

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

IANA VITÓRIA SPADINI ARANTES

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DA
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE ÓLEOS COMESTÍVEIS UTILIZANDO
SISTEMA BIA COM DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA**

UBERLÂNDIA

2018

IANA VITÓRIA SPADINI ARANTES

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DA
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE ÓLEOS COMESTÍVEIS UTILIZANDO
SISTEMA BIA COM DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Química da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Química Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alejandro
Abarza Muñoz.

UBERLÂNDIA

2018

IANA VITÓRIA SPADINI ARANTES

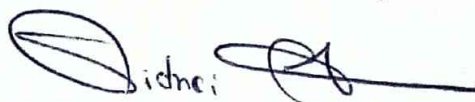
**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DA
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE ÓLEOS COMESTÍVEIS UTILIZANDO
SISTEMA BIA COM DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Química da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Química Industrial.

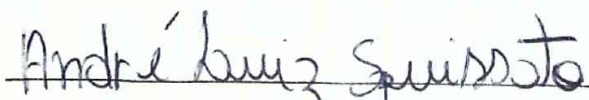
Uberlândia, 07 de dezembro de 2018



Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz
(Orientador)



Prof. Dr. Sidnei Gonçalves da Silva
(Examinador)



Doutorando André Luiz Squissato
(Examinador)

RESUMO

O presente trabalho apresenta um método eletroanalítico para determinação da capacidade antioxidante de óleos comestíveis. O método utiliza eletrodos impressos de grafite (SPGE, do inglês *Screen-Printed Graphitic Electrode*) descartáveis acoplados a uma célula de análise por injeção em batelada (BIA), e baseia-se na medida do consumo do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Os SPGE's utilizados nesse trabalho são eletrodos resistentes a solventes orgânicos e, dessa forma, compatíveis com as amostras de óleo e demais solventes orgânicos utilizados para preparo das soluções de DPPH. A reação de DPPH com as amostras de óleo, ou padrão de antioxidante, sendo eles α -tocoferol, ácido cafeico e butil-hidroxitolueno (BHT), foi realizada na proporção de 25 μL de amostra para 5,0 mL de DPPH, deixando reagir por 1 h ao abrigo da luz. Uma micropipeta automática controla a velocidade de injeção ($193 \mu\text{L s}^{-1}$) e o volume das amostras (150 μL) injetadas sob o eletrodo de trabalho, imerso em uma solução eletrolítica de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ LiCl em metanol/etanol 1:1 v/v contida na célula BIA. O DPPH remanescente após a reação foi determinado por amperometria a um potencial fixo de +0,1 V (vs. pseudo AgCl). A capacidade antioxidante (porcentagem de consumo de DPPH e mg de antioxidante equivalente nas amostras) foi obtida utilizando o método proposto em comparação com o método espectrofotométrico. Os resultados são similares de acordo com o teste t pareado (95% de confiança). Além disso, o método é preciso (DPR = 2,3%; n = 12), rápido (180 h^{-1}), apresenta um baixo limite de detecção de DPPH ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) e permite análises em campo.

Palavras-chave: Antioxidantes. Amperometria. BIA. DPPH. Eletrodos impressos. Óleos comestíveis. Tocoferol. Ácido Cafeico. BHT.

ABSTRACT

This work reports an electroanalytical method for the determination of antioxidant capacity of edible oils. This method uses a disposable screen-printed graphitic electrode (SPGE) coupled with a batch-injection analysis cell (BIA), based on the measurement of the consumption of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). The SPGE's used in this work are organic-resistant electrodes and thus compatible with oil samples and organic solvents used to dissolve DPPH. The reaction between DPPH and oil samples or antioxidant standard, such as α -tocopherol, caffeic acid and butyl-hydroxitoluene (BHT), was performed by the reaction of a mixture containing 25 μ L of sample and 5.0 mL of DPPH for 1 hour protected from light. A micropipette controlled the release ($193 \mu\text{L s}^{-1}$) of sample (150 μ L) upon the working electrode immersed in an electrolytic solution of 1:1 v/v ethanol/methanol containing 0.05 mol L^{-1} LiCl contained in the BIA cell. The remaining DPPH was amperometrically detected at +0.1 V (vs. pseudo AgCl). The antioxidant capacity (percentage of DPPH scavenging and mg equivalent of tocopherol in the samples) was obtained using the proposed and spectrophotometric methods. The results were in agreement according to paired *t*-test (confidence level of 95%). Moreover, the method is precise (RSD = 2.3%; *n*=12), fast (180 h^{-1}), presents low detection limit of DPPH ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$), and allows on-site analysis.

Keywords: Antioxidants. Amperometry. BIA. DPPH. Edible oils. Screen-Printed Electrodes. Tocopherol. Caffeic acid. BHT.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema geral de mecanismo de oxidação.	14
Figura 2 – Mecanismo de ação para os antioxidantes primários.....	15
Figura 3 - Estrutura química dos antioxidantes: (A) α -tocoferol; (B) Ácido cafeico; (C) Butil-hidroxitolueno.....	16
Figura 4 – Estrutura química do radical DPPH.....	18
Figura 5 – Esquema de reação do radical DPPH com antioxidantes e espécies radicais.....	19
Figura 6 – Espectros de absorção do radical DPPH e do composto DPPH-H.	19
Figura 7 – Voltamograma cíclico típico do DPPH.....	20
Figura 8 – Aplicação do potencial para a voltametria cíclica: (A) potencial com varredura linear; (B) potencial do tipo escada; (C) voltamograma obtido para um sistema reversível.....	22
Figura 9 - (A) Aplicação do potencial para amperometria; (B) amperograma obtido da corrente em função do tempo.....	23
Figura 10 – Etapas de operação de um sistema BIA e o amperograma resultante: (A) Antes da injeção; (B) Transporte; (C) Fim da injeção; (D) Dispersão; (E) Equilíbrio final.....	24
Figura 11 - Representação do eletrodo impresso de grafite (SPGE) utilizado neste trabalho.....	27
Figura 12 – Representação da célula BIA com o eletrodo impresso de grafite (SPGE) (vista de cima, com e sem a tampa), e a respectiva célula montada e conectada com a micropipeta eletrônica.	30

- Figura 13** - Voltamogramas cíclicos de soluções de DPPH 1 mmol L⁻¹ preparadas em LiCl 0,05 mol L⁻¹ em diferentes proporções de metanol e etanol. Condições: velocidade de varredura de 0,05 V s⁻¹ e potencial de step de 0,005 V.....34
- Figura 14** – Voltamograma hidrodinâmico (-0,5 a +0,5 V) obtido por amperometria através de injeções de solução de DPPH 80 µmol L⁻¹ (n=3). Condições: velocidade de injeção de 345 µL s⁻¹ e volume de injeção de 100 µL. 35
- Figura 15** - Voltamogramas cíclicos de soluções de DPPH, BHT, ácido cafeico e α-tocoferol a 1 mmol L⁻¹, preparadas em LiCl 0,05 mol L⁻¹ em metanol:etanol 1:1. Condições: velocidade de varredura de 0,05 V s⁻¹ e potencial de step de 0,005 V. 36
- Figura 16** - Estudo do volume injetado no sistema BIA (25 a 200 µL) para injeções de DPPH 80 µmol L⁻¹ (n=3). Condições: potencial de +0,1 V e velocidade de injeção de 345 µL s⁻¹.....38
- Figura 17** - Estudo da velocidade de injeção no sistema BIA (28 a 345 µL s⁻¹) para injeções de DPPH 80 µmol L⁻¹ (n=3). Condições: potencial de +0,1 V e volume de injeção de 100 µL.....39
- Figura 18** – (A) Estudo da repetibilidade por injeções sucessivas de 80 µmol L⁻¹ de radical DPPH (n=12) e (B) respectivos valores de corrente. Condições: potencial de +0,1 V; volume de injeção de 150 µL e vazão de 193 µL s⁻¹. 40
- Figura 19** – (A) Resposta amperométrica do estudo de faixa linear, obtida após injeção de soluções contendo radical DPPH (n=3) nas seguintes concentrações: (a) 1,0; (b) 5,0; (c) 10; (d) 50; (e) 100; (f) 150; (g) 200; (h) 250; (i) 300 e (j) 500 µmol L⁻¹, com zoom (a-c: 1,0–10 µmol L⁻¹); (B) Curva de calibração de DPPH de 1,0–500 µmol L⁻¹ (R = 0,9996). 41
- Figura 20** – (A) Resposta amperométrica obtida após injeção de soluções contendo radical DPPH (n=3) (a-f: 10–100 µmol L⁻¹); (B) Curva de calibração do radical DPPH: aumentando a concentração (■ R = 0,9992), e reduzindo a concentração (● R =

0,9998). Condições: potencial de +0,1 V; volume de injeção de 150 μL e vazão de 193 $\mu\text{L s}^{-1}$ 42

Figura 21 – Consumo de DPPH (%) em função da concentração de tocoferol (2 a 10 mg mL^{-1}) (A) pelo método BIA proposto e (B) pelo método comparativo UV-Vis. 44

Figura 22 – Consumo de DPPH (%) em função da concentração de (A) ácido cafeico (1 a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e (B) BHT (10 a 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) pelo método BIA.....46

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Miscibilidade de diferentes volumes de uma amostra de óleo de soja com 10 mL de solução de LiCl 0,05 mol L⁻¹ em diferentes proporções de metanol e etanol, após 8 minutos no banho de ultrassom. 33
- Tabela 2** - Consumo de DPPH (%) obtido pelos métodos BIA e espectrofotométrico, calculados através das equações (1) e (2), respectivamente, para amostras de óleos e azeites de diferentes tipos e marcas (n=3). 43
- Tabela 3** – Equivalente de tocoferol (mg de tocoferol /g de amostra) calculado pelos métodos BIA e espectrofotométrico para amostras de óleos e azeites de diferentes tipos e marcas. 45
- Tabela 4** – Equivalente de ácido cafeico (µg de ácido cafeico /g de amostra) e equivalente de BHT (µg de BHT /g de amostra) calculado pelo método BIA para amostras de óleos e azeites de diferentes tipos e marcas. 47
- Tabela 5** – Dados de desempenho dos antioxidantes avaliados, obtidos através do método eletroquímico BIA proposto. 47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a	Coeficiente angular da reta
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
BIA	<i>“Batch-Injection Analysis”</i> – Análise por Injeção em Batelada
DPb	Desvio padrão do branco
DPR	Desvio padrão relativo
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DPPH-H	Hidrazina, produto de redução do DPPH
EC₅₀	Concentração eficaz
FIA	<i>“Flow Injection Analysis”</i> – Análise por Injeção em Fluxo
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
PG	Propil galato
R	Coeficiente de correlação linear
RSD	<i>“Relative Standard Deviation”</i> – Desvio padrão relativo
SPEs	<i>“Screen-Printed Electrodes”</i> – Eletrodos impressos
SPGE	<i>“Screen-Printed Graphitic Electrode”</i> – Eletrodo impresso de grafite
TBHQ	Terc-butil-hidroquinona

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Métodos para determinação da capacidade antioxidante.....	17
1.1.1 Método do radical DPPH.....	18
1.2 Técnicas eletroanalíticas	21
1.2.1 Voltametria cíclica.....	21
1.2.2 Amperometria.....	22
1.3 Análise por Injeção em Batelada (BIA) com detecção amperométrica	23
1.4 Eletrodos impressos “Screen-Printed Electrodes” (SPEs)	25
2 OBJETIVO	28
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	29
3.1 Reagentes e soluções.....	29
3.2 Instrumentação.....	29
3.3 Análise eletroquímica	31
3.4 Análise espectrofotométrica.....	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 Avaliação do eletrólito suporte e miscibilidade das amostras	33
4.2 Seleção do potencial de detecção por amperometria	35
4.3 Teste de interferentes	36
4.4 Estudo do volume e velocidade de injeção.....	37
4.5 Repetibilidade	39
4.6 Linearidade da resposta analítica.....	41
4.7 Análise das amostras	43
4.7.1 Equivalente de tocoferol	44
4.7.2 Equivalente de ácido cafeico e BHT.....	45
4.8 Avaliação dos antioxidantes.....	47
4.9 Limitações do método BIA.....	48

5 CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

O consumo de alimentos obtidos de fontes naturais, incluindo cereais, vegetais, frutas, bebidas e óleos, sendo esse último o foco do trabalho, apresenta potencial efeito na prevenção de doenças crônicas devido à presença de antioxidantes que atuam contra o estresse oxidativo (OLIVEIRA; CARVALHO; MELO, 2014).

Óleos ou lipídios, de maneira geral, são substâncias imiscíveis em água, de cadeia carbônica longa, compostos principalmente por triacilgliceróis, que são formados pela esterificação completa do glicerol com ácidos graxos. São denominados de óleo quando líquidos à temperatura ambiente, ou gordura quando sólidos nesta temperatura. Podem ainda ser denominados como azeite, dependendo da fonte de extração, como o caso do azeite de oliva. No entanto, a principal diferença em relação ao óleo é que o azeite não recebe tratamento por meio de solventes, passando apenas pelo processo físico de prensagem (GIOIELLI, 1996).

A maior parte dos constituintes dos óleos vegetais é oxidável em diferentes graus, sendo que os ácidos graxos insaturados são as estruturas mais suscetíveis ao processo oxidativo. Assim, com a finalidade de inibir ou retardar a oxidação lipídica de óleos e gorduras são empregados compostos químicos conhecidos como antioxidantes (RAMALHO; JORGE, 2006).

As espécies antioxidantes presentes nesses alimentos são capazes de proteger sistemas biológicos contra a ação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, também chamadas de radicais livres, responsáveis por danos oxidativos às células lipídicas, proteínas e ácidos nucleicos (RAMADAN; MOERSEL, 2006; SZYDŁOWSKA-CZERNIAK et al., 2008).

O dano oxidativo sofrido pelas biomoléculas está diretamente relacionado com as patologias de um grande número de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson) e câncer (KIM; JEONG; LEE, 2003; MENDEL; YODIM, 2004; WISEMAN; WATERHOUSE; KORVER, 2001). Assim, o estudo da capacidade antioxidante dos alimentos pode ser um parâmetro relevante para interesses nutricionais e médicos (OLIVEIRA; CARVALHO; MELO, 2014).

Tanto óleos vegetais quanto extratos de plantas têm sido estudados e avaliados quanto o seu potencial antioxidante, demonstrando alta eficiência (MORAIS, 2009). Além de apresentarem bioatividade no organismo humano, os antioxidantes naturais presentes nos óleos vegetais ajudam a protegê-los contra a ação de radicais livres que iniciam e perpetuam a peroxidação lipídica, que consiste na principal forma de degradação desses óleos e em

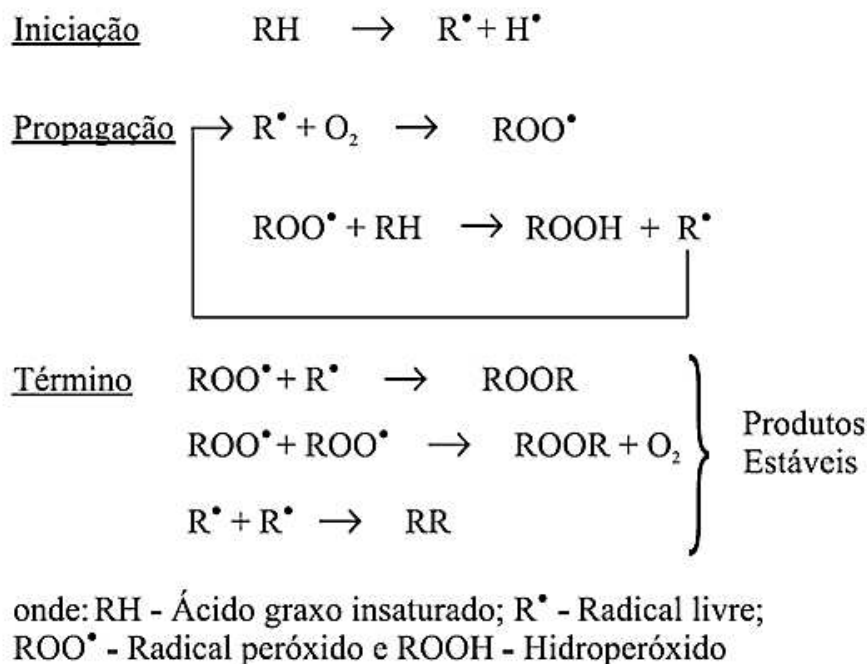
importante fonte de prejuízos para a indústria de alimentos (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

A oxidação lipídica é responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis, conhecidos como “ranço”, reduzindo a vida-de-prateleira dos alimentos e tornando-os impróprios para consumo, além de também provocar outras alterações que irão afetar não só a qualidade nutricional, devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, mas também a integridade e segurança em relação ao consumo desses alimentos, devido à formação de compostos poliméricos potencialmente tóxicos (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). Dessa forma, os antioxidantes têm sido foco de interesse científico e tecnológico visando tanto a promoção de maior estabilidade oxidativa dos óleos vegetais, quanto a sua bioatividade no organismo humano (CASTELO-BRANCO; TORRES, 2011).

No contexto do trabalho, definem-se antioxidantes como compostos capazes de promover o sequestro dos radicais livres, retardando ou inibindo a oxidação lipídica de óleos e gorduras insaturadas, evitando o início ou a propagação das reações em cadeia de oxidação, através da formação de estruturas estáveis (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; KHAN; MAALIK; MURTAZA, 2016).

A capacidade antioxidante, por sua vez, consiste em um dos parâmetros antioxidantes mais importantes, sendo essa capacidade definida como a habilidade de um composto (ou mistura de compostos) de inibir a degradação oxidativa de um sistema, prevenindo por exemplo, a peroxidação lipídica (SOCHOR et al., 2013). Os lipídeos podem ser oxidados por diferentes caminhos, dentre eles através de reações hidrolíticas, oxidações enzimáticas, foto-oxidação e auto oxidação (RAMALHO; JORGE, 2006).

A auto oxidação é o principal mecanismo de oxidação dos óleos e gorduras. Na Figura 1 é apresentada uma sequência de reações inter-relacionadas que explicam o processo de auto oxidação dos lipídios, que está associada à reação do oxigênio com ácidos graxos insaturados e ocorre em três etapas (RAMALHO; JORGE, 2006).

Figura 1 - Esquema geral de mecanismo de oxidação.

Fonte: Ramalho e Jorge (2006, p. 755).

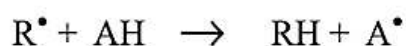
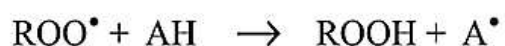
Na etapa de iniciação, ocorre a formação dos radicais livres do ácido graxo devido à retirada de um hidrogênio do carbono alílico na molécula do ácido graxo, em condições favorecidas por luz e calor. Em seguida tem-se a propagação, em que os radicais livres que são prontamente suscetíveis ao ataque do oxigênio atmosférico, são convertidos em outros radicais, resultando nos produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos), cuja estrutura depende da natureza dos ácidos graxos presentes. Os radicais livres formados atuam como propagadores da reação, resultando em um processo auto catalítico. Por fim, na etapa de término, dois radicais combinam-se, com a formação de produtos estáveis (produtos secundários de oxidação) obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (RAMALHO; JORGE, 2006).

Para evitar a auto oxidação de óleos e gorduras é necessário a diminuição da incidência de todos os fatores que a favorecem, como luz e temperatura, que são responsáveis pelo desencadeamento do processo de formação de radicais livres, evitando também a presença de traços de metais no óleo e o contato com oxigênio. Além disso, é possível bloquear a formação de radicais livres por meio de antioxidantes, os quais, em pequenas quantidades, atuam interferindo nos processos de oxidação lipídica (RAMALHO; JORGE, 2006).

Os antioxidantes podem ser classificados em primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e mistos. Os antioxidantes tais quais estudados neste

trabalho, entre outros também conhecidos, como os polifenóis butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG), que são sintéticos, e os tocoferóis e ácido cafeico, que são naturais, são classificados como primários. Os antioxidantes primários são compostos fenólicos que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênio lábeis a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia. O mecanismo de ação descrito é representado pela Figura 2 (RAMALHO; JORGE, 2006).

Figura 2 – Mecanismo de ação para os antioxidantes primários.

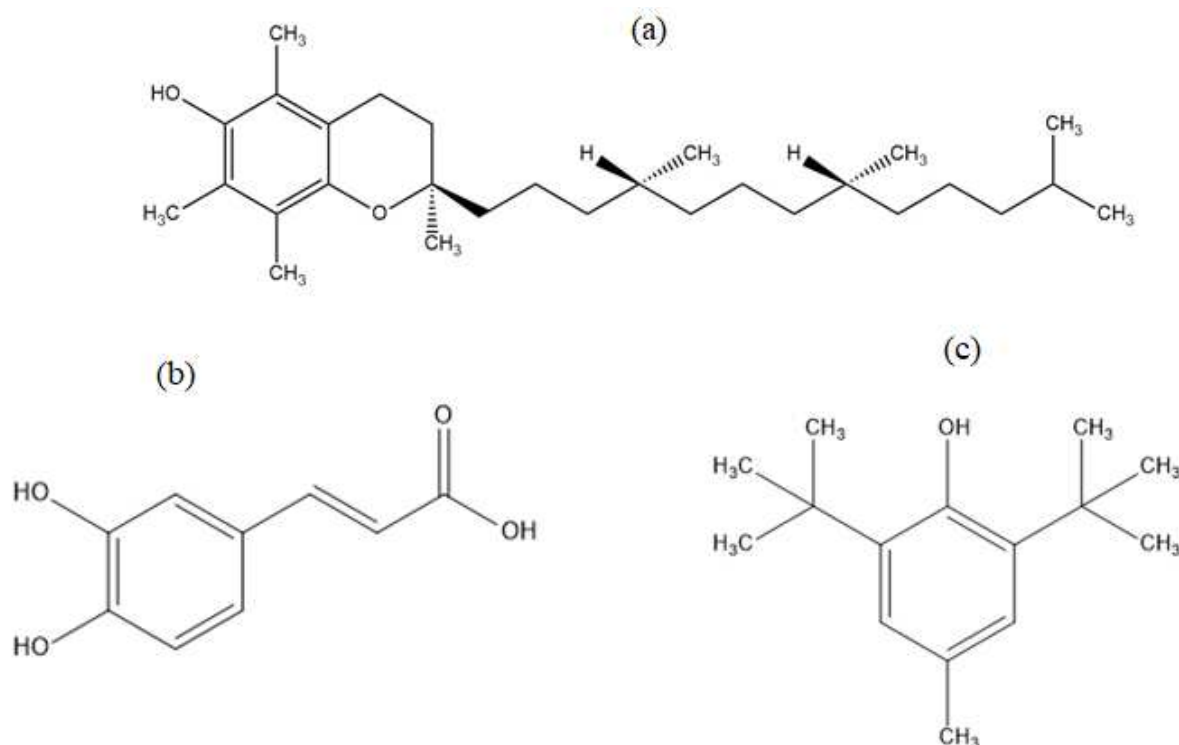


onde: $\text{ROO}^\bullet$ e $\text{R}^\bullet$ - radicais livres; AH - antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo e $\text{A}^\bullet$ - radical inerte

Fonte: Ramalho e Jorge (2006, p. 756).

Uma grande variedade de antioxidantes naturais e sintéticos está presente nos óleos vegetais, como já citado anteriormente. A Figura 3 apresenta os antioxidantes estudados neste trabalho: α -tocoferol, ácido cafeico e butil-hidroxitolueno.

Figura 3 - Estrutura química dos antioxidantes: (A) α -tocoferol; (B) Ácido cafeico; (C) Butil-hidroxitolueno.



Fonte: A autora.

O tocoferol, também conhecido como vitamina E, é um antioxidante natural, que existe em quatro diferentes tipos, segundo a localização dos grupos metila no anel aromático: α , β , γ e δ -tocoferol. A fração do α -tocoferol (FIGURA 3-A), especificamente, está presente em alimentos como vegetais verdes, gema de ovo, gordura do leite, manteiga, carne, nozes e óleos vegetais (ZIMMERMANN; KIRSTEN, 2008). A atividade antioxidante dos tocoferóis se deve principalmente à capacidade de doar seus hidrogênios fenólicos aos radicais livres lipídicos interrompendo a propagação em cadeia. Por ser um dos melhores antioxidantes naturais é amplamente aplicado como meio para inibir a oxidação dos óleos e gorduras comestíveis, prevenindo a oxidação dos ácidos graxos insaturados (CASTELO-BRANCO; TORRES, 2011). Atualmente, no Brasil, a legislação vigente permite a adição de até 300 mg/kg de α -tocoferol em óleos e gorduras, como aditivos intencionais, com função de antioxidante (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 1988).

O ácido cafeico (FIGURA 3-B) também consiste em um antioxidante natural, sendo encontrado em extratos de plantas, frutos, vegetais, azeites, mel, arroz e bebidas como cafês, vinhos e chás, apresentando diversas atividades farmacológicas, tais como antitumoral e anti-inflamatória (KHAN; MAALIK; MURTAZA, 2016; SOUSA, 2008). É um derivado do ácido

hidroxicinâmico, que por sua vez constitui uma classe de compostos fenólicos (JIA et al., 2016). Tem sido reportado que a adição de ácido cafeico em óleos e azeites aumenta a estabilidade desses produtos através da inibição da oxidação lipídica (DAMASCENO et al., 2013; LUO, 2012; MARINOVA; TONEVA; YANISHLIEVA, 2009).

O butil-hidroxitolueno (BHT) (FIGURA 3-C) está entre os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos. A estrutura fenólica deste composto, quando utilizado como aditivo em óleos e gorduras, permite a doação de um próton a um radical livre, regenerando a molécula do acilglicerol e interrompendo o mecanismo de oxidação por radicais livres. Dessa forma, os derivados fenólicos se transformam em radicais livres, os quais se estabilizam sem promover ou propagar reações de oxidação (RAMALHO; JORGE, 2006). A legislação brasileira permite a adição de BHT em óleos e gorduras no limite máximo de 100 mg/kg (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 1988). O uso controlado desse aditivo se deve ao fato de haver estudos toxicológicos demonstrando a possibilidade deste e de outros antioxidantes sintéticos apresentarem efeito carcinogênico (BOTTERWECK et al., 2000).

É demonstrado que a atividade dos compostos antioxidantes depende de diversos fatores físico-químicos, como as interações entre os antioxidantes entre si e também destes com outros componentes do meio (CASTELO-BRANCO; TORRES, 2011). Portanto, o estudo de um composto isoladamente pode levar a resultados inconclusivos. Ademais, sabe-se que a estabilidade oxidativa dos óleos e gorduras não depende apenas de sua composição química, mas reflete também a qualidade da matéria-prima empregada, as condições a que foi submetido durante o processamento e as condições de estocagem do produto (ANTONIASSI, 2001; CASTELO-BRANCO et al., 2016). Dessa forma, existe um crescente interesse por métodos capazes de avaliar de forma integrada a ação de compostos antioxidantes e como esses atuam em diferentes óleos vegetais.

1.1 Métodos para determinação da capacidade antioxidante

Atualmente existem estudos acerca de diferentes métodos para a determinação da capacidade antioxidante de alimentos e de outras amostras em geral. A capacidade antioxidante pode ser expressa por vários parâmetros, de acordo com o método utilizado. Dentre eles, são conhecidos os métodos de remoção do radical peroxil, como a capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) e o potencial antioxidante reativo total (TRAP); os métodos relacionados à capacidade de redução de metal ferro (FRAP) ou íons cobre (CUPRAC); o

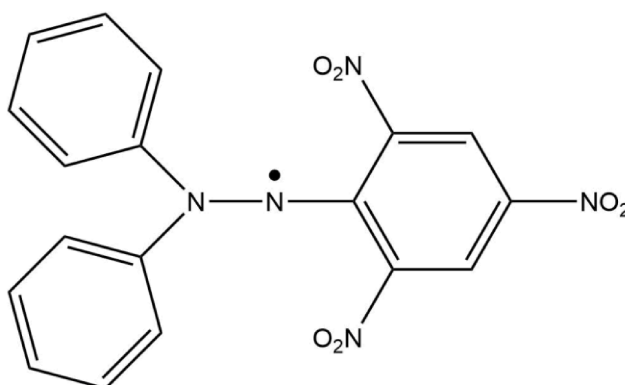
método da oxidação pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico e os métodos de sequestro de radicais livres como o 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico) (ABTS), superóxido (O_2^-) e 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) (ANTOLOVISH et al., 2002; GULÇIN, 2012; SUCUPIRA et al., 2012).

1.1.1 Método do radical DPPH

Dentre os métodos apresentados, o método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) consiste em um dos mais utilizados para se determinar a capacidade antioxidante em amostras de alimentos, sendo, portanto, destacado neste trabalho.

O DPPH, representado na Figura 4, consiste em um radical orgânico de nitrogênio estável, e encontra-se disponível comercialmente. Apresenta uma coloração violeta intensa, e é solúvel apenas em solventes orgânicos, sendo bastante estável em solução, desde que armazenado sob refrigeração e ao abrigo da luz, a fim de evitar sua degradação (SOUSA et al., 2015).

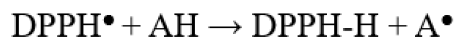
Figura 4 – Estrutura química do radical DPPH.



Fonte: A autora.

Esse radical pode reagir com antioxidantes ou outras espécies radicais que sejam capazes de doar um átomo de hidrogênio para a solução de DPPH radicalar. Por meio dessa reação, o DPPH é reduzido à hidrazina (DPPH-H), provocando uma mudança de cor na solução, passando de violeta, que corresponde ao DPPH radicalar, para amarelo, correspondente ao seu produto de redução, a hidrazina (DPPH-H). As reações podem ser observadas na Figura 5. Por esse motivo, técnicas de espectrofotometria na região do visível podem ser utilizadas para monitorar o decaimento da intensidade da coloração do DPPH (SOUSA et al., 2015).

Figura 5 – Esquema da reação do radical DPPH com antioxidantes e espécies radicais.

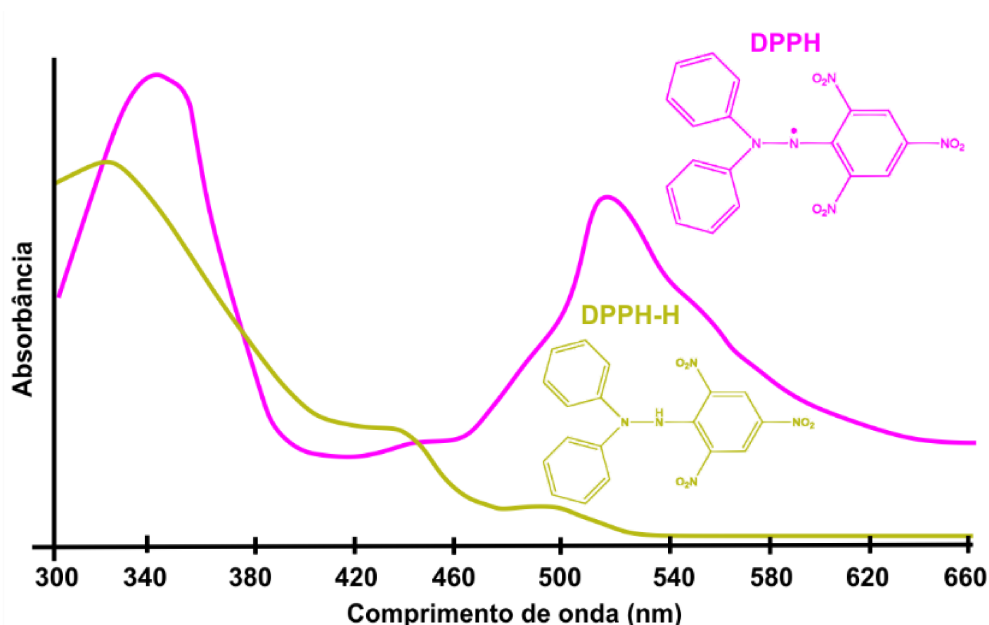


onde: $\text{DPPH}^\bullet$ – DPPH em sua forma radicalar, AH – antioxidante, DPPH-H e DPPH-R – forma reduzida do DPPH, $\text{R}^\bullet$ – radical livre, $\text{A}^\bullet$ – radical inerte.

Fonte: Milardovic; Ivekovic e Grabaric (2006).

Como a forma radicalar do DPPH absorve na faixa de luz visível, o método espectrofotométrico baseia-se no monitoramento da absorbância da amostra no comprimento de onda fixo de 517 nm. Sabe-se que o radical DPPH apresenta um elétron desemparelhado no átomo de nitrogênio, o qual pode ser reduzido, seja através de um átomo de hidrogênio ou também por uma transferência de elétrons de ânions fenóxido. Em ambos os casos é formado a hidrazina (DPPH-H) correspondente. Dessa forma, no método espectrofotométrico, realiza-se a leitura da absorbância do DPPH a 517 nm, pois nesse comprimento de onda é possível medir a máxima absorbância do radical sem a interferência da hidrazina, como visto na Figura 6 (SOUSA et al., 2015).

Figura 6 – Espectros de absorção do radical DPPH e do composto DPPH-H.

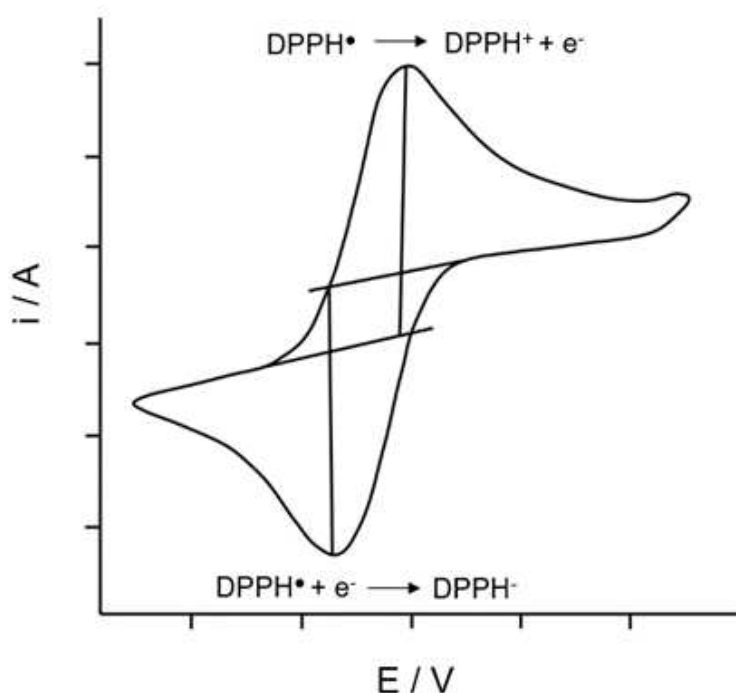


Fonte: Adaptada de Sousa et al. (2015, p. 545).

Por outro lado, amostras coloridas ou turvas muitas vezes não podem ser analisadas utilizando o método espectrofotométrico, tendo em vista as interferências de matriz da amostra. Com isso, técnicas eletroquímicas de análise também têm sido utilizadas para a determinação da capacidade antioxidante, uma vez que o radical DPPH pode ser reduzido eletroquimicamente, e o sinal de corrente gerado nesse processo pode ser diretamente relacionado com a sua concentração (SOUSA et al., 2015).

A voltametria cíclica é uma das técnicas mais utilizadas para se adquirir informações qualitativas a respeito de processos eletroquímicos. Diante disso, diversos estudos foram realizados empregando a voltametria cíclica a fim de investigar o comportamento eletroquímico do radical DPPH, demonstrando se tratar de um processo redox reversível, cuja transferência eletrônica envolve apenas um elétron e é controlada por difusão (AHMED et al., 2012; LEÓN et al., 2011; MILARDOVIC et al., 2006; ZHUANG et al., 1999). A Figura 7 apresenta um voltamograma cíclico típico do radical DPPH.

Figura 7 – Voltamograma cíclico típico do DPPH.



Fonte: Adaptada de Sousa et al. (2015, p. 556).

A determinação da capacidade antioxidante através do método do radical DPPH usando técnicas eletroanalíticas baseia-se na corrente gerada pela redução eletroquímica desse radical durante a análise. A reação do DPPH com o antioxidante levará a um decréscimo na corrente,

medida em um potencial constante, selecionado previamente por estudos de voltametria cíclica ou através de um voltamograma hidrodinâmico. Assim, uma vez que a corrente é proporcional à concentração de DPPH, é possível avaliar a porcentagem do radical consumido pelo antioxidante. A detecção da corrente gerada pode ser realizada por diferentes técnicas eletroquímicas, como a voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e amperometria (SOUSA et al., 2015).

1.2 Técnicas eletroanalíticas

As técnicas eletroanalíticas têm sido cada vez mais utilizadas e, muitas vezes, consideradas superiores ao ensaio espectrofotométrico, devido a sua maior sensibilidade, ausência de efeito de matriz perante turvações da amostra, e portabilidade inerente (BURATTI et al., 2008). Além disso, medidas eletroquímicas podem permitir a obtenção de parâmetros físico-químicos importantes a respeito dos processos oxidativos, como o potencial, número de elétrons envolvidos, taxa de transferência de elétrons, constante redox, etc. Estes parâmetros permitem tanto a avaliação da capacidade antioxidante das espécies em estudo, quanto 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).

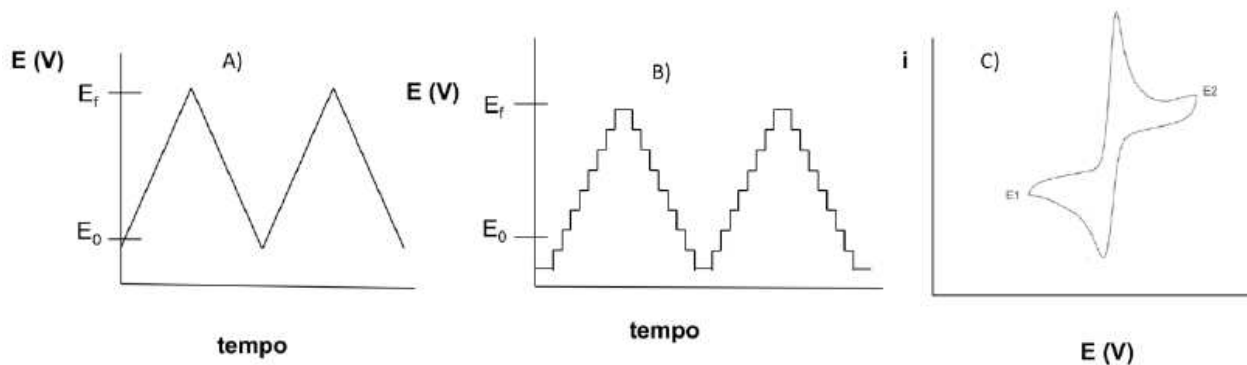
1.2.1 Voltametria cíclica

Uma das técnicas eletroquímicas utilizadas nesse trabalho é a voltametria cíclica, que consiste na técnica mais comumente usada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos. A eficiência desta técnica resulta de sua habilidade de rapidamente fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos. A forma de aplicação do potencial na voltametria cíclica está representada na Figura 8-A, em que o potencial é varrido linearmente com o tempo no eletrodo de trabalho, em uma solução sem agitação (PACHECO et al., 2013).

Durante a varredura do potencial, o potenciostato mede a corrente resultante versus o potencial aplicado (FIGURA 8-C). Em alguns casos, o potencial pode ser aplicado na forma de escada (*staircase*) como pode ser visto na Figura 8-B, com degraus de potenciais pequenos (da

ordem de 10 mV) e tempo de duração curto (50 ms). O objetivo dessa variação é conseguir uma minimização da contribuição da corrente capacitiva na corrente total (PACHECO et al., 2013).

Figura 8 – Aplicação do potencial para a voltametria cíclica: (A) potencial com varredura linear; (B) potencial do tipo escada; (C) voltamograma obtido para um sistema reversível.



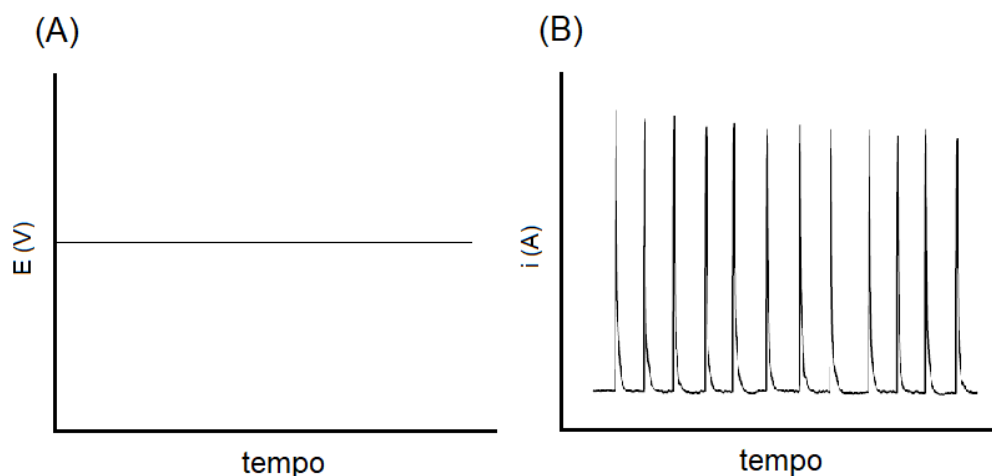
Fonte: Pacheco et al. (2013, p. 528).

Nessa técnica, como o potencial varia linearmente com o tempo, há uma contribuição significativa da corrente capacitiva, que limita o valor do limite de detecção a aproximadamente 10^{-5} M, afetando, até certo ponto, seu uso em medições quantitativas (PISOSCHI; CIMPEANU; PREDOI, 2015).

1.2.2 Amperometria

Embora a voltametria cíclica apresente vantagens em relação à caracterização dos analitos de interesse, não apresenta bons resultados quanto a quantificação. Por isso, a principal técnica eletroquímica utilizada neste trabalho para fins de quantificação foi a amperometria. Na amperometria, é aplicado um potencial constante ao eletrodo de trabalho (FIGURA 9-A), e a corrente é medida em função do tempo (FIGURA 9-B). Como o potencial não varia, a amperometria não resulta em um voltamograma, e sim em um amperograma. A corrente é gerada pela oxidação ou redução do composto eletroativo analisado, e pode ser correlacionada estequiometricamente com a concentração dessa espécie (PISOSCHI; CIMPEANU; PREDOI, 2015). Na Figura 9-B é apresentado um amperograma resultante de um composto que sofre oxidação.

Figura 9 - (A) Aplicação do potencial para amperometria; (B) amperograma obtido da corrente em função do tempo.



Fonte: A autora.

A amperometria é uma técnica simples, altamente quantitativa, fornecendo excelentes limites de detecção, boa faixa linear e boa reprodutibilidade sob condições controladas (HANSON; PAPPAS; HOLLAND, 2005). A utilização da amperometria associada ao método do radical DPPH para determinação da capacidade antioxidante já é descrita na literatura, sendo aplicada para diferentes amostras (MILARDOVIC; IVEKOVIC; GRABARIC, 2006; OLIVEIRA et al., 2016).

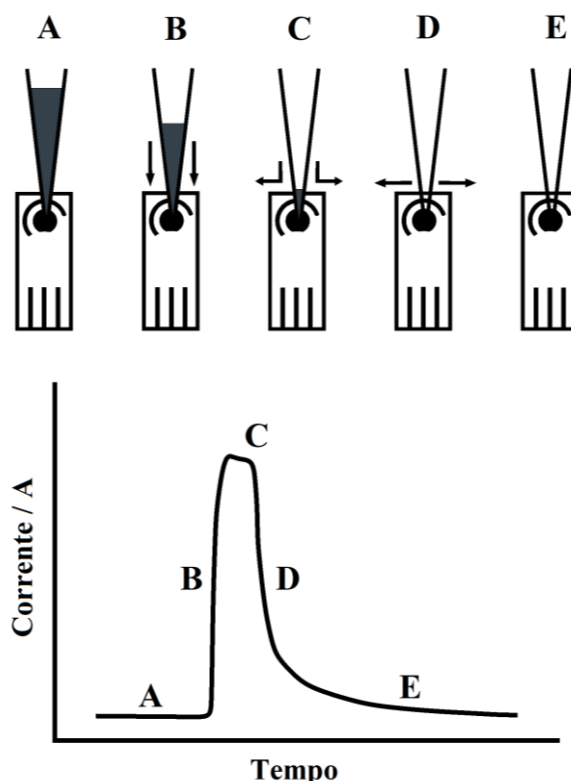
1.3 Análise por Injeção em Batelada (BIA) com detecção amperométrica

O desenvolvimento de sistemas automatizados, rápidos e precisos tem se tornado essencial na área da química analítica. Nesse sentido, o sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA), que se baseia na injeção da amostra em um fluxo de solução contínuo, tem sido bastante utilizado para diversas aplicações. Uma alternativa interessante ao sistema FIA é o sistema de Análise por Injeção em Batelada (BIA), proposto por Wang e Taha (1991), que quando associado à detecção amperométrica, consiste em uma ferramenta bastante eficaz para a análise de alimentos, amostras ambientais e farmacêuticas (QUINTINO; ANGNES, 2004).

No sistema BIA, uma pequena alíquota da amostra é injetada na célula, a partir de uma micropipeta, diretamente na superfície do eletrodo de trabalho, imerso em um grande volume de eletrólito suporte inerte. O eletrodo registra uma corrente proporcional ao processo redox que ocorre durante a passagem da amostra pela sua superfície. A magnitude da corrente reflete então a concentração do analito injetado (WANG; TAHA, 1991).

A Figura 10 ilustra as etapas de operação de um sistema BIA, adaptado para o uso de eletrodos impressos (SPEs), e o resultado obtido para análise de uma espécie que sofre oxidação.

Figura 10 – Etapas de operação de um sistema BIA e o amperograma resultante: (A) Antes da injeção; (B) Transporte; (C) Fim da injeção; (D) Dispersão; (E) Equilíbrio final.



Fonte: Adaptada de Quintino e Angnes (2004, p. 514).

Pela Figura 10 observa-se que antes da injeção da solução contendo a espécie eletroativa (etapa A), há uma corrente constante, devido à corrente capacitiva atribuída ao eletrólito suporte. Nessa etapa, ainda não há transferência de elétrons na interface eletrodo/solução. Assim que a amostra é injetada (etapa B), há um rápido aumento da corrente, devido ao processo redox do analito de interesse que está sendo transportado até a superfície do eletrodo. Ao final da injeção (etapa C), observa-se que a corrente atinge um valor máximo, e, logo após (etapa D), tem-se uma queda acentuada do sinal analítico, em decorrência da mudança do transporte mecânico fornecido pela micropipeta, para o transporte de massa por difusão. Nesta etapa, o analito começa a ser diluído pelo eletrólito suporte pelo processo de difusão, até que se

restabeleçam as condições iniciais do equilíbrio existente antes da injeção (etapa E) (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, devido à substituição dos componentes do sistema FIA pelas micropipetas eletrônicas. O uso de micropipetas eletrônicas promove ainda ótimos resultados relacionados à precisão, devido à reprodutibilidade do movimento do pistão. Além disso, as medidas realizadas com injeção em batelada apresentam alto desempenho analítico, com análises rápidas, de alta sensibilidade, reprodutibilidade e simplicidade, semelhante ao observado em condições FIA (WANG; TAHA, 1991).

Devido ao crescente uso de eletrodos impressos (SPEs), as células para análise por injeção em batelada (BIA) estão sendo adaptadas para uso específico desses eletrodos (TORMIN et al., 2014). Recentemente, a empresa espanhola Metrohm DropSens Company, em parceria com pesquisadores da Universidade Federal de Uberlândia disponibilizaram a primeira versão comercial de um sistema BIA, caracterizando-o como um sistema eletroquímico portátil para análises em campo (RICHTER et al., 2016). Além disso, o fácil acesso às impressoras 3D nos laboratórios de química permite a construção das versões convencionais e inovadoras da célula BIA, podendo ser construída de maneira personalizada (DIAS et al., 2016).

1.4 Eletrodos impressos “*Screen-Printed Electrodes*” (SPEs)

Os eletrodos impressos, do inglês “*Screen-Printed Electrodes*” (SPEs), são sensores eletroquímicos impressos em formato de dispositivos planares, podendo apresentar diferentes geometrias e substratos de acordo com sua aplicação.

Os SPEs representam uma tecnologia promissora na área da eletroquímica, uma vez que têm a capacidade de serem produzidos em larga escala e com baixo custo, levando a configurações altamente reprodutíveis para esses eletrodos. Além disso, por serem produzidos em massa, podem ser utilizados de maneira descartável, evitando assim possíveis efeitos de memória e contaminação, a depender do tipo de análise. Ao mesmo tempo, essas características excluem a necessidade de pré-tratamento e preparo dos eletrodos, como polimento, por exemplo, como ocorre em eletrodos convencionais de carbono vítreo e diamante dopado com boro (FOSTER et al., 2014; METTERS; KADARA; BANKS, 2012), mas ainda assim podem apresentar a necessidade de realização de ciclos de potencial para ativação do eletrodo.

Com os avanços na produção desses dispositivos, tem-se a possibilidade de sua aplicação em análises em campo, uma vez que apresenta respostas rápidas, alta sensibilidade e reprodutibilidade, baixo consumo de energia, ampla faixa de trabalho e capacidade de operar em temperatura ambiente. Além disso, a superfície dos SPEs pode ser facilmente modificada, e os mesmos podem ser produzidos de acordo com os requisitos de um analito específico (LI et al., 2012).

Este tipo de eletrodo é produzido por uma técnica chamada “*screen-printing*” ou impressão de tela. O processo de impressão utiliza um suporte para apoiar uma matriz de tinta e um rolo é movido através desta matriz para forçar a tinta a passar pelos caminhos gerados pelo molde. As camadas referentes ao eletrodo de trabalho, contra eletrodo e eletrodo de referência são impressas sobre o substrato usando diferentes padrões de tela e cada camada é posteriormente tratada por aquecimento para solidificar a respectiva tinta (LI et al., 2012; WANG et al., 1998).

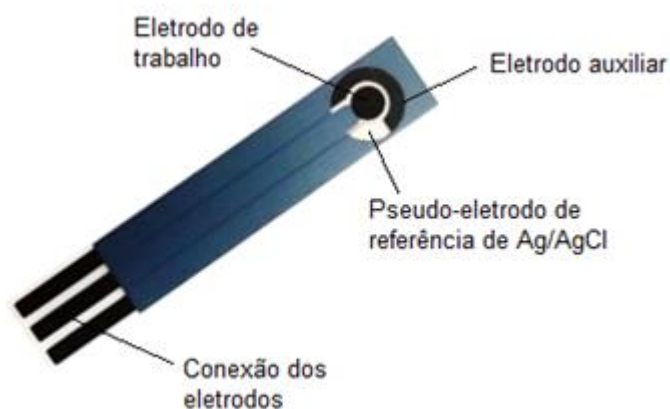
Diversos são os materiais que podem ser usados para a produção em massa desse tipo de eletrodo, destacando-se carbono e metais como platina e ouro, para o eletrodo de trabalho, e tinta de prata como base para o eletrodo de referência. Outros aditivos para a dispersão, impressão e adesão para eletrodos comerciais variam de acordo com o fabricante. Os eletrodos a base de carbono são altamente atrativos porque são relativamente baratos e apresentam baixas correntes de fundo, com janelas de trabalho de potencial adequados. É importante destacar que os materiais envolvidos na impressão (composição da tinta, tipo, tamanho e carga de partículas de grafite) e também a temperatura de secagem das tintas podem afetar na reatividade de transferência de elétrons e no desempenho dos eletrodos (WANG et al., 1998).

A maioria dos eletrodos impressos comerciais não são compatíveis com solventes orgânicos, sendo necessário um preparo prévio da amostra e a diluição em um eletrólito aquoso, a fim de obter medidas eletroquímicas precisas. A presença de solventes orgânicos no eletrólito, principalmente os solventes apolares, podem afetar as medidas eletroquímicas devido à sua baixa constante dielétrica, e também pelo fato de que a maioria das tintas utilizadas para a fabricação dos SPEs se dissolverem quando em contato com esse tipo de solvente (ALMEIDA et al., 2016).

Dessa forma, foi utilizado neste trabalho um eletrodo impresso de grafite, “*Screen-Printed Graphitic Electrode*” (SPGE) resistente a solventes orgânicos. Esse eletrodo, representado na Figura 11, foi impresso pelo grupo de pesquisa do Prof. Craig Banks da Manchester Metropolitan University (FOSTER et al., 2014). Almeida et al. (2016) foi o primeiro a demonstrar a aplicação desse eletrodo para medidas em meios altamente orgânicos

(99% etanol v/v). Essa característica se deve à interação da tinta condutora com o substrato flexível de poliéster utilizado para sua impressão, que confere ao SPGE alta compatibilidade com solventes orgânicos.

Figura 11 - Representação do eletrodo impresso de grafite (SPGE) utilizado neste trabalho.



Fonte: A autora.

O Núcleo de Pesquisa em Eletroanalítica (NuPE) do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (IQ UFU) apresenta diversos trabalhos com o uso de eletrodos impressos associados ao método BIA para a determinação de diferentes analitos, tais como fármacos em amostras farmacêuticas (STEFANO et al., 2016; STEFANO et al., 2017), metais em biocombustíveis (TORMIN et al., 2015), antioxidantes em combustíveis líquidos (ALMEIDA et al., 2016) e inibidores de corrosão em matrizes diversas (SQUISSATO et al., 2017).

2 OBJETIVO

O presente trabalho tem por objetivo desenvolver um método eletroanalítico simples, portátil e de baixo custo para determinação da capacidade antioxidante de óleos comestíveis, através do monitoramento do consumo do radical DPPH, utilizando análise por injeção em batelada (BIA) com detecção amperométrica e eletrodos impressos de grafite resistentes a solventes orgânicos.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e soluções

Para o preparo das soluções aquosas, foi utilizada água deionizada (resistividade maior que 18 M Ω cm) obtida do sistema de purificação Millipore Direct-Q3. O radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (97% m/m) e o antioxidante α -tocoferol (96% m/m) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os demais antioxidantes, ácido cafeico (99% m/m) e butil-hidroxitolueno (BHT) (99% m/m), bem como os componentes do eletrólito suporte, composto por uma mistura 1:1 (v/v) de etanol e metanol (99,9% v/v) contendo 0,05 mol L⁻¹ de cloreto de lítio (LiCl), foram obtidos da Vetec. Todos os reagentes utilizados apresentavam grau de pureza analítica. As amostras de óleos e azeites foram adquiridas em comércio local. Todas as soluções foram preparadas imediatamente antes do uso, sendo diluídas diretamente no eletrólito suporte.

3.2 Instrumentação

As medidas voltamétricas e amperométricas foram realizadas por meio de um potenciostato μ Autolab Tipo III (Metrohm Autolab), conectado a um computador para coleta e tratamento de dados, sendo utilizado o software Nova 1.11 para Windows 8®. As soluções de padrões e amostras foram injetadas no sistema usando uma micropipeta eletrônica (Eppendorf Multipette® Stream), que controla o volume injetado, de 10 a 1000 μ L, em uma ponteira de 1 mL, e a velocidade de injeção, de 28 a 345 μ L s⁻¹.

As medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro UV-Vis Thermo Scientific modelo Genesys 10S, tendo seu comprimento de onda ajustado em 517 nm para medir a absorbância do DPPH. A absorbância foi medida utilizando uma cubeta de quartzo (caminho óptico de 1 cm) com capacidade para 2,0 mL.

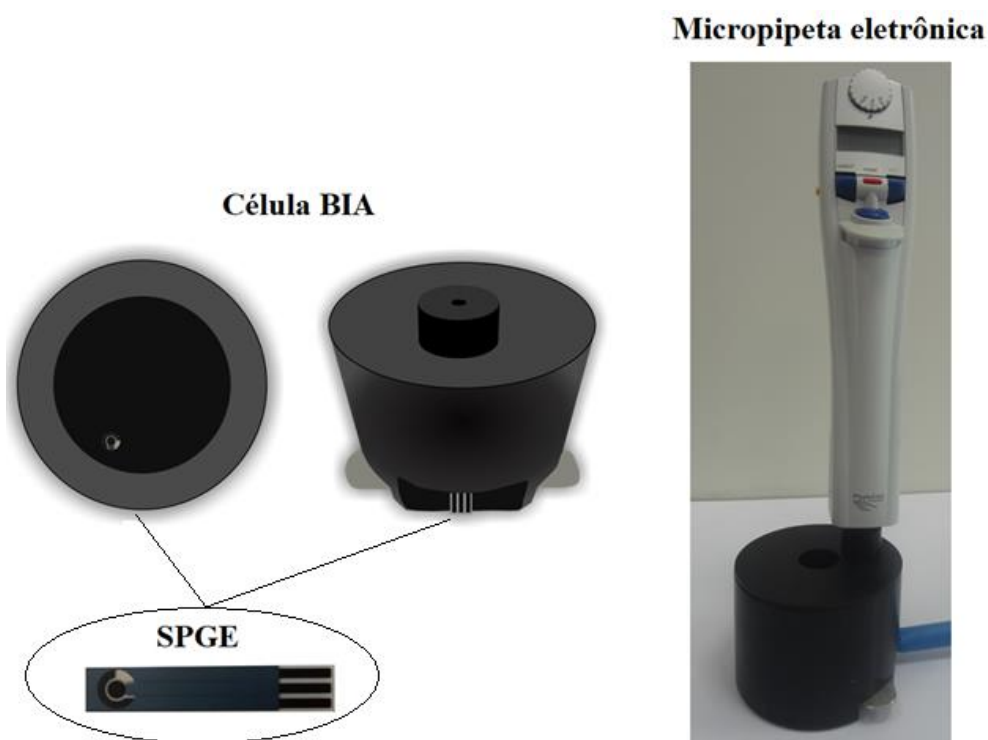
Os eletrodos impressos de grafite (SPGE's) utilizam tintas condutoras de grafite (Gwent Electronic Materials Ltd) impressas em um substrato flexível de poliéster (250 μ m de espessura) como eletrodo auxiliar e de trabalho (diâmetro de 2,8 mm), e uma tinta condutora de Ag/AgCl (Gwent Electronic Materials Ltd) como eletrodo de pseudo-referência. Uma tinta isolante também é impressa no mesmo substrato. Após cada impressão é realizado um processo de cura durante 30 minutos a 60 °C. A tira final do SGPE é compatível com solventes orgânicos

(ALMEIDA et al., 2016). Estes eletrodos foram impressos pelo grupo de pesquisa de um colaborador do projeto, Prof. Craig Banks da Manchester Metropolitan University.

A célula de análise por injeção em batelada (BIA) utilizada (FIGURA 12) consiste em uma cavidade cilíndrica de polipropileno (diâmetro interno de 5,7 cm e comprimento de 5,4 cm), onde a tira do SPE é conectada de maneira transversal à base do cilindro. A área de trabalho dos três eletrodos na tira é limitada por um anel *O-ring* de 0,5 cm de diâmetro para evitar vazamento da solução contida na célula. Após a conexão do SPGE e a introdução do eletrólito suporte, a tampa da célula é colocada sobre o cilindro.

A ponteira usada para injeção das soluções na célula é encaixada na micropipeta eletrônica e inserida através de um orifício de 7 mm de diâmetro contido na tampa. A micropipeta é posicionada de modo que a distância entre a ponteira e o eletrodo SPGE seja de aproximadamente 2 mm (configuração *wall-jet*) (BRETT et al.; 1994). Assim que a ponteira é preenchida com solução e a leitura amperométrica se inicia, as injeções podem ser realizadas (TORMIN et al., 2014).

Figura 12 – Representação da célula BIA com o eletrodo impresso de grafite (SPGE) (vista de cima, com e sem a tampa), e a respectiva célula montada e conectada com a micropipeta eletrônica.



Fonte: A autora.

3.3 Análise eletroquímica

Para cada novo SPE utilizado, faz-se necessário a realização de uma varredura na presença do eletrólito suporte, empregando a técnica de voltametria cíclica. A faixa de potencial utilizada foi de -0,3 a +1,0 V, com velocidade de varredura de 0,05 V s⁻¹. Após a estabilização da linha base (atingida normalmente com 5 varreduras), o SPE encontra-se pronto para ser utilizado em medidas subsequentes.

A composição de etanol e metanol da solução contendo o eletrólito suporte, bem como o eletrólito e sua concentração, foi estudada com base na resposta analítica do radical DPPH e também na miscibilidade das amostras de óleo no meio.

Para o preparo da solução de DPPH, um banho ultrassônico (Unique UltraCleaner 1640A) foi utilizado para dissolução do radical no eletrólito, durante cerca de 30 minutos e na ausência de luz, visando minimizar a decomposição do analito, conforme descrito em trabalhos anteriores (AMATATONGCHAI et al., 2012).

A reação entre o DPPH e as amostras de óleo ou padrão de antioxidante foram realizadas em um balão volumétrico de 10 mL, pela adição de 5,0 mL de solução de DPPH 80 µmol L⁻¹ e 25 µL de cada amostra ou padrão. Após cada adição, o balão foi tampado, agitado e colocado em banho ultrassônico por 8 minutos para a completa solubilização da amostra. Com a amostra solubilizada, a mistura foi deixada em repouso à temperatura ambiente e protegido da luz com auxílio de papel alumínio, pelo período de 1 hora.

Após 1 hora em repouso e à temperatura ambiente, uma alíquota de 150 µL da solução contida no balão volumétrico foi injetada no sistema BIA, em triplicata, com uma velocidade de injeção de 193 µL s⁻¹. As análises amperométricas para a determinação do DPPH remanescente foram realizadas aplicando um potencial fixo de +0,1 V.

Para o cálculo da porcentagem de consumo do radical DPPH pelos antioxidantes contidos na amostra ou padrão, foi utilizada a Equação 1 (OLIVEIRA et al., 2016):

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

Onde I_{amostra} é a corrente do DPPH remanescente a partir da reação entre o DPPH e a amostra ou padrão após 1 hora; I_{branco} é a corrente do branco (5,0 mL de eletrólito e 25 µL de amostra ou padrão, sem o DPPH); I_{controle} é a corrente da solução de DPPH (80 µmol L⁻¹) antes

da reação com a amostra ou padrão e I_{solvente} é a corrente correspondente ao solvente utilizado, que consiste no próprio eletrólito suporte.

3.4 Análise espectrofotométrica

A análise espectrofotométrica (UV-Vis) foi realizada como um método comparativo, e foi baseada em um método descrito na literatura (OLIVEIRA et al., 2016). A reação entre o DPPH e as amostras foi realizada da mesma maneira que no método eletroquímico (5,0 mL de solução de DPPH $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ e 25 μL de cada amostra ou padrão). A solução foi deixada em repouso à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante 1 hora. Após esse período, a solução foi transferida para uma cubeta de quartzo de 2,0 mL. A absorbância foi determinada em 517 nm. A porcentagem de sequestro do radical DPPH foi determinada por:

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

Em que $\text{Abs}_{\text{amostra}}$ é a absorbância do DPPH remanescente a partir da reação entre o DPPH e a amostra ou padrão após 1 hora; $\text{Abs}_{\text{branco}}$ é a absorbância do branco (5,0 mL de eletrólito e 25 μL de amostra ou padrão, sem o DPPH) e $\text{Abs}_{\text{controle}}$ é a absorbância da solução de DPPH ($80 \mu\text{mol L}^{-1}$) antes da reação com a amostra ou padrão de antioxidante.

O tempo de 1 hora de reação entre o radical DPPH e as amostras foi baseado na cinética lenta da reação envolvendo o DPPH e os possíveis antioxidantes presentes em óleos vegetais (tipicamente tocoferóis) (OLIVEIRA et al., 2016).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação do eletrólito suporte e miscibilidade das amostras

O primeiro passo do trabalho foi avaliar o comportamento eletroquímico do radical DPPH em diferentes meios alcóolicos capazes de solubilizar as amostras de óleo. Trabalhos anteriores utilizaram como eletrólito suporte tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7 (AMATATONGCHAI et al., 2012) e tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 5,5 (OLIVEIRA et al., 2016), ambos contendo 60% (v/v) de etanol, no entanto, estes apresentaram-se incapazes de solubilizar as matrizes oleosas em estudo. Além disso, um estudo reportado na literatura demonstrou que o DPPH sofre degradação na presença de tampão fosfato, levando a uma resposta analítica insatisfatória (AL-DABBAS et al., 2007).

Diante disso, optou-se pelo estudo do cloreto de lítio como eletrólito suporte, preparado em meios contendo metanol e etanol. A Tabela 1 mostra os resultados de miscibilidade de uma amostra de óleo de soja com 5 mL de solução de LiCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ preparada em metanol e etanol em diferentes proporções. Para fins de padronização, após a adição da amostra nas respectivas soluções, estas foram agitadas e em seguida colocadas em banho ultrassônico por um período de 8 minutos. Somente após esse procedimento foi avaliada se a amostra era ou não miscível, tendo em vista que algumas não se misturam de imediato.

A concentração de LiCl foi mantida a $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pois a amostra não apresentou boa miscibilidade em concentrações maiores. Pela Tabela 1 observa-se que, quanto menor a proporção de óleo diluída na solução, maior a capacidade de solubilização. Verifica-se também que a miscibilidade aumenta com o aumento da concentração de etanol na solução, visto que a amostra é imiscível em metanol puro. As demais amostras de óleos e azeites usados no trabalho seguem o mesmo padrão de miscibilidade do óleo de soja.

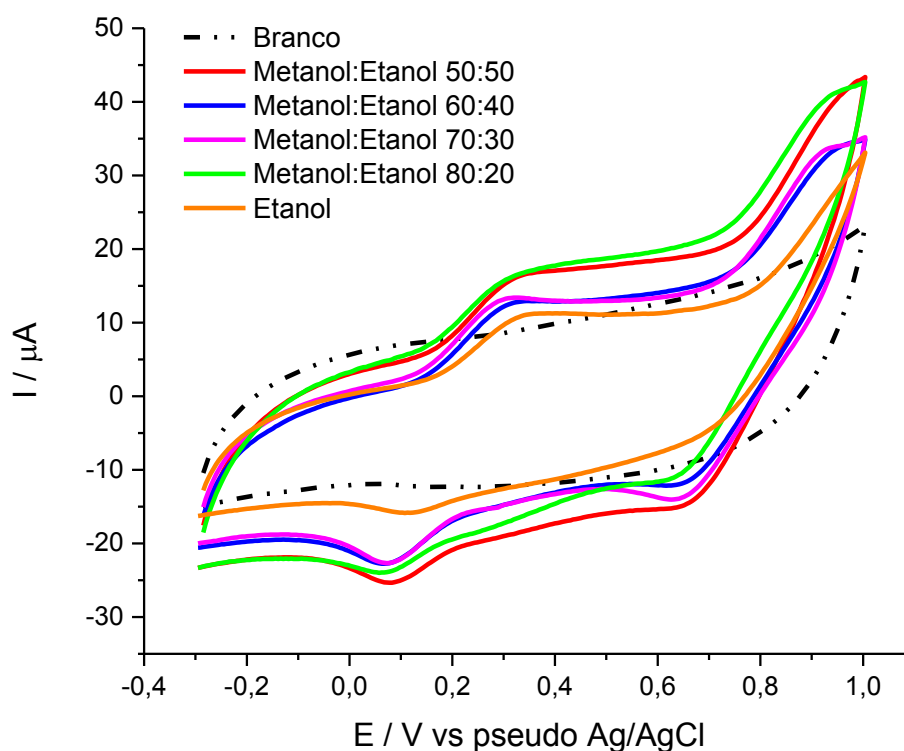
Tabela 1 - Miscibilidade de diferentes volumes (μL) de uma amostra de óleo de soja com 5 mL de solução de LiCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ preparada com diferentes proporções de metanol e etanol.

Volume de óleo (μL)	Metanol:Etanol 80:20 (v/v)	Metanol:Etanol 70:30 (v/v)	Metanol:Etanol 50:50 (v/v)
5	Miscível	Miscível	Miscível
10	Pouco miscível	Miscível	Miscível
25	Imiscível	Imiscível	Miscível
50	Imiscível	Imiscível	Imiscível

Fonte: A autora.

O comportamento eletroquímico do radical DPPH nesses meios foi investigado inicialmente por voltametria cíclica usando um eletrodo impresso de grafite. Embora as amostras sejam solúveis em etanol, conforme se observa na Figura 13, a solução de LiCl em etanol puro não gera um sinal de corrente satisfatório para o radical DPPH, sendo necessária a utilização de metanol no meio para promover um aumento no sinal. De fato, há estudos que comprovam um aumento na reatividade do DPPH na presença de metanol, quando comparado a outros solventes orgânicos (TSIMOGIANNIS; OREOPOULOU, 2004).

Figura 13 - Voltamogramas cíclicos de soluções de DPPH 1 mmol L⁻¹ preparadas em LiCl 0,05 mol L⁻¹ em diferentes proporções de metanol e etanol. Condições: velocidade de varredura de 0,05 V s⁻¹ e potencial de step de 0,005 V.



Fonte: A autora.

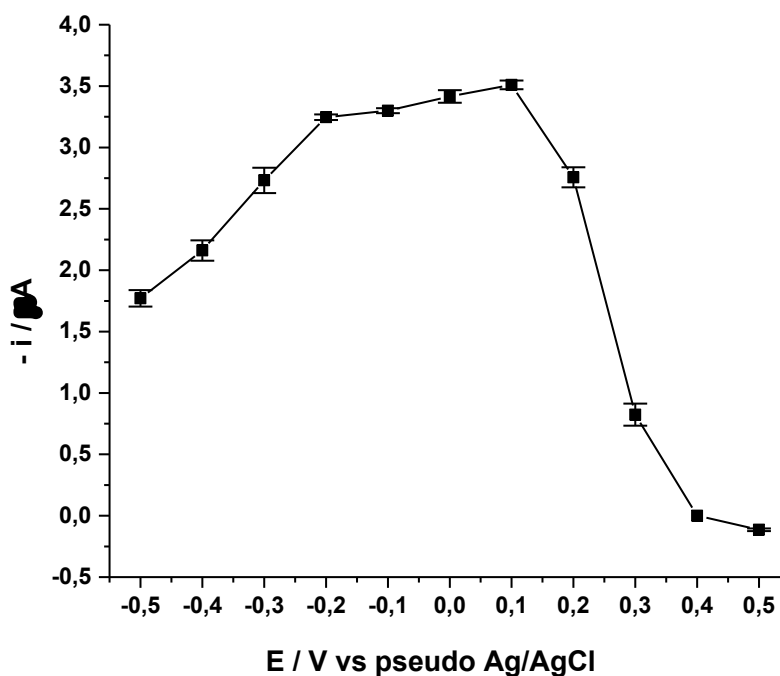
Resumidamente, tem-se que a presença do etanol no meio é necessária para promover uma melhor solubilização das amostras de óleos e azeites, enquanto que a presença do metanol auxilia na reatividade do radical DPPH, resultando em uma resposta analítica mais satisfatória. Dessa forma, visando tanto a solubilização da amostra quanto um sinal de corrente alto para o DPPH, foi escolhido trabalhar com solução de LiCl 0,05 mol L⁻¹ em metanol:etanol 50:50 (v/v)

como solvente e eletrólito suporte, promovendo a solubilização das amostras na proporção de 25 μL de óleo para 5 mL de solução.

4.2 Seleção do potencial de detecção por amperometria

Um voltamograma hidrodinâmico, realizado para selecionar o melhor potencial de detecção do analito (radical DPPH), foi obtido através do sistema BIA com detecção amperométrica, selecionando diferentes potenciais e realizando injeções da solução de DPPH ($80 \mu\text{mol L}^{-1}$) em triplicata. A Figura 14 mostra o voltamograma hidrodinâmico resultante, correspondente à média ($n=3$) dos valores de corrente obtidos em função dos potenciais aplicados, variando na faixa de $-0,5$ a $+0,5$ V.

Figura 14 – Voltamograma hidrodinâmico ($-0,5$ a $+0,5$ V) obtido por amperometria através de injeções de solução de DPPH $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($n=3$). Condições: velocidade de injeção de $345 \mu\text{L s}^{-1}$ e volume de injeção de $100 \mu\text{L}$.



Fonte: A autora.

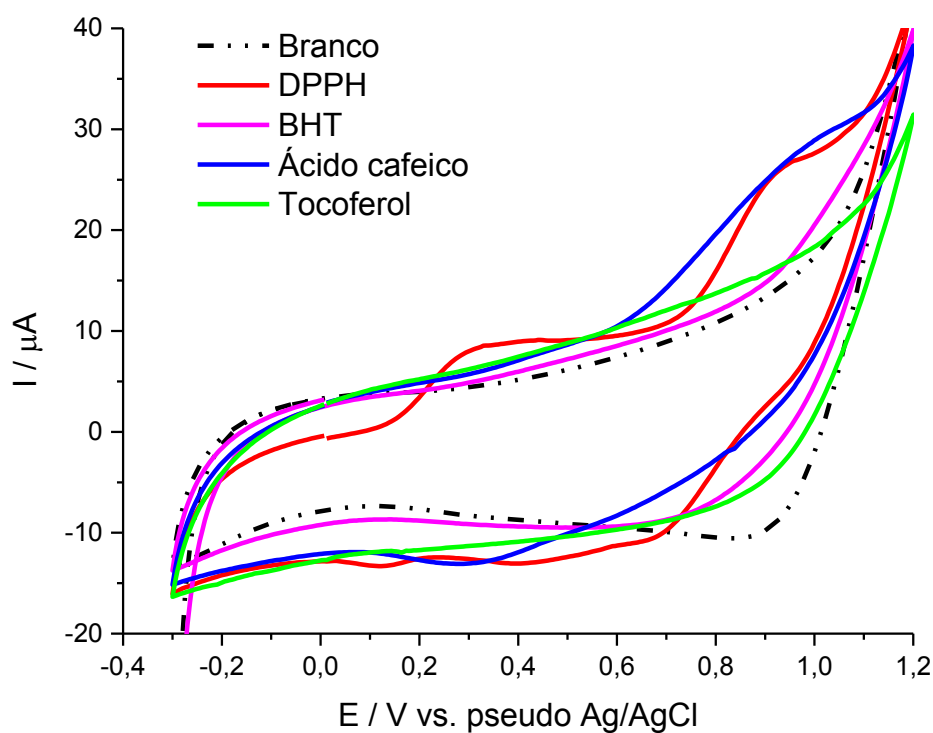
Os resultados de corrente mostrados na Figura 14 representam a redução eletroquímica do radical DPPH para o seu respectivo radical aniônico (AHMED et al., 2012). Sendo assim, com base no voltamograma obtido foi possível verificar que o potencial em que ocorre a maior

resposta de redução do radical DPPH é em +0,1 V, sendo este fixado para as análises amperométricas posteriores.

4.3 Teste de interferentes

Foram realizados voltamogramas cíclicos a fim de avaliar o perfil eletroquímico do DPPH em comparação com o dos antioxidantes α -tocoferol, ácido cafeico e BHT, conforme a Figura 15, os quais podem ser encontrados em amostras tais como as analisadas nesse trabalho.

Figura 15 - Voltamogramas cíclicos de soluções de DPPH, BHT, ácido cafeico e α -tocoferol a 1 mmol L^{-1} , preparadas em $\text{LiCl } 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol:etanol 1:1. Condições: velocidade de varredura de $0,05 \text{ V s}^{-1}$ e potencial de step de $0,005 \text{ V}$.



Fonte: A autora.

Observando os voltamogramas da Figura 15 verifica-se a ausência de sinal analítico por parte dos antioxidantes no potencial de redução do DPPH. Esse fato comprova que os antioxidantes presentes nas amostras analisadas não interferem no sinal do analito, uma vez que se oxidam em potenciais mais positivos do que +0,1 V.

Além desse estudo, para confirmar a ausência de sinal dos antioxidantes, foram realizadas injeções em triplicata ($n=3$) de α -tocoferol, ácido cafeico e BHT no sistema BIA,

utilizando o potencial de +0,1 V selecionado pelo voltamograma hidrodinâmico, e as demais condições posteriormente otimizadas (volume e velocidade de injeção). Tais injeções não geraram sinal de corrente significativo, sendo equivalente ao sinal do branco (eletrólito suporte LiCl em metanol:etanol 1:1). O mesmo foi realizado para as amostras de óleos e azeites, não apresentando qualquer sinal analítico no potencial analisado.

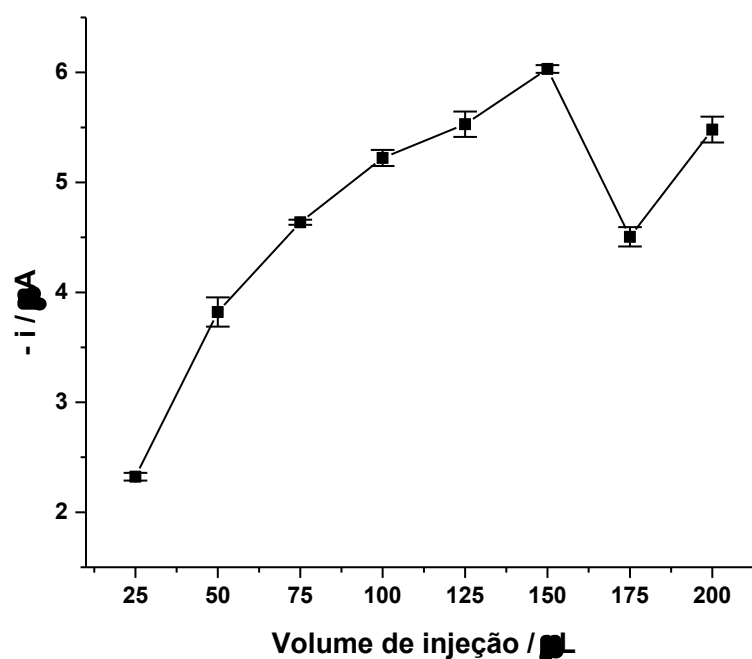
Assim, para a seleção do potencial de trabalho (+0,1 V), além de ter sido avaliado o melhor sinal amperométrico do DPPH no voltamograma hidrodinâmico, também foi considerado a ausência de resposta eletroquímica por parte dos antioxidantes, o que provocaria interferência, dificultando a análise.

Por outro lado, sabendo-se que ocorre uma reação entre os antioxidantes e o radical DPPH, após o tempo de reação espera-se que todo o antioxidante presente tenha sido consumido pelo radical, proporcionando, de qualquer maneira, uma ausência de sinal analítico do antioxidante, restando apenas o excesso de DPPH em solução, o qual será reduzido eletroquimicamente em +0,1 V.

4.4 Estudo do volume e velocidade de injeção

Selecionados o eletrólito e o potencial de trabalho para obtenção do maior sinal de redução do DPPH, foi necessária a otimização dos parâmetros analíticos relacionados ao sistema BIA, como o volume de amostra injetado e a velocidade de injeção, regulados na micropipeta eletrônica. Nas Figuras 16 e 17 é possível verificar o comportamento da corrente analítica do DPPH diante dessas variáveis.

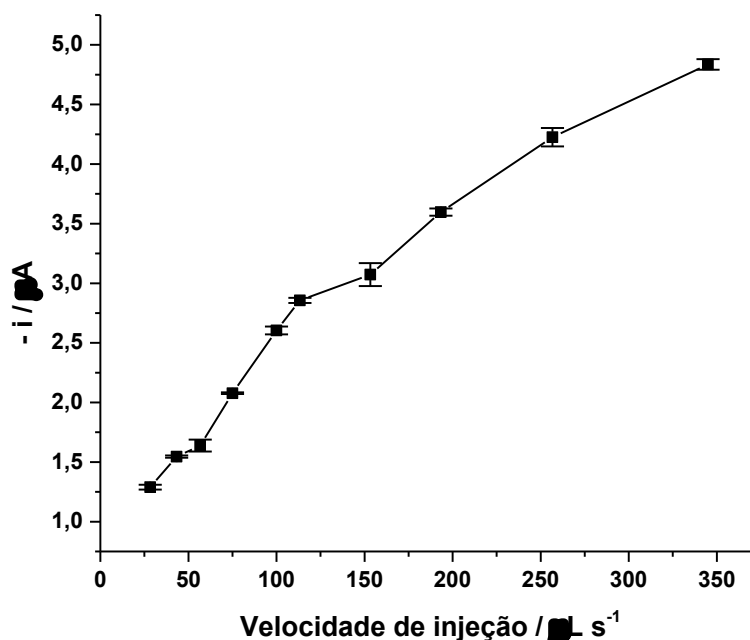
Figura 16 - Estudo do volume injetado no sistema BIA (25 a 200 μL) para injeções de DPPH $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($n=3$). Condições: potencial de +0,1 V e velocidade de injeção de $345 \mu\text{L s}^{-1}$.



Fonte: A autora.

Pela Figura 16, verifica-se que a corrente de pico aumentou com o aumento do volume injetado, de 25 até 150 μL , apresentando queda de sinal em volumes maiores do que 150 μL . Portanto, o volume de 150 μL foi selecionado para ser empregado em análises posteriores, levando em consideração a obtenção do maior sinal de corrente do DPPH, com o menor desvio possível. Resultado semelhante foi observado em outros trabalhos na literatura empregando o sistema BIA com detecção amperométrica (STEFANO et al., 2012; TORMIN et al., 2012).

Figura 17 - Estudo da velocidade de injeção no sistema BIA (28 a $345 \mu\text{L s}^{-1}$) para injeções de DPPH $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($n=3$). Condições: potencial de $+0,1 \text{ V}$ e volume de injeção de $100 \mu\text{L}$.



Fonte: A autora.

A velocidade de injeção foi avaliada mantendo-se um volume constante de DPPH $80 \mu\text{mol L}^{-1}$, e variando a velocidade de dispensa conforme as opções fornecidas pela micropipeta eletrônica (28 a $345 \mu\text{L s}^{-1}$). Pela Figura 17 pode-se observar a presença de duas faixas lineares de velocidade de injeção em função da corrente de redução, com um aumento linear das correntes de redução de DPPH até $113 \mu\text{L s}^{-1}$, e depois de 153 até $345 \mu\text{L s}^{-1}$.

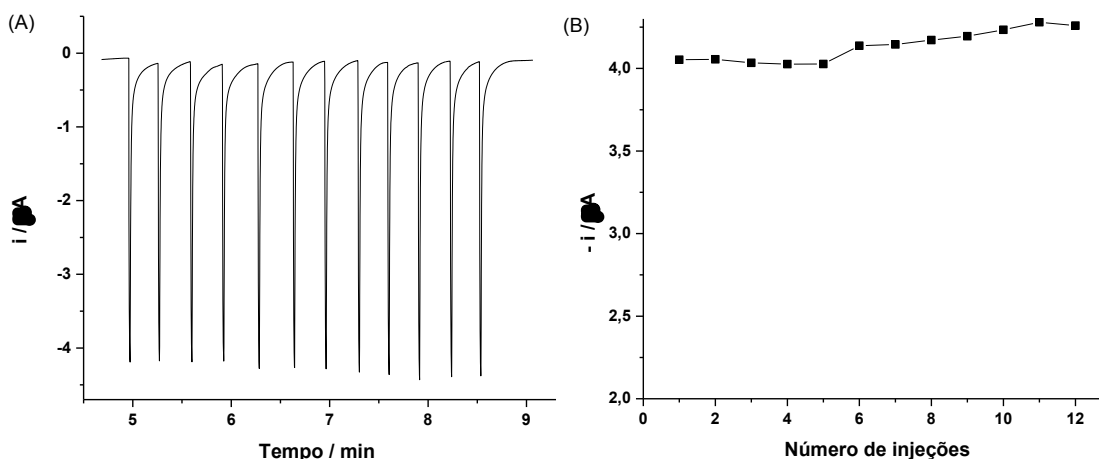
Dessa forma, o valor da velocidade de injeção selecionado foi de $193 \mu\text{L s}^{-1}$ para as medições amperométricas posteriores, visto que apresentou um alto valor de corrente e um baixo desvio padrão. Além disso, valores maiores poderiam afetar a reprodutibilidade das análises devido ao baixo número de pontos de aquisição de sinal de corrente em velocidades de injeção muito altas.

4.5 Repetibilidade

O estudo de repetibilidade, demonstrado na Figura 18, foi realizado para avaliar a precisão do método BIA de determinação do radical DPPH. O teste foi conduzido através de

uma série de 12 injeções sucessivas de solução de DPPH $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ nas condições já otimizadas anteriormente.

Figura 18 – (A) Estudo da repetibilidade por injeções sucessivas de $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ de radical DPPH ($n=12$) e (B) respectivos valores de corrente. Condições: potencial de $+0,1 \text{ V}$; volume de injeção de $150 \mu\text{L}$ e vazão de $193 \mu\text{L s}^{-1}$.



Fonte: A autora.

Foi observado um baixo desvio padrão relativo ($\text{DPR} = 2,3\%$; $n=12$), calculado conforme Equação 3, o que mostra que a análise é reprodutível na detecção do analito. Esse fato pode ser atribuído à precisão do volume e da velocidade de injeção fornecidos pela micropipeta eletrônica, e também ao posicionamento fixo da micropipeta em relação ao eletrodo descartável (aproximadamente 2 mm). Além disso, esse estudo demonstra não ocorrer adsorção do radical DPPH, bem como seu produto de redução eletroquímica, na superfície do eletrodo. Por meio dos dados da Figura 18 também foi possível calcular a frequência analítica do método BIA, estimada em cerca de 180 injeções por hora, considerando o tempo gasto para a troca das soluções injetadas em uma análise real.

$$\text{DPR} = \frac{\text{DPx}}{\bar{x}} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

DPx = Desvio padrão absoluto das medidas realizadas;

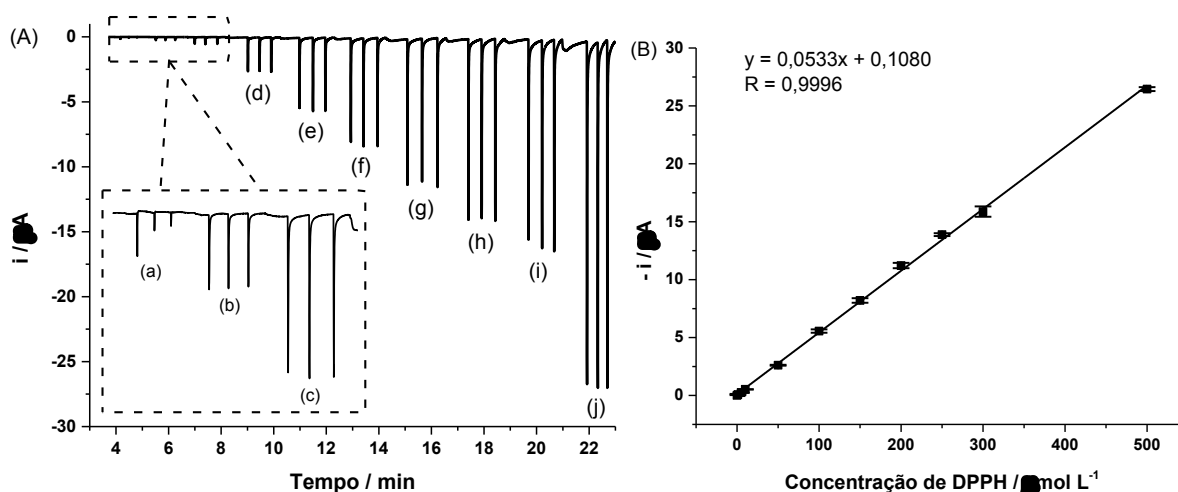
$\bar{x}$ = Média aritmética das medidas realizadas.

4.6 Linearidade da resposta analítica

Para determinar a faixa linear correspondente ao analito, foi realizado um estudo de linearidade do radical DPPH, por meio da injeção em triplicata de 150 μL de DPPH em diferentes concentrações, nas condições anteriormente otimizadas para o sistema BIA. A faixa testada variou de 0,5 a 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, no entanto, observou-se que concentrações menores que 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e maiores que 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ apresentavam desvio da linearidade.

Dessa forma, conforme mostrado na Figura 19-A, a faixa linear do analito corresponde ao intervalo de concentração entre 1,0 a 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, o que consiste em uma ampla faixa de trabalho para esse radical. Um zoom entre as injeções de 1,0 a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi aplicado para melhor visualização das respostas analíticas. A curva de calibração correspondente é apresentada na Figura 19-B, com bom coeficiente de correlação ($R = 0,9996$).

Figura 19 – (A) Resposta amperométrica do estudo de faixa linear, obtida após injeção de soluções contendo radical DPPH ($n=3$) nas seguintes concentrações: (a) 1,0; (b) 5,0; (c) 10; (d) 50; (e) 100; (f) 150; (g) 200; (h) 250; (i) 300 e (j) 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com zoom (a-c: 1,0–10 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (B) Curva de calibração de DPPH de 1,0–500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($R = 0,9996$).



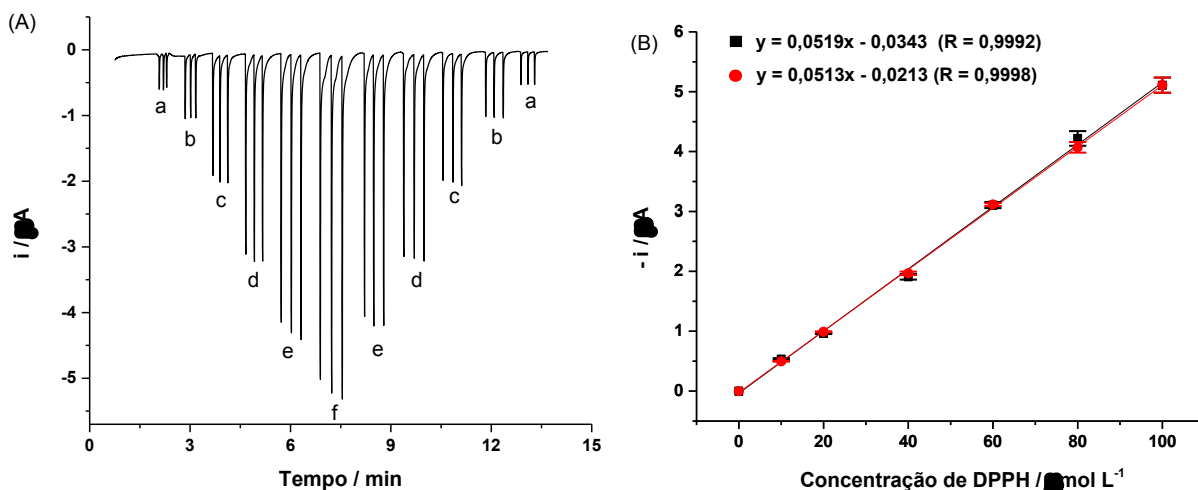
Fonte: A autora.

Em seguida a Figura 20-A apresenta injeções em triplicata de 150 μL de DPPH, registradas em +0,1 V, seguindo as demais condições otimizadas. Esse estudo foi realizado por meio de injeções com aumento de concentração do radical DPPH, na faixa de 10 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e, em seguida, injeções diminuindo a concentração nessa mesma faixa. As curvas de calibração correspondentes estão representadas na Figura 20-B, onde são observados bons

coeficientes de correlação linear tanto para as injeções de concentração crescentes ($R = 0,9992$) quanto para as injeções de concentração decrescentes ($R = 0,9998$) do analito.

Observa-se também que os valores de coeficiente angular para as concentrações crescentes ($0,0519 \mu\text{A mol}^{-1} \text{L}$) e decrescentes ($0,0513 \mu\text{A mol}^{-1} \text{L}$) estão em concordância. Isso indica ausência de efeitos residuais por parte do analito, ou seja, que não ocorre adsorção do radical DPPH na superfície do eletrodo, mesmo ao trabalhar em diferentes concentrações.

Figura 20 – (A) Resposta amperométrica obtida após injeção de soluções contendo radical DPPH ($n=3$) (a-f: $10\text{--}100 \mu\text{mol L}^{-1}$); (B) Curva de calibração do radical DPPH: aumentando a concentração (■ $R = 0,9992$), e reduzindo a concentração (● $R = 0,9998$). Condições: potencial de $+0,1 \text{ V}$; volume de injeção de $150 \mu\text{L}$ e vazão de $193 \mu\text{L s}^{-1}$.



Fonte: A autora.

Através das curvas da Figura 20-B, foram estimados os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do analito, baseados nas equações 4 e 5. Os valores encontrados foram de $1,00$ e $3,30 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

$$LD = \frac{3 \times DPb}{a} \quad (4)$$

$$LQ = \frac{10 \times DPb}{a} \quad (5)$$

Onde:

DPb = Desvio padrão do branco, injetado 10 vezes consecutivas;

a = Coeficiente angular da curva de calibração ou sensibilidade analítica.

4.7 Análise das amostras

Na Tabela 2 são apresentados os resultados em triplicata obtidos acerca do consumo de DPPH por parte das respectivas amostras de óleos e azeites, após o tempo de reação de 1 hora ao abrigo da luz, através do método BIA proposto e do método comparativo por espectrofotometria UV-Vis. O consumo de DPPH por ambos os métodos foi calculado através das equações (1) e (2), respectivamente.

Tabela 2 - Consumo de DPPH (%) obtido pelos métodos BIA e espectrofotométrico, calculados através das equações (1) e (2), respectivamente, para amostras de óleos e azeites de diferentes tipos e marcas (n=3).

Amostras	Consumo de DPPH (%)	
	BIA	UV-Vis
Azeite de Oliva <i>a</i>	25,4 ± 1,6	26,9 ± 0,3
Azeite de Oliva <i>b</i>	30,5 ± 4,6	35,7 ± 1,0
Óleo de Soja	46,5 ± 3,2	44,8 ± 3,0
Óleo de Girassol	26,3 ± 2,3	28,4 ± 1,2
Óleo de Canola	19,0 ± 2,3	19,7 ± 3,0

Fonte: A autora.

Os resultados obtidos por ambos os métodos foram estatisticamente comparados aplicando o teste *t* pareado a 95% de confiança. Não foram observadas diferenças significativas entre os dois métodos, uma vez que o valor de *t* calculado é menor que o valor crítico ($t_{\text{calculado}} = 0,7668$ e $t_{\text{crítico}} = 2,776$).

A medida do consumo de DPPH é uma maneira indireta de determinar a capacidade antioxidante de uma amostra. Sabe-se que quanto maior a porcentagem de consumo de DPPH, maior a atividade antioxidante das amostras, o que está relacionado à quantidade de antioxidante presente no óleo, e também à capacidade destes em reduzir o DPPH. Dentre as amostras avaliadas, o óleo de soja é o que apresenta a maior capacidade antioxidante, pois é capaz de consumir cerca de 46,5% de DPPH, segundo o método BIA. Na sequência tem-se o azeite de oliva *b* (30,5%), óleo de girassol (26,3%), azeite de oliva *a* (25,4%) e óleo de canola (19,0%).

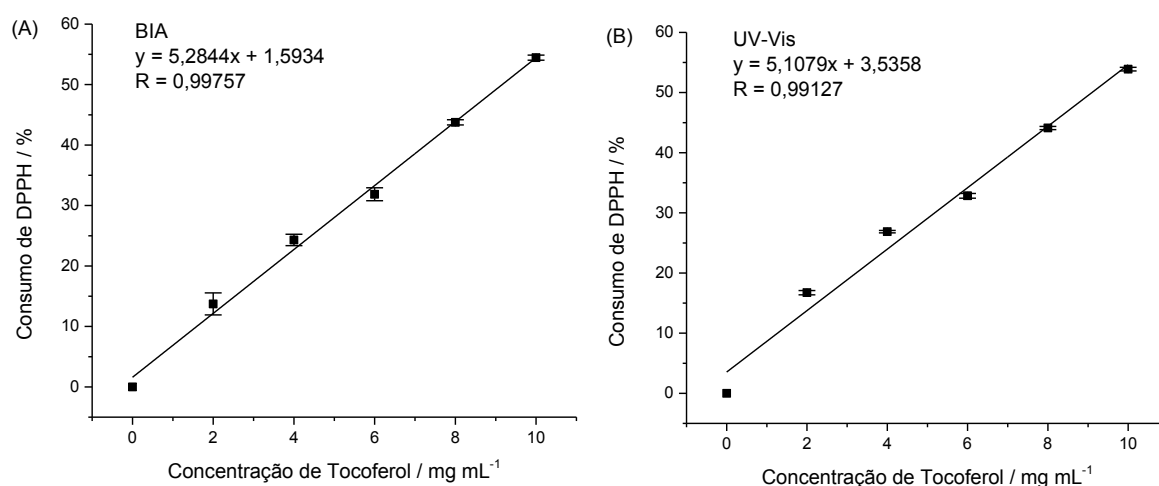
Os óleos vegetais comerciais podem apresentar antioxidantes naturais, tipicamente tocoferóis e ácido cafeico, este último em menor quantidade, ou sintéticos, como o BHT, que são adicionados à sua composição contribuindo para a atividade antioxidante das amostras. Dessa forma, além da origem vegetal do óleo, a capacidade antioxidante também pode sofrer variações dependendo da marca e das especificações do fabricante.

4.7.1 Equivalente de tocoferol

O cálculo do equivalente de tocoferol é também uma forma usual para expressar a capacidade antioxidante de amostras de óleos comestíveis, pois é o principal antioxidante presente nesta amostra (MARINOVA; BATCHVAROV, 2011).

Para determinação da quantidade equivalente de tocoferol contido em cada amostra analisada, construiu-se uma curva de calibração da porcentagem de consumo do DPPH em função da concentração de tocoferol, em uma faixa de 2 a 10 mg mL⁻¹. As curvas obtidas para os métodos BIA e UV-Vis, são apresentadas na Figura 21-A e B, respectivamente. A reação dos padrões de antioxidantes com o DPPH segue o mesmo procedimento descrito para as amostras.

Figura 21 – Consumo de DPPH (%) em função da concentração de tocoferol (2 a 10 mg mL⁻¹) (A) pelo método BIA proposto e (B) pelo método comparativo UV-Vis.



Fonte: A autora.

Os coeficientes de correlação das curvas do método BIA ($R = 0,9976$) e UV-Vis ($R = 0,9913$) indicam boa linearidade entre o consumo de DPPH e a concentração de tocoferol, o

que permite obter a quantidade equivalente de tocoferol nas amostras de óleo, através das equações de reta obtidas. A Tabela 3 apresenta os resultados expressos em miligramas de tocoferol equivalente por grama de amostra, considerando as diluições realizadas durante a reação com DPPH e o valor de densidade de cada amostra de óleo.

Tabela 3 – Equivalente de tocoferol (mg de tocoferol /g de amostra) calculado pelos métodos BIA e espectrofotométrico para amostras de óleos e azeites de diferentes tipos e marcas.

Amostras	Equivalente de Tocoferol (mg/g)	
	BIA	UV-Vis
Azeite de Oliva <i>a</i>	4,54 ± 0,31	4,62 ± 0,07
Azeite de Oliva <i>b</i>	5,84 ± 0,78	6,94 ± 0,22
Óleo de Soja	9,23 ± 0,65	9,01 ± 0,72
Óleo de Girassol	4,71 ± 0,44	4,91 ± 0,23
Óleo de Canola	3,45 ± 0,45	3,31 ± 0,61

Fonte: A autora.

As quantidades equivalentes de tocoferol em cada amostra foram muito semelhantes quando calculadas através dos resultados obtidos por ambos os métodos, não sendo observado diferenças significativas entre eles, por meio do teste t pareado a 95% de confiança ($t_{calculado} = 0,8635$ e $t_{critico} = 2,776$).

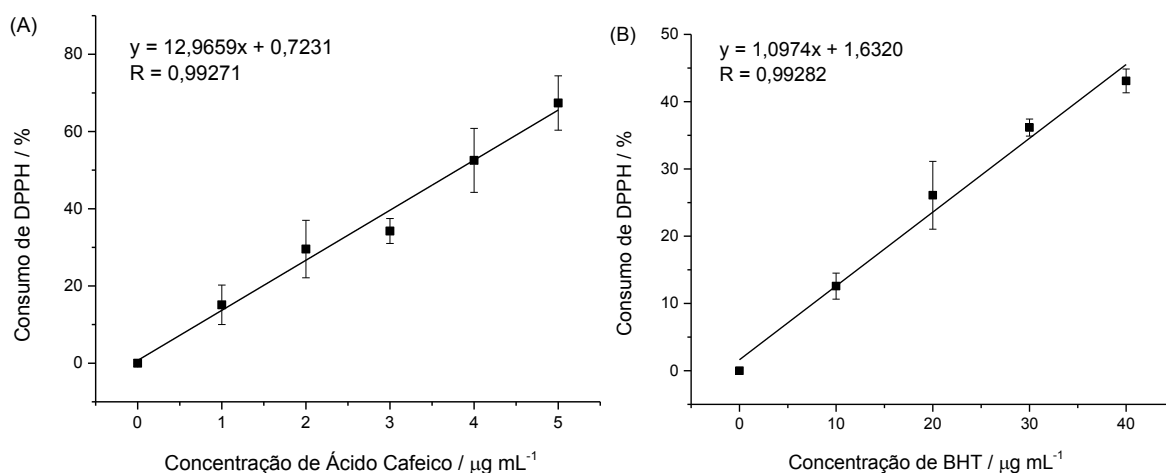
Observa-se que os resultados da Tabela 3 estão coerentes com os resultados da capacidade antioxidante obtida para cada amostra, mostrados anteriormente na Tabela 2. Conforme visto, dentre as amostras avaliadas, o óleo de soja foi o que apresentou a maior porcentagem de consumo de DPPH (46,5%) pelo método BIA e, consequentemente, a maior quantidade de tocoferol por grama de amostra (9,23 mg/g). A mesma concordância é observada para os demais óleos e azeites estudados, comprovando que o consumo de DPPH é um parâmetro eficaz para a determinação da capacidade antioxidante de uma amostra, uma vez que quanto maior for o consumo desse radical por parte da amostra, maior a atividade antioxidante desta, devido a uma maior concentração de antioxidante presente, conforme demonstrado.

4.7.2 Equivalente de ácido cafeico e BHT

Embora presentes em menor quantidade nas amostras, também se estimaram as quantidades de ácido cafeico e BHT equivalentes nas mesmas amostras, somente pelo método BIA. Semelhante ao realizado para o tocoferol, foram construídas curvas de calibração da

porcentagem de consumo do DPPH em função da concentração dos antioxidantes, na faixa de 1 a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o ácido cafeico e 10 a 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o BHT. As respectivas curvas são representadas na Figura 22-A e B.

Figura 22 – Consumo de DPPH (%) em função da concentração de (A) ácido cafeico (1 a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e (B) BHT (10 a 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) pelo método BIA.



Fonte: A autora.

Os coeficientes de correlação linear obtidos para ambas as curvas demonstram boa linearidade entre a porcentagem de consumo de DPPH e a concentração dos antioxidantes, possibilitando, através das respectivas equações de reta, expressar a capacidade antioxidante destas amostras em equivalente de ácido cafeico e de BHT. A Tabela 4 apresenta os resultados de equivalente de ácido cafeico e BHT, em microgramas, contidos em cada grama de amostra, considerando as diluições realizadas durante a reação com DPPH e a densidade correspondente a cada óleo.

Tabela 4 – Equivalente de ácido cafeico (μg de ácido cafeico /g de amostra) e equivalente de BHT (μg de BHT /g de amostra) calculado pelo método BIA para amostras de óleos e azeites de diferentes tipos e marcas.

Amostras	Equivalente de Ácido Cafeico ($\mu\text{g/g}$)	Equivalente de BHT ($\mu\text{g/g}$)
Azeite de Oliva <i>a</i>	$1,92 \pm 0,13$	$21,8 \pm 1,5$
Azeite de Oliva <i>b</i>	$2,45 \pm 0,31$	$28,1 \pm 3,6$
Óleo de Soja	$3,83 \pm 0,27$	$44,4 \pm 3,1$
Óleo de Girassol	$1,99 \pm 0,18$	$22,6 \pm 2,1$
Óleo de Canola	$1,48 \pm 0,18$	$16,6 \pm 2,2$

Fonte: A autora.

Assim como os resultados obtidos para o tocoferol, as quantidades equivalentes de ácido cafeico e BHT nas amostras também se mostraram coerentes com as respectivas porcentagens de consumo de DPPH, apresentando a maior quantidade equivalente de antioxidante a amostra que proporcionou o maior consumo do radical. A seguir será discutido o poder de cada antioxidante em função dos resultados obtidos para consumo do radical DPPH.

4.8 Avaliação dos antioxidantes

A Tabela 5 apresenta um resumo dos dados anteriormente obtidos das Figuras 21 e 22 para discussão.

Tabela 5 – Dados de desempenho dos antioxidantes avaliados, obtidos através do método eletroquímico BIA proposto.

Antioxidante	Faixa linear	Sensibilidade	R	EC ₅₀
Tocoferol	2 - 10 mg mL ⁻¹	5,2844 % mg ⁻¹ mL	0,9976	9,16 mg mL ⁻¹
Ácido cafeico	1 - 5 μg mL ⁻¹	12,966 % μg^{-1} mL	0,9927	3,80 μg mL ⁻¹
BHT	10 - 40 μg mL ⁻¹	1,0974 % μg^{-1} mL	0,9928	44,08 μg mL ⁻¹

Fonte: A autora.

Conforme descrito na Tabela 5, verifica-se que para todos os antioxidantes avaliados foram obtidos valores de coeficiente de correlação linear satisfatórios. Outro fator que se pode observar é que o antioxidante tocoferol apresenta uma faixa de trabalho na ordem de miligramas, enquanto as demais encontram-se em microgramas. Com isso pode-se inferir que o tocoferol é menos sensível ao método proposto (5,2844 % mg⁻¹ mL), o que é confirmado

pelos resultados de sensibilidade. Por outro lado, o ácido cafeico apresenta a menor faixa linear de trabalho, sendo, portanto, o mais sensível ($12,966 \% \mu\text{g}^{-1} \text{ mL}$), seguido do BHT ($1,0974 \% \mu\text{g}^{-1} \text{ mL}$).

Foram calculados também os valores de concentração eficaz (EC_{50}), que consiste na concentração de antioxidante necessária para consumir 50% do radical DPPH, após 1 hora de reação. Esse cálculo foi efetuado por meio das respectivas curvas de calibração de cada antioxidante. Sabe-se que, quanto menor for a EC_{50} , maior será a capacidade antioxidante de uma espécie, uma vez que uma concentração baixa da espécie em questão já seria suficiente para consumir o DPPH pela metade.

Dessa forma, pelos resultados da Tabela 5 conclui-se que, dentre as espécies avaliadas, a de maior capacidade antioxidante é o ácido cafeico, por apresentar a menor concentração eficaz ($\text{EC}_{50} = 3,80 \mu\text{g mL}^{-1}$), seguido do BHT ($\text{EC}_{50} = 44,08 \mu\text{g mL}^{-1}$), e por fim o tocoferol ($\text{EC}_{50} = 9,16 \text{ mg mL}^{-1}$), o que está de acordo com trabalhos encontrados na literatura (GADOW; JOUBERT; HANSMANN, 1997; PAPADOPOULOS; BOSKOU, 1991). O valor de sensibilidade maior para o ácido cafeico indica que este reagiu de maneira mais eficaz com o DPPH, confirmando sua maior capacidade antioxidante.

4.9 Limitações do método proposto

Conforme estimado pelo teste de repetibilidade, tem-se que a frequência analítica do método BIA proposto é de aproximadamente 180 injeções por hora, resultando assim em um volume total de 27 mL após 1 hora de análise (considerando volume de injeção de 150 μL de amostra). Dessa forma, considerando que a capacidade da célula BIA é de 100 mL, dos quais apenas 80 mL são inicialmente preenchidos com eletrólito, a capacidade máxima da célula seria atingida em menos de 1 hora. Portanto, o excesso de eletrólito deve ser removido caso seja necessário um tempo maior de análise.

Através dos testes realizados constatou-se que o eletrodo impresso de grafite (SPGE) utilizado é capaz de operar continuamente no monitoramento do radical DPPH por detecção amperométrica por cerca de 8 horas, equivalente a um dia inteiro de trabalho, sem a necessidade de substituição. Além disso, também foi possível a utilização do eletrodo por 10 dias consecutivos, não constatando variações significativas no sinal. Isso é possível especialmente ao se trabalhar com esse analito, uma vez que não ocorre adsorção do DPPH na superfície do eletrodo de trabalho. Dessa forma, após a substituição da solução eletrolítica, o sistema pode

ser usado continuamente para determinação da capacidade antioxidante de centenas de amostras, através de equipamentos simples e portáteis.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se através desse trabalho que o método eletroquímico de análise por injeção em batelada (BIA) proposto para a determinação da capacidade antioxidante de amostras de óleos comestíveis pode atuar como um substituto ao método espectrofotométrico já existente, uma vez que os resultados encontrados para ambos os métodos são equivalentes, a 95% de confiança. O método eletroquímico baseado no consumo do radical DPPH apresentou também boa sensibilidade, precisão ($DPR = 2,3\%$) e rapidez (180 h^{-1}) na determinação da capacidade antioxidante das amostras de óleos comestíveis e também dos padrões de antioxidantes analisados.

Através do método proposto pôde ser determinado não só a capacidade antioxidante das amostras, tendo como parâmetro o consumo do radical DPPH, mas também foi determinado o equivalente de cada antioxidante nelas contido, fornecendo assim informações completas acerca da amostra em estudo, tudo isso tendo sido executado pelo mesmo método, utilizando os mesmos reagentes.

Observou-se também que o eletrodo SPGE utilizado, embora possa ser descartável, apresentou boa resistência para análises consecutivas, podendo ser utilizado por mais de 10 dias sem perder a eficiência do sinal analítico, uma vez que não ocorre adsorção do analito em sua superfície. Além disso, o SPGE foi seletivo e sensível ao sinal do DPPH, além de ser compatível com amostras e solventes orgânicos, como demonstrado para a análise de óleos e azeites, podendo assim ser aplicado para análises de outras amostras de alimentos e matrizes oleosas.

Com isso, conclui-se que o método do radical DPPH associado à análise por injeção em batelada consiste em um método versátil, podendo determinar, de maneira indireta, diferentes parâmetros a respeito da atividade antioxidante das amostras de interesse. Ademais, o método BIA proposto apresenta vantagens frente ao método espectrofotométrico, pois é capaz de realizar análises mesmo diante de amostras coloridas ou turvas, não sendo suscetível a interferências de matriz, e permite a reutilização do mesmo eletrólito e eletrodo para várias análises, além de exigir um baixo consumo de reagentes, uma vez que são feitas injeções na ordem de microlitros. Por fim, é um método que fornece praticidade, pois pode ser facilmente adaptado para análises em campo, devido à utilização dos eletrodos impressos descartáveis e potenciostatos portáteis.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução nº 04, de 24 de novembro de 1988. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 de dez. de 1988. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/04_cns.pdf/a85ab159-9cc5-41b8-9ee1-512af02d1a10>. Acesso em: 15 out. 2018.
- 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**, Baltimore, v. 159, n. 5, p. 103-109, 2012.
- 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**, London, v. 104, n. 2, p. 734-739, 2007.
- ALMEIDA, E. S.; SILVA, L. A.; SOUSA, R. M. F.; RICHTER, E. M.; FOSTER, C. W.; BANKS C. E.; MUNOZ, R. A. A. Organic-resistant screen-printed graphitic electrodes: Application to on-site monitoring of liquid fuels. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 934, p. 1-8, 2016.
- 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**, London, v. 97, p. 267-272, 2012.
- ANTOLOVISH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analytst**, London, v. 127, n. 1, p. 183-198, 2002.
- ANTONIASSI, R. Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 19, p. 353-380, 2001.
- BOTTERWECK, A. A. M.; VERHAGEN, H.; GOLDBOEHM, 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**, Oxford, v. 38, n. 7, p. 599-605, 2000.
- 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**, Weinheim, v. 7, n. 3, p. 225-229, 1994.
- 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**, London, v. 75, n. 1, p. 312-316, 2008.
- CASTELO-BRANCO, V. N.; SANTANA, I.; DI-SARLI, V. O.; FREITAS, S. P.; TORRES, A. G. Antioxidant capacity is a surrogate measure of the quality and stability of vegetable oils. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 118, n. 2, p. 224-235, 2016.

CASTELO-BRANCO, V. N.; TORRES, A. G. Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 173-187, 2011.

DAMASCENO, S. S.; SANTOS, N. A.; SANTOS, I. M. G.; SOUZA, A. L.; SOUZA, A. G.; QUEIROZ, N. Caffeic and ferulic acids: an investigation of the effect of antioxidants on the stability of soybean biodiesel during storage. **Fuel**, London, v. 107, p. 641-646, 2013.

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

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

FOSTER, C. W.; METTERS, J. P.; KAMPOURIS, D. K.; BANKS, C. E. Ultraflexible screen-printed graphitic electroanalytical sensing platforms. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 26, p. 262-274, 2014.

GADOW, V. A.; JOUBERT, E.; HANSMANN, C. F. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -Tocopherol, BHT, and BHA. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, London, v. 45, n. 3, p. 632-638, 1997.

GIOIELLI, L. A. Óleos e gorduras vegetais: composição e tecnologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 211-232, 1996.

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

HANSON, K. M.; PAPPAS, T. J.; HOLLAND, L. A. Electrochemical detection in capillary electrophoresis – Amperometry. **Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis**, Morgantown, v. 8, p. 413-440, 2005.

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**, Amsterdam, v. 1572, n. 1, p. 123-132, 2002.

JIA, C.; WANG, X.; QI, J.; HONG, S.; LEE, K. Antioxidant properties of caffeic acid phenethylEster and 4-vinylcatechol in stripped soybean oil. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 81, n. 1, p. 35-41, 2016.

KHAN, F. A.; MAALIK, A.; MURTAZA, G. Inhibitory mechanism against oxidative stress of caffeic acid. **Journal of Food and Drug Analysis**, Taiwan, v. 24, n. 4, p. 695-702, 2016.

KIM, D. O.; JEONG, W.; LEE, C. Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, London, v. 81, n. 3, p. 321-326, 2003.

LEÓN, G. I. R. C.; GÓMEZ HERNÁNDEZ, M.; DOMÍNGUEZ Y RAMÍREZ, A. M.; MEDINA LÓPEZ, J. R.; ALARCÓN ÁNGELES, G.; MORALES PÉREZ, A. Adaptation of DPPH method for antioxidant determination. **ECS Transactions**, New Jersey, v. 36, n. 1, p. 401-411, 2011.

LI, M.; LI, Y. T.; LI, D. W.; LONG, Y. T. Recent development and applications of screen-printed electrodes in environmental assays – A review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 734, p. 31-44, 2012.

LUO, M.; ZHANG, R. Y.; ZHENG, Z.; WANG, J. L.; JI, J. B. Impact of some natural derivatives on the oxidative stability of soybean oil based biodiesel. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 241-246, 2012.

MARINOVA, E. M.; TONEVA, A.; YANISHLIEVA, N. Comparison of the antioxidative properties of caffeic and chlorogenic acids. **Food Chemistry**, London, v. 114, n. 4, p. 1498-1502, 2009.

MARINOVA, G.; BATCHVAROV, V. Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, Sófia, v. 17, n. 1, p. 11-24, 2011.

MENDEL, S.; YODIM, M. B. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 37, n. 3, p. 304-317, 2004.

METTERS, J. P.; KADARA, R. O.; BANKS, C. E. Electroanalytical properties of screen printed graphite microband electrodes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Lausanne, v. 169, p. 136-143, 2012.

MILARDOVIC, S.; IVEKOVIC, D.; GRABARIC, B. S. A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. **Bioelectrochemistry**, Amsterdam, v. 68, n. 2, p. 175–180, 2006.

MORAIS, S. M.; EVELINE, S. B.; CAVALCANTI, S. M. O.; COSTA, L. A. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 315-320, 2009.

OLIVEIRA, G. K. F.; TORMIN, T. F.; SOUSA, R. M. F.; OLIVEIRA, A.; MORAES, S. A. L.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Batch-injection analysis with amperometric detection of the DPPH radical for evaluation of antioxidant capacity. **Food Chemistry**, London, v. 192, p. 691–697, 2016.

OLIVEIRA, L. L.; CARVALHO, M. V.; MELO, L. Health promoting and sensory properties of phenolic compounds in food. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, p. 764-779, 2014.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.

PAPADOPOULOS, G.; BOSKOU, D. Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v. 68, n. 9, p. 669-671, 1991.

PISOSCHI, A. M.; CIMPEANU, C.; PREDOI, G. Electrochemical methods for total antioxidant capacity and its main contributors determination: A review. **Open Chemistry**, Berlin, v. 13, n. 1, p. 824-856, 2015.

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

RAMADAN, M. F.; MOERSEL, J. T. Screening of the antiradical action of vegetable oils. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, n. 8, p. 838-842, 2006.

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

RICHTER, E. M.; TORMIN, T. F.; MUNOZ, R. A. A.; CUNHA, R. R. A compact batch injection analysis cell for screen printed electrodes: A portable plectrochemical system for on-site analysis. **Electroanalysis**, New York, v. 28, p. 1856-1859, 2016.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SOCHOR, J.; DOBES, J.; KRYSTOFOVA, O.; RUTTKAY-NEDECKY, B.; BABULA, P.; POHANKA, M.; JURIKOVA, T.; ZITKA, O.; ADAM, V.; KLEJDUS, B.; KIZEK, R. Electrochemistry as a tool for studying antioxidant properties. **International Journal of Electrochemical Science**, Belgrade, v. 8, p. 8464-8489, 2013.

SOUSA, J. B. A. S. P. **Atividade biológica de derivados do ácido cafeico**: efeito antioxidante e anti-inflamatório. 2008. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, 2008.

SOUSA, R. M. F.; OLIVEIRA, G. K. F.; OLIVEIRA, A.; MORAES, S. A. L.; MUNOZ, R. A. A. Determination of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. In: RUIZ-CAPILLAS, C.; NOLLET, L. M. L. (Org.). **Flow Injection Analysis of Food Additives**, 1.ed. Boca Raton: CRC Press – Taylor & Francis Group, 2015. cap. 29, v. 29, p. 539-570.

SQUISSATO, A. L.; SILVA, W. P.; DEL CLARO, A. T. S.; ROCHA, D. P.; DORNELLAS, R. M.; RICHTER, E. M.; FOSTER, C. W.; BANKS, C. E.; MUNOZ, R. A. A. Portable electrochemical system using screen-printed electrodes for monitoring corrosion inhibitors. **Talanta**, London, v. 174, p. 420-427, 2017.

STEFANO, J. S.; CORDEIRO, D. S.; MARRA, M. C.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Batch-injection versus flow-injection analysis using screen-printed electrodes: Determination of ciprofloxacin in pharmaceutical formulations. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 28, n. 2, p. 350-357, 2016.

STEFANO, J. S.; 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**, São Paulo, v. 23, n. 10, p. 1834-1838, 2012.

STEFANO, J. S.; TORMIN, T. F.; SILVA, J. P.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Amperometric determination of omeprazole on screen-printed electrodes using batch injection analysis. **Microchemical Journal**, New York, v. 133, p. 398-403, 2017.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **UNOPAR Científica: ciências biológicas e da saúde**, Londrina, v. 14, n. 4, p. 263-169, 2012.

SZYDŁOWSKA-CZERNIAK, A.; KARLOVITS, G.; DIANOCZKI, C.; RECSEG, K.; SZŁYK, E. Comparison of two analytical methods for assessing antioxidant capacity of rapeseed and olive oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Boulder, v. 85, n. 2, p. 141-149, 2008.

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**, London, v. 99, p. 527-531, 2012.

TORMIN, T. F.; CUNHA, R. R.; DA SILVA, R. A. B.; MUNOZ, 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**, Lausanne, v. 202, p. 93-98, 2014.

TORMIN, T. F.; OLIVEIRA, G. K. F.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. 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**, Weinheim, v. 27, p. 1-8, 2015.

TSIMOGIANNIS, D. I.; OREOPOULOU, V. 2004. Free radical scavenging and antioxidant activity of 5,7,3',4' hydroxy-substituted flavonoids. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 5, n. 4, p. 523-528, 2004.

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

WANG, J.; TIAN, B.; NASCIMENTO, V. B.; ANGNES, L. Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks. **Electrochimica Acta**, New York, v. 43, n. 23, p. 3459-3465, 1998.

WISEMAN, S.; WATERHOUSE, A.; KORVER, O. The health effects of tea and tea components: Opportunities for standardizing research methods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 41, n. 5, p. 387-412, 2001.

ZHUANG, Q.; SCHOLZ, F.; PRAGST, F. The voltammetric behaviour of solid 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) microparticles. **Electrochemistry Communications**, New York, v. 1, n. 9, p. 406-410, 1999.

ZIMMERMANN, A. M.; KIRSTEN, V. R. Alimentos com função antioxidante em doenças crônicas: uma abordagem clínica. **Disciplinarum Scientia**, Santa Maria, v. 9, n. 1, p. 51-68, 2008.