desenvolvimento de métodos para avaliação da capacidade antioxidante em diferentes tipos de amostras associados a diferentes estratégias em fluxo as principais perspectivas deste trabalho são:

*i)* realizar uma avaliação comparativa de outras aminas aromáticas como N,N, dietil-*p*-fenilenodiamino, N-etil-N-(2-hidroxi-*etil*)-*p*-fenilenodiamino, N-etil-N-isopropil-*p*-fenilenodiamino, N<sub>4</sub>-etil-N<sub>4</sub>-(2-hidroxi-*etil*)-2-metil-*p*-fenilenodiamino, *p*-fenilenodiamino e *p*-aminofenol com os resultados obtidos para o NFFD e DMPD (SANTOS, 2008);

*ii)* avaliar outras estratégias em fluxo como o uso de sistemas multicomutados e minibombas solenóides visando estabelecer configurações com um grau de mistura mais eficiente que os sistemas SIA;

*iii)* avaliar a geração e inibição de diferentes radicais derivados de aminas aromáticas frente à diferentes solventes e compostos com atividade antioxidante com características hidrofílicas e lipofílicas.

*iv)* estender a avaliação de reatividade de diferentes radicais derivados de aminas aromáticas frente a fármacos fenólicos, antiinflamatórios, fitoterápicos, amostras biológicas (plasma, por exemplo), entre outras.

# REFERÊNCIAS

---

---

## REFERÊNCIAS

- ARTS, M. J. T. J.; DALLINGA, J. S.; VOSS, H.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A.. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. **Food Chemistry**, n. 88, p. 567-570, 2004.
- ASGHAR, M.N.; KHAN, I.U.; ARSHAD, M.N. and SHERIN, L. Evaluation of antioxidant activity using an improved DMPD radical cation decolorization assay, **Acta Chimica Slovenica**, n. 54, p. 295–300, 2007.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.. **Como fazer experimentos**. 3. ed. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2007.
- BURATTI, S.; BENEDETTI, S. and COSIO, M.S. Evaluation of the antioxidant power of honey, propolis and royal jelly by amperometric flow injection analysis. **Talanta**, n. 71, p. 1387–1392, 2007.
- BURATTI, S.; SCAMPICCHIO, M.; GIOVANELLI, G. and MANNINO, S.. A low-cost and low-tech electrochemical flow system for the evaluation of total phenolic content and antioxidant power of tea infusions. **Talanta**, n. 75, p. 312-316, 2008.
- CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G. and SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos, *In*: SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A. and PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5ª edição, Editora da UFRGS, Porto Alegre, 2004.
- CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G. de; AUGUSTO, O.. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.
- CHIANG, Y.; LIANG, Y.; CHANG, C.; CHAO, Y.. Differentiation ozone direct and indirects reactions on decomposition of humic substances. **Chemosphere**, n. 65, p. 2395-2400, 2006.
- COSTIN, J.W.; BARNETT, N.W.; LEWIS, S.W. and MCGILLIVERY, D.J. Monitoring the total phenolic/antioxidant levels in wine using flow injection analysis with acidic potassium permanganate chemiluminescence detection, **Analytica Chimica Acta**, n. 499, p. 47–56, 2003
- DAVID, J. M.; et. al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, 2010.
- ECONOMOU, A.. Sequential-injection analysis (SIA): a useful tool for on-line sample-handling and pre-treatment. **Trends in analytical chemistry**, v. 24, n. 5, 2005.
- FOGLIANO, V.; VERDE, V.; RANDAZZO, G.; RITIENE, A.. Method for Measuring Antioxidant Activity and Its Applications to Monitoring the Antioxidant Capacity of Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 47, p. 1035-1040, 1999.
- FOLIN, O. and CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins, **Journal of Biological Chemistry**, n. 73(2), p. 627-650, 1927.
- FOLIN, O. and DENIS, W. A colorimetric method for the determination of phenols (and phenols derivatives) in urine, **Journal of Biological Chemistry**, n. 22(2), p. 305-308, 1915.
- FOTI, M. C.; DAQUINO, C.; GERACI, C.. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with DPPH radical in alcoholic solutions. **Journal of Organical Chemistry**, n. 69, p. 2309-2314, 2004.
- GARCIA, A.; BROSÉUS, R.; VICENT, S.; BARBEAU, B.; PRÉVOST, M.; SAUVÉ, S.. Oxidation kinetics of cyclophosphamide and methotretaxe by ozone in drink water. **Chemosphere**, n. 79, p. 1056-1063, 2010.

- GARCIA, J.B.; SARAIVA, M.L.M.F.S. and LIMA, J.L.F.C. Determination and antioxidant activity evaluation of etodolac, an anti-inflammatory drug, by sequential injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 573–574, p. 371–375, 2006.
- GUBELI, T.; CHRISTIAN, G. D.; RUZICKA, J. Fundamentals of sinusoidal flow sequential injection spectrophotometry, **Analytical Chemistry**, n. 63, p. 2407-2413, 1991.
- HALLIWELL, B.; MURCIA, M.A.; CHIRICO, S.; ARUOMA, O.I Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, n. 35, p. 7-20, 1995.
- HORWITZ W (ed.), **Official methods of analysis of AOAC International**, 17 th, AOAC International, 2002.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R, L.. The Chemistry Behind the Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, n. 53, p. 1841-1856, 2005.
- INFANTE, C.M.C.; SOARES, V.R.B; KORN, M. and ROCHA, F.R.P. An improved flow-based procedure for microdetermination of total tannins in beverages with minimized reagent consumption, **Microchim Acta**, n. 161, p. 279–283, 2008.
- IKAWA, M.; SCHAPER, T.D.; DOLLARD, C. A.; SASNER, J. J.. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 51, p. 1811-1815, 2003.
- IVASKA, A.; RUZICKA, J.. From flow injection to sequential injection: comparison of methodologies and selection of liquid drives. **ANALYST**. jul, v. 118, 1993.
- IVEKOVIC, D.; MILARDOVIC, S.; ROBOZ, M. and GRABARIC, B.S. Evaluation of the antioxidant activity by flow injection analysis method with electrochemically generated ABTS radical cation. **Analytst**, n. 130, p. 708–714, 2005
- KHAN, I. U. et. al. Evaluation of Antioxidant Activity Using an Improved DMPD Radical Cation Decolorization Assay. **Acta Chimica Slovenica**, n. 54, p. 295–300, 2007.
- KINGSTON, H. M.; KINGSTON, M. L.. Nomenclature in laboratory robotics and automation (IUPAC recommendations 1994). **Pure and Applied Chemistry**, Vol. 66, n. 3, 609-630, 1994.
- LACHMAN, J.; SULE, M.; SCHILLA, M.. Comparison of the total antioxidant status of Bohemian wines during the wine making process. **Food Chemistry**, n. 103, p. 802-807, 2007.
- LAPA, R.A.S.; LIMA, J.L.F.C.; REIS, B.F.; SANTOS, J.L.M. and ZAGATTO, E.A.G. Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities, **Analytica Chimica Acta**, n. 466, p. 125–132, 2002.
- LIMA, M. J. R. TÓTH, I.V. and RANGEL, A.O.S.S., A new approach for the sequential injection spectrophotometric determination of the total antioxidant activity. **Talanta**, n. 68, p. 207-213, 2005.
- LIU, R. H.; FELICE, D. L.. Antioxidans and whole food phytochemical for cancer prevention. In: SHAHIDI, F. (editor); HO, C.(editor). **Antioxidant measurement and applications**. USA: American Chemical Society, 2007.
- LUCAS, M. S.; PERES, J. A.; LAN, B. Y.; LI PUMA, G.. Ozonization kinetics os winery wastewater in a pilot-scale bubble column reactor. **Water Research**. 43, 1523-1532, 2009.
- MAGALHÃES, L.M.; SEGUNDO, M.A.; REIS, S. and LIMA, J.L.F.C Automatic method for determination of total antioxidant capacity using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay. **Analytica Chimica Acta**, n. 558, p. 310–318, 2006a.

MAGALHÃES, L.M.; SEGUNDO, M.A.; REIS, S.; LIMA, J.L.F.C.; TÓTH, I.V. and RANGEL, A.O.S.S. Automatic method for the determination of Folin-Ciocalteu reducing capacity in food products, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 54, p. 5241-5246, 2006b.

MAGALHÃES, L.M.; SEGUNDO, M.A.; REIS, S.; LIMA, J.L.F.C.; ESTELA, J.M. and CERDÁ, V. Automatic in vitro determination of hypochlorous acid scavenging capacity exploiting multisyringe flow injection analysis and chemiluminescence, **Analytical Chemistry**, n. 79, p. 3933-3939, 2007a.

MAGALHÃES, L. M. *et al.* Automatic flow system for sequential determination of ABTS+ scavenging capacity and Folin-Ciocalteu index: a comparative study in food products. **Analytica Chimica Acta**, n. 592, p. 193-201, 2007b.

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

MAGALHÃES, L.M.; LÚCIO, M.; SEGUNDO, M.A.; REIS, S. and LIMA, J.L.F.C. Automatic flow injection based methodologies for determination of scavenging capacity against biologically relevant reactive species of oxygen and nitrogen. **Talanta**, n. 78, p. 1219-1226, 2009a.

MAGALHÃES, L.M.; SANTOS, M.; SEGUNDO, M.A.; REIS, S. and LIMA, J.L.F.C. Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity. **Talanta**, n. 77, p. 1559-1566, 2009b.

MASINI, J. C. Demonstrando os fundamentos, potencialidades e limitações da análise por injeção sequencial. **Química Nova**. V. 31, n. 3, p. 704-708, 2008.

MARSHALL, G.; *et al.* Zone fluidics in flow analysis: potentialities and application. **Analytica Chimica Acta**, n.499, p. 29-40, 2003.

MENESES, S. R. P. *et al.* Evaluation of the total antioxidant capacity by using multipumping flow system with chemiluminescent detection. **Analytical Biochemistry**, n. 345, p. 90-95, 2005.

MILARDOVIC, S.; KERECOVIC, I.; RUMENJAK, V.. A flow injection bioamperometric method for determination of total antioxidant capacity of alcoholic beverages using bienzimatically produced ABTS<sup>•+</sup>. **Food Chemistry**, n. 105, p. 1688-1694, 2007.

MIGUÉZ, M. G.; MANZANO, S. G.; BAILÓN, M. T. E.; HEREDIA, F. J.; BUELGA, C. S.. Influence of different phenolic copigments on the color of mavidin 3-glucoside. **J. Agricultural and Food Chemistry**, n. 54, p. 5422 – 5429, 2006.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A.. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, n. 4, 407-412, 1993.

MINIOTI, K. S.; GEORGIU, C. A. High throughput flow injection bioluminometric method for olive oil antioxidant capacity. **Food Chemistry**, n. 109, p. 455–461, 2008.

MUNOZ, J. C.; *et al.* Quantification of the antioxidant capacity of different molecules and their kinetic antioxidant efficiencies. **J. Agric. Food Chem.** n. 58, p. 2062-2070, 2010.

MIYAMOTO, A. *et al.* Sequential injection analysis with chemiluminescence detection for the antioxidant activity against singlet oxygen. **Analytical Sciences**, jan, vol. 22, 2006.

- MIYAMOTO, A. *et al.*. Quase-simultaneous determination and antioxidative activities against superoxide anion of nitric oxide by a combination of sequential injection analysis with chemiluminescence detection. ***Analytical and Bioanalytical Chemistry***, n. 388, p. 1809-1814, 2007.
- NALEWAJKO-SIELIWONIUK, E.; TARASEWICZ, I.; KOJLO, A.. Flow injection chemiluminescence determination of the total phenolics levels in plants-derived beverages using soluble manganese (IV). ***Analytica Chimica Acta***, n. 668, p. 19-25, 2010.
- NIE, Y.; CHEN, J.; YAN, Y.; LV, J.. Flow-sonochemiluminescence method for antioxidant capacity assay. ***Food Chemistry***, n. 122, p. 360-365, 2010.
- OLIVEIRA, A. C. *et al.* Fontes Vegetais Naturais de Antioxidantes. ***Química Nova***. v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.
- PAIXÃO, N.; PERESTRELO, R.; MARQUES, J. C.; CÂMARA, J. S.. Relationship between antioxidant capacity and total phenolics content of red, rosé and white wines. ***Food Chemistry***, n.105, p. 204-214, 2007.
- PASAMONTES, A.; CALLAO, M. P.. Sequential injection analysis linked to multivariate curve resolution with alternating least squares. ***Trends in Analytical Chemistry***. v. 25 n. 1, 2006.
- PASQUINI, C.. Why its called monosegmented flow analysis. ***Journal Brazilian Chemical Society***. v. 10, n. 6, p. 527-529, 1999.
- PASQUINI, C.; OLIVEIRA, W. A. de. Monosegmented system for continuous flow analysis. Spectrophotometric determination of chromium(VI), ammonia e phosphorus. ***Analytical Chemistry***, v. 57, n. 13, 1985.
- PELLEGRINI, N. *et al.*. Application of 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation assay to a flow injection system for the evaluation of antioxidant activity os some pure compounds na beverages. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, n. 51, p. 260-264, 2003.
- PINTO, P. C. A. G. *et. al.*. Automatic sequential determination of the hydrogen peroxide scavenging activity and evaluation of the antioxidant potential by the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation assay in wines by sequential injection analysis. ***Analytica Chimica Acta***, n. 531, p. 25-32, 2005.
- PRIOR, J. A. V.. ***Sistemas automáticos em fluxo contínuo para o control de formulações farmacêuticas***. Dissertação (Doutorado) – Universidade do Porto, Portugal, 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***, n. 53, p. 4290-4302, 2005.
- PRIOR, R. L.; WU, X.. Hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity in foods: measurement and *in vivo* implications. In: SHAHIDI, F. (editor); HO, C.(editor). ***Atioxidant measurement and applications***. USA: American Chemical Society, 2007.
- PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F.. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, n. 48, p. 3396-3402, 2000.
- REIS, B. F. *et al.*. Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plants digest. ***Analytica Chimica Acta***, n. 293, p. 129-138, 1994.
- RIBEIRO, M.F.T.; DIAS, A.C.B.; SANTOS, J.L.M.; FERNANDES, E.; LIMA, J.L.F.C. and ZAGATTO, E.A.G. A Multipumping flow system for in vitro screening of

- peroxynitrite scavengers, *Journal of Biomolecular Screening*, n. 12(6), p. 875-880, 2007.
- RIVERO-PEREZ, M.D.; PEREZ-MAGARINO, S. and GONZALEZ-SAN JOSÉ, M.L.; Role of melanoidins in sweet wines, *Analytica Chimica Acta*, n. 458, p. 169–175, 2002.
- RUZICKA, J.; HANSEN, E. H.. Flow injection analyses: part I a new concept o fast continuous flow analysis. *Analytica Chimica Acta*, n. 78, p. 145 – 157, 1975.
- SANTOS, J. C. C.. *Avaliação da interação de íons metálicos com biocompostos e o desenvolvimento de procedimentos de análise em fluxo para determinação de compostos de interesse biológico em alimentos*. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2008.
- SANTOS, E. B. G. N.. *Estudo da aplicação de soluções ozonizadas de ácido nítrico para o preparo de amostras em recipientes fechado auxiliado por microondas*. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual da Bahia, Bahia, 2009
- SCHOONEN, J.W. and SALES, M.G.F. Determination of polyphenols in wines by reaction with 4-aminoantipyrine and photometric flow-injection analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, n. 372, p. 822–828, 2002.
- SHARMA, O. P.; BHAT, T. K.. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, n. 113, p. 1201-1205, 2009.
- SHPIGUN, L.K.; ARHAROVA, M.A., BRAININA, K.Z. and IVANOVA, A.V. Flow injection potentiometric determination of total antioxidant activity of plant extracts. *Analytica Chimica Acta*, v. 573–574, p. 419–426, 2006.
- SHAHIDI, D.; HO, C.. Antioxidant measurement and implications: na overview. In: \_\_\_\_\_. *Atioxidant measurement and applications*. USA: American Chemical Society, 2007.
- SHAHIDI, F.; ZHONG, Y.. Measurement of antioxidant activity in food and biological systems. In: SHAHIDI, F. (editor); HO, C.(editor). *Atioxidant measurement and applications*. USA: American Chemical Society, 2007.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A.. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdc-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, n. 16, p. 144-158, 1965.
- TANG, B.; ZHANG, L. and GENG, Y. Determination of the antioxidant capacity of different food natural products with a new developed flow injection spectrofluorimetry detecting hydroxyl radicals. *Talanta*, n. 65, p. 769–775, 2005.
- THONGCHAI, W.; LIAWRUANGRSTH, B.; LIAWRUANGRSTH, S.. Flow injection analysis of curcuminoids in tumeric and total antioxidante capacity usind 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay. *Food Chemistry*, n. 112, p. 494-499, 2009.
- UKEDA, H.; ADACHI, Y. and SAWAMURA, M. Flow injection analysis of DPPH radical based on electron spin resonance. *Talanta*, n. 58, p. 1279-1283, 2002.
- VOLIKAKIS, G. J.; EFSTATHIOU, C. E.. Fast screening of total flavonols in wines, tea-infusions and tomato juice by flow injection/adsortive stripping voltametry. *Analytica Chimica Acta*, n. 551, p. 124-131, 2005.