



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA - UFU

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química – Doutorado

GRACY KELLY FARIA OLIVEIRA

**ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA COM DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA
DA ASTAXANTINA E DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM ALIMENTOS**

UBERLÂNDIA – MG

2017

GRACY KELLY FARIA OLIVEIRA

**ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA COM DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA
DA ASTAXANTINA E DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM ALIMENTOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito à obtenção do título de Doutor em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Linha de Pesquisa: Eletroanalítica

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo A. A. Muñoz

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo M. Richter

Uberlândia - MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

O48a
2017

Oliveira, Gracy Kelly Faria, 1988-
Análise por injeção em batelada com detecção amperométrica da
astaxantina e da capacidade antioxidante em alimentos / Gracy Kelly
Faria Oliveira. - 2017.
86 f. : il.

Orientador: Rodrigo Alejandro Albarza Muñoz.

Coorientador: Eduardo Mathias Richter.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Química.

Inclui bibliografia.

1. Química - Teses. 2. Radicais livres (Química) - Teses. 3.
Antioxidantes - Teses. 4. Chá - Teses. I. Albarza Muñoz, Rodrigo
Alejandro. II. Richter, Eduardo Mathias. III. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.



**Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química,
do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM QUÍMICA, NÚMERO 64/PPQUI.**

DATA: 17/03/2017

DISCENTE: Gracy Kelly Faria Oliveira

MATRÍCULA: 11323QMI011

TÍTULO DO TRABALHO: Análise por injeção em batelada com detecção amperométrica para a determinação de antioxidantes e capacidade antioxidante em alimentos.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

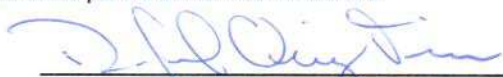
LINHA DE PESQUISA: Eletroquímica Aplicada


PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Desenvolvimento de sensores eletroquímicos e métodos analíticos nas áreas de energia e meio ambiente.

Às oito horas do dia dezessete de março do ano dois mil e dezessete, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, Bloco 5I, Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Rafael de Queiroz Ferreira, da Universidade Federal do Espírito Santo, Wallans Torres Pio dos Santos, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Alex Domingues Batista e Sidnei Gonçalves Silva, da Universidade Federal de Uberlândia e Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz, orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Regulamentar nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(a) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e aprovou o(a) candidata(o). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será

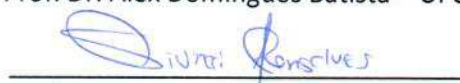
Análise por Injeção em batelada com detecção
amperométrica de astaxantina e da capacidade
antioxidante em alimentos


Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 12 horas e 10 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.


Prof. Dr. Rafael de Queiroz Ferreira – UFES


Prof. Dr. Alex Domingues Batista – UFU


Prof. Dr. Wallans Torres Pio dos Santos –
UFVJM


Prof. Dr. Sidnei Gonçalves Silva – UFU


Professor(a) Orientador(a): Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz – IQUFU

DEDICATÓRIA

Ao meu amado esposo Venicio pelo amor incondicional em todos os momentos e pelas palavras de incentivo.

Aos meus pais José Vanderley e Grazia que me ensinaram dignamente os princípios da honestidade e do bom caráter. Qualidades imprescindíveis a um bom profissional.

Ao meu filho João Lucas que chegou no meu último ano de doutoramento e me trouxe a serenidade, a coragem e a força de que precisava para finalizar mais essa etapa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar mais esta oportunidade de aprendizado.

Ao meu querido e amado esposo por todo amor, incentivo, compreensão e carinho. Por estar presente desde a graduação e por ter me fortalecido sempre que precisei.

Aos meus amados pais por me educarem e me ensinarem a importância da família. Pelo acolhimento, principalmente, neste último ano.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo A. A. Muñoz, a quem muito devo agradecer pela confiança, pelas oportunidades oferecidas, principalmente em relação ao Núcleo de Pesquisas em Eletroanalítica (NUPE). Pela orientação nesta pesquisa, pelos conhecimentos transmitidos que vão além do nível profissional.

Ao co-orientador, Prof. Dr. Eduardo Richter, por acrescentar sempre que possível seus conhecimentos aos meus trabalhos e também por me ensinar a ser uma pessoa melhor, por meio de seu exemplo.

Aos meus irmãos, Wanderley e Wendell, por me apoiarem, incentivarem e sempre torcerem pelo meu sucesso.

Ao Instituto de Química e ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia.

Aos amigos do NUPE, sem exceção, por contribuírem com minha formação profissional. Em especial, a Thiago Tormin, pela paciência e pelos ensinamentos sobre eletroanalítica. E a minha querida amiga Jéssica pelo apoio e atenção.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

À Secretária da Pós-Graduação, Mayta Peixoto.

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota no
mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

Madre Tereza de Calcutá

Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa
ignorância.

John F. Kennedy

A persistência é o menor caminho do êxito.

Charles Chaplin

RESUMO

Nesta tese, apresenta-se o desenvolvimento de métodos eletroquímicos que empregam a análise por injeção em batelada (BIA) com detecção amperométrica para determinação da capacidade antioxidante de amostras de chá e extratos vegetais e determinação de astaxantina em salmão. O primeiro método foi desenvolvido para determinar a capacidade antioxidante de amostras de chá e extratos de plantas com base na medida do consumo de radicais DPPH, uma vez que este radical é eletroativo. Com este método, mediu-se a concentração eficaz ou o valor CE_{50} que corresponde à concentração necessária de amostra ou padrão capaz de consumir 50% de radicais DPPH. Para a determinação exata do CE_{50} , as amostras foram incubadas com radical DPPH durante 1 h, pois muitos compostos polifenólicos tipicamente encontrados nas plantas e responsáveis pela atividade antioxidante exibem cinética lenta. O sistema BIA com detecção amperométrica utilizando um eletrodo de carbono vítreo apresentou alta precisão (DPR = 0,7%, $n = 12$), baixo limite de detecção ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) e seletividade do radical DPPH (livre de interferências de antioxidantes). Estes resultados contribuíram para baixos limites de detecção para os antioxidantes ácido gálico e butil-hidroxitolueno ($0,015$ e $0,19 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente). O segundo método desenvolvido baseou-se na oxidação eletroquímica do antioxidante astaxantina em eletrodo de carbono vítreo para sua determinação amperométrica em amostras de salmão. O método consistiu na injeção de $80 \mu\text{L}$ de extrato da amostra diretamente no eletrodo de carbono vítreo imerso em solução composta por acetona, diclorometano e água (80:10:10 v/v) contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HClO}_4$. Este método apresentou vantagens que incluem alta precisão (DPR de 2,4%), frequência analítica de 240 h^{-1} e baixo limite de detecção ($0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$, que corresponde a $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$) para a análise de amostras de salmão extraídas com acetona. Valores de recuperação entre 83 e 97% foram obtidos. Além disso, ambos métodos propostos são promissores pois trazem a possibilidade do uso de sistemas portáteis uma vez que a instrumentação usada (micropipeta eletrônica e potenciostato) está disponível comercialmente.

Palavra-chave: Astaxantina. BIA. Chá. DPPH. Plantas. Salmão.

ABSTRACT

In this thesis, we present the development of electrochemical methods using batch injection analysis (BIA) with amperometric detection to determine the antioxidant capacity of tea samples and plant extracts and determination of astaxanthin in salmon. The first method was developed to determine the antioxidant capacity of tea samples and plant extracts based on the extent of the consumption of DPPH radicals, since this radical is electroactive. In this method the effective concentration or EC_{50} value corresponding to the required concentration of sample or standard capable of consuming 50% of DPPH radicals was measured. For the exact determination of the EC_{50} , the samples were incubated with DPPH radical for 1 h, since many polyphenolic compounds typically found in plants and responsible for the antioxidant activity exhibit slow kinetics. The BIA system with amperometric detection using a vitreous carbon electrode showed high precision ($RSD = 0.7\%$, $n = 12$), low detection limit ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) and DPPH radical selectivity (free of antioxidant interferences). These results contributed to low detection limits for the antioxidants gallic acid and butylhydroxytoluene (0.015 and $0.19 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively). The second method developed was based on the electrochemical oxidation of the antioxidant astaxanthin on a glassy carbon electrode for its amperometric determination in salmon samples. The method consisted of the injection of $80 \mu\text{L}$ of sample extract directly into the vitreous carbon electrode immersed in a solution composed of acetone, dichloromethane and water ($80:10:10 \text{ v/v}$) containing $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HClO}_4$. This method presented advantages that include high accuracy (RSD of 2.4%), analytical frequency of 240 h^{-1} and low detection limit ($0.3 \mu\text{mol L}^{-1}$, corresponding to $0.1 \mu\text{g g}^{-1}$) for The analysis of salmon samples extracted with acetone. Recovery values between 83 and 97% were obtained. In addition, both proposed methods are promising because they bring the possibility of using portable systems since the instrumentation used (electronic micropipette and potentiostat) is commercially available.

Key words: Astaxanthin. BIA. Tea. DPPH. Plants. Salmon.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – Propostas possíveis de mecanismos entre compostos fenólicos e radical DPPH	19
FIGURA 2 - Estrutura química do Ácido Gálico.....	22
FIGURA 3 – Estrutura química do BHT.....	23
FIGURA 4 – Estrutura química da Astaxantina	24
FIGURA 5 – Representação esquemática da célula BIA utilizada neste trabalho. Eletrodo de referência: Ag/AgCl/KCl _(sat.) ; contra eletrodo: Pt e eletrodo de trabalho de carbono vítreo	27
FIGURA 6 – Etapas de operação de um sistema BIA e resultado obtido	27
FIGURA 7 - (A) Imagem do sistema BIA, utilizado no trabalho, com a pipeta eletrônica e (B) ampliação da célula BIA	35
FIGURA 8 – Voltamogramas cíclicos de solução de DPPH em eletrodo de carbono vítreo obtidos para uma solução de DPPH 0,1 mmol L ⁻¹ em eletrólito de tampão acetato e tampão fosfato, contendo 60% (v/v) de etanol	46
FIGURA 9 – Voltamograma hidrodinâmico obtido a partir de injeções para uma solução contendo 87 µmol L ⁻¹ de DPPH [•] (n=3) no sistema BIA com detecção amperométrica. Condições: 0,2 mol L ⁻¹ de tampão de acetato (pH 5,5) em etanol (40:60, v/v) como eletrólito; a velocidade de injeção de 153 µL s ⁻¹ e o volume de injeção de 100 µL	47
FIGURA 10 – Voltamogramas cíclicos dos antioxidantes e do radical DPPH em eletrodo de carbono vítreo. Condições: 0,2 mol L ⁻¹ de tampão de acetato (pH 5,5) em etanol (40:60, v/v) como eletrólito; a velocidade de injeção de 153 µL s ⁻¹ e o volume de injeção de 100 µL	48
FIGURA 11 - Estudo do efeito da variação do volume de injeção (20-120 µL) para uma solução contendo 87 µmol L ⁻¹ de DPPH [•] (n=3). Condições: 0,2 mol L ⁻¹ de tampão de acetato (pH 5,5) em etanol (40:60, v/v) como eletrólito, potencial de +0,05 V e velocidade de injeção de 153 µL s ⁻¹	49
FIGURA 12 – Estudo do efeito da velocidade de injeção (28-345 µL s ⁻¹) para uma solução contendo 87 µmol L ⁻¹ de DPPH [•] (n=3). Condições: 0,2 mol L ⁻¹ de tampão acetato (pH 5,5) em etanol (40:60, v/v) como eletrólito, potencial de trabalho de +0,05 V e volume de injeção de 80 µL	50
FIGURA 13 – Dados de repetibilidade obtidos para injeções sucessivas de solução contendo 87 µmol L ⁻¹ de DPPH [•] (n = 12). Condições: 0,2 mol L ⁻¹ de tampão acetato (pH 5,5) em etanol (40:60, v/v) como eletrólito, potencial de trabalho de +0,05 V, volume injetado de 80 µL e velocidade de injeção de 153 µL s ⁻¹	51
FIGURA 14 - (A) Respostas amperométricas obtidas após injeções em triplicata no sistema BIA-AMP de soluções de DPPH [•] de concentrações: (a) 1, (b) 5, (c) 10, (d) 20,	

(e) 40, (f) 60, (g) 100, (h) 250, (i) 500 e (j) 750 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com zoom em (a-f: 1 – 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$). (B) Curva de calibração de injeções de soluções de DPPH (●, $R = 0,998$). As condições experimentais foram como descrito na Fig. 13.....53

FIGURA 15 – (A) Respostas amperométricas obtidas após injeções em triplicata no sistema BIA de soluções de DPPH[•] (a-f : 10,0 - 100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). (B) Curvas de calibração de injeções em concentrações crescentes (▲, $R = 0,999$) e decrescentes (●, $R = 0,997$) de DPPH. As condições experimentais foram como descrito na Fig. 1354

FIGURA 16 – Curvas do estudo cinético da reação entre o DPPH[•] e diferentes amostras com monitoramento da reação durante 60 minutos. (A) Método Espectrofotométrico e (B) Sistema BIA-AMP. As condições experimentais para o sistema BIA-AMP foram como descrito na Fig. 1355

FIGURA 17 – Respostas amperométricas obtidas após injeções em triplicata no sistema BIA de soluções contendo (a) DPPH 87 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (b – h) mistura de DPPH 87 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com amostra de chá (b: 4, c: 7, d: 10, e: 13, f: 16, g: 19 e h: 22 $\mu\text{g mL}^{-1}$). As condições experimentais foram como descrito, na Fig. 13.....57

FIGURA 18 – Os valores de CE_{50} para amostras (Moringa, Eugenia e chás) obtidas pelo método eletroquímico proposto BIA e pelo método espectrofotométrico58

FIGURA 19 – Voltamogramas cíclicos em eletrodo de carbono vítreo obtidos para solução de astaxantina 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em eletrólito contendo tampão Br na faixa de pH 4,8 a 10 e em eletrólito otimizado.....63

FIGURA 20 – Os voltamogramas cíclicos em eletrodo de carbono vítreo obtidos para o branco (a) e para a solução de astaxantina 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (b). Eletrólito: mistura contendo acetona, diclorometano e ácido perclórico 0,1 mol L^{-1} (80:10:10, v/v); velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} 64

FIGURA 21 – Voltamograma hidrodinâmico obtido a partir de injeções em triplicata de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de astaxantina no sistema de BIA com detecção amperométrica. Eletrólito: mistura contendo acetona, diclorometano e ácido perclórico 0,1 mol L^{-1} (80:10:10, v/v); velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; velocidade de injeção de 153 $\mu\text{L s}^{-1}$ e volume de injeção de 100 μL 65

FIGURA 22 – Estudo do efeito da variação do volume de injeção (20 - 200 μL) para uma solução contendo 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Astaxantina ($n=3$). Eletrólito: mistura contendo acetona, diclorometano e ácido perclórico 0,1 mol L^{-1} (80:10:10, v/v), potencial de trabalho: +0,8 V e velocidade de injeção: 153 $\mu\text{L s}^{-1}$ 66

FIGURA 23 – Estudo do efeito da velocidade de injeção (28-345 $\mu\text{L s}^{-1}$) para uma solução contendo 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Astaxantina ($n=3$). Eletrólito: mistura contendo acetona, diclorometano e ácido perclórico 0,1 mol L^{-1} (80:10:10, v/v), potencial de trabalho: +0,8 V e volume de injeção: 80 μL 67

FIGURA 24 – Dados de repetibilidade obtidos para injeções sucessivas de solução contendo 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Astaxantina ($n = 12$) Eletrólito: mistura contendo acetona, diclorometano e ácido perclórico 0,1 mol L^{-1} (80:10:10, v/v), potencial de trabalho: +0,8 V, volume injetado: 80 μL e velocidade de injeção: 193 $\mu\text{L s}^{-1}$68

FIGURA 25 – (A) Respostas amperométricas obtidas após injeções em triplicata no sistema BIA-AMP para soluções de astaxantina (a - f : 1,0-50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e de amostras puras (g e i) e dopadas (h e j : 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) com solução de astacantina. (B) Curvas de calibração de injeções crescentes (●, $R = 0,992$) e decrescentes (▲, $R = 0,996$) de solução de Astaxantina. As condições experimentais foram como descrito na legenda da Fig. 2469

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - Trabalhos recentes do uso do sistema BIA com detecção amperométrica.....	30
TABELA 2 - Lista de reagentes usados e sua respectiva procedência	36
TABELA 3 – Faixa de concentrações para padrões e amostras (valores mínimos e máximos).....	39
TABELA 4 – Características de desempenho do método eletroquímico proposto BIA usando AG e BHT como antioxidantes	56
TABELA 5 – Comparação do método BIA com detecção amperométrica com métodos alternativos para a determinação da capacidade antioxidante	59
TABELA 6 - Valores de recuperação para amostras enriquecidas e concentrações de astaxantina encontrados em amostras de salmão comerciais pelo método proposto (n=3).....	70

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α	– Coeficiente angular da curva analítica ou sensibilidade da calibração
AG	– Ácido Gálico
ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ArO \cdot	– Radical fenoxila
ArO $^-$	– Radical fenóxido
BIA	– do inglês, <i>Batch Injection Analysis</i> (Análise por Injeção em Batelada)
BHA	– Butil-hidroxianisol
BHT	– Butil-hidroxitolueno
BR	– Britton-Robson (solução tampão)
CE ₅₀	– Concentração do composto que induz metade do efeito máximo
CLAE	– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DPPH	– 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DPR	– Desvio Padrão Relativo
FIA	– do inglês, <i>Flow Injection Analysis</i> (Análise por Injeção em Fluxo)
LD	– Limite de Detecção
LQ	– Limite de Quantificação
PG	– Propil galato
TBHQ	– <i>tert</i> -butilhidroquinona

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Importância na Análise de Antioxidantes em Alimentos	15
1.2 Definição e Classificação de Antioxidante.....	16
1.3 Capacidade Antioxidante e Técnicas de Determinação da Capacidade Antioxidante em Amostras Variadas	18
1.3.1 Técnicas Eletroquímicas para Determinação da Capacidade Antioxidante ..	20
1.4 Espécies Químicas Analisadas	21
1.4.1 Ácido Fenólico Ácido Gálico (AG) e Butil-hidroxitolueno (BHT)	21
1.4.2 Carotenoide Xantofila Astaxantina	23
1.4.2.1 <i>Técnicas analíticas utilizadas para monitoramento de carotenoides</i>	25
1.5 Análise por Injeção em Batelada (BIA)	26
2 OBJETIVOS.....	32
2.1 Objetivos Gerais.....	32
2.2 Objetivos Específicos	32
3 PARTE EXPERIMENTAL	34
3.1 INSTRUMENTAÇÃO	34
3.2 Soluções, Reagentes e Preparo de Amostras	36
3.2.1 Soluções e Preparo de Amostras para Avaliação da Capacidade Antioxidante	37
3.2.1.1 <i>Análise Eletroquímica</i>	38
3.2.2 Soluções e Preparo de Amostras para Determinação de Astaxantina em Salmão.....	40
3.2.2.1 <i>Análise eletroquímica</i>	40
3.3 Análise Comparativa por Espectrofotometria para Avaliação do Consumo do Radical DPPH	41
3.3.1 Análise Espectrofotométrica	41
3.4 Análise Comparativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para Determinação de Astaxantina.....	42
3.5 Parâmetros Analíticos Utilizados nos Métodos Propostos	42
3.5.1 Limite de Detecção	42

	14
3.5.2 Limite de Quantificação.....	43
3.5.3 Repetibilidade	43
3.5.4 Adição e Recuperação.....	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	45
4.1 Considerações Gerais	45
4.2 Parte 1: Determinação da Capacidade Antioxidante a partir do Consumo de DPPH'	45
4.2.1 Seleção do Potencial de Detecção por Amperometria	46
4.2.2 Velocidade e Volume de injeção	49
4.2.3 Repetibilidade	51
4.2.4 Linearidade e Curva Analítica	52
4.2.5 Estudo de Cinética	54
4.2.6 Aplicação do Sistema BIA e Comparação entre o Método Proposto BIA e Método Espectrofotométrico	55
4.2.7 Conclusões Parciais – Determinação Indireta da Capacidade Antioxidante a partir do Consumo de DPPH'	61
4.3 PARTE 2: DETERMINAÇÃO DE ASTAXANTINA EM AMOSTRAS DE SALMÃO COMERCIAL	62
4.3.1 Estudo do Comportamento Eletroquímico da Astaxantina por Voltametria Cíclica	62
4.3.2 Seleção do Potencial de Detecção por Amperometria	64
4.3.3 Velocidade e Volume de injeção	65
4.3.4 Repetibilidade	67
4.3.5 Linearidade	68
4.3.6 Aplicação do Sistema BIA.....	70
4.3.7 Conclusões Parciais - Determinação de Astaxantina em Amostras de Salmão Comercial	71
CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO	86

1 INTRODUÇÃO

1.1 Importância na Análise de Antioxidantes em Alimentos

A oxidação em organismos vivos compreende um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as atividades essenciais das células, produzindo radicais (ROESLER et al., 2007). Todos os sistemas biológicos, exceto os microrganismos anaeróbicos, produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) como resultado do seu metabolismo energético (FRIDOVICH, 1999). Essas espécies reativas interferem em alguns sistemas bioquímicos das células (ZHENG; STORZ, 2000). A discrepância entre a produção de agentes oxidantes e a sua degradação dos é chamada de estresse oxidativo (SIES, 1991).

O estresse oxidativo tem sido um dos processos mais estudados por vários anos, uma vez que está envolvido no surgimento de muitas doenças como: a aterosclerose, a doença de Parkinson, doença de Alzheimer (LITESCU et al., 2011), patologias relacionadas ao processo de envelhecimento (LITESCU et al., 2011; REIS et al., 2009), artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (BARREIROS; DAVID, 2006). Este estresse quando a produção de moléculas prejudiciais, chamadas de radicais livres, está além da capacidade protetora das defesas antioxidantes.

Os radicais livres são átomos ou moléculas altamente reativos, que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (HALLIWELL, 2000). Sua alta reatividade confere-se ao não emparelhamento de elétrons da última camada. Exemplos de radicais livres são o ânion superóxido, o radical hidroxila, os metais de transição como o ferro e o cobre, o ácido nítrico e o ozônio (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (BARREIROS; DAVID, 2006).

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena endógena (por ex., enzima superóxido dismutase), ou serem provenientes da dieta alimentar (SOUSA et al., 2007).

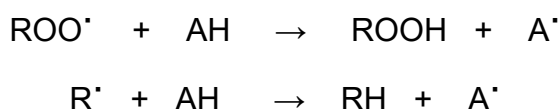
Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células (SOUSA et al., 2007; ATOUI et al., 2005; BARREIROS; DAVID, 2006).

Estudos clínicos e epidemiológicos têm demonstrado que uma dieta rica em frutas e vegetais (AMIDI et al., 2012), chás, legumes e grãos (REIS et al., 2009) está associada a uma diminuição do risco de doenças cardiovasculares, cânceres, redução na incidência de doenças crônicas e outras doenças relacionadas. Estes efeitos benéficos à saúde têm sido atribuídos, em parte, à presença de antioxidantes na dieta alimentar (AMIDI et al., 2012). Destaca-se a presença de tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenoides. Dessa forma, torna-se evidente a importância da análise de antioxidantes presentes em alimentos.

1.2 Definição e Classificação de Antioxidante

Segundo Halliwell (2000), antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a sua oxidação. Os antioxidantes minimizam o número de danos oxidativos ao DNA, proteínas e lipídeos atuando como sequestradores de espécies reativas de oxigênio nocivas (DIPLOCK et al., 1998). Além disso, por retardarem a oxidação, podem ser utilizados como conservantes, para inibir ou reduzir a oxidação lipídica de alimentos, ração animal e outros produtos, como cosméticos (RAMALHO; JORGE, 2006).

Bailey e Hui (2005) classificaram os antioxidantes em primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos. Os primários são compostos fenólicos que promovem a remoção ou inativação do radical livre formado, por meio da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (SIMIC; JAVANOVIC, 1994). Frankel (1980) apresentou o mecanismo de ação de oxidantes primários, exposto, a seguir:



onde:

ROO[•] e R[•] – radicais livres;

AH – antioxidante com um átomo de hidrogênio;

A[•] – radical inerte

Os polifenóis, como butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG), que são compostos sintéticos, e tocoferóis, que são naturais, são os principais e mais conhecidos antioxidantes deste grupo (NAMIKI, 1990). Os tocoferóis também podem ser classificados como antioxidantes biológicos (NAMIKI, 1990; BAILEY, 1996).

Os antioxidantes classificados como sinergistas são substâncias com pouca ou nenhuma atividade antioxidante, que podem aumentar a atividade dos antioxidantes primários quando usados em combinação adequada com eles (BAILEY, 1996).

Os classificados como removedores de oxigênio são compostos que atuam capturando o oxigênio presente no meio, por intermédio de reações químicas estáveis tornando-se, conseqüentemente, indisponíveis para atuarem como propagadores da autoxidação. Podem ser citados como melhores exemplos, o ácido ascórbico, seus isômeros e seus derivados (BAILEY, 1996; BELITZ, 1988).

As substâncias que podem remover oxigênio ou compostos altamente reativos de um sistema alimentício, tais como as várias enzimas (glucose oxidase, superóxido dismutase e catalases), são classificadas como os antioxidantes biológicos (BAILEY, 1996).

Os antioxidantes classificados como agentes quelantes/sequestrantes complexam íons metálicos, principalmente cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica, sendo também responsável pelo aumento da capacidade antioxidante (complexação de flavonoides com Fe^{2+} (PORFÍRIO et al., 2014). Um par de elétrons não compartilhado na sua estrutura molecular promove a ação de complexação. Os mais comuns são ácido cítrico e seus sais, fosfatos e sais de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (LABUZA, 1971; BAILEY, 1996).

De acordo com Bailey (1996), os antioxidantes mistos incluem compostos de plantas e animais que têm sido amplamente estudados como antioxidantes em alimentos. Entre eles estão várias proteínas hidrolisadas, flavonóides e derivados de ácido cinâmico (ácido cafeico).

1.3 Capacidade Antioxidante e Técnicas de Determinação da Capacidade Antioxidante em Amostras Variadas

A capacidade antioxidante é medida entre uma solução antioxidante, que pode ser composta por uma mistura de compostos antioxidantes, e os radicais livres. Essa medida determina a capacidade que os antioxidantes têm em inibir os radicais livres. A atividade antioxidante desses compostos é devida às suas propriedades redutoras e à sua estrutura química, que desempenham um importante papel na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição. Esses compostos agem tanto na etapa de iniciação quanto na propagação do processo oxidativo (SOARES, 2002; SOUSA et al., 2007).

É de grande interesse para o público em geral, médicos, nutricionistas e pesquisadores em saúde e ciência conhecerem a capacidade antioxidante e os constituintes dos alimentos consumidos. Devido à complexidade da composição dos alimentos, separar cada composto antioxidante e estudá-lo individualmente é dispendioso e ineficiente. Por isso é mais conveniente determinar a capacidade antioxidante total.

Além disso, podem ocorrer interações sinérgicas entre os compostos antioxidantes em mistura de alimentos, o que dificultaria ainda mais as análises. Portanto, é muito atraente para os pesquisadores o fato de existir um método para quantificação de antioxidantes com intuito de determinar a capacidade antioxidante dos alimentos e posterior uso destes na prevenção de doenças (HUANG; BOXIN; PRIOR, 2005).

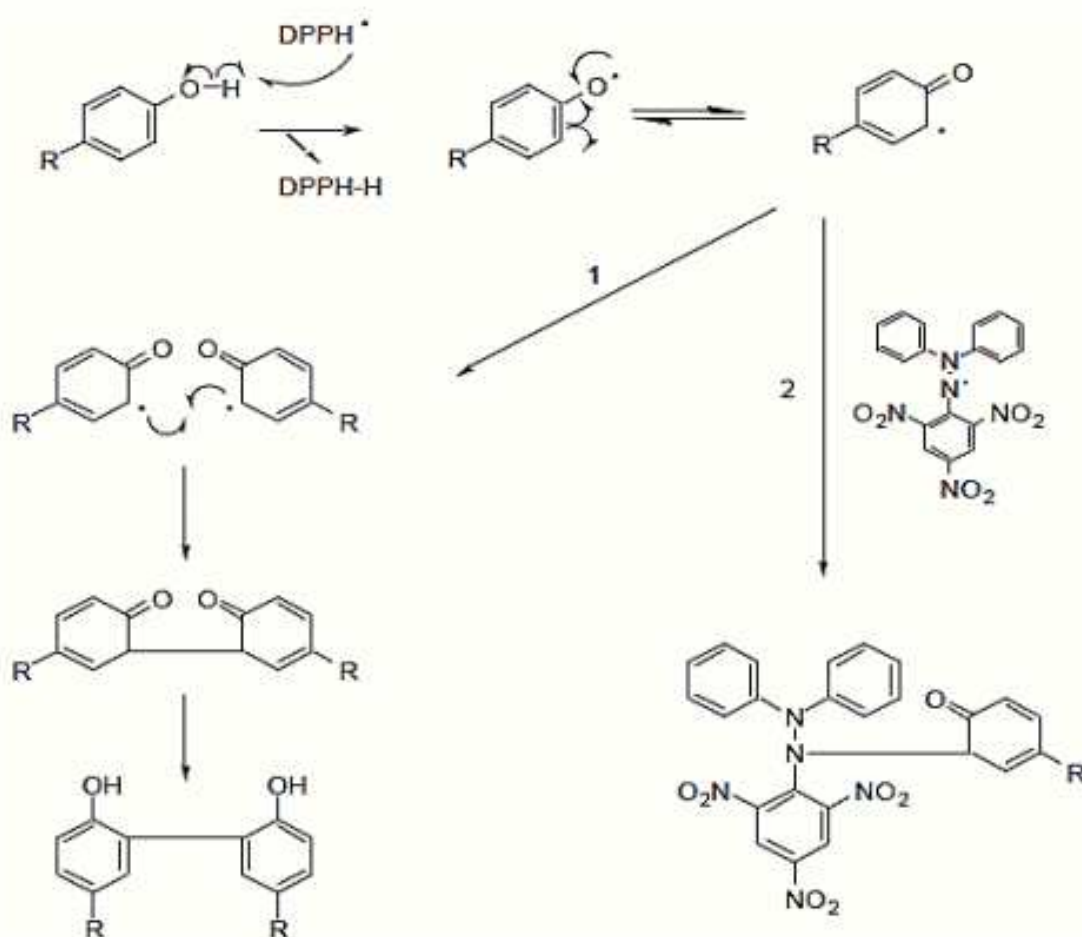
Como consequência, os antioxidantes têm recebido atenção considerável, existindo diversos estudos relacionados ao potencial antioxidante (LITESCU et al., 2011). Neste contexto, métodos como o 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfonato) (ABTS⁺), peróxido superóxido (O₂), poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), capacidade antioxidante de redução do cério (CRAC), voltametria cíclica, o método da oxidação pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico e principalmente o método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) vêm sendo usados para a determinação da atividade antioxidante.

O método de sequestro de radical DPPH é um dos métodos mais utilizados para analisar a capacidade antioxidante em várias amostras. Neste método o radical DPPH livre reage com o antioxidante presente nas amostras, o qual converte

para a forma reduzida. A avaliação quantitativa da atividade antioxidante consiste no monitoramento pelo espectrofotômetro (517-518 nm) do decréscimo da absorbância da solução de DPPH que inicialmente é violeta e torna-se amarela à medida que a amostra sequestra os radicais livres. (LIU, 2010; MACDONALD-WICKS; WOOD; GARG, 2006; ANTOLOVICH et al., 2002; GULCIN, 2012; ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013; MAGALHÃES et al., 2008; HUANG; BOXIN; PRIOR, 2005). Quanto menor for a coloração violeta, maior a atividade antioxidante, ou seja, menor a concentração de DPPH residual após certo tempo.

A reação entre os compostos fenólicos e o radical DPPH pode ocorrer pelo seguinte mecanismo de reação, ilustrado na Figura 1.

FIGURA 1 – Propostas possíveis de mecanismos entre compostos fenólicos e radical DPPH



Fonte: Brand-Williams et al. (1995).

Na Figura 1, observa-se que as hidroxilas fenólicas por reação radicalar doam elétrons através do hidrogênio para os radicais DPPH, que são por sua vez estabilizados. Com a reação, radicais fenolatos e fenoxil são formados, entretanto,

são espécies bastante estabilizadas por efeitos de ressonância. As estruturas radicalares podem reagir entre si e até mesmo com os radicais (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

Medidas eletroquímicas podem permitir a obtenção de parâmetros físico-químicos do processo oxidativo de polifenóis, por exemplo: potencial, número de elétrons, taxa de transferência de elétrons, constante redox, etc. Estes parâmetros parecem possuir grandes potencialidades não só para a avaliação das capacidades antioxidantes de polifenóis, mas também para a compreensão de seus mecanismos de reação. Entre estes parâmetros, o potencial redox, ou seja, o poder redutor de um antioxidante pode ser um fator-chave que rege a sua atividade antioxidante (HOTTA et al., 2002).

Neste contexto, as técnicas eletroquímicas têm sido, muitas vezes consideradas superiores ao ensaio espectrofotométrico, graças a maior sensibilidade, insensibilidade à turvação da amostra e portabilidade inerente (BURATTI et al., 2008).

1.3.1 Técnicas Eletroquímicas para Determinação da Capacidade Antioxidante

Ahmed e colaboradores (2012) estudaram o comportamento eletroquímico do radical DPPH por voltametria cíclica. Os resultados demonstraram que envolve a transferência de um elétron, em um processo eletroquimicamente reversível e controlado por difusão.

Em 2012, Amatongchai e colaboradores realizou o estudo voltamétrico do radical DPPH utilizando eletrodo de trabalho carbono vítreo não modificado e eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono, sendo que o eletrodo modificado apresentou maior sinal analítico. Esses autores propuseram o uso de análise de injeção em fluxo (FIA) com detecção amperométrica para avaliar o consumo de DPPH[•] na determinação da capacidade antioxidante de compostos presentes em plantas. Neste sistema, a solução de DPPH[•] é transportada em um fluxo contínuo para o eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono e que se junta à amostra segundos antes de chegar ao detector (AMATONGCHAI et al., 2012).

Em um outro trabalho, Andrei et al. (2014) propuseram o uso do sistema FIA com detecção amperométrica em eletrodo de ouro para avaliar a capacidade

antioxidante de diferentes vinhos, também com base no consumo de DPPH[•]. Porém, nesse caso as amostras foram primeiramente pré-incubadas com solução de DPPH[•] e então injetadas em fluxo contínuo de uma solução tampão (ANDREI et al., 2014).

Ahmed et al. (2012), Alvarez-diduk et al.(2008), Litescu e radu (2000) realizaram um estudo em que a utilização de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial foi proposta para avaliar a capacidade antioxidante de amostras e diferentes padrões antioxidantes em função da medida do consumo do radical DPPH.

Buratti e colaboradores (2008) relataram que durante a análise das matrizes alimentares complexas com ensaios eletroquímicos, uma desvantagem comum é o produto da oxidação de alguns compostos que podem-se depositar ou se adsorver sobre o eletrodo de trabalho, reduzindo a magnitude do sinal analítico. No entanto, estes processos adsorptivos podem ser evitados pela aplicação de um potencial de limpeza que permite a renovação da superfície do eletrodo.

Neste sentido, o desenvolvimento de métodos analíticos que promovem menor contaminação do eletrodo e análises que apresentem características como simplicidade, rapidez, eficiência, seletividade, baixo custo e baixo consumo de reagentes torna-se de extremo interesse, por parte de laboratórios de controle de qualidade. Métodos analíticos empregando detectores amperométricos acoplados a sistemas de análise por injeção em batelada (BIA) apresentam tais características (QUINTINO; ANGNES, 2004; CUNHA et al., 2013).

Além disso, em relação ao fenômeno de contaminação da superfície do eletrodo de trabalho devido a processos adsorptivos do analito ou produto de oxidação/redução, o sistema BIA também apresenta vantagens, no que se refere aos sistemas estacionários em razão do menor tempo de contato da solução injetada na interface eletrodo/solução durante a análise (QUINTINO; ANGNES, 2004).

1.4 Espécies Químicas Analisadas

1.4.1 Ácido Fenólico Ácido Gálico (AG) e Butil-hidroxitolueno (BHT)

Os polifenóis compreendem o maior grupo dentre os compostos bioativos presentes nos vegetais, sendo subdivididos em classes, de acordo com a estrutura química de cada substância (ARTS; HOLLMAN, 2005).

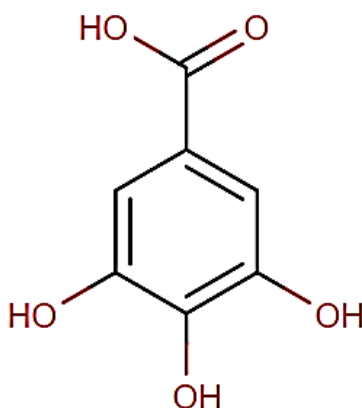
Os compostos fenólicos de plantas se enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzoico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (NACZK; SHAHIDI, 2004). Nos últimos anos, os compostos fenólicos têm despertado muita atenção, dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, por inibirem a peroxidação lipídica (degradação oxidativa dos lipídeos) e a lipooxigenase *in vitro* (HASLAM, 1996; SOARES, 2002).

De acordo com Scalbert, Johnson e Saltmarsh (2005), as ações fisiológicas exercidas pelos polifenóis já foram relacionadas à prevenção de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer, entre outras, principalmente em função da elevada capacidade antioxidante.

O ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) é um polifenol encontrado em chás, uvas, vinho tinto, castanha entre outros produtos naturais (TRIKHA et al., 2003). Possui comprovada atividade anti-inflamatória, além de atividade antimutagênica, anticancerígena e antioxidante (SOONG et al., 2006).

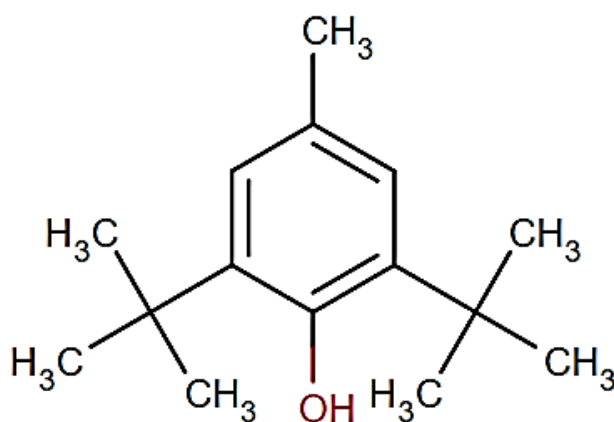
A Figura, a seguir, representa a estrutura química desse composto fenólico.

FIGURA 2 - Estrutura química do Ácido Gálico



Dentre os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos destaca-se o butil-hidroxitolueno (BHT), cuja estrutura química é apresentada na figura seguinte.

FIGURA 3 – Estrutura química do BHT



A estrutura fenólica deste composto, quando utilizado como aditivo em óleos e gorduras, permite a doação de um próton a um radical livre, regenerando, assim, a molécula do acilglicerol e interrompendo o mecanismo de oxidação por radicais livres. Dessa maneira, os derivados fenólicos se transformam em radicais livres. Entretanto, estes radicais podem se estabilizar sem promover ou propagar reações de oxidação (BUCK, 1981). No Brasil, o uso deste antioxidante é controlado pelo Ministério da Saúde que limita a 100 mg/g de BHT como concentração máxima permitida (ANVISA¹, 2003) em alimentos como aditivos. Este uso é controlado, pelo fato de haver estudos toxicológicos que têm demonstrado a possibilidade deste antioxidante e de outros antioxidantes sintéticos apresentarem efeito carcinogênico (BOTTERWECK et al., 2000), tornando-se atrativa a busca por compostos antioxidantes de origem natural, tais como os encontrados em extratos de plantas.

1.4.2 Carotenoide Xantofila Astaxantina

Os carotenoides contidos em alguns alimentos possuem propriedades antioxidantes que podem prevenir danos à saúde (PRIOR; CAO, 2000) incluindo o câncer, causados por estresse oxidativo radicalar (MOSKOVITZ; YIM; CHOCK, 2002). Eles protegem os lipídios dos danos peroxidativos inativando o oxigênio singlete, sem sofrer degradação, por meio da reação com os radicais peroxila, hidroxila e

¹ Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Recentemente, tem despertado interesse em razão de suas propriedades antioxidantes. Estudos clínicos comprovam inúmeros benefícios da astaxantina na saúde cardiovascular, fertilidade, diabetes (FOCSAN; PAN; KISPERT, 2014), efeitos antitumorais (JYONOUCHI et al., 2000), atividade imunomoduladora (BENDICH, 1991), dentre outros. Este antioxidante pode ser encontrado em vários micro-organismos (-CIAPARA, et al., 2006), nas algas *Haematococcus pluvialis*, por ser a principal fonte de astaxantina (FOCSAN; PAN; KISPERT, 2014; SARADA; TRIPATHI; RAVISHANKAR, 2002; SARADA et al., 2012), e em salmão e camarão, por estes se alimentarem das algas, acarretando assim um acúmulo do antioxidante no tecido muscular (-CIAPARA, et al., 2006; AMBATI et al., 2014).

1.4.2.1 Técnicas analíticas utilizadas para monitoramento de carotenoides

Abdolmajid e Choul-gyun (2006) desenvolveram um método espectrofotométrico para a medição simultânea da concentração de clorofila e de astaxantina em algas *Haematococcus pluvialis* foi desenvolvido (ABDOLMAJID; CHOUL-GYUN, 2006). Análise dos carotenoides por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica já foi relatada na literatura (GUARATINI et al., 2009), bem como análise por cromatografia líquida com espectrometria de massa e ionização por *eletrospray* para a identificação e quantificação de carotenoides (FRASSANITO et al., 2008).

Os métodos eletroquímicos podem ser um importante instrumento para monitorizar a astaxantina, uma vez que são simples, sensíveis, utilizam de equipamento portátil e proporcionam uma resposta rápida, podendo ser usado em um elevado número de amostras. A eletroquímica do carotenoide astaxantina foi investigada em eletrodo de platina, e o mecanismo proposto envolve uma oxidação com transferência de dois elétrons e a formação de um radical neutro (FOCSAN; PAN; KISPERT, 2014; HAN et al., 2006). Na literatura, não há relatos sobre métodos eletroquímicos aplicados para a determinação de astaxantina com base na sua eletroatividade.

Não obstante, os resultados encontrados na análise de carotenoides em amostras biológicas podem apresentar uma problemática com relação à comparação dos resultados em diferentes estudos, por fatores como: problemas na determinação exata destes compostos, devido ao seu caráter antioxidante, isto é, capacidade de

formar radical estável; instabilidade térmica, uma vez que podem sofrer alterações nas suas estruturas químicas, em decorrência da alteração na temperatura; fotossensibilidade, visto que sofrem alterações químicas na presença de luz; isomerização, ou seja, alteração em sua isomeria, devido a diversos fatores como temperatura e/ou pH (VALDIVIELSO et al., 2014); e baixa solubilidade aquosa da astaxantina (KIM et al., 2010). Esses fatores que podem alterar sua estrutura química dificultam a comparação entre resultados na análise de carotenoides.

1.5 Análise por Injeção em Batelada (BIA)

Análise por injeção em batelada (BIA) é uma técnica analítica, proposta por Wang e Taha (1991). A associação desse sistema à detecção amperométrica é uma ferramenta poderosa para a análise de alimentos, amostras ambientais e farmacêuticas (QUINTINO; ANGNES, 2004). Neste sistema BIA, pequenas alíquotas de uma amostra ou padrão são injetadas diretamente na superfície do eletrodo de trabalho, imerso em um grande volume de eletrólito suporte e inerte, com o auxílio de uma micropipeta.

Inicialmente, os volumes de solução inerte, dentro da célula, utilizados nesta técnica variavam entre 250 a 700 mL. No entanto, estudos têm demonstrado que podem ser realizados experimentos BIA com células de menores volumes, por exemplo, 40 mL, em que o volume de eletrólito suporte é suficiente para proporcionar a diluição do analito ou padrão, após obtido o sinal analítico, mantendo as mesmas características atraentes das células de grandes volumes, tais como precisão, simplicidade e alta frequência de análise. Além disso, proporcionam o desenvolvimento de sistemas portáteis miniaturizados e evitam o desperdício de reagentes (WANG; CHEN, 1994; QUINTINO, 2003).

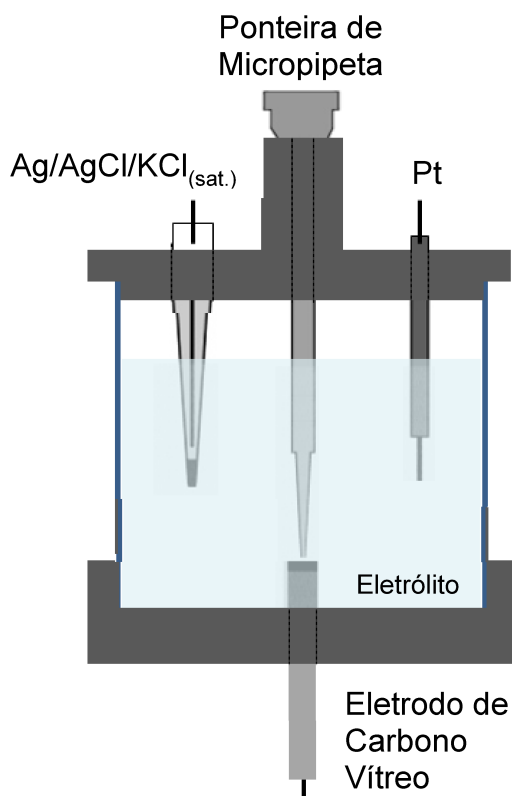
Em 2003, Quintino e colaboradores realizaram um trabalho, no qual foi utilizada uma célula BIA com capacidade de 40 mL de eletrólito suporte, sendo todas as determinações realizadas sem agitação, obtendo bons resultados de repetibilidade e baixos valores de desvio padrão.

A utilização de uma micropipeta eletrônica na etapa de injeção, aumenta a precisão da análise, em comparação com o uso de seringas ou micropipetas convencionais, pois as condições - volume e velocidade de injeção - são programadas

eletronicamente. Deste modo, as injeções, no sistema BIA, podem ser realizadas de forma bastante reprodutível (QUINTINO; ANGNES, 2004).

Na sequência, a Figura 5 apresenta um diagrama esquemático de uma célula BIA, utilizada nesta pesquisa. O eletrodo de trabalho e a ponteira da micropipeta ficam posicionados em sentidos opostos, ou seja, na configuração “*wall-jet*”, de modo que todas as injeções sejam feitas com a mesma distância entre a ponteira e a superfície do eletrodo de trabalho (QUINTINO; ANGNES, 2004).

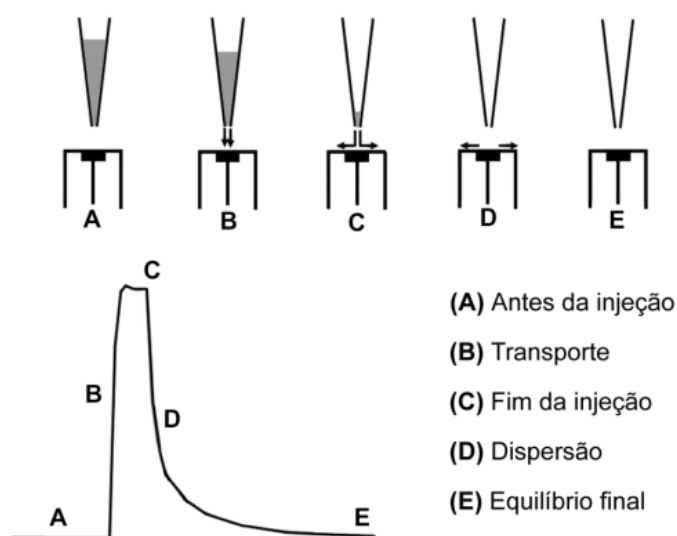
FIGURA 5 – Representação esquemática da célula BIA utilizada neste trabalho. Eletrodo de referência: $\text{Ag/AgCl/KCl}_{(\text{sat.})}$; contra eletrodo: Pt e eletrodo de trabalho de carbono vítreo



Fonte: Adaptado de Silva et al. (2012)

A passagem da espécie em análise sobre a superfície do sensor resulta em picos de oxidação ou redução. A Figura 6, a seguir, ilustra as etapas de operação de um sistema BIA e o resultado obtido para análise de uma espécie que sofre processo de oxidação.

FIGURA 6 – Etapas de operação de um sistema BIA e resultado obtido



Fonte: Quintino e Angnes (2004)

Como se pode observar, na Figura 6, antes da injeção da solução contendo a espécie eletroativa (etapa A), nota-se uma corrente constante, atribuída ao eletrólito suporte (corrente capacitiva), mostrando que não há transferência na interface eletrodo/solução. Após a solução padrão ou amostra ser inicialmente injetada (etapa B), há um rápido aumento da corrente, devido ao processo redox do analito de interesse que está sendo transportado, eletronicamente pela micropipeta, até a superfície do sensor. Finalizando a injeção (etapa C), pode-se observar que a corrente atinge um valor máximo. Logo após (etapa D), nota-se uma queda acentuada do sinal analítico, em decorrência da mudança do transporte mecânico (micropipeta) para o transporte de massa por difusão. Nesta etapa, o analito começa a ser diluído pelo eletrólito suporte (processo de difusão) até que se restabeleçam as condições iniciais do equilíbrio existente antes da injeção (etapa E) (QUINTINO; ANGNES, 2004).

Esta técnica possui características atraentes e similares àquelas apresentadas pelo sistema Análise por Injeção em Fluxo (FIA), como: alta velocidade de análise, simplicidade, boa repetibilidade, sensibilidade e possibilidade de trabalhar com baixos volumes de amostras e reagentes (QUINTINO; ANGNES, 2004).

Comparando com o sistema FIA, a técnica BIA elimina o uso de injetores e bombas normalmente utilizadas em sistemas FIA e traz a possibilidade de um sistema portátil, uma vez que micropipetas eletrônicas substituem os componentes do sistema FIA. O sistema FIA é bastante versátil, permitindo etapas de tratamento de

amostra e derivatização de analito em linha, o que não se consegue no sistema BIA. Além disso, este sistema é facilmente acoplado a detectores espectrofotométricos e eletroquímicos e pode ser automatizado usando bombas solenoides para injeção de analito, eletrólito e amostra, controlados por software, o que faz este sistema bastante utilizado pela comunidade científica.

Por outro lado, nos últimos cinco anos houve um grande aumento no uso do sistema BIA. Uma série de artigos mostra o uso de BIA com detecção amperométrica para análises individuais e simultâneas em amostras farmacêuticas, alimentos e antioxidantes em combustíveis (Tabela 1). No entanto, na literatura, não há relatos na literatura do uso do sistema BIA com detecção amperométrica para a determinação da capacidade antioxidante a partir do consumo de DPPH' em amostras de extratos de plantas e chás e ainda para a determinação de astaxantina em salmão comercial. Observa-se, na Tabela 1, que as aplicações foram predominantes em amostras farmacêuticas, com poucas aplicações a amostras de alimentos.

TABELA 1 - Trabalhos recentes do uso do sistema BIA com detecção amperométrica

(Continua)

ELETRODO	ANALITO	AMOSTRA	REFERÊNCIA
Eletrodo modificado com azul da Prússia	H ₂ O ₂	Leite	SILVA et al., 2012
Carbono Vítreo	BHA,TBHQ	Biodiesel	TORMIN et al., 2012
Eletrodo de ouro	Etanol	Gasolina	PEREIRA et al., 2012
Carbono Vítreo	Naproxeno	Amostras farmacêuticas	STEFANO et al.,2012
Diamante dopado com Boro	Nimesulina, Paracetamol	Amostras farmacêuticas	PEREIRA et al., 2013
Diamante dopado com Boro	Hidroquinona	Cosméticos	CUNHA et al., 2013
Diamante dopado com Boro	Codeína, Diclofenaco	Amostras farmacêuticas	GIMENES et al., 2013
Impressos de carbono e de ouro	Diclofenaco, H ₂ O ₂ e Metais (Cu, Pb e Hg)	Não aplicado	TORMIN et al., 2014
Diamante dopado com Boro	Ciprofloxacina	Amostras farmacêuticas e leite	MONTES et al., 2014 ^a
Diamante dopado com Boro	Propranolol, Hidroclorotiazida	Amostras farmacêuticas	GIMENES et al., 2014
Filme de Mercúrio	Metais	Bioetanol	TORMIN et al., 2014
Diamante dopado com Boro	Dimoxistrobina	Águas Naturais	DORNELLAS et al., 2014
Diamante dopado com Boro	Mancozeb	Inseticidas	SILVA et al., 2014
Modificado com metais nanoestruturados	Isoniazida	Amostras farmacêuticas	MARTINS et al., 2014
Diamante dopado com Boro	Prometazina, Codeína	Amostras farmacêuticas	PEREIRA et al., 2014
Diamante dopado com Boro	Dimenidrinato	Amostras farmacêuticas	MACHADO et al., 2014
Modificado com Nanotubos de carbono	Naproxeno	Amostras farmacêuticas	MONTES et al., 2014b
Diamante dopado com boro	Sulfametoxazol, Trimetoprima	Amostras farmacêuticas	PEREIRA et al., 2015
Diamante dopado com Boro	Hidroclorotiazida Captopril	Amostras farmacêuticas	GIMENES et al., 2015
Impresso de carbono	Carbendazima, Catechol e Hidroquinona	Água de torneira	CARAMIT et al., 2015
Ouro	Zinco	Bioetanol	TORMIN et al., 2015a

ELETRODO	ANALITO	AMOSTRA	REFERÊNCIA
Eletrodo modificado	Ácido fólico	Amostras farmacêuticas	FERREIRA et al., 2015
Carbono vítreo sem e com modificação	Catecol, Hidroquinona, TBHQ e Dopamina	Não aplicado	CARDOSO et al., 2015
Diamante dopado com boro	Picoxistrobina	Águas Naturais	DORNELAS et al., 2015
Impresso de ouro	Metais (Cu, Pb e Hg)	Biodiesel	TORMIN et al., 2015b
Modificados e não modificados com nanotubos de carbono	Fipronil	Medicamento veterinário	MONTES et al., 2015
Impresso de ouro	Chumbo	Combustível de aviação	ALMEIDA et al., 2015
Impresso de carbono modificado com azul da Prússia	Glicose	Soro artificial	DIAS et al., 2016
Modificado com Nanotubos de carbono de paredes múltiplas com nanopartículas de ZnO	Dopamina, Hidroquinona e TBHQ	Não aplicado	FREIRE et al., 2016
Diamante dopado com boro	Nafazolina, Zinco	Amostras farmacêuticas	da COSTA et al., 2016
Grafite modificado	Ácido α -lipóico	Urina sintética e Suplementos dietéticos	dos SANTOS et al., 2016
Modificado com por Irídio de Valência Mista e Óxidos de Rutênio	Cafeína	Comprimidos	SHAI DAROVA et al., 2016
Diamante dopado com boro	Amlopídina, Atenolol	Amostras farmacêuticas	SILVA et al., 2016
Diamante dopado com boro	Sulfametoxazol, Fenazopiridina e Trimetoprim	Amostras farmacêuticas	PEREIRA et al., 2016
Impresso modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas	Ciprofloxacina	Amostras farmacêuticas	STEFANO et al., 2016
Diamante dopado com boro	Cocaína	Amostras de drogas apreendidas	FREITAS et al., 2016
Impresso de carbono	2,6-di-terc-butilfenol	Combustível de aviação Biodiesel	ALMEIDA et al., 2016
Modificados com nanotubos de carbono	4-cloroanilina	Solução antiséptica de clorexidina	MONTES et al., 2016

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho apresenta os seguintes objetivos gerais:

- Desenvolver métodos eletroanalíticos simples e de baixo custo, empregando análise por injeção em batelada (BIA) associada à detecção amperométrica;
- Determinar a capacidade antioxidante, a partir do consumo de radical DPPH em amostras de extratos vegetais e chás e quantificar o antioxidante astaxantina em salmão;
- Utilizar eletrodo de carbono vítreo sem modificação química/eletroquímica da superfície como eletrodo de trabalho e preparo de amostras que envolvem apenas extração e/ou diluição.

2.2 Objetivos Específicos

Para o cumprimento dos objetivos gerais, têm-se como objetivos específicos:

- Avaliar o perfil voltamétrico do radical DPPH e do antioxidante astaxantina frente ao eletrodo de carbono vítreo para posterior escolha do potencial de trabalho;
- Otimizar as condições de detecção para ambos os métodos propostos, como a velocidade e volume de injeção e repetibilidade do método;
- Escolher o eletrólito ideal que será utilizado nas medidas eletroquímicas de cada um dos métodos propostos;

- avaliar a faixa de trabalho para o radical DPPH e para o antioxidante astaxantina;
- Aplicar o método proposto para a determinação da capacidade antioxidante em amostras nativas como extratos vegetais e chás;
- Comparar os resultados obtidos pelo método proposto com base no consumo de DPPH (usando sistema BIA) com método espectrofotométrico padrão;
- Aplicar o método proposto para determinação de astaxantina em amostra de salmão comercial;
- Realizar teste de adição e recuperação em amostras de salmão.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Instrumentação

As medidas eletroquímicas foram realizadas, utilizando um μ -Autolab Tipo III (Eco Chemie, Utrecht, Holanda), controlado por software GPE S4.9.007 (General Purpose Sistema Eletroquímico). As injeções de soluções padrão ou amostras foram conduzidas, utilizando uma micropipeta eletrônica (Eppendorf® Multipette stream) que permite injeções de 10 a 1000 μ L, usando um combitip® (ponteira) de 1 mL, com velocidades de injeção programável de 28 a 350 μ L s⁻¹, aproximadamente.

Um eletrodo de carbono vítreo comercial (Metrohm®) de 3 mm de diâmetro foi utilizado como eletrodo de trabalho. Para a limpeza da superfície desse eletrodo, usou-se polimento manual sobre uma almofada de feltro contendo alumina (0,3 μ m), com posterior lavagem com água desionizada. Antes do uso, nos estudos propostos, a superfície de resposta do eletrodo foi avaliada, por meio de voltamogramas cíclicos sucessivos em meio de eletrólito em estudo até obtenção de estabilidade.

Em todos os experimentos, utilizou-se um mini eletrodo de referência - Ag/AgCl/KCl_(sat.) (PEDROTTI; AGNES; GUTZ, 1996), construído em laboratório pela eletrodeposição de AgCl sobre um fio de Ag, por meio da aplicação de +0,3 V em meio a uma solução de HCl 0,10 mol L⁻¹, durante 1 hora; e, como eletrodo auxiliar, foi utilizado um fio de platina.

As investigações iniciais dos processos eletroquímicos do radical DPPH[•] e dos antioxidantes (AG, BHT, Astaxantina e outros) foram realizadas por voltametria cíclica, em uma célula convencional de vidro (béquer de 10 mL). Realizou-se todos os experimentos sem a remoção do O₂ dissolvido e à temperatura ambiente.

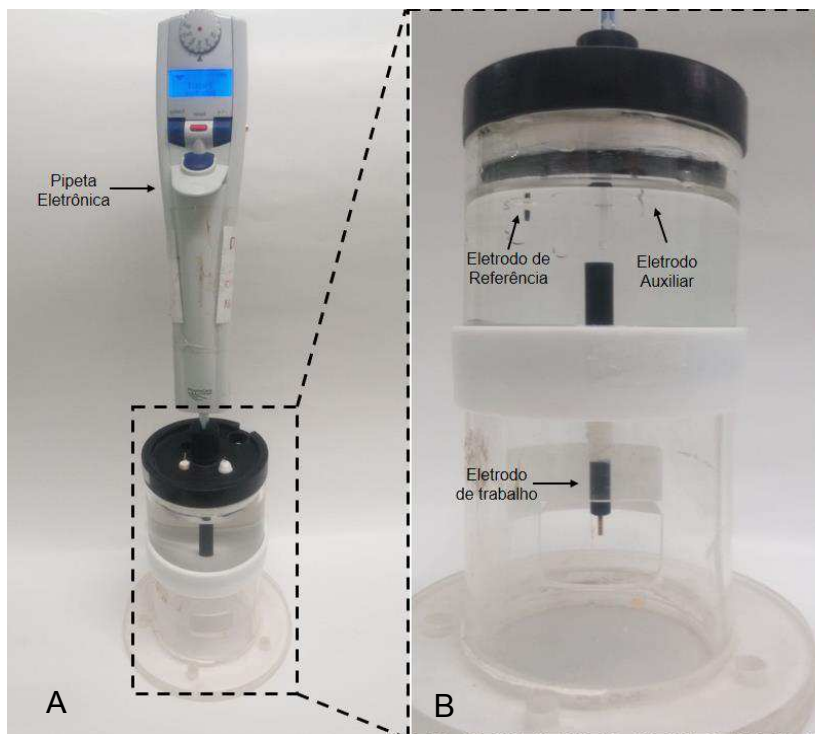
Nos estudos para as medições amperométricas com o sistema BIA, utilizou-se uma célula eletroquímica, construída no próprio laboratório e anteriormente descrita na literatura (SILVA et al., 2012). A célula BIA foi construída, a partir de um cilindro de vidro com volume total de aproximadamente 200 mL, diâmetro interno de sete centímetros e duas tampas de polietileno, que foram firmemente fixadas na extremidade superior e inferior do cilindro. A tampa superior continha três orifícios: dois para o posicionamento dos eletrodos (referência e auxiliar) e um orifício central

para o posicionamento da ponteira da micropipeta que foi firmemente introduzida no orifício, no centro da tampa, de tal maneira que o procedimento de injeção foi altamente reprodutível.

A tampa inferior continha um único furo (localizado com precisão no centro da tampa), no qual foi inserido o eletrodo de trabalho de carbono vítreo comercial (posicionado de maneira oposta à ponteira da micropipeta). Uma fita de teflon foi usada para fixar o eletrodo no orifício de forma a evitar vazamentos de eletrólito. A célula eletroquímica foi construída de forma que, durante a injeção, a ponteira da micropipeta ficasse posicionada acerca de 2 mm (configuração *wall-jet*) do eletrodo de carbono vítreo, conforme recomendado anteriormente (BRETT et al., 1994).

A figura seguinte apresenta um diagrama esquemático da célula BIA, utilizada nos métodos propostos.

FIGURA 7 - (A) Imagem do sistema BIA, utilizado no trabalho, com a pipeta eletrônica e (B) ampliação da célula BIA



3.2 Soluções, Reagentes e Preparo de Amostras

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (resistividade superior a 18 MΩ cm) a 25 °C obtida de sistema de purificação Direct-Q (Millipore). Todos os reagentes utilizados apresentavam pureza analítica. Na Tabela 2 constam os reagentes usados neste estudo com sua respectiva procedência.

TABELA 2 - Lista de reagentes usados e sua respectiva procedência

REAGENTE	ORIGEM
Ácido clorogênico	Acros Organics
Folin-Ciocalteu	Cromoline
Acetato de Etila	CAAL
Ácido bórico	QM
2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)	
Astaxantina (3,3'-di-hidroxi-β,β-caroteno-4,4'-diona)	
α-tocoferol	Sigma-Aldrich
Catequina	
Flavanona	
Rutina	
Ácido acético	
Ácido ascórbico	
Acetonitrila	
Butil Hidroxitolueno	Vetec/Carlo Erba
Ácido fosfórico	
Ácido Gálico	
Ácido perclórico	
Etanol	
Metanol	Synth
Hidróxido de Sódio	Synth/Diadema

3.2.1 Soluções e Preparo de Amostras para Avaliação da Capacidade Antioxidante

Para análises eletroquímicas do método BIA proposto para avaliação da capacidade antioxidante a partir do consumo de radicais DPPH, uma solução estoque de $348 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DPPH^{*} foi preparada dissolvendo uma quantidade apropriada do reagente em uma mistura contendo $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão acetato e etanol (20:80, v/v). Para a preparação da solução de DPPH^{*}, um banho ultrassônico (Unique UltraCleaner 1640A) foi utilizado para dissolução de DPPH^{*}, durante cerca de 2 h, na ausência de luz para minimizar a decomposição do analito, como descrito em trabalhos anteriores (AMATATONGCHAI et al., 2012).

Os padrões AG e BHT foram preparados, em diferentes concentrações ($0,08 - 1,6$ e $1,7 - 6,6 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) dissolvendo uma quantidade apropriada do reagente em uma mistura contendo $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão acetato e etanol (40:60, v/v).

As folhas da *Moringa oleífera* e *Eugenia uniflora* foram recolhidas em Uberlândia, Minas Gerais, Brasil ($18^\circ 55' 3.7''\text{S}$, $48^\circ 15' 38.3''\text{W}$ e $19^\circ 09' 20''\text{S}$, $48^\circ 23' 20''\text{W}$). Extratos de folhas da *M. oleífera* e *E. uniflora*, foram preparados e analisados. Primeiramente o material vegetal foi secado a 35°C , até obter 7% de umidade. O procedimento de extração foi realizado por maceração de 15 g de folhas em pó em 200 mL de etanol (98 e 70%) para Moringa e o mesmo volume de acetona 80% e etanol 70% para a Eugenia.

Após a maceração, o material foi submerso em solvente durante 7 dias. Em seguida, o extrato foi filtrado e o solvente foi removido por evaporação no rotaevaporador 40°C . O processo foi repetido três vezes para conseguir completa extração. Os extratos secos foram transferidos para frascos âmbar e armazenados a 4°C até a análise. Os rendimentos dos extratos de Moringa foram de 31,2% para etanol 70% e 11,5% para de etanol 98%. Os rendimentos de extratos de Eugenia foram de 37,1% para etanol 70% e 37,3% para acetona 80%. Análises para a determinação do teor de fenóis totais nos extratos foram realizadas de acordo com o procedimento descrito na literatura (FERNANDES et al., 2015). Uma porção de 2 mL de carbonato de sódio 7,5% (m/v), recentemente preparada, foi adicionada em uma mistura que continha 0,5 mL de extrato de amostra em metanol a $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ (exceto para as amostras de chá em que foram utilizados $130 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 2,5 mL de uma solução aquosa do reagente de Folin-Ciocalteu 10% (v/v). A mistura foi mantida a

50 °C durante 5 min e em seguida a absorvância foi determinada a 760 nm. O mesmo procedimento foi realizado utilizando-se 0,5 mL de metanol para se obter o valor do branco.

O conteúdo fenólico total das amostras foi determinado, por meio do uso de uma análise de regressão gráfica de soluções de padrão ácido gálico em metanol (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$) *versus* absorbância. Os resultados foram expressos em mg de Ácido Gálico Equivalente (AGE) por grama de extrato.

Após obtenção dos extratos, as soluções em diferentes concentrações foram preparadas com a diluição de uma quantidade de massa apropriada em uma mistura contendo 0,2 mol L^{-1} de tampão acetato e etanol (40:60, v/v).

As amostras de chás foram obtidas no comércio local e as soluções foram preparadas com 1,7 g das amostras comerciais (um sachê) em 100 mL de água desionizada a 100 °C, durante ~5 min, em infusão. Um mililitro da solução foi recolhido e secado para calcular a concentração da amostra, sendo que a concentração obtida foi de 2,3 e 1,6 mg mL^{-1} para as amostras de chá 1 e chá 2, respectivamente. O rendimento foi de 13,5% e 9,4% para o chá 1 e chá 2. Posteriormente, os chás foram diluídos em uma mistura de eletrólito contendo 0,2 mol L^{-1} de tampão acetato e etanol (40:60 v/v).

3.2.1.1 *Análise Eletroquímica*

Nas análises eletroquímicas, uma alíquota de 0,5 mL de uma solução contendo 348 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DPPH[•] foi adicionada em um microtubo âmbar (capacidade de 2 mL), em seguida, adicionou-se 1,5 mL de cada amostra ou padrão em diferentes concentrações. As faixas de concentração para os antioxidantes padrões AG e BHT e para as amostras de extrato de plantas e chás estão descritas na tabela, a seguir.

TABELA 3 – Faixa de concentrações para padrões e amostras (valores mínimos e máximos)

PADRÃO / AMOSTRA	FAIXA DE CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Ácido Gálico (AG)	0,08 – 1,6
BHT	1,7 – 6,6
Chá 1	0,9 – 5,2
Chá 2	4,0 – 22,0
<i>Eugenia uniflora</i> (extratos de 70% de etanol e 80% de acetona)	3,0 – 9,1
<i>Moringa oleífera</i> (extrato de 98% de etanol)	11,2 – 131,2
<i>Moringa oleífera</i> (extrato de 70% de etanol)	26,2 – 86,2

Após 1 hora de reação entre o radical DPPH e os antioxidantes padrões e/ou amostras nativas, à temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) e proteção da luz, as soluções contidas nos microtubos foram injetadas no sistema BIA para a determinação amperométrica do restante de DPPH $^{\bullet}$. A capacidade de consumo baseada nas medições amperométricas de DPPH $^{\bullet}$, que corresponde a percentagem de radicais DPPH consumidos, foi determinada pela equação 1, a seguir.

$$DPPH \text{ radical consumido} = \left[1 - \frac{(I_{amostra} - I_{branco})}{I_{controle}} \right] \times 100 \quad (1)$$

onde $I_{amostra}$ é a corrente residual para a reação entre o DPPH $^{\bullet}$ e a amostra (ou padrão), após 1 hora. Em I_{branco} representa a corrente do branco (1,5 mL de eletrólito e 0,5 mL de amostra ou solução do padrão), e $I_{controle}$ é a corrente inicial de DPPH $^{\bullet}$ estabelecido como o controle (1,5 mL de eletrólito e 0,5 mL da solução de DPPH $^{\bullet}$).

O valor de CE₅₀ (concentração eficaz), que denota a concentração da amostra (ou padrão) necessária para eliminar 50% de radicais DPPH, foi calculado por meio da análise do gráfico de regressão linear da capacidade de consumo em relação às concentrações de amostra (ou padrão). O tempo de 1 h de reação, entre

as amostras (ou antioxidante padrões) e o DPPH^{*}, baseou-se na baixa cinética de reação de compostos polifenólicos tipicamente encontrados nas amostras analisadas nest. trabalho, tal como descrito na literatura (SÁNCHEZ-MORENO et al., 1998). Essa cinética da reação entre o DPPH^{*} e as diferentes amostras foi monitorada por injeções no sistema BIA, durante 1 h, com intervalos de 5 min.

Neste método proposto uma mistura contendo 0,2 mol L⁻¹ de tampão acetato e etanol (40:60 v/v) foi usada como eletrólito suporte em todas as medidas eletroquímicas.

3.2.2 Soluções e Preparo de Amostras para Determinação de Astaxantina em Salmão

A solução tampão Britton-Robbinson (BR) foi preparada pela mistura dos ácidos bórico, acético e fosfórico, todos com concentração de 0,04 mol L⁻¹ e usada nos estudos de voltametria. Os diferentes valores de pH foram ajustado com hidróxido de sódio.

Uma solução estoque de 1 mmol L⁻¹ de astaxantina foi preparada diariamente por dissolução da quantidade apropriada em diclorometano.

Amostras de salmão fresco e posteriormente congeladas, foram obtidas de supermercados locais. O procedimento de extração foi realizado com cerca de 2 g de salmão e 50 mL de acetona. Amostras puras e fortificadas foram preparadas, para tanto, primeiramente, o salmão foi macerado com 3 mL de acetona, em seguida, o extrato foi filtrado (funil com papel de filtro) e recolhido em um frasco de 50 mL. O procedimento foi repetido três vezes para conseguir melhor extração e o volume completado com acetona. Para o preparo das amostras fortificadas (3 e 9 mg g⁻¹ de astaxantina) o procedimento de fortificação envolveu a adição de uma alíquota de uma solução padrão de astaxantina diretamente sobre as amostras de salmão, e, em seguida, o procedimento de extração (anteriormente descrito) foi realizado .

3.2.2.1 *Análise eletroquímica*

Para medidas eletroquímicas, uma curva em concentrações crescentes e depois decrescentes foi preparada. Alíquotas de diferentes concentrações do padrão astaxantina foram diluídas em uma mistura de acetona, diclorometano, e água (80:10:10 v / v) contendo 0,1 mol L⁻¹ de HClO₄. As amostras puras e fortificadas

também foram preparadas com a adição de 1 mL de amostra pura ou fortificada com 1 mL de eletrólito de suporte em microtubos âmbar de 2 mL. Neste método proposto, uma mistura de acetona, diclorometano e água (80:10:10 v / v) contendo 0,1 mol L⁻¹ de HClO₄ foi usada como eletrólito suporte em todas as medidas eletroquímicas.

3.3 Análise Comparativa por Espectrofotometria para Avaliação do Consumo do Radical DPPH

Todas as medidas espectrométricas foram realizadas, por meio de um espectrofotômetro HITACHI modelo U-200 com comprimento de onda de 517 nm. Para análise, utilizaram-se cubetas de quartzo de capacidade de 2,0 mL para análise.

3.3.1 Análise Espectrofotométrica

O procedimento para as análises espectrofotométricas foi baseado no método descrito na literatura (SOUZA et al., 2014). Uma alíquota de 0,5 mL de uma solução contendo 348 µmol L⁻¹ de DPPH[•] foi adicionada em uma cubeta de quartzo. Em seguida, adicionou-se 1,5 mL de cada amostra em diferentes concentrações, cujas faixas foram preparadas nas mesmas concentrações para as determinações eletroquímicas do sistema BIA, dissolvidas também em uma mistura de solventes contendo 0,2 mol L⁻¹ de tampão acetato e etanol (40:60 v/v). Após 1 h à temperatura ambiente e protegido da luz, a absorvância foi determinada a 517 nm. A capacidade antioxidante, que corresponde à percentagem de consumo de radicais DPPH, foi determinada pela equação 2, a seguir.

$$DPPH \text{ radical consumido} = \left[1 - \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco})}{Abs_{controle}} \right] \times 100 \quad (2)$$

onde Abs_{amostra} é a absorvância residual da reação entre o DPPH[•] e a amostra (ou padrão), após 1 h, Abs_{branco} representa a absorvância do branco (1,5 mL da mistura

solventes e 0,5 mL de amostra ou solução do padrão) e $Abs_{controle}$ é a absorvância do controle (1,5 mL da mistura de solventes e 0,5 mL da solução de DPPH').

Os valores de CE_{50} obtidos foram calculados por espectrofotometria utilizando-se do mesmo procedimento de análise eletroquímica. A cinética da reação entre o DPPH' e as diferentes amostras foi monitorada por espectrofotometria durante 1 h, com intervalos de 5 min.

3.4 Análise Comparativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para Determinação de Astaxantina

Os resultados obtidos na determinação de astaxantina, por meio do método proposto foram comparados aos obtidos por CLAE. Nestas análises, foi utilizado o equipamento Shimadzu LC-20A equipado com um detector de arranjo de diodos (SPD-M20A), coluna cromatográfica com fase estacionária C_{18} (Phenomenex 110A° Gemini- C_{18} , 250 mm x 4.6 mm, 5 μ m), duas bombas (LC-6AD-VP) e um injetor automático com amostragem de 50 μ L. A fase móvel foi composta por metanol, acetato de etila e acetonitrila, na proporção 80:10:10 (v/v). O comprimento de onda fixado para detecção foi 450 nm e o fluxo da fase móvel empregado foi de 1,0 mL min⁻¹.

3.5 Parâmetros Analíticos Utilizados nos Métodos Propostos

Os procedimentos analíticos são caracterizados por inúmeras características de desempenho, sendo que algumas dessas foram utilizadas no presente trabalho e encontram-se descritas brevemente, a seguir (ANVISA, 2003; INMETRO², 2003; RIBANI et al., 2004; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2001).

3.5.1 Limite de Detecção

A menor concentração da espécie analítica que pode ser detectada (não necessariamente quantificada), sob as condições experimentais estabelecidas é dada

² Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO).

pelo Limite de Detecção (LD). Para os métodos que empregam uma curva analítica, o limite de detecção pode ser expresso em uma equação, como a seguinte:

$$LD = \frac{3 \times DPb}{a} \quad (3)$$

Na qual,

DPb = desvio padrão absoluto do branco;

a = coeficiente angular da curva analítica ou sensibilidade da calibração.

3.5.2 Limite de Quantificação

A menor concentração da espécie analítica que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão (concordância entre os vários resultados obtidos da mesma forma) e exatidão (é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro) é dada pelo limite de quantificação (LQ), que pode ser calculado como:

$$LQ = \frac{10 \times DPb}{a} \quad (4)$$

3.5.3 Repetibilidade

O grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetibilidade (mesmo procedimento de medição, observador, instrumento usado sob mesmas condições, local e repetições em curto espaço de tempo) é dado pela repetibilidade. Esta é verificada contemplando uma faixa de concentração dentro do intervalo linear do método e pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo de uma série de medidas. O desvio padrão relativo é calculado da seguinte forma:

$$DPR (\%) = \frac{DPx}{\bar{x}} \times 100 \quad (5)$$

onde:

DPx = Desvio padrão absoluto da concentração encontrada;

\bar{x} = concentração média encontrada.

3.5.4 Adição e Recuperação

A proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada (“*spiked*”) na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada é dada pela recuperação (ou fator de recuperação). E é calculada como:

$$Recuperação (\%) = \left(\frac{C1 - C2}{C3} \right) \times 100 \quad (6)$$

Onde:

$C1$ = concentração do analito na amostra fortificada,

$C2$ = concentração do analito na amostra não fortificada,

$C3$ = concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

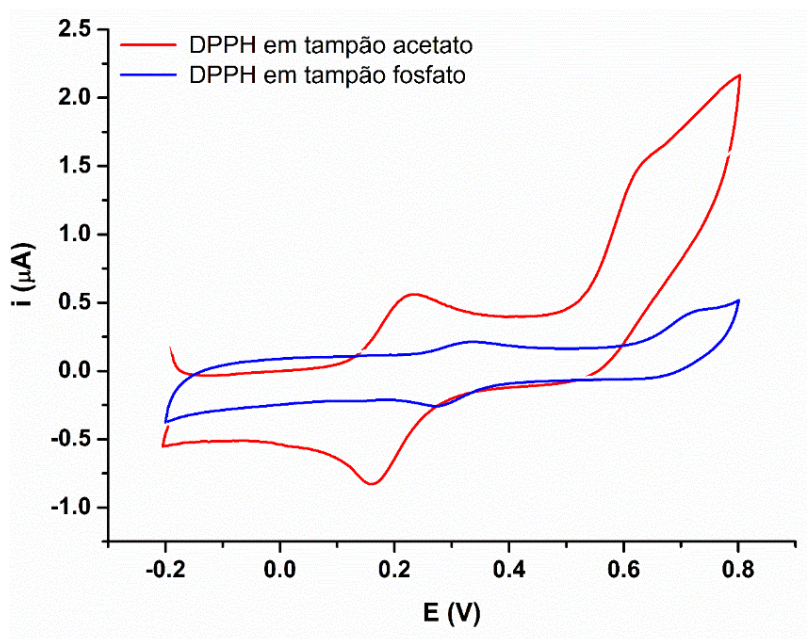
4.1 Considerações Gerais

Os resultados e discussões abordados, nesta tese, são divididos em duas partes. Na primeira, apresentam-se os estudos realizados para a determinação da capacidade antioxidantes a partir do consumo de DPPH[•]. Na segunda, são apresentados os estudos da determinação de astaxantina em amostras de salmão.

4.2 Parte 1: Determinação da Capacidade Antioxidante a partir do Consumo de DPPH[•]

O método BIA proposto para a determinação da capacidade antioxidante total teve como base na detecção amperométrica de DPPH[•] observada após a sua reação com as amostras ou padrões antioxidantes. No entanto, o primeiro passo do presente trabalho foi o de avaliar o método BIA com detecção amperométrica para a determinação precisa e sensível de DPPH[•] em meio hidroetanólico. O comportamento eletroquímico de DPPH[•] foi investigado inicialmente por voltametria cíclica usando um eletrodo de carbono vítreo em tampão fosfato (pH 7) (AMATATONGCHAI, et al., 2012), e tampão acetato (pH 5,5), ambos contendo 60% (v/v) de etanol (Figura 8).

FIGURA 8 – Voltamogramas cíclicos de solução de DPPH em eletrodo de carbono vítreo obtidos para uma solução de DPPH $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em eletrólito de tampão acetato e tampão fosfato, contendo 60% (v/v) de etanol

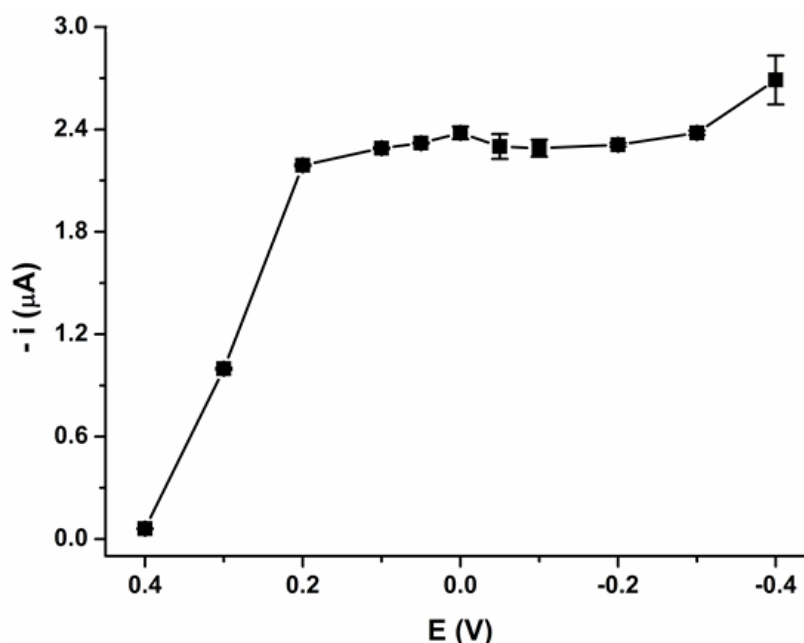


A solução de eletrólito que proporcionou o maior sinal analítico para DPPH $^{\cdot}$ foi tampão acetato contendo 60% (v/v) de etanol, enquanto a resposta ao DPPH $^{\cdot}$ em tampão fosfato não foi tão intensa, conforme Figura 8. Um estudo reportado na literatura demonstrou que DPPH $^{\cdot}$ sofre degradação na presença de tampão fosfato, o que pode ser considerado como a possível razão para a baixa resposta analítica do DPPH $^{\cdot}$ neste meio (AL-DABBAS et al., 2007).

4.2.1 Seleção do Potencial de Detecção por Amperometria

Um voltamograma hidrodinâmico para explorar a faixa de potencial da redução eletroquímica do radical DPPH foi obtido usando o sistema de BIA com detecção amperométrica, fixando um potencial e realizando injeções da solução de DPPH $^{\cdot}$ ($87 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) em triplicata. A Figura 9 mostra o voltamograma hidrodinâmico resultante, o que corresponde a um gráfico da média ($n = 3$) dos valores de corrente, obtidos em função do potencial aplicado.

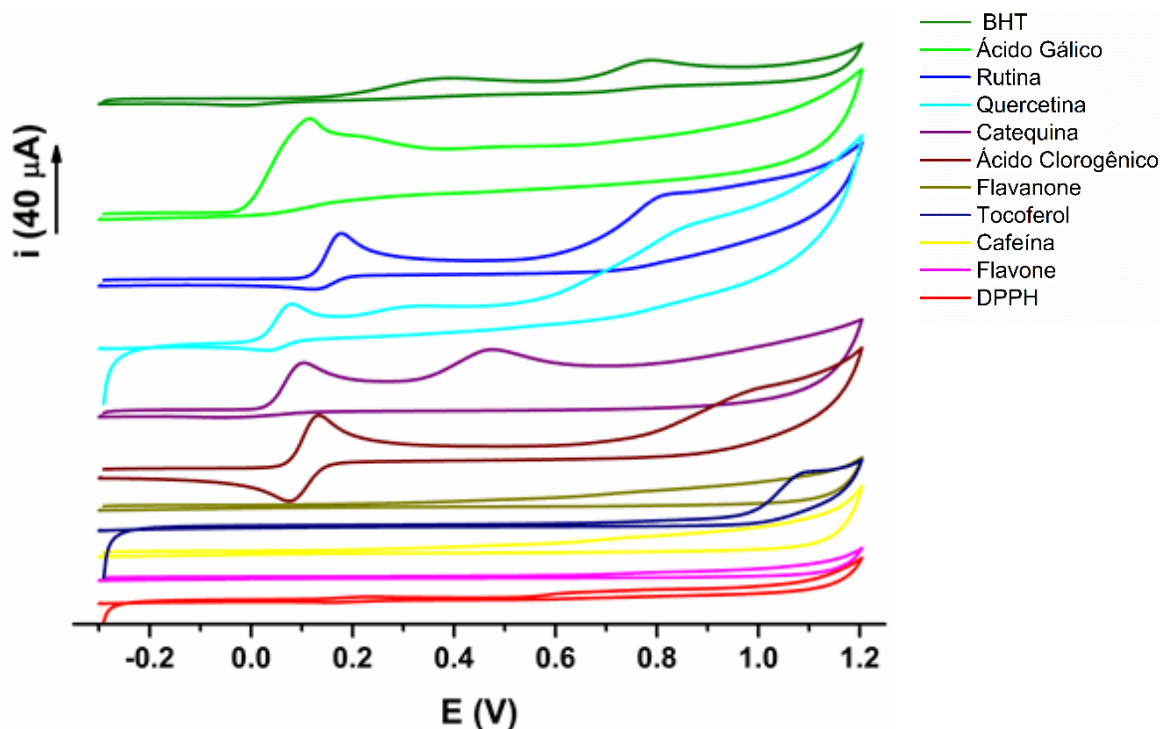
FIGURA 9 – Voltamograma hidrodinâmico obtido a partir de injeções para uma solução contendo $87 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DPPH \cdot (n=3) no sistema BIA com detecção amperométrica. Condições: $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão de acetato (pH 5,5) em etanol (40:60, v/v) como eletrólito; a velocidade de injeção de $153 \mu\text{L s}^{-1}$ e o volume de injeção de $100 \mu\text{L}$



Na Figura 9, pode-se observar a redução eletroquímica do DPPH \cdot para o respectivo radical ânionico (AHMED, et al., 2012) em uma faixa de potencial entre -0,40 V a +0,40 V. Com base neste voltamograma hidrodinâmico, o potencial de +0,05 V foi selecionado para a detecção amperométrica de DPPH \cdot nas medidas subsequentes. Este potencial está de acordo com um trabalho anteriormente descrito na literatura, o qual utilizou sistema o FIA para avaliar consumo do radical DPPH (AMATATONGCHAI et al., 2012).

Foram realizados voltamogramas cíclicos (Figura 10) a fim de avaliar o perfil eletroquímico de antioxidantes, incluindo AG e BHT, os quais podem ser encontrados em amostras, tais como as analisadas, nesta pesquisa.

FIGURA 10 – Voltamogramas cíclicos dos antioxidantes e do radical DPPH em eletrodo de carbono vítreo. Condições: $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão de acetato (pH 5,5) em etanol (40:60, v/v) como eletrólito; a velocidade de injeção de $153 \mu\text{L s}^{-1}$ e o volume de injeção de $100 \mu\text{L}$



Como se pode observar no potencial selecionado quase todos os antioxidantes não apresentam sinal analítico. Posteriormente, medições amperométricas do radical DPPH e de todos os antioxidantes foram realizadas em triplicata, nas condições otimizadas para a detecção de DPPH^{\cdot} , com objetivo de confirmar a ausência de sinal analítico dos antioxidantes. É importante mencionar que a corrente do branco (para a equação 1) foi insignificante para os dois antioxidantes padrões (AG e BHT), o que leva a conclusão de que ambos são submetidos à oxidação eletroquímica em potenciais mais positivos do que $+0,05 \text{ V}$, assim, eles não interferiram na detecção de DPPH^{\cdot} . Por outro lado, uma vez observando que ocorre uma reação entre os antioxidantes e o radical DPPH, pode-se concluir que após o tempo de reação, espera-se que todo o antioxidante presente tenha sido consumido pelo radical, proporcionando, assim, essa ausência de sinal analítico do antioxidante, restando apenas o radical DPPH excedente em solução que será reduzido eletroquimicamente em $+0,05 \text{ V}$.

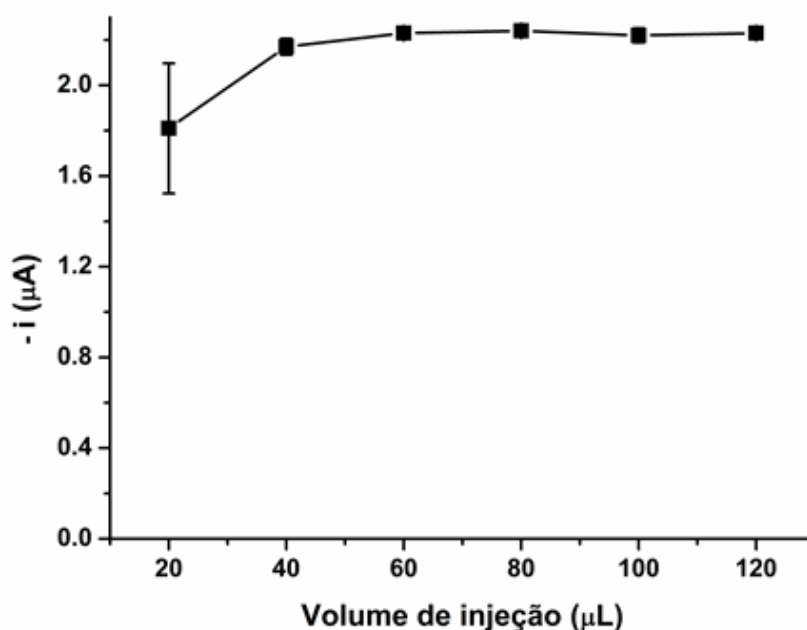
Portanto, para a seleção do potencial de trabalho (+0,05 V), além de este ter sido analisado com base no melhor sinal amperométrico para DPPH[•], considerou-se ainda a ausência de respostas eletroquímicas dos vários antioxidantes.

Da mesma maneira, as medições amperométricas no sistema BIA otimizado para detecção de DPPH[•], bem como voltametria cíclica, foram aplicadas para as amostras de chá e extratos de plantas. Todas as amostras produziram picos de oxidação em potenciais mais positivos do que +0,05 V, portanto, elas não interferiram na resposta amperométrica do DPPH[•].

4.2.2 Velocidade e Volume de injeção

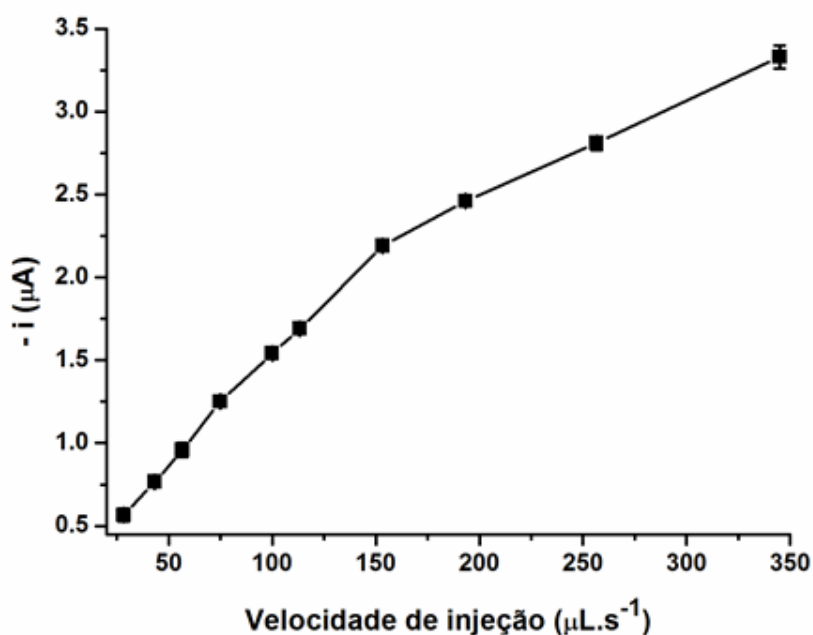
Após selecionar o eletrólito e o potencial aplicado para se obter a mais alta corrente analítica de DPPH[•], parâmetros do sistema BIA, como o volume injetado e a velocidade de injeção da micropipeta eletrônica, foram avaliados (Figuras 11 e 12).

FIGURA 11 - Estudo do efeito da variação do volume de injeção (20-120 μL) para uma solução contendo $87 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DPPH[•] ($n=3$). Condições: $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão de acetato (pH 5,5) em etanol (40:60, v/v) como eletrólito, potencial de +0,05 V e velocidade de injeção de $153 \mu\text{L s}^{-1}$



A corrente de pico aumentou com o aumento do volume de injeção de 20 para 40 μL , e manteve-se quase constante entre 40 e 120 μL (Figura 11). Um maior desvio padrão relativo foi verificado para injeções de 20 μL , comparado com os desvios dos demais volumes analisados. Provavelmente devido ao baixo volume injetado em uma velocidade de injeção relativamente alta (tempo de injeção de $\sim 0,13$ s em um intervalo de amostragem de sinal de 0,10 s). Portanto, foi selecionado o volume de 80 μL para ser empregado em análises posteriores levando em consideração o número de pontos adquiridos, no valor máximo de corrente, no momento da aquisição do sinal analítico. Resultado semelhante foi observado em outros trabalhos da literatura que empregaram o sistema BIA com detecção amperométrica (TORMIN et al., 2012; STEFANO et al., 2012).

FIGURA 12 – Estudo do efeito da velocidade de injeção ($28\text{-}345 \mu\text{L s}^{-1}$) para uma solução contendo $87 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{DPPH}^{\cdot-}$ ($n=3$). Condições: $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão acetato (pH 5,5) em etanol (40:60, v/v) como eletrólito, potencial de trabalho de $+0,05 \text{ V}$ e volume de injeção de 80 μL



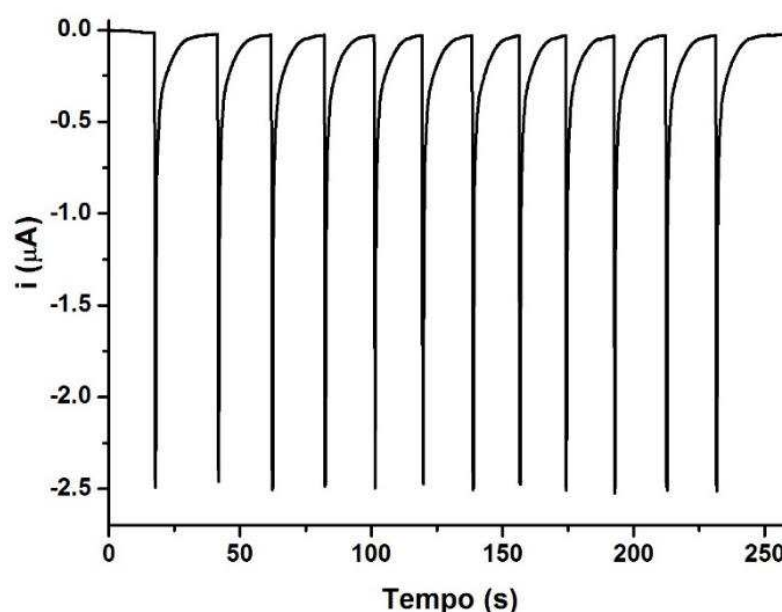
A velocidade de dispensa foi avaliada mantendo-se constante o volume de injeção de 80 μL utilizando-se uma solução de $87 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{DPPH}^{\cdot-}$. Há duas faixas lineares bem definidas que podem ser observadas neste estudo de velocidade de injeção em função da corrente de redução. Verifica-se que as correntes de redução para $\text{DPPH}^{\cdot-}$ aumentaram linearmente até $153 \mu\text{L s}^{-1}$ (Figura 12). Portanto, o valor da

velocidade de injeção selecionado foi de $153 \mu\text{L s}^{-1}$ para posteriores medições amperométricas, visto que valores maiores poderiam afetar a reprodutibilidade das análises devido ao baixo número de pontos de aquisição de sinal de corrente em velocidades maiores de injeção. Resultado semelhante foi observado em outros trabalhos da literatura que empregaram o sistema BIA com detecção amperométrica (STEFANO et al. 2012; CARDOSO et al., 2015).

4.2.3 Repetibilidade

Após a definição das melhores condições de trabalho, um estudo de repetibilidade foi conduzido para avaliar a precisão do método BIA para determinação de DPPH^{\cdot} . Na Figura 13 são apresentados os resultados obtidos para 12 injeções sucessivas de solução contendo $87 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DPPH^{\cdot} .

FIGURA 13 – Dados de repetibilidade obtidos para injeções sucessivas de solução contendo $87 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DPPH^{\cdot} ($n = 12$). Condições: $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão acetato (pH 5,5) em etanol (40:60, v/v) como eletrólito, potencial de trabalho de $+0,05 \text{ V}$, volume injetado de $80 \mu\text{L}$ e velocidade de injeção de $153 \mu\text{L s}^{-1}$



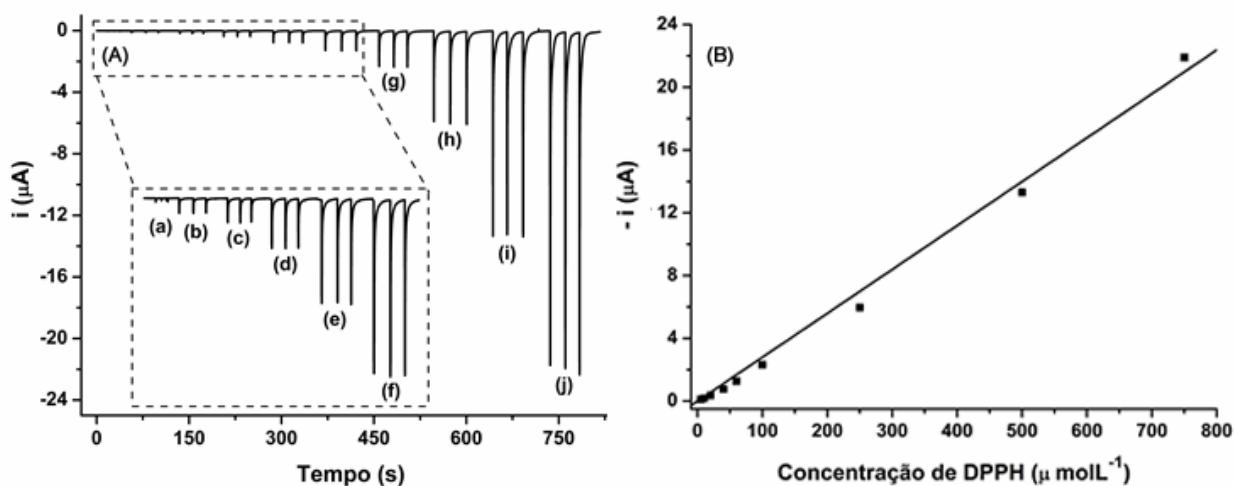
Como se pode observar, na Figura 13, a injeção da solução padrão de radical DPPH^{\cdot} resultou em respostas repetitíveis, ou seja, os sinais amperométricos obtidos alcançaram valores de corrente semelhantes não havendo adsorção do analito

no eletrodo e isso justifica o baixo valor obtido para DPR de 0,7% ($n=12$), o que é comparável com os dados obtidos por outros métodos BIA (TORMIN et al., 2012; STEFANO et al., 2012; SILVA et al., 2012, PEREIRA et al., 2012; MONTES et al., 2014). Este baixo valor de DPR atesta que as injeções fornecidas pela micropipeta eletrônica são altamente precisas, pelo posicionamento reprodutível da ponta da micropipeta perto da superfície do eletrodo de trabalho (~ 2 mm). A frequência de análise deste método BIA foi estimada usando dados, a partir da Figura 13, em 180 injeções por hora. No entanto, em uma análise real, as injeções e o tempo de reabastecimento entre as injeções que devem ser em triplicata, torna-se necessário considerar aproximadamente 60 segundos, sendo assim, a frequência de amostragem da amostra seria de aproximadamente 90 injeções por hora.

4.2.4 Linearidade e Curva Analítica

Um teste de linearidade do radical DPPH foi realizado para verificar a sua faixa linear deste radical, conforme pode ser observado na Figura 14 – A. Este teste consiste na injeção em triplicata de 80 μL de soluções do radical DPPH na faixa de concentração 1 a 750 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em condições já anteriormente otimizadas. E um zoom entre as injeções de 1 a 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi aplicado para melhor visualização das respostas analíticas. A curva de calibração também é apresentada na Figura 14 – B.

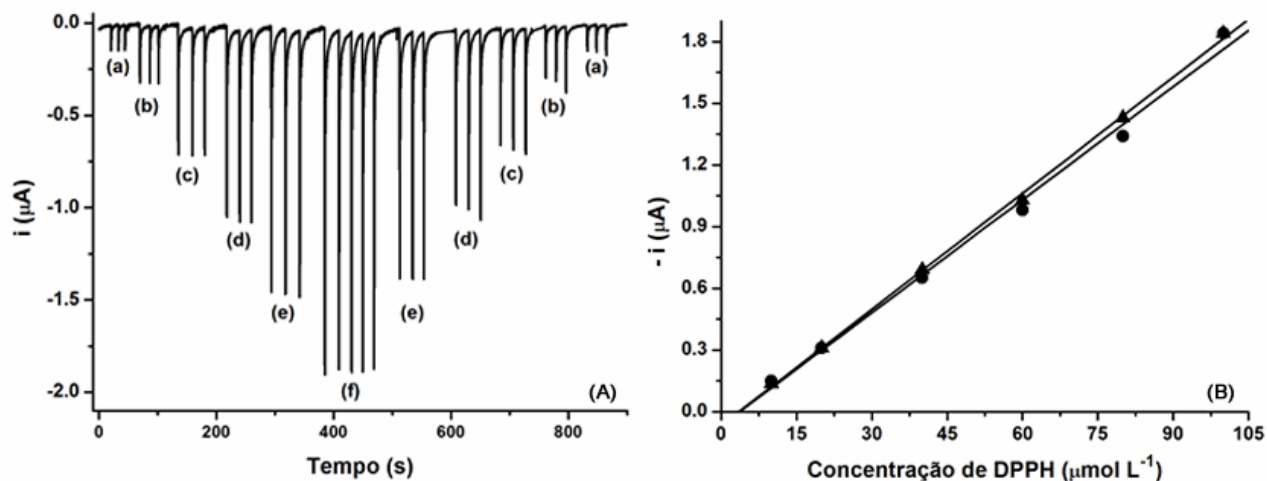
FIGURA 14 - (A) Respostas amperométricas obtidas após injeções em triplicata no sistema BIA-AMP de soluções de DPPH[•] de concentrações: (a) 1, (b) 5, (c) 10, (d) 20, (e) 40, (f) 60, (g) 100, (h) 250, (i) 500 e (j) 750 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com zoom em (a-f: 1 – 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$). (B) Curva de calibração de injeções de soluções de DPPH (●, R = 0,998). As condições experimentais foram como descrito na Fig. 13



Um comportamento linear pode ser observado em toda a faixa de concentração avaliada, com bom coeficiente de correlação ($R = 0,998$), o qual mostra uma ampla faixa de trabalho para este radical.

Na sequência, a Figura 15-A apresenta as respostas amperométricas para injeções, em triplicata, de 80 μL de soluções, contendo concentrações crescentes e decrescentes de DPPH[•] (a-f: 10-100 $\mu\text{mol L}^{-1}$), registradas em +0,05 V. As respectivas curvas de calibração são também apresentadas na Figura 14-B. Estes testes foram realizados em tampão acetato e etanol (40:60, v/v).

FIGURA 15 – (A) Respostas amperométricas obtidas após injeções em triplicata no sistema BIA de soluções de DPPH[•] (a-f : 10,0 - 100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). (B) Curvas de calibração de injeções em concentrações crescentes (\blacktriangle , $R = 0,999$) e decrescentes (\bullet , $R = 0,997$) de DPPH. As condições experimentais foram como descrito na Fig . 13

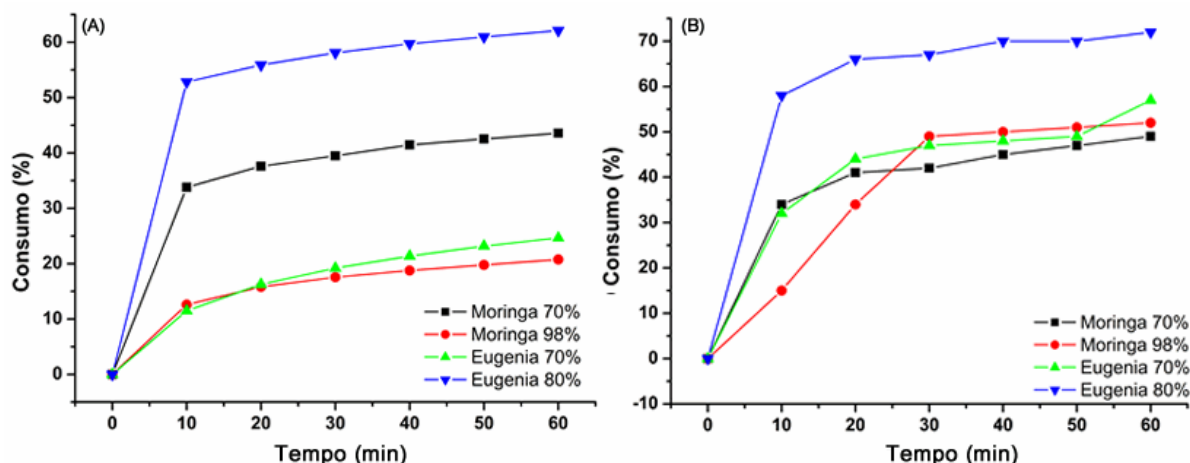


Observou-se um comportamento linear com bons coeficientes de correlação ($R = 0,999$ e $R = 0,997$ para sentido crescente e decrescente, respectivamente) entre 10 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DPPH[•]. Os valores dos coeficientes angulares apresentaram concordância entre si ($1,88 \times 10^{-8}$ e $1,83 \times 10^{-8} \mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$, respectivamente) e os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) de DPPH[•] foram estimados em 1,0 e 3,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

4.2.5 Estudo de Cinética

Antes de iniciar os testes de determinação da capacidade antioxidante total por meio do sistema BIA, realizou-se um teste de cinética para verificar o tempo necessário para cada amostra consumir 50% de radicais DPPH[•], ou seja, o tempo em que o antioxidante deveria estar em contato com o radical DPPH para que este fosse consumido pela metade. Este teste foi realizado a partir de sucessivas injeções da solução de DPPH com as diferentes amostras no sistema BIA com monitoramento da reação a cada 5 minutos e no espectrofotômetro com leitura da absorbância a cada 5 minutos. A Figura 16 mostra o consumo do radical DPPH, à medida que aumenta o tempo de reação, para o método espectrofotométrico (Figura 16-A) e para o método BIA-AMP (Figura 16-B).

FIGURA 16 – Curvas do estudo cinético da reação entre o DPPH[•] e diferentes amostras com monitoramento da reação durante 60 minutos. (A) Método Espectrofotométrico e (B) Sistema BIA-AMP. As condições experimentais para o sistema BIA-AMP foram como descrito na Fig. 13



Os resultados obtidos para este teste de cinética da reação comprovam o consumo do radical DPPH ao longo do tempo de reação. Pode-se observar que para diferentes amostras testadas a partir de aproximadamente 30 minutos decorridos de reação, o consumo do radical começa a se estabilizar, o que leva à conclusão de que os testes para avaliação do CE_{50} de diferentes amostras poderiam ser realizados com tempo de 60 minutos de reação. Este tempo mínimo pode ser observado em ambos os métodos. Dessa forma, os demais testes para aplicação do sistema BIA foram realizados após decorridos 1 h de reação do radical DPPH e as diferentes amostras. Sendo assim, foi possível garantir que o consumo de 50% do radical livre teria sido atingido.

4.2.6 Aplicação do Sistema BIA e Comparação entre o Método Proposto BIA e Método Espectrofotométrico

Após a otimização das condições ideais para a detecção de DPPH[•] por BIA com detecção amperométrica, a determinação da capacidade antioxidante total de dois antioxidantes convencionais, AG e BHT, foi realizada. CE_{50} , que é definido como a concentração eficaz de antioxidante necessária para eliminar 50% de radicais

DPPH[•] após 1 h de reação, foi determinada, utilizando-se medições amperométricas para consumo DPPH[•] por diferentes concentrações de ambos os antioxidantes.

Para isso, os antioxidantes padrões foram analisados separadamente, injetando-se no sistema BIA-AMP, soluções contendo apenas DPPH[•] e soluções contendo solução de DPPH[•] com AG ou BHT em diferentes concentrações. As características de desempenho para cada curva mostradas na Tabela 4, a seguir.

TABELA 4 – Características de desempenho do método eletroquímico proposto BIA usando AG e BHT como antioxidantes

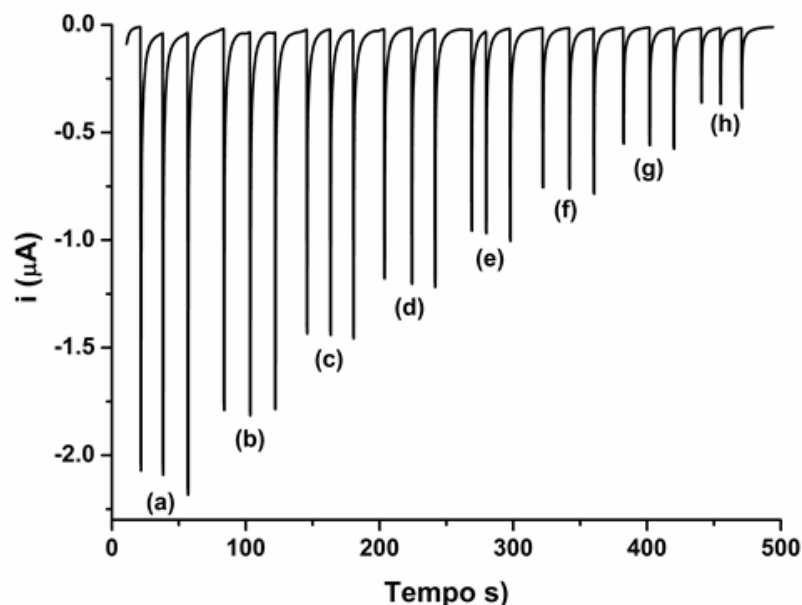
Antioxidante Padrão	Equação da Faixa Linear	R^2	Faixa Linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Sensibilidade ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$)
AG	$y = 0,233x - 0,1999$	0,999	2 – 10	0,233
BHT	$y = 0,032x + 0,304$	0,994	10 – 35	0,032

Conforme se pode observar, na Tabela 4, para ambos os padrões antioxidantes, o método proposto apresentou resultados satisfatórios, com bons coeficientes de correlação. A partir da curva, pode-se calcular o valor de CE_{50} para o AG e para BHT, sendo $5,6 \pm 0,1$ e $19,0 \pm 1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Estes resultados indicam a maior capacidade antioxidante do AG em relação ao BHT. O valor de sensibilidade maior para o AG indica que este reagiu de forma mais efetiva com o radical DPPH, ou seja, confirma seu maior poder antioxidante.

Para efeito de comparação, a capacidade antioxidante total destes dois antioxidantes padrão também foi determinada por espectrofotometria, obtendo-se os seguintes valores de CE_{50} para o AG e para BHT ($5,2 \pm 1,0$ e $21,0 \pm 1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente). Como se pode observar, os valores de CE_{50} encontrados para ambos os métodos foram similares, considerando os desvios. Isso comprova que o método proposto poderia ser aplicado em amostras nativas.

A avaliação da capacidade antioxidante total de duas plantas (*Moringa oleífera* e *Eugenia uniflora*) e de dois chás foi realizada em triplicata para cada amostra. A Figura 17 apresenta o amperograma para a determinação da atividade antioxidante de uma amostra de chá, na qual, em (a) se encontram sinais de corrente para DPPH[•], seguida de sinais de corrente para DPPH[•] residual (b – h).

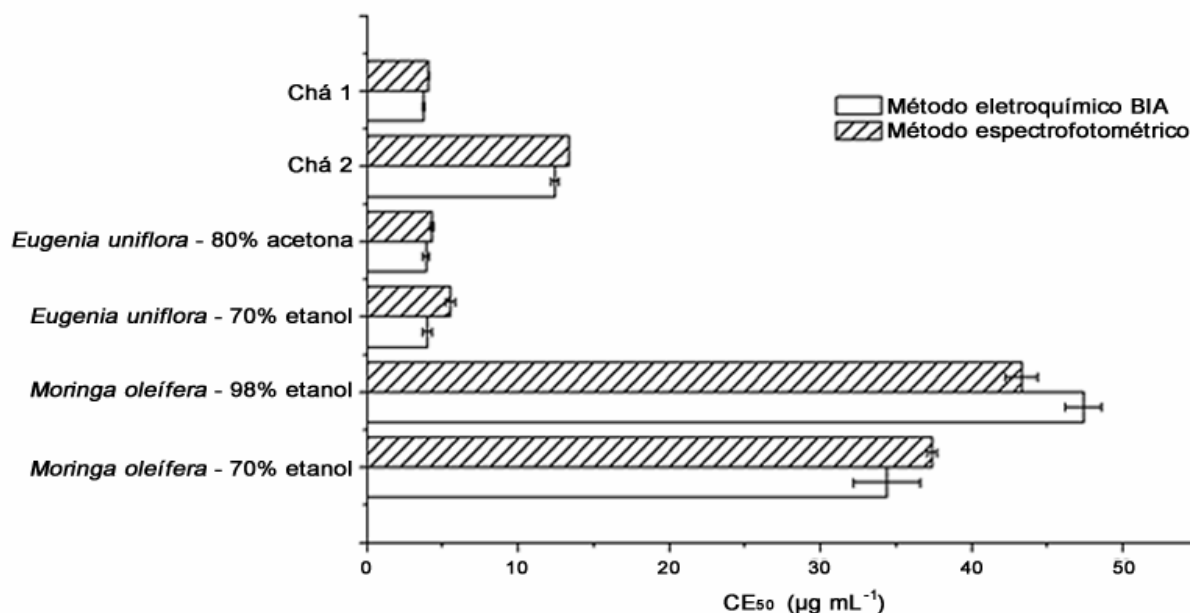
FIGURA 17 – Respostas amperométricas obtidas após injeções em triplicata no sistema BIA de soluções contendo (a) DPPH $87 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (b – h) mistura de DPPH $87 \mu\text{mol L}^{-1}$ com amostra de chá (b: 4, c: 7, d: 10, e: 13, f: 16, g: 19 e h: $22 \mu\text{g mL}^{-1}$). As condições experimentais foram como descrito, na Fig . 13



O amperograma da Figura 17 mostra que há um decréscimo na corrente de redução do radical DPPH entre as injeções b e h, justificada pela presença de antioxidantes na amostra de chá, os quais reagem com o radical, consumindo-o, mesmo, proporcionando assim um menor sinal analítico, à medida que se têm concentrações crescentes da amostra.

Foram realizados para as demais amostras de extratos de plantas e de chá amperogramas semelhantes ao anterior. Os dados obtidos pelo método BIA-AMP foram comparados com os valores obtidos pelo método espectrofotométrico e são mostrados na figura seguinte.

FIGURA 18 – Os valores de CE_{50} para amostras (Moringa, Eugenia e chás) obtidas pelo método eletroquímico proposto BIA e pelo método espectrofotométrico



Os resultados, na Figura 18, mostram a concordância entre o método proposto BIA-AMP e o método espectrofotométrico com base na medida do consumo de DPPH \cdot . O valor do teste *t* de Student pareado foi calculado (1,79), considerando nível de confiança de 95%, sendo esse valor menor do que o valor crítico (2,57, $n = 6$), isso indica que não houve diferenças significativas entre os resultados. O menor valor de CE_{50} (concentração suficiente de amostra para eliminar 50% de radicais DPPH \cdot) indica maior capacidade antioxidante, ou seja, quanto menor for a quantidade de amostra necessária para consumir 50 % de radicais, maior será sua capacidade antioxidante. Portanto, em comparação entre os chás, a amostra chá 1 apresentou maior capacidade antioxidante do que a amostra de chá 2, enquanto que entre os extratos, os de *Moringa oleífera* apresentaram menor capacidade antioxidante do que os de *Eugenia uniflora*.

A Tabela 5, na sequência, apresenta uma lista de trabalhos publicados na literatura voltados à determinação da atividade antioxidante em amostras similares usando métodos eletroquímicos de análise. Algumas características destes trabalhos são comparadas com o trabalho proposto nesta tese, que emprega BIA com detecção amperométrica.

TABELA 5 – Comparação do método BIA com detecção amperométrica com métodos alternativos para a determinação da capacidade antioxidante

ELETRODO	TÉCNICA	AMOSTRA	RESPOSTA	REFERÊNCIA
Carbono vítreo	Voltametria cíclica	Compostos fenólicos de cadeia curta (Soluções padrão)	Potencial e corrente de oxidação	ARTEAGA et al., 2012
Carbono vítreo	Voltametria Cíclica	Chás	Potencial e corrente de oxidação	PILJAC-ŽEGARAC et al., 2010
Impresso de carbono modificado com compósito a base de grafeno	Amperometria	Bebidas e extrato de planta	Consumo de DPPH e avaliação usando o padrão Trolox ($5 - 30 \mu\text{mol L}^{-1}$) LD = $0,59 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Trolox LQ = $1,97 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Trolox	TIRAWATTANAKO SON et al., 2016
Carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono	Amperometria em sistema FIA	Extratos de plantas	Consumo DPPH e avaliação com ácido gálico ($0,6 - 12 \mu\text{mol L}^{-1}$) (LD = $0,04 \mu\text{mol L}^{-1}$), catequina (LD = $0,02 \mu\text{mol L}^{-1}$), quercetina (LD = $0,03 \mu\text{mol L}^{-1}$), ácido cafeico (LD = $0,08 \mu\text{mol L}^{-1}$) e Trolox ($0,3 - 8 \mu\text{mol L}^{-1}$) / (LD = $0,04 \mu\text{mol L}^{-1}$) Frequência analítica (45 injeções por hora)	AMATATONGCHAI et al., 2012
Dois eletrodos de carbono vítreo	Biamperometria	Chás, vinhos, sucos e café	Consumo de DPPH e avaliação usando o padrão Trolox ($5 - 25 \mu\text{mol L}^{-1}$) LD = $0,05 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Trolox	MILARDOVIC et al., 2005
Impresso de platina	Voltametria de pulso diferencial	Azeites e óleos comestíveis	Consumo de DPPH e avaliação usando os padrões de tocoferol (α , σ e τ)	VASILESCU et al., 2015
Carbono vítreo	Amperometria em sistema BIA	Chás e extratos de plantas	Consumo de DPPH e avaliação usando o padrão ácido gálico ($2 - 10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e BHT ($10 - 35 \mu\text{mol L}^{-1}$) LD = $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de radical DPPH	Trabalho desta tese

O método BIA com detecção amperométrica é mais rápido que todos os métodos listados, pois permite 180 injeções por hora devido às características do sistema BIA. O método FIA descrito por Amatatongchai et al., 2012 possui frequência analítica de 60 injeções por hora. O tempo de reação do radical DPPH com as amostras pode ser variado (no trabalho desenvolvido pelo autor, o tempo foi bem menor que 1 h), no entanto, caso seja necessário determinar a CE_{50} deve-se esperar por tal período de tempo para que a reação seja completada, tal como demonstrado no experimento de cinética. O uso de nanotubos de carbono aumentou a detectabilidade frente ao DPPH, como indicado na faixa de avaliação do antioxidante ácido gálico (AMATATONGCHAI et al., 2012), mas a faixa linear foi bastante próxima do valor obtido neste trabalho, o que não justificaria a modificação do eletrodo.

4.2.7 Conclusões Parciais – Determinação Indireta da Capacidade Antioxidante a partir do Consumo de DPPH[•]

Nesta pesquisa, foi demonstrada a primeira aplicação do sistema BIA com detecção amperométrica para determinar a capacidade antioxidante de amostras nativas com base na medição do consumo de DPPH[•]. O sistema BIA com detecção amperométrica é um método rápido com frequência analítica de 180 h⁻¹ e rendimento real de 90 injeções por hora (considerando o tempo adicional de preenchimento das micropipetas), ou seja, de frequência analítica elevada comparados a trabalhos onde a frequência analítica é de 70 injeções por hora (da COSTA et al., 2016; SILVA et al., 2016), de elevada precisão (DPR = 0,7%), alta sensibilidade e seletividade para o DPPH[•].

Um método simples pois utiliza-se de um eletrodo de trabalho sem qualquer modificação química ou eletroquímica e sem nenhuma necessidade de polimento entre as análises, diferente de outros métodos relatados na literatura onde houve a necessidade de modificação do eletrodo de trabalho (MARTINS et al., 2014; SILVA et al., 2012; FREIRE et al., 2016). As etapas para preparo de amostra necessitam apenas de extração e/ou diluição.

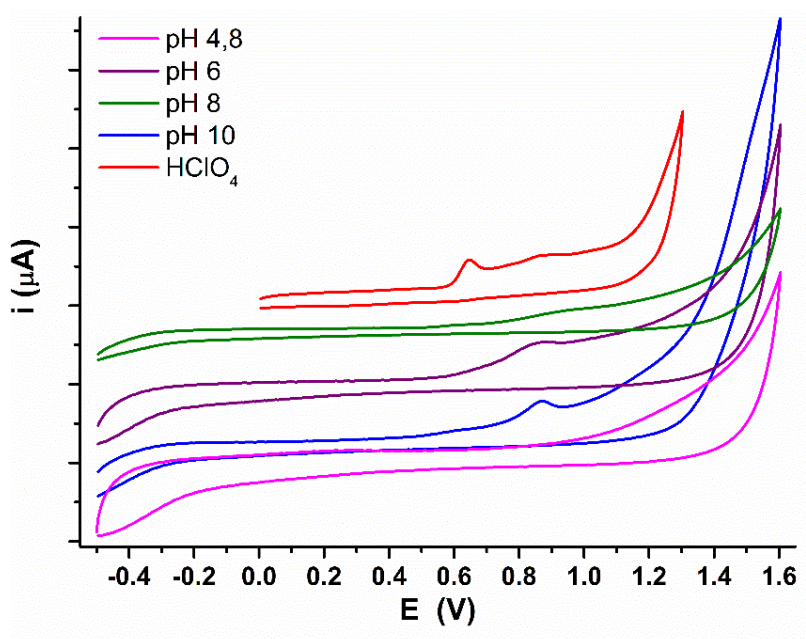
Sendo este aplicado com êxito para avaliar a capacidade antioxidante de amostras de chá e de plantas com obtenção de resultados similares aos obtidos pelo método espectrofotométrico.

4.3 Parte 2: Determinação de Astaxantina em Amostras de Salmão Comercial

4.3.1 Estudo do Comportamento Eletroquímico da Astaxantina por Voltametria Cíclica

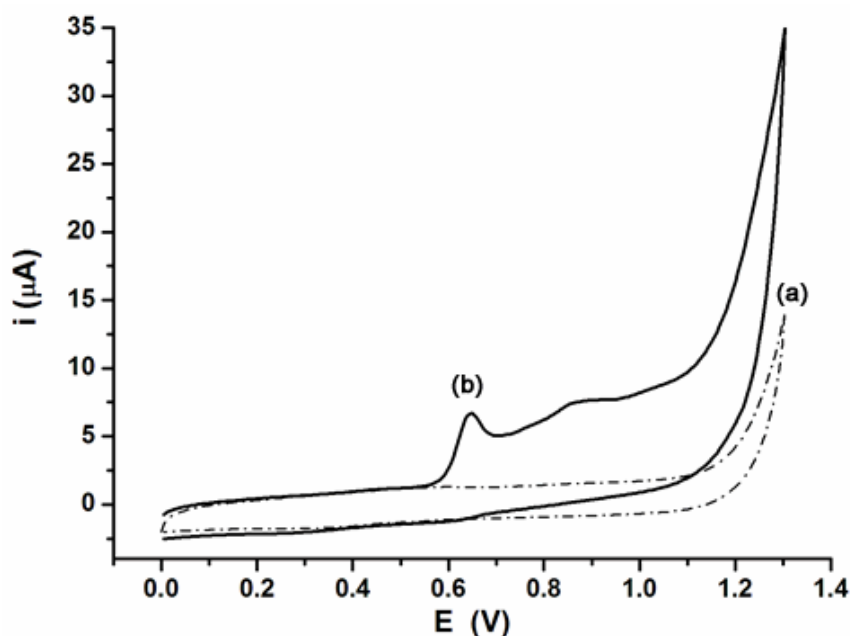
O primeiro passo, deste estudo, foi o de avaliar a solubilidade de astaxantina em diferentes solventes, tais como etanol, acetona e diclorometano. A acetona foi relatada como sendo o solvente extrator mais eficiente para extrair astaxantina de salmão e menos tóxico em comparação com outros solventes (ABDOLMAJID; CHOUL-GYUN, 2006; OLIVEIRA et al., 2011). No entanto, a solubilidade da astaxantina é maior em diclorometano do que em acetona. Por conseguinte, as soluções em diferentes proporções de acetona, diclorometano e água contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HClO_4 como concentração final na solução foram avaliadas como eletrólito para a detecção de astaxantina usando voltametria cíclica. A escolha de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ HClO_4 foi baseada em trabalhos anteriores que demonstraram maior sensibilidade utilizando este eletrólito para a determinação eletroquímica de antioxidantes (HAN et al., 2006). Com base na baixa solubilidade em água de astaxantina, a fração de solução aquosa de eletrólito no final foi reduzida para 10% v/v. Os voltamogramas cíclicos revelaram melhor resposta analítica para a astaxantina usando a proporção de 80:10:10 v/v de acetona, diclorometano e água, mantendo a concentração final de HClO_4 em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, o que resultou em uma solução homogênea monofásica. Manteve-se a proporção de 80% de acetona e 10% de diclorometano e avaliou-se a solução de hidróxido de sódio e a solução de tampão BR na faixa de pH 4,8 a 10,0 na concentração final de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 19 apresenta voltamogramas cíclicos de astaxantina em eletrólito contendo tampão BR em diferentes pH e em eletrólito otimizado e a Figura 20 mostra apenas voltametria cíclica de astaxantina usando o eletrólito otimizado.

FIGURA 19 – Voltamogramas cíclicos em eletrodo de carbono vítreo obtidos para solução de astaxantina $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em eletrólito contendo tampão Br na faixa de pH 4,8 a 10 e em eletrólito otimizado



Como se pode observar, na Figura 19, o eletrólito que apresentou melhor sinal de corrente foi o eletrólito contendo acetona, diclorometano e ácido perclórico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, nos demais não foram verificadas respostas eletroquímicas apreciáveis, sendo o eletrólito contendo ácido perclórico selecionado como eletrólito ótimo para ser utilizado nas análises subsequentes. A Figura 20, a seguir, apresenta o voltamograma para astaxantina apenas na mistura contendo acetona, diclorometano e ácido perclórico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (80:10:10, v/v), o qual foi o melhor eletrólito para posterior medidas eletroquímicas visando a sua quantificação.

FIGURA 20 – Os voltamogramas cíclicos em eletrodo de carbono vítreo obtidos para o branco (a) e para a solução de astaxantina $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ (b). Eletrólito: mistura contendo acetona, diclorometano e ácido perclórico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (80:10:10, v/v); velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}



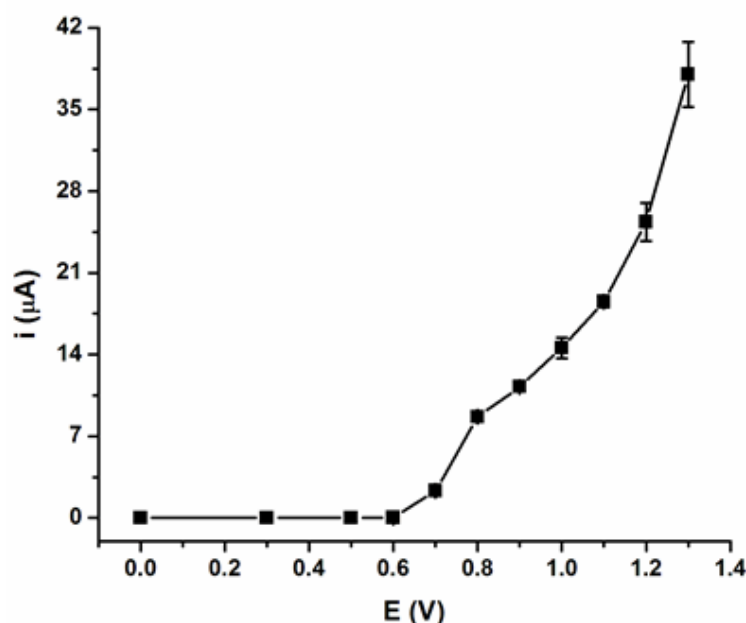
A Figura 20 apresenta o voltamograma cíclico da oxidação da astaxantina, o qual mostrou dois picos de oxidação, sendo o primeiro em aproximadamente $+0,65 \text{ V}$ e o segundo em aproximadamente $+0,85 \text{ V}$. Estudos anteriores revelaram dois processos eletroquimicamente reversíveis para astaxantina em eletrólito não aquoso (HAN et al., 2006). A presença de água no eletrólito pode afetar o processo eletroquímico da astaxantina de tal maneira que as espécies de radicais dos carotenoides formados na primeira transferência de elétrons não são estáveis. Portanto, a oxidação eletroquímica da astaxantina na presença de água neste caso, apresentou-se como sendo um processo irreversível.

4.3.2 Seleção do Potencial de Detecção por Amperometria

Um voltamograma hidrodinâmico foi obtido a partir de injeções ($n=3$) de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ astaxantina e a média da corrente de pico registradas no modo amperométrico foi usada para a construção de um gráfico de corrente de oxidação da

astaxantina em função da aplicação de valores de potenciais constantes (0,0 - 1,3 V), conforme Figura 21.

FIGURA 21 – Voltamograma hidrodinâmico obtido a partir de injeções em triplicata de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de astaxantina no sistema de BIA com detecção amperométrica. Eletrólito: mistura contendo acetona, diclorometano e ácido perclórico 0,1 mol L^{-1} (80:10:10, v/v); velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; velocidade de injeção de 153 $\mu\text{L s}^{-1}$ e volume de injeção de 100 μL



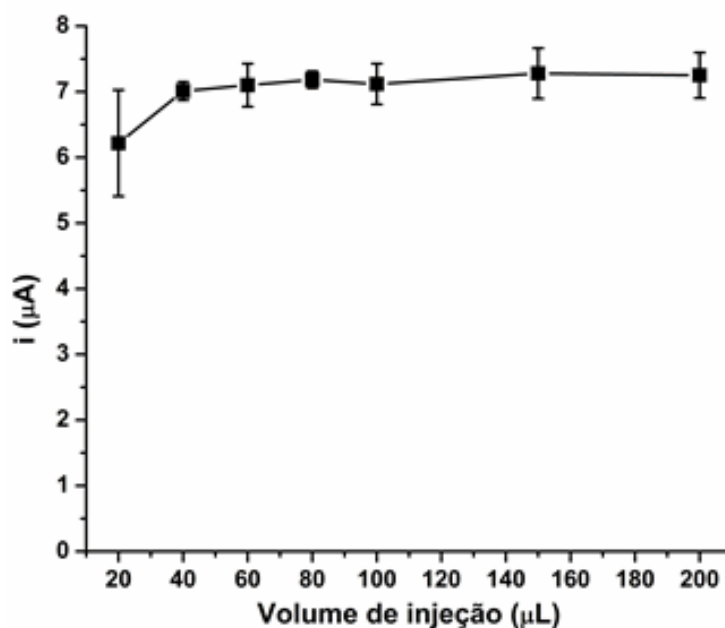
A oxidação eletroquímica de astaxantina em condições hidrodinâmicas iniciou-se a partir de +0,6 V atingindo maiores correntes em potencial de +1,3 V. Com base neste voltamograma hidrodinâmico o potencial de +0,8 V foi selecionado para outras medições amperométricas. Apesar de a escolha deste potencial poder afetar a sensibilidade do método, este foi selecionado com intuito de evitar possíveis interferentes, tais como: vitaminas, ferro, entre outros, que poderiam estar presentes na matriz da amostra.

4.3.3 Velocidade e Volume de injeção

Após selecionar o eletrólito e o potencial aplicado para se obter a maior corrente analítica para a oxidação de Astaxantina na possível ausência de

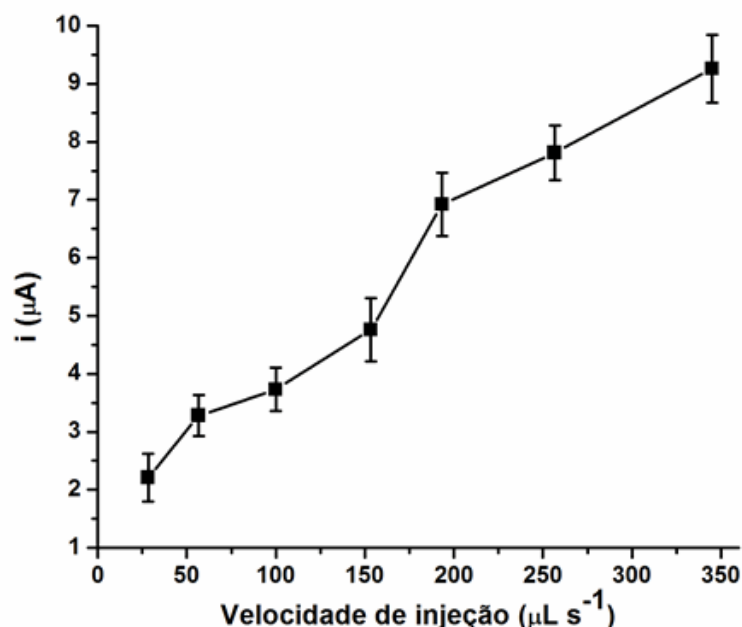
interferentes, os parâmetros BIA como o volume injetado e a velocidade de injeção da micropipeta eletrônica foram avaliados (Figuras 22 e 23, respectivamente).

FIGURA 22 – Estudo do efeito da variação do volume de injeção (20 - 200 μL) para uma solução contendo 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Astaxantina ($n=3$). Eletrólito: mistura contendo acetona, diclorometano e ácido perclórico 0,1 mol L^{-1} (80:10:10, v/v), potencial de trabalho: +0,8 V e velocidade de injeção: 153 $\mu\text{L s}^{-1}$



Um aumento de volume injetado causa um aumento na corrente de oxidação da Astaxantina entre injeções de 20 a 40 μL , posteriormente a corrente manteve-se praticamente constante entre 40 e 200 μL (Figura 22). Um desvio padrão relativo (DPR) elevado foi verificado para injeções BIA de 20 μL , provavelmente, devido ao baixo volume injetado em uma velocidade de injeção relativamente alta (tempo de injeção de $\sim 0,13$ s) e para injeções acima de 100 μL , possivelmente devido a adsorção do analito na superfície do eletrodo. O maior valor para a resposta analítica e menor valor de DPR para Astaxantina foram obtidos para a injeção de 80 μL (Figura 22) sendo, portanto, o volume empregado nas análises posteriores. Em trabalho anterior visando à detecção do radical DPPH e em outros trabalhos da literatura que empregaram BIA com detecção amperométrica pode ser observado resultado semelhante (MONTES et al., 2014b; CARDOSO et al., 2015).

FIGURA 23 – Estudo do efeito da velocidade de injeção ($28\text{--}345\ \mu\text{L s}^{-1}$) para uma solução contendo $50\ \mu\text{mol L}^{-1}$ de Astaxantina ($n=3$). Eletrólito: mistura contendo acetona, diclorometano e ácido perclórico $0,1\ \text{mol L}^{-1}$ (80:10:10, v/v), potencial de trabalho: $+0,8\ \text{V}$ e volume de injeção: $80\ \mu\text{L}$

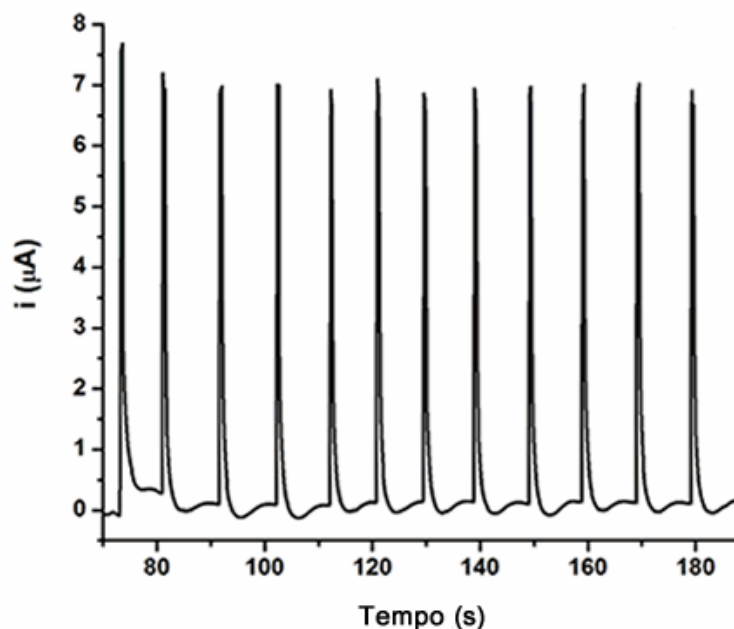


A velocidade de dispensa foi avaliada mantendo-se constante o volume ótimo de injeção de $80\ \mu\text{L}$, utilizando-se uma solução de $50\ \mu\text{mol L}^{-1}$ de Astaxantina. Os resultados mostram que o sinal analítico aumenta com o aumento da velocidade de injeção. No entanto, o valor da velocidade de injeção selecionado foi o de $193\ \mu\text{L s}^{-1}$ para posteriores medições amperométricas, a fim de se obter uma relação favorável entre a resposta analítica e o valor DPR e garantir maior precisão das análises. Resultado semelhante foi observado no trabalho anterior visando à detecção do radical DPPH e em outros trabalhos da literatura que empregaram BIA com detecção amperométrica (FREIRE et al., 2016; MONTES et al., 2014b; MONTES et al., 2016).

4.3.4 Repetibilidade

Um estudo sobre repetibilidade foi conduzido para avaliar a precisão do método BIA para determinação de astaxantina (Figura 24). Este teste foi obtido a partir de uma série de 12 injeções sucessivas de soluções contendo $50\ \mu\text{mol L}^{-1}$ de astaxantina.

FIGURA 24 – Dados de repetibilidade obtidos para injeções sucessivas de solução contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Astaxantina ($n = 12$) Eletrólito: mistura contendo acetona, diclorometano e ácido perclórico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (80:10:10, v/v), potencial de trabalho: $+0,8 \text{ V}$, volume injetado: $80 \mu\text{L}$ e velocidade de injeção: $193 \mu\text{L s}^{-1}$



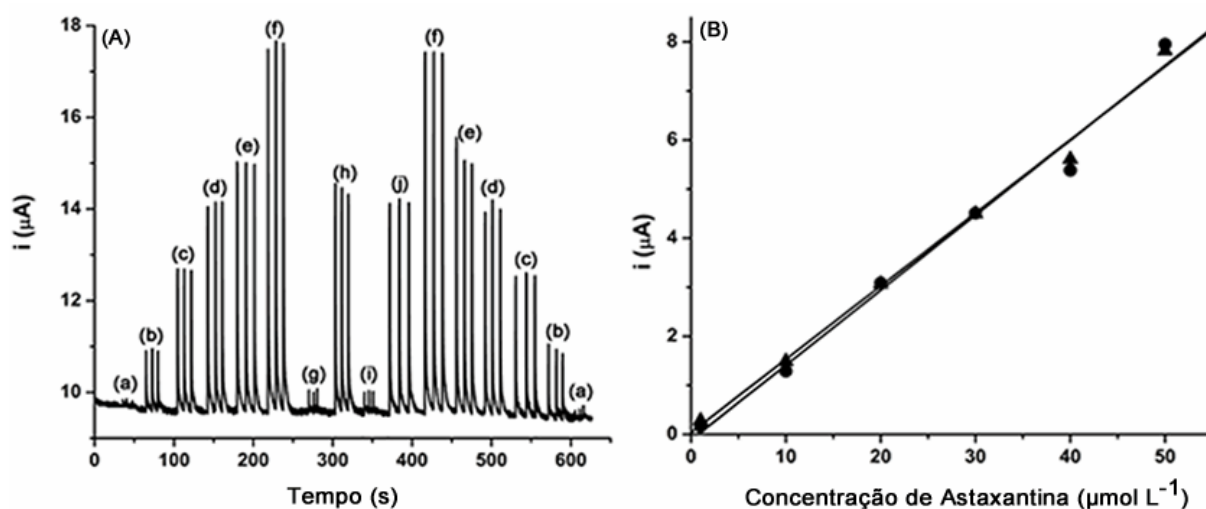
Os resultados apresentados, na Figura 24, demonstram que não há flutuações significativas nas áreas de picos registradas ao longo das medidas e um baixo valor de DPR de 2,4% ($n=12$) pode ser observado. A frequência de análise deste método BIA foi estimada (usando dados a partir da Figura 24), em 240 injeções por hora. No entanto, considerando, em uma análise real, as injeções e o tempo de reabastecimento entre elas, as quais devem ser em triplicata, torna-se necessário considerar ($\sim 60 \text{ s}$), desse modo, a frequência de amostragem seria de aproximadamente 120 injeções por hora. Ainda assim, esta frequência analítica é bastante superior a métodos cromatográficos normalmente aplicados a este analito.

4.3.5 Linearidade

A Figura 25-A mostra as respostas amperométricas registradas em $+0,8 \text{ V}$ para injeções em triplicata de $80 \mu\text{L}$ de soluções crescentes e decrescentes de astaxantina (a - f: $1-50 \mu\text{mol L}^{-1}$) e intermediadas por injeções em triplicata de soluções de amostras de salmão puras (g e i) e dopadas com $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ (h e j) de solução de

astaxantina. A Figura 25-B apresenta as respectivas curvas analíticas. Este experimento foi realizado em condições anteriormente otimizadas.

FIGURA 25 – (A) Respostas amperométricas obtidas após injeções em triplicata no sistema BIA-AMP para soluções de astaxantina (a - f : $1,0$ - $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e de amostras puras (g e i) e dopadas (h e j : $30 \mu\text{mol L}^{-1}$) com solução de astacantina. (B) Curvas de calibração de injeções crescentes (●, $R = 0,992$) e decrescentes (▲, $R = 0,996$) de solução de Astaxantina. As condições experimentais foram como descrito na legenda da Fig. 24



Observou-se um comportamento linear com coeficientes de correlação adequados ($R = 0,992$ para concentrações crescentes e $R = 0,996$ para concentrações decrescentes) entre 1 e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de astaxantina. O sistema não apresentou comportamento linear para concentrações maiores de astaxantina. Os valores dos coeficientes angulares ($0,153 \pm 0,009$ e $0,149 \pm 0,006 \mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$, respectivamente) estão em concordância entre si. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) de astaxantina foram estimados em $0,3$ e $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (que corresponde a $0,1$ e $0,33 \mu\text{g g}^{-1}$ de amostra), respectivamente.

As injeções em triplicata na Figura 25-A, identificadas como (g); (h); (i); e (j) correspondem à análise da amostra 1 e os respectivos valores de recuperação (1A e 1B na Tabela 6). Possíveis interferentes (espécies eletroativas que oxidam a $0,8$ V) podem estar presentes nas amostras de salmão o que poderá resultar em uma alteração na resposta eletroquímica, mesmo sob condições amperométricas otimizadas.

4.3.6 Aplicação do Sistema BIA

O desempenho do método proposto foi avaliado, por meio da análise de duas amostras de salmão, após a otimização das condições ideais para a determinação de astaxantina por BIA com detecção amperométrica. A Tabela 6, a seguir, apresenta as concentrações encontradas de astaxantina em amostras de salmão e valores de recuperação relacionados para amostras enriquecidas. Conforme apresentado, os valores de recuperação ficaram entre 83 e 97%.

TABELA 6 - Valores de recuperação para amostras enriquecidas e concentrações de astaxantina encontrados em amostras de salmão comerciais pelo método proposto (n=3)

Amostras	Valor encontrado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Dopagem ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Valor recuperado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperação (%)
1A	0,95 \pm 0,20	9,00	9,69 \pm 0,19	97 \pm 2
1B	0,95 \pm 0,20	9,00	9,17 \pm 0,18	91 \pm 2
2A	1,85 \pm 0,06	3,00	4,20 \pm 0,15	83 \pm 2
2B	1,85 \pm 0,06	9,00	9,20 \pm 0,31	84 \pm 1

4.3.7 Conclusões Parciais - Determinação de Astaxantina em Amostras de Salmão Comercial

Este trabalho apresenta a primeira investigação sobre a oxidação eletroquímica de astaxantina em eletrodo de carbono vítreo não modificado. Com base na atividade eletroquímica de astaxantina em eletrodo de carbono vítreo, a detecção amperométrica usando um sistema BIA é demonstrada para a determinação do analito presente em amostras de salmão comercial. O método proposto é rápido (frequência analítica de 240 h^{-1} e frequência de amostragem de 120 h^{-1} considerando o tempo para preenchimento da micropipeta para novas adições), preciso (DPR de 2,4%) e apresenta o limite de detecção de $0,3\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ que corresponde a $0,1\text{ }\mu\text{g}$ de astaxantina g^{-1} da amostra, devido à detecção amperométrica sensível do analito em eletrodo de carbono vítreo. O método proposto foi aplicado com sucesso na análise de amostras de salmão com valores de recuperação entre 83 ± 2 e 97 ± 2 , os quais estão adequados considerando à complexidade das amostras de alimentos. Pode-se comparar tais valores com os valores de recuperação entre 86 ± 4 e 103 ± 2 encontrados por SILVA et al. (2012) em amostras de leite.

Adicionalmente, foram realizados testes comparativos por cromatografia líquida de alta eficiência, porém os resultados não foram satisfatórios, sendo estes menores ($\sim 75\%$) que os encontrados no método eletroquímico proposto. Conclui-se que a discrepância entre os resultados pode ter ocorrido, em razão da instabilidade térmica do padrão, durante a separação cromatográfica de cinco minutos, fotossensibilidade, uma vez que os estudos não foram simultâneos, entre outros fatores, os quais podem afetar a estrutura química o que dificulta a comparação entre resultados na análise da astaxantina. Além disso, o método por HPLC usado para comparação não é um método validado e portanto, precisaria ser melhor estudado e devidamente validado para utilização como método de comparação.

CONCLUSÕES

Com esta pesquisa, desmontrou-se a potencialidade da detecção por amperometria acoplada à técnica BIA no desenvolvimento de novos métodos de análise. Pela primeira vez, foi atestada a possibilidade de uso do sistema BIA com detecção amperométrica para a determinação da capacidade antioxidante, a partir do consumo de DPPH[•] e para a determinação de astaxantina em amostras de salmão comercial.

No método baseado no consumo do radical DPPH, o sistema BIA demonstrou ser um método rápido com frequência analítica real de 90 h⁻¹, de elevada precisão (DPR = 0,7%), alta sensibilidade e seletividade para o radical. Este método foi aplicado com êxito para avaliar a capacidade antioxidante de amostras de chá e de extratos de plantas, sendo que os resultados foram similares aos obtidos pelo método espectrofotométrico.

No segundo trabalho, foi possível investigar a oxidação eletroquímica da astaxantina em eletrodo de carbono vítreo não modificado. O método proposto apresentou características satisfatórias ao primeiro, tais como rapidez (frequência analítica real de 120 h⁻¹) e precisão (DPR de 2,4%). E pode-se aplicá-lo com sucesso na análise de amostras de salmão com valores de recuperação adequados.

Os métodos propostos utilizando o sistema BIA com detecção amperométrica mostraram ser simples, uma vez que se utilizam de um eletrodo de trabalho sem qualquer modificação química ou eletroquímica e sem nenhuma necessidade de polimento entre as análises e as etapas para preparo de amostra necessitam apenas de extração e/ou diluição.

São métodos rápidos, pois apresentam frequência analítica elevada se comparados a trabalhos nos quais a frequência analítica é de 70 injeções por hora e possuem maior portabilidade, visto que se utilizam de micropipetas eletrônicas e potenciostatos movidos a bateria, podendo ser aplicáveis em análises em campo.

Além disso, apresentam boa sensibilidade, seletividade e estabilidade para a determinação desses compostos antioxidantes. Dessa forma, todas essas características tornam os métodos ainda mais atraentes para aplicações em análises de rotina.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Resolução RE n.º 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2 jun. 2003.

ABDOLMAJID, L.; CHOUL-GYUN, L. Simultaneous Measurement of Chlorophyll and Astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* Cells by First-Order Derivative Ultraviolet-Visible Spectrophotometry. **Journal Bioscience Bioengineering**, Japão, v. 101, n. 2, p. 104 -110, fev. 2006.

AHMED, S.; TABASSUM, S.; SHAKEEL, F.; KHAN, A. Y. A Facile Electrochemical Analysis to Determine Antioxidant Activity of Flavonoids against DPPH Radical. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 159, n.5, p.103-109, fev. 2012.

AMIDI, S.; MOJAB, F.; MOGHADDAM, A. B.; TABIB, K.; KOBARFARD, F. **A Simple Electrochemical Method for the Rapid Estimation of Antioxidant Potentials of Some Selected Medicinal Plants. Services Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, Iran, v. 11, n. 1, p. 117-121, 2012.

ANDREI, V.; BUNEA, A. I.; TUDORACHE, A.; GASPAR, S.; VASILESCU, A. Simple DPPH-Based Electrochemical Assay for the Evaluation of the Antioxidant Capacity: a Thorough Comparison with Spectrophotometric Assays and Evaluation with Real-World Samples. **Electroanalysis**, New York, v. 26, n. 12, p. 2677-2685, jul. 2014.

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

AL-DABBAS, M. M.; AL-ISMAIL, K.; KITAHARA, K.; CHISHAKI, N.; HASHINAGA, F.; SUGANUMA, T.; TADERA, K. The effects of different inorganic salts, buffer systems, and desalting of Varthemia crude water extract on DPPH radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v.104, n. 2, p. 734-739, 2007.

ALMEIDA, E. S.; SILVA, L. A. ; SOUSA, R. M. ; RICHTER, E. M. ; FOSTER, C. W. ; BANKS, C. E.; MUNOZ, R. A. Organic-resistant screen-printed graphitic electrodes: Application to on-site monitoring of liquid fuels. **Analytica Chimica Acta**, v. 934, p. 1-8, ago. 2016.

_____.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. Voltammetric Lead Determination in Aviation Fuel Samples Using a Screen-Printed Gold Electrode and Batch-Injection Analysis. **Electroanalysis**, New York, v. 27, n. 3, p. 633 – 639, mar. 2015.

ALVAREZ-DIDUK, R.; IBARRA-ESCUZIA, P.; MARTY, J. L.; GALANO, A.; ROJAS-HERNÁNDEZ, A.; RAMÍREZ-SILVA, M. T. Electrochemical determination of the antioxidant capacity of organic compounds. **ECS Transactions**, Ensenada, v.15, n. 1, p. 471-478, jun. 2008.

AMBATI, R. R.; PHANG, S. M.; RAVI, S.; ASWATHANARAYANA, R. G. Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications - A Review. **Mar. Drugs**, v. 12, n. 1, p. 128-152, jan. 2014.

AMATATONGCHAI, M.; LAOSING, S.; CHAILAPAKUL, O.; NACAPRICHA, D. Simple flow injection for screening of total antioxidant capacity by amperometric detection of DPPH radical on carbon nanotube modified-glassy carbon electrode. **Talanta**, Amsterdam v. 97, p. 267-272, ago. 2012.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, Cambridge, v. 127, n. 1, p. 183-198, jan. 2002.

ANTIOCHIA, R.; GATTA, T.; MAZZONE, E.; MANNINA L.; CAMPANELLA, L. A comparison among three different analytical methods to test the scavenging properties of different integrators against radicalic stress. **J. Pharm. Sci.**, v. 27, p. 25-32, jan. 2014.

ARTS, I. C. W.; HOLLMAN, P. C. H. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **The American journal of clinical nutrition**, v. 81, n.1, p. 317S-325S, jan. 2005.

ATOUI, A. K., MANSOURI, A., BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food chemistry**, v. 89, n.1, p. 27-36, jan. 2005.

BAILEY, A. E.; HUI, Y. H. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. 5 ed. New York: John Wiley, 2005, v. 6.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse Oxidativo: Relação Entre Geração De Espécies Reativas E Defesa Do Organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, jan./fev. 2006.

BARROSO, M. F. **Métodos analíticos em processos de biodegradação de pesticidas** – o molinato. 2001. 82f. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente) – Programa de Pós-graduação em Engenharia do Ambiente, Departamento de Engenharia Química da Universidade do Porto, Porto, 2001.

BELITZ, H. D. G., BELITZ, W. H. D.; GROSCH, W. **Química de los alimentos**. Acribia: Zaragoza, 1988.

BENDICH, A. Non vitamin a activity of carotenoids: immune enhancement. **Food Science and Technology**, v. 2, p. 127-129, maio. 1991.

BEZERRA, F. J. L.; VALE, N. B.; MACEDO, B. O.; REZENDE, A. A.; ALMEIDA, M. das G. A. Avaliação de Parâmetros Antioxidantes em Ratos Tratados com Sevofluran. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Campinas, v. 60, n. 2, p. 162-169, mar./abr. 2010.

BOTTERWECK, A. A. M.; VERHAGEN, H. ; GOLDBOHN, R. A. ; KLEINJANS, J.; VAN DEN BRANDT, P. A. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated

hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 599-605, jul. 2000.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n.1, p. 25-30, dez. 1995.

BRETT, A. M. C. F. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica: princípios, métodos e aplicações**. Coimbra: Almedina, 1996.

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; MITOSERIU, L. C. Amperometric batch injection analysis: Theoretical aspects of current transients and comparison with wall-jet electrodes in continuous flow. **Electroanalysis**, New York, v. 7, n. 3, p. 225-229, maio 1994.

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; MITOSERIU, L. C. Amperometric and voltammetric detection in batch injection analysis. **Analytical Chemistry**, v. 66, n.19, p. 3145-3150, maio 1994.

BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. Carotenoids. Handbook; Birkhauser Verlag: Basel, Boston: Berlin, p. 1-647, 2004, v.5.

BUCK, D. F. Antioxidants in soya oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 58, n. 3, p. 275-278, mar. 1981.

BURATTI, S.; SCAMPICCHIO, M.; GIOVANELLI, G.; MANNINO, S. A low-cost and low-teach electrochemical flow system for the evaluation of total phenolic content and antioxidant power of tea infusions. **Talanta**, Amsterdam, v. 75, n. 1, p. 312-316, mar. 2008.

CARAMIT, R. P.; LUCCA, B. G.; SOUZA FERREIRA, V.; ABARZA MUNOZ, R. A., RICHTER, E. M.; Da SILVA, R. A. B. On-Site Determination of Carbendazim, Cathecol and Hydroquinone in Tap Water Using a Homemade Batch Injection Analysis Cell for Screen Printed Electrodes. **Electroanalysis**, New York, v. 27, n. 2, p. 271-275, 5 fev. 2015.

CARDOSO, R. M.; MONTES, R. H.; LIMA, A. P.; DORNELLAS, R. M.; NOSSOL, E.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. Multi-walled carbon nanotubes: Size-dependent electrochemistry of phenolic compounds. **Electrochimica Acta**, local?, 10 set. 2015, v. 176, p. 36-43.

CAMPANELLA, L.; BONANNI, A.; BELLANTONI, D.; TOMASSETTI, M. Biosensors for determination of total antioxidant capacity of phytoterapeutic integrators: Comparison with other spectrophotometric, fluorimetric and voltammetric methods. **J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, n. 2, p. 303-320, abr. 2004.

CATARINO, R. I.; CONCEIÇÃO, A. C.; GARCIA, M. B. Q.; GONÇALVES, M. L. S.; LIMA, J. L.; Dos SANTOS, M. C. Flow amperometric determination of pharmaceuticals with on-line electrode surface renewal. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, n. 4, p. 571-580, nov. 2003.

CUNHA, R. R.; TORMIN, T. F.; RICHTER, E. M.; MUÑOZ, R. A. A. Determinação rápida de hidroquinona usando análise por injeção em batelada (BIA) com detecção amperométrica. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 5, p. 663-668, fev. 2013.

Da COSTA OLIVEIRA, T., FREITAS, J. M., MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. A batch injection analysis system with square-wave voltammetric detection for fast and simultaneous determination of naphazoline and zinc. **Talanta**, Amsterdam, v. 152, p. 308-313, maio 2016.

De CARVALHO, R. M.; FREIRE, R. S.; RATH, S.; KUBOTA, L. T. Effects of EDTA on signal stability during electrochemical detection of acetaminophen. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, n. 5, p. 871-878, out. 2004.

DIAS, A. A., CARDOSO, T. M., CARDOSO, R. M., DUARTE, L. C., MUÑOZ, R. A., RICHTER, E. M.; COLTRO, W. K. Paper-based enzymatic reactors for batch injection analysis of glucose on 3D printed cell coupled with amperometric detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 226, p. 196-203, abr. 2016.

DIPLOCK, A. T.; CHARLEUX, J. L.; CROZIER-WILLI, G.; KOK, F. J.; RICE-EVANS, C.; ROBERFROID, M.; STAHL, W.; VIÑA-RIBES, J. Functional food science and defence against reactive oxidative. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 80, n. S1, p. S77-S112, 1998.

DORNELLAS, R. M.; TORMIN, T. F.; RICHTER, E. M.; AUCELIO, R. Q.; MUÑOZ, R. A. Electrochemical Oxidation of the Fungicide Dimoxystrobin and Its Amperometric Determination by Batch-Injection Analysis. **Analytical Letters**, v. 47, n.3, p. 492-503, fev. 2014.

DORNELLAS, R. M., MUNOZ, R. A.; AUCELIO, R. Q. Electrochemical determination of picoxystrobin on boron-doped diamond electrode: square-wave voltammetry versus BIA-multiple pulse amperometry. **Microchemical Journal**, v. 123, p. 1-8, maio 2015.

Dos SANTOS, W. T. P.; GIMENES, D. T.; DE ALMEIDA, E. G. N.; EIRAS, S. P.; ALBUQUERQUE Y. D. T.; RICHTER, E. M. Simple flow injection amperometric system for simultaneous determination of dipyrone and paracetamol in pharmaceutical formulations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1249-1255, maio 2009.

Dos SANTOS PEREIRA, L. N.; DA SILVA, I. S.; ARAÚJO, T. P.; TANAKA, A. A.; ANGNES, L. Fast quantification of α -lipoic acid in biological samples and dietary supplements using batch injection analysis with amperometric detection. **Talanta**, Amsterdam, v. 154, p. 249-254, jul. 2016.

DHANKHAR, J.; KADIAN, S.S.; SHARMA, A. Astaxanthin: A potential carotenoid. **Int. J. Pharm. Sci. Res.**, v. 3, p. 1246-1259, maio 2012.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; DOS SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Evaluation of the antioxidant activity using the β -carotene/linoleic acid system and the DPPH scavenging method. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, abr./jun. 2006.

FERREIRA, L.; MARTINS, P. R.; ARAKI, K.; TOMA, H. H.; ANGNES, L. Amperometric Folic Acid Quantification Using a Supramolecular Tetra-ruthenated Nickel Porphyrin μ -

Peroxo-Bridged Matrix Modified Electrode Associated to Batch Injection Analysis. **Electroanalysis**, New York, v. 27, n. 10, p. 2322-2328, out. 2015.

FOCSAN, A. L.; PAN, S.; KISPERT, L. D. Electrochemical Study of Astaxanthin and Astaxanthin n-Octanoic Monoester and Diester: Tendency to Form Radicals. **J. Physical Chemistry B**, Tuscaloosa, v. 118, p. 2331-2339, ago. 2013.

FRANKEL, E. N. Lipid oxidation. **Progress in lipid research**, Califórnia, v. 19, n.1, p. 1-22, fev. 1980.

FRASSANITO, R.; CANTONATI, M.; FLAIM, G.; MANCINI, I.; GUELLA G. A new method for the identification and the structural characterisation of carotenoid esters in freshwater microorganisms by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom**, v. 22, n. 22, p. 3531-3539, nov. 2008.

FREIRE, P. G., MONTES, R. H., ROMEIRO, F. C., LEMOS, S. C., LIMA, R. C., RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. Morphology of ZnO nanoparticles bound to carbon nanotubes affects electrocatalytic oxidation of phenolic compounds. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 223, p. 557-565, fev. 2016.

FREITAS, J. M.; RAMOS, D. L.; SOUSA, R. M.; PAIXÃO, T. R.; SANTANA, M. H., MUÑOZ, R. A.; RICHTER, E. M. A portable electrochemical method for cocaine quantification and rapid screening of common adulterants in seized samples. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 243, p. 557-565, maio 2017.

FRIDOVICH, I. Fundamental Aspects of Reactive Oxygen Species, or What's the Matter with Oxygen? **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 893, n.1, p. 13-18, nov. 1999.

GIMENES, D. T. **Desenvolvimento de metodologias analíticas usando FIA com detecção amperométrica: análise de dopamina, ácido ascórbico e ácido úrico**. 2009. 103f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

_____.; PEREIRA, P. F.; CUNHA, R. R.; SILVA, A. B.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. A simple strategy to improve the accuracy of the injection step in batch injection analysis systems with amperometric detection. **Electroanalysis**, New York, v. 24, n. 9, p. 1805-1810, set. 2012.

_____.; MARRA, M. C.; DE FREITAS, J. M.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Simultaneous determination of captopril and hydrochlorothiazide on boron-doped diamond electrode by batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, New York, v. 212, p. 411-418, jun. 2015.

_____.; SANTOS, W. T. P.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Internal standard in flow injection analysis with amperometric detection. **Electrochemistry Communications**, New York, v. 12, n. 2, p. 216-218, fev. 2010a.

_____.; MARRA, M. C.; MUÑOZ, R. A. A., ANGNES, L.; RICHTER, E. M. Determination of propranolol and hydrochlorothiazide by batch injection analysis with

amperometric detection and capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **Analytical Methods**, local?, v. 6, n.10, p. 3261-3267, mar. 2014.

_____.; CUNHA, R. R.; DE CARVALHO RIBEIRO, M. M. A.; PEREIRA, P. F.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Two new electrochemical methods for fast and simultaneous determination of codeine and diclofenac. **Talanta**, Amsterdam v. 116, p. 1026-1032, nov. 2013.

GUARATINI, T.; CARDOZO, K. H. M.; PINTOC, E.; COLEPICOLO, P. Comparison of Diode Array and Electrochemical Detection in the C30 Reverse Phase HPLC Analysis of Algae Carotenoids. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 20, n. 9, p. 1609-1616, set. 2009.

GUERIN, M.; HUNTLEY, M. E.; OLAIZOLA, M. *Haematococcus* astaxanthin: Applications for human health and nutrition. **Trends Biotechnol.**, v. 21, p. 210-216, maio. 2003.

GULCIN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, n.3, p. 345-391, mar. 2012.

GUTIERREZ, A.; OSEGUEDA, S.; GUTIÉRREZ-GRANADOS, S.; ALATORRE, A.; GARCÍA, M.; GODÍNEZ, L. A. Amperometric Detection and Quantification of 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) Using Dendrimer Modified Electrodes". **Electroanalysis**, New York, v. 20, n. 21, p. 2294-2300, nov. 2008.

HAGHIGHI, B.; RAHMATI-PANAH, A.; SHLEEV, S.; GORTON, L. Carbon ceramic electrodes modified with laccase from *Trametes hirsuta*: fabrication, characterization and their use for phenolic compounds detection. **Electroanalysis, New York**, v. 19, n. 9, p. 907-917, abr. 2007.

HAN, R. M.; TIAN, Y. X.; WU, Y. S.; WANG, P.; AI, X. C.; ZHANG, J. P.; SKIBSTED L. H. Mechanism of Radical Cation Formation from the Excited States of Zeaxanthin and Astaxanthin in Chloroform. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, p. 538-546, mar. 2006.

HALLIWELL, B. **The antioxidant paradox**. **The Lancet**, v. 355, n. 9210, p. 1179 - 1180, abr. 2000.

_____.; GUTTERIDGE, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 1-85, jan. 1990.

_____. Reactive oxygen species and the central nervous system. In: **FREE RADICALS IN THE BRAIN**. Springer: Berlin Heidelberg, p. 21-40, 1992.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of natural products**, v. 59, n.2, p. 205-215, fev. 1996.

HIGUERA-CIAPARA, I.; FELIX-VALENZUELA, L.; GOYCOOLEA, F.M. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, v. 46, n. 2, p. 185-196, 2006.

HOTTA, H.; NAGANO, S.; UEDA, M.; TSUJINO, Y.; KOYAMA, J.; OSAKAI, T. Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical

reactions following their oxidation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, p.123-132, set. 2002.

HUANG, D.; BOXIN, O. U.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, mar. 2005.

HUSSEIN, G.; SANKAWA, U.; GOTO, H.; MATSUMOTO, K.; WATANABE, H. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. **J. Nat. Prod.**, v. 69, p. 443-449, mar. 2006.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**. DOQ-CGCRE-008. Brasília, 2003.

IWAMOTO, T.; HOSODA, K.; HIRANO, R.; KURATA, H.; MATSUMOTO, A.; MIKI, W.; KAMIYAMA, M.; ITAKURA, H. YAMAMOTO, S.; KONDO, K. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by astaxanthin. **J. Atheroscler. Thromb.**, v. 7, n. 4, p. 216-222, 2000.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P.; SAKARIAH, K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. **Food Chemistry**, v. 73, n. 3, p. 285-290, maio 2001.

JIA, W.; GUO, M.; ZHENG, Z.; YU, T.; WANG, Y.; RODRIGUEZ, E. G.; LEI, Y. Vertically aligned CuO nanowires based electrode for amperometric detection of hydrogen peroxide. **Electroanalysis**, New York, v. 20, n.19, p. 2153–2157 jul. 2008.

JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, I.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; SAURA-CALIXTO, F. Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n.11, p. 1686-1690, jul. 2000.

JYONOUCHI, H.; SUN, S.; IJIMA, K.; GROSS, M. Antitumor activity of astaxanthin and its mode of action. **Nutrition and Cancer**, v. 36, n. 1, p. 59-65, 2000.

KIDD, P. Astaxanthin, cell membrane nutrient with diverse clinical benefits and anti-aging potential. **Altern. Med. Rev.** v. 16, n. 4, p. 355-364, dez. 2011.

KIM, S.; CHO, E.; YOO, J.; CHO, E.; CHOI, S. J.; SON, S. M.; LEE, J. M.; IN, MAN-JIN; KIM, D. C.; KIM, JIN-HYUN.; CHAE, H. J. β -CD-mediated Encapsulation Enhanced Stability and Solubility of Astaxanthin. **J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.**, v. 53, p. 559-565, 2010.

KISSINGER, P.T.; W.R. HEINEMAN. **Cyclic voltammetry**. **Journal of Chemical Education**, v. 60, n. 9, p. 702, set. 1983.

LABUZA, T. P.; DUGAN JR, L. R. Kinetics of lipid oxidation in foods. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, Minesota, v. 2, n. 3, p. 355-405, out. 1971.

LITESCU, S.; OPREA, E.; DIACONU, M.; LUCIAN RADU, G. A rapid determination of radical scavenger properties of plant extracts using electrochemical approach. **Revue Roumaine Chimie**, v. 56, n.1, p. 25-32, jan. 2011.

LITESCU, S. C.; RADU, G. L. Estimation of the antioxidative properties of tocopherols-an electrochemical approach. **European Food Research and Technology**, v. 211, p. 218-221, ago. 2000.

LIU, Z. Q. Chemical methods to evaluate antioxidant ability. **Chemical Reviews**, v. 110, n.10, 5675-5691, jul. 2010.

MACDONALD-WICKS, L. K.; WOOD, L. G.; GARG, M. L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 86, n.13, p. 2046-2056, ago. 2006.

MACHADO FREITAS, J.; DA COSTA OLIVEIRA, T.; SILVA, P. L.; TOFANELLO GIMENES, D.; ABARZA MUNOZ, R. A.; RICHTER, E. M. Development of a simple and fast electrochemical method for screening and stoichiometric determination of dimenhydrinate. **Electroanalysis**, New York, v. 26, n. 9, p. 1905-1911, ago. 2014.

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

MARTINS, P. R., FERREIRA, L. M. C., ARAKI, K.; ANGNES, L. Influence of cobalt content on nanostructured alpha-phase-nickel hydroxide modified electrodes for electrocatalytic oxidation of isoniazid. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 192, p. 601-606, mar. 2014.

MIKI, W. Biological functions and activities of animal carotenoids. **Pure Applied Chem.**, v. 63, n. 1, p. 141-146, 1991.

MILARDOVIC, S., IVEKOVIĆ, D., RUMENJAK, V.; GRABARIĆ, B. S. Use of DPPH·|DPPH Redox Couple for Biamperometric Determination of Antioxidant Activity. **Electroanalysis**, New York, v.17, n. 20, p.1847-1853, jul. 2005.

MONTES, R. H. de O. **Efeito do tamanho de nanotubos de carbono de paredes múltiplas em sensores eletroquímicos para moléculas de interesse farmacêutico**. 2015. 178f. Tese Doutorado em Química – Instituto de Química Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

_____.; MARRA, M. C.; RODRIGUES, M. M.; RICHTER, E. M.; MUÑOZ, R. A. A. Fast Determination of Ciprofloxacin by Batch Injection Analysis with Amperometric Detection and Capillary Electrophoresis with Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection. **Electroanalysis**, New York, v. 23, p. 432-438, jan. 2014a.

_____.; STEFANO, J. S., RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. Exploring multiwalled carbon nanotubes for naproxen detection. **Electroanalysis**, New York, v. 26, n.7, p. 1449-1453, jun. 2014b.

_____.; DORNELLAS, R. M., SILVA, L. A., SQUISSATO, A. L., RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. Amperometric determination of the insecticide fipronil using batch injection analysis: comparison between unmodified and carbon-nanotube-modified electrodes. **Journal of Solid State Electrochemistry**, New York, v. 20, n.9, p. 2453-2459, 2015.

MONTES, R. H.; LIMA, A. P.; DOS SANTOS, V. B.; VIDAL, D. T.; DO LAGO, C. L.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. Carbon-nanotube amperometric sensor for selective

determination of 4-chloroaniline in commercial chlorhexidine solutions. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 231, p. 38-44, ago. 2016.

MORAIS, S. A. L. D.; AQUINO, F. J. T. D.; NASCIMENTO, P. M. D.; NASCIMENTO, E. A. D.; CHANG, R. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café conilon submetido a diferentes graus de torra. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 327-331, fev. 2009.

MOSKOVITZ, J.; YIM, M. B.; CHOCK, P. B. Free radicals and disease. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 397, n. 2, p. 354-359, jan. 2002.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n.1, p. 95-111, nov. 2004.

NAGUIB, Y. M. A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. **J. Agric. Food Chem**, v. 48, n. 4, p. 1150-1154, abr. 2000.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, Japan, v. 29, n. 4, p. 273-300, 1990.

NISHINO, H. Cancer prevention by carotenoids. **Mutat. Res.**, v. 402, n.1-2, p. 159-163, jun. 1998.

OLIVEIRA, S. C.; CIRILO, A. T. O.; BASTOS, V. S.; AQUINO, A. C. M. S.; CASTRO, A. A.; NARAIN, N. Estudo da Extração e Estabilidade dos Carotenóides em Amostras de Salmão (*Salmo salar*) Cru Resfriado e Congelado Durante o Armazenamento. **Scientia Plena**, São Cristovão, v. 7, n. 5, p. 1-6, maio 2011.

PEDROSA, V. A.; LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. FIA Determination of Paracetamol in Pharmaceutical Drugs by Using Gold Electrodes Modified with a 3-Mercaptopropionic Acid Monolayer. **Electroanalysis**, New York, v. 18, n.9, p. 931-934, abr. 2006.

PEDROTTI, J. J.; ANGNES, L.; GUTZ, I. G. R. Miniaturized reference electrodes with microporous polymer junctions. **Electroanalysis**, New York, v. 8, n. 7, p. 673-675, jul. 1996.

PEREIRA, P. F.; MARRA, M. C.; MUNOZ, R. A.; RICHTER, E. M. Fast batch injection analysis system for on-site determination of ethanol in gasohol and fuel ethanol. **Talanta**, Amsterdam, v. 90, p. 99-102, fev. 2012a.

PEREIRA, P. F.; MARRA, M. C.; LIMA, A. B.; DOS SANTOS, W. T. P.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Fast and simultaneous determination of nimesulide and paracetamol by batch injection analysis with amperometric detection on bare boron-doped diamond electrode. **Diamond and Related Materials**, Switzerland, v. 39, p. 41-46, out. 2013.

PEREIRA, P. F.; MARRA, M. C.; CUNHA, R. R.; DA SILVA, W. P.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Two simple and fast electrochemical methods for simultaneous determination of promethazine and codeine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, local?, v. 713, p. 32-38, jan. 2014.

PEREIRA, P. F.; SILVA, W. P. D.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Fast and simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim using batch

injection analysis with amperometric detection and boron-doped diamond electrode. **Química Nova**, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 663-668, jun. 2015.

PEREIRA, P. F.; DA SILVA, W. P.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. A simple and fast batch injection analysis method for simultaneous determination of phenazopyridine, sulfamethoxazole, and trimethoprim on boron-doped diamond electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 766, p. 87-93, 2016.

PILJAC-ŽEGARAC, J.; VALEK, L.; STIPČEVIĆ, T.; MARTINEZ, S. Electrochemical determination of antioxidant capacity of fruit tea infusions. **Food chemistry**, v.121, n. 3, p. 820-825, ago. 2010.

PORFÍRIO, D. A.; FERREIRA, R. Q.; MALAGUTTI, A. R.; VALLE, E. M. Eletrochemical study of the increased antioxidant capacity of flavonoids through complication with iron(II) ions. **Electrochimica Acta**, v. 141, p. 33-38, set. 2014.

PRIOR, R. L.; CAO, G. Flavonoids: Diet and health relationship. **Nutr. Clin. Care**, Arkansas, v. 3, p. 279-288, out. 2000.

QUINTINO, M. D. S. M. **Desenvolvimento de sensores eletroquímicos associados a batch injection analysis (BIA) para aplicações analíticas**. 2003. 117f. São Paulo. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, 2003.

QUINTINO, M. S. M.; ANGNES L. Batch injection analysis: An almost unexplored powerful tool. **Electroanalysis**, New York, v. 16, n.7, p. 513-523, abr. 2004.

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

REIS, N. S.; SERRANO, S. H. P.; MENEGHATTI, R.; GIL, E. de S. Métodos Eletroquímicos usados para Avaliação da Atividade Antioxidante de Produtos Naturais. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 28, n. 6, p. 949-953, jun. 2009.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, set./out. 2004.

RICHTER, E. M.; FRACASSI DA SILVA, J. A.; GUTZ, I. G. R.; DO LAGO, C. L.; ANGNES, L. Disposable twin gold electrodes for amperometric detection in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, Wernheim, v. 25, n. 17, p. 2965-2969, set. 2004.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n.1, p. 53-60, jan./mar. 2007.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n.2, p. 270-276, fev. 1998.

SARADA, R.; TRIPATHI, U.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. **Process Biochem.**, v. 37, n. 6, p. 623-627, jan. 2002.

_____.; RANGA RAO, A.; SANDESH, B. K.; DAYANANDA, C.; ANILA, N.; CHAUHAN, V. S.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of different culture conditions on yield of biomass and value added products in microalgae. **Dyn. Biochem. Proc. Biotechnol. Mol. Biol.**, Mysore, v. 6, p. 77- 85, 2012.

SCALBERT, A.; JOHNSON, I. T.; SALTMARSH, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **The American journal of clinical nutrition**, v. 81, n.1, p. 215S-217S, jan. 2005.

SIES, H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3, p. 31-38, set. 1991.

SILVA, R. A. B.; MONTES, R. H. O.; RICHTER, E. M.; MUÑOZ, R. A. A. Rapid and selective determination of hydrogen peroxide residues in milk by batch injection analysis with amperometric detection. **Food Chemistry**, v. 133, n. 1, p. 200-204, jul. 2012.

SILVA, R. A.; SILVA, L. A.; MUNOZ, R. A.; RICHTER, E. M.; OLIVEIRA, A. C. Fast and direct determination of mancozeb through batch injection analysis with amperometric detection on boron-doped diamond electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 733, p. 85-90, nov. 2014.

SILVA, A. A.; SILVA, L. A.; MUNOZ, R. A.; OLIVEIRA, A. C.; RICHTER, E. M. Determination of Amlodipine and Atenolol by Batch Injection Analysis with Amperometric Detection on Boron-doped Diamond Electrode. **Electroanalysis**, New York, v. 28, n.7, p. 1455-1461, fev. 2016.

SIMIC, M. G.; JOVANOVIC, S. V. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. **ACS symposium series e books (USA)**, v. 547, n.1, p. 20 – 32, maio. 1994.

SHIMIDZU, N.; GOTO, M.; MIKI, W. Carotenoids as singlet oxygenquenchers in marine organisms. **Fisheries Science**, v. 62, n. 1, p. 134-137, 1996.

SHAI DAROVA, L. G.; CHELNOKOVA, I. A.; DEGTEVA, M. A.; MAKHMUTOVA, G. F.; LEKSINA, Y. A.; GEDMINA, A. V.; BUDNIKOV, G. K. Amperometric Detection Under Batch-Injection Analysis Conditions of Caffeine on an Electrode Modified by Mixed-Valence Iridium and Ruthenium Oxides. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 49, n.10, p. 711-714, jan. 2016.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principios de análises instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SOUSA, R. M. F.; LIRA, C. S.; RODRIGUES, A. O.; MORAIS, S. A. L.; QUEIROZ, C. R. A. A.; CHANG, R.; AQUINO, F. J. T.; MUÑOZ, R. A. A.; OLIVEIRA, A. Atividade antioxidante de extratos de folhas de ora-pro-nóbis (*pereskia aculeata* mill.) usando métodos espectrofotométricos e voltamétricos. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 3, p. 448-456, 2014.

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

SOONG, Y.; BARLOW, P. J. Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 97, n. 3, p. 524-530, ago. 2006.

SOUSA, C. M. D. M.; SILVA, H. R. E.; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S. D.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. D. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, mar./abr. 2007.

STEFANO, J. S.; DE LIMA, A. P.; MONTES, R. H. O.; RICHTER, E. M.; MUÑOZ, R. A. A. Fast determination of naproxen in pharmaceutical formulations by batch injection analysis with pulsed amperometric detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 10, p. 1834-1838, out. 2012.

STEFANO, J. S.; CORDEIRO, D. S.; MARRA, M. C.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. Batch-injection versus Flow-injection Analysis Using Screen-printed Electrodes: Determination of Ciprofloxacin in Pharmaceutical Formulations. **Electroanalysis**, New York, v. 28, n.2, p. 350-357, fev. 2016.

TIRAWATTANAKOSON, R.; RATTANARAT, P.; NGAMROJANAVANICH, N.; RODTHONGKUM, N.; CHAILAPAKUL, O. Free radical scavenger screening of total antioxidant capacity in herb and beverage using graphene/PEDOT: PSS-modified electrochemical sensor. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 767, p. 68-75, abr. 2016.

TORMIN, T. F.; CUNHA, R. R.; RICHTER, E. M.; MUÑOZ, R. A. A. Fast simultaneous of BHA and TBHQ antioxidants in biodiesel by batch injection analysis with pulsed-amperometric detection. **Talanta**, Amsterdam, v. 99, p. 527-531, set. 2012.

TORMIN, T. F.; CUNHA, R. R.; SILVA, R. A. B.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Combination of screen printed electrodes and batch injection analysis: a simple, robust, high-throughput, and portable electrochemical system. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 202, p. 93-98, out. 2014.

_____.; NARCISO, L. C.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. Batch-injection stripping voltammetry of metals in fuel bioethanol. **Fuel**, v. 117, p. 952-956, jan. 2014.

_____.; _____.; _____.; _____. Batch-injection stripping voltammetry of zinc at a gold electrode: application for fuel bioethanol analysis. **Electrochimica Acta**, v. 164, p. 90-96, maio 2015a.

_____.; OLIVEIRA, G. K.; RICHTER, E. M., & MUNOZ, R. A. Voltammetric Determination of Pb, Cu and Hg in Biodiesel Using Gold Screen-printed Electrode: Comparison of Batch-injection Analysis with Conventional Electrochemical Systems. **Electroanalysis**, New York, v. 28, n. 5, p. 940 - 946, nov. 2015b.

TRIKHA, M.; CORRINGTON, R.; KLEIN, B.; ROSSI, J. F. Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer a review of the rationale and clinical evidence. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n.13, p. 4653-4665, out. 2003.

VALDIVIELSO, I.; BUSTAMANTE, M. A.; DE GORDOA, J. C. R.; NÁJERA, A. I.; DE RENOBLES, M.; BARRON, M. L. J. R. Simultaneous analysis of carotenoids and tocopherols in botanical species using one step solid-liquid extraction followed by high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 173, p. 709-717, abr. 2015.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C. J.; TELSER, J. V. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 266, n. 1, p. 37-56, nov. 2004.

VARODI, C.; GLIGOR, D.; MURESAN, L. M. Carbon paste electrodes incorporating synthetic zeolites and methylene blue for amperometric detection of ascorbic acid. **Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia**, v. 52, n.1, p. 109-11, jan. 2007.

VASILESCU, I.; EREMIA, S. A.; ALBU, C.; RADOI, A.; LITESCU, S. C.; RADU, G. L. Determination of the antiradical properties of olive oils using an electrochemical method based on DPPH radical. **Food chemistry**, v.166, p.324-329, jan. 2015.

WANG, J.; CHEN, L. Small-volume batch-injection analyser. **Analyst**, v. 119 n. 6, p. 1345-1348, 1994.

WANG, J.; CHEN, L.; ANGNES, L.; TIAN, B. Computerized pipettes with programmable dispensation. **Analytica chimica acta**, v. 267, n.1, p. 171-177, set. 1992.

WANG, J. ; TAHA, Z. Batch injection analysis. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 1053-1056, maio 1991.

YUAN, J. P.; PENG, J.; YIN, K.; WANG, J. H. Potential health promoting effects of astaxanthin: A high-value carotenoid mostly from microalgae. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 55, n. 1, p. 150-165, jan. 2011.

YAMASHITA, E. Astaxanthin as a medical food. **Funct. Foods Health Dis.**, v. 3, n. 7, p. 254-258, jul. 2013.

YANG, Y.; KIM, B.; LEE, J. Y. Astaxanthin structure, metabolism, and health benefits. **J. Hum. Nutr. Food Sci.**, v. 1003, p. 1-11, 2013.

ZHANG, W.; WANG, G.; ZHANG, X.; FANG, B. Amperometric Detection of Hydrogen Peroxide Using Glassy Carbon Electrodes Modified with Chromium Hexacyanoferrate/Single-Walled Carbon Nanotube Nanocomposites. **Electroanalysis**, New York, v. 21, n.2, p. 179-183, jan. 2009.

ZHENG, M.; STORZ, G. Redox sensing by prokaryotic transcription factors. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, n.1, p. 1-6, jan. 2000.

ANEXO

Publicações no Doutorado

PUBLICAÇÃO EM REVISTAS CIENTÍFICAS DE ARTIGOS RELACIONADOS A TESE

1. **OLIVEIRA, GRACY K. F.**; TORMIN, THIAGO F.; SOUSA, RAQUEL M.F.; DE OLIVEIRA, ALBERTO; DE MORAIS, SÉRGIO A.L.; RICHTER, EDUARDO M.; MUNOZ, RODRIGO A.A. "Batch-injection analysis with amperometric detection of the DPPH radical for evaluation of antioxidant capacity". *Food Chemistry*, v.192, p.691 - 697, **2016**.

2. **OLIVEIRA, GRACY K. F.**; TORMIN, THIAGO F.; DE'O.'MONTES, RODRIGO H.; RICHTER, EDUARDO M.; MUÑOZ, RODRIGO A. A. "Electrochemical Oxidation of Astaxanthin on Glassy-carbon Electrode and its Amperometric Determination Using Batch Injection Analysis (BIA)". *Electroanalysis* (New York, N.Y.), v.28, p.2143 - 2148, **2016**.

DEMAIS PUBLICAÇÕES EM REVISTAS CIENTÍFICAS

3. TORMIN, THIAGO F.; **OLIVEIRA, GRACY K. F.**; RICHTER, EDUARDO M.; MUNOZ, RODRIGO A. A. "Voltammetric Determination of Pb, Cu and Hg in Biodiesel Using Gold Screen-printed Electrode: Comparison of Batch-injection Analysis with Conventional Electrochemical Systems". *Electroanalysis* (New York, N.Y.). , v.28, p.940 - 946, **2016**.

CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO

1. SOUSA, R. M. F.; **OLIVEIRA, G. K. F.**; OLIVEIRA, A.; MORAIS, S. A. L.; MUNOZ, R. A. A. "Determination of 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Method In: Flow Injection Analysis of Food Additives". 1 ed. Boca Raton : Taylor & Francis group, v.29, p. 539-569, **2015**.