



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

EMILY KUSSMAUL GONÇALVES MORENO

**Avaliação do potencial antioxidante e atividade vasorrelaxante
de *Cinnamomum* sp.**

Goiânia
2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

EMILY KUSSMAUL GONÇALVES MORENO

3. Título do trabalho

Avaliação do potencial antioxidante e atividade vasorrelaxante de Cinnamomum sp.

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);
 - b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
- O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Eric De Souza Gil, Professor do Magistério Superior**, em 31/05/2023, às 14:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Emily Kussmaul Goncalves, Discente**, em 06/06/2023, às 00:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3791641** e o código CRC **652C60DA**.

EMILY KUSSMAUL GONÇALVES MORENO

**Avaliação do potencial antioxidante e atividade vasorrelaxante
de *Cinnamomum* sp.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.
Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientador: Prof. Dr. Eric de Souza Gil

Coorientador: Dr. Isaac Yves Lopes de Macêdo

Goiânia

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Moreno, Emily Kusssmaul Gonçalves
Avaliação do potencial antioxidante e atividade vasorrelaxante de Cinnamomum sp. [manuscrito] / Emily Kusssmaul Gonçalves Moreno. - 2023.
xxiii, 81 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Eric de Souza Gil; co-orientador Dr. Isaac Yves Lopes de Macêdo.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Goiânia, 2023.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Antioxidante. 2. Voltametria. 3. Biossensor. 4. Vasorrelaxante. 5. Cinnamomun sp.. I. Gil, Eric de Souza, orient. II. Título.

CDU 615.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

FACULDADE DE FARMÁCIA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº **141** da sessão de Defesa de Tese de **EMILY KUSSMAUL GONÇALVES MORENO** que confere o título de Doutora em **Ciências Farmacêuticas**, na área de concentração em **Fármacos e Medicamentos**.

Aos dezesseis **dias do mês de maio de dois mil e vinte e três**, a partir das **08:00 horas**, através de **videoconferência**, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada **“Avaliação do potencial antioxidante e atividade vasorrelaxante de Cinnamomum sp.”**. Os trabalhos foram instalados pelo co-orientador, **Doutor Isaac Yves Lopes de Macêdo (FF/UFG)** - cuja participação ocorreu através de **videoconferência**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Professora Doutora Telma Alves Garcia (FF/UFG)** - cuja participação ocorreu através de **videoconferência**, membro titular interno; **Professor Doutor Fábio Bahls Machado (UniGoiás)** - cuja participação ocorreu através de **videoconferência**, membro titular externo; **Professor Doutor Matheus Lavorenti Rocha (FF/UFG)** - cuja participação ocorreu através de **videoconferência**, membro titular externo; **Professor Doutor Murilo Ferreira de Carvalho (UNIP)** - cuja participação ocorreu através de **videoconferência**, membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo **Doutor Isaac Yves Lopes de Macêdo (FF/UFG)** - cuja participação ocorreu através de **videoconferência**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos dezesseis **dias do mês de maio de dois mil e vinte e três**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Matheus Lavorenti Rocha, Professor do Magistério Superior**, em 16/05/2023, às 09:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **ISAAC YVES LOPES DE MACÊDO, Usuário Externo**, em 16/05/2023, às 09:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **MURILO FERREIRA DE CARVALHO, Usuário Externo**, em 16/05/2023, às 09:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Telma Alves Garcia, Professora do Magistério Superior**, em 16/05/2023, às 09:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **FÁBIO BAHLS MACHADO, Usuário Externo**, em 16/05/2023, às 11:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso=0, informando o código verificador **3703661** e o código CRC **EF11264A**.

Referência: Processo nº 23070.021547/2023-15

SEI nº 3703661



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Prof. Dr. Eric, de Souza Gil

Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Profa. Dra. Carolina Horta Andrade

Goiânia-GO

2023

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal de Goiás
BANCA EXAMINADORA

Aluna: Ms. Emily Kussmaul Gonçalves Moreno

Orientador: Prof. Dr. Eric de Souza Gil

Coorientador: Dr. Isaac Yves Lopes de Macêdo

Dr. Isaac Yves Lopes de Macêdo / Presidente

Pesquisador na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Profa. Dra. Telma Alves Garcia / Membro Titular

Professora da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Prof. Dr. Matheus Lavorenti Rocha / Membro Titular

Professor da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Prof. Dr. Murilo Ferreira de Carvalho / Membro Titular

Professor da Universidade Paulista, UNIP.

Prof. Dr. Fabio Bahls Machado/ Membro Titular

Professor do Centro Universitário de Goiás, UNIGOIÁS.

Prof. Dr. Bruno Junior Neves/ Membro Suplente

Professor da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Dra. Bruna Guimarães Isecke / Membro Suplente

Pesquisadora na Universidade Federal de Goiás, UFG.

Data: 16/05/2023

***Aos meus amados filhinhos Davi e
Melissa, minha maior alegria e
motivação.***

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, criador e mantenedor da minha vida. Tudo que sou devo a Ele que me trouxe a esse mundo com propósito e está sempre ao meu lado, me guiando, orientando e auxiliando nesta caminhada.

Agradeço profundamente aos meus pais, José Cândido Gonçalves e Haidi Kussmaul Gonçalves, meus maiores instrutores, incentivadores e responsáveis pela minha formação. Não existem palavras para explicar tamanha gratidão por tudo o que já me proporcionaram e representam para mim. Obrigada pelo amor incondicional, pela abdicção e esforços constantes. Amo vocês com todo o meu coração.

Agradeço imensamente ao meu esposo, Marcus Moreno, por dividir comigo todos os sonhos e lutas diárias. Essa vitória é nossa, pois não teria conseguido sem você. Muito obrigada por sempre acreditar em mim, por ser meu ombro amigo e me ajudar a chegar mais longe do que achei ser possível.

Gratidão especial ao meu filho Davi, mesmo tão pequeno me ensina diariamente sobre o amor, a bondade, a beleza de cada apreendizado e a verdadeira felicidade.

Gratidão também a minha filhinha Melissa, que ainda em meu ventre, desperta em mim a vontade de ser melhor a cada dia, me preenche com um amor puro e me dá forças para continuar caminhando. Você, seu irmão e o papai são a minha melhor parte. Todo o meu amor por vocês.

Muito obrigada também aos meus irmãos Cádís e Evelyn, que já compartilharam tantas histórias e aventuras comigo. Vocês são fundamentais para mim. Obrigada por tudo.

Minha gratidão a todos os demais familiares, avós, tios, primos, sogros, cunhados e sobrinhas, vocês iluminam a minha vida. Amo vocês!

Minha eterna gratidão aos meus amigos, aqueles que me acompanham nas conquistas e desafios da vida. Obrigada pelas risadas, aprendizados, experiências compartilhadas. A vida é mais feliz com vocês.

Grande gratidão ao meu orientador, Prof. Dr. Eric de Souza Gil, pela orientação desde o mestrado. Muito obrigada por todas as oportunidades e ensinamentos que ultrapassaram os conceitos acadêmicos. Obrigada pela paciência e compreensão nas minhas muitas fases como acadêmica, profissional e mãe. Foi muito bom trabalhar e aprender com o senhor.

Muito obrigada ao meu co-orientador, Dr. Isaac Yves Lopes de Macêdo, que além de me orientar em diversas etapas deste projeto é um grande amigo.

À Universidade Federal de Goiás (UFG), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela importante contribuição em minha formação.

Muito obrigada também aos colegas do Laboratório de Análise Farmacêutica e Ambiental (LAFAM) pela parceria e colaborações. Aqui destaco meus amigos LAFAMtásticos, Bruna, Carlos, Edson, Érica, Fábio, Giovanna, Isaac, Karlla, Luane, Mayk e Murilo. Vocês fizeram essa trajetória mais fácil e prazerosa.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela concessão da bolsa de doutorado.

À servidora Fernanda Bellato, pela disposição, profissionalismo e eficiência em suas atividades prestadas junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Agradeço ao Prof. Dr. Matheus Lavorenti Rocha e ao Laboratório de Farmacologia Cardiovascular (LAFACARDIO) pela colaboração nos ensaios farmacológicos.

Ao Prof. Dr. José Realino de Paula e ao Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN) pela contribuição na produção dos extratos.

À Profª. Dra. Danielle Guimarães Almeida Diniz e ao Centro de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Fármacos, Medicamentos e Cosméticos (FARMATEC) pela colaboração na liofilização dos extratos.

Ao Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz e ao Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LaCEM) pela colaboração nos experimentos.

Ao Hospital das Clínicas da UFG por me acolher como funcionária pública e me proporcionar tantos aprendizados e ricas experiências.

Agradeço aos membros da banca examinadora por terem aceitado o convite de aprimorar este trabalho, por meio de suas correções e sugestões.

Muito obrigada a todos que de alguma forma me ajudaram a alcançar esse objetivo e contribuíram para o desenvolvimento desta tese. Vocês fazem parte da minha história.

“There are two ways to live your life. One is as though nothing is a miracle. The other is as though everything is a miracle”.

(Albert Einstein)

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS -----	xi
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS -----	xiv
RESUMO -----	xvii
ABSTRACT -----	xviii
1 INTRODUÇÃO -----	1
1.1 Balanço oxidativo, alimentação e patogênese -----	2
1.2 Antioxidantes -----	3
1.3 Compostos fenólicos -----	5
1.4 Canela -----	6
1.5 Atividade vasorrelaxante -----	9
1.6 Avaliação da capacidade antioxidante -----	11
1.6.1 DPPH -----	11
1.6.2 ABTS -----	12
1.6.3 <i>Folin-Ciocalteu</i> -----	14
1.7 Estudos eletroquímicos -----	15
1.7.1 Voltametria cíclica -----	17
1.7.2 Voltametria de pulso diferencial -----	18
1.7.3 Voltametria de onda quadrada -----	19
1.8 Sensores eletroquímicos -----	20

1.8.1 Biossensores -----	21
2 OBJETIVOS -----	24
3 MÉTODOS -----	25
3.1 Delineamento experimental -----	25
3.2 Reagentes e Padrões -----	26
3.3 Preparação das Amostras -----	26
3.4 Animais -----	26
3.5 Ensaio eletroquímico -----	27
3.5.1 Índice eletroquímico -----	27
3.5.2 Biossensor -----	28
3.6 Ensaio espectrofotométrico -----	28
3.6.1 Ensaio de eliminação de radical DPPH -----	28
3.6.2 Ensaio de eliminação de radical ABTS -----	29
3.6.3 Ensaio de fenóis totais -----	30
3.7 Espectrometria de massas -----	30
3.8 Estudos em artérias isoladas de ratos -----	30
3.9 Análise estatística -----	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	33
5 CONCLUSÃO -----	61
5.2 PERSPECTIVAS -----	62
REFERÊNCIAS -----	63
ANEXOS -----	77

FIGURAS

Figura 1: Formação das espécies reativas de oxigênio.	3
Figura 2: Antioxidantes endógenos e exógeno.	4
Figura 3: Estrutura química dos componentes da canela relacionados a atividade antimicrobiana.	8
Figura 4: Reação de estabilização do reagente DPPH pelo antioxidante (AH).	12
Figura 5: Reação de estabilização do reagente ABTS com persulfato de potássio pelo antioxidante (AH).	13
Figura 6: Reação de redução do reagente <i>Folin-Ciocalteu</i> (W^{6+} , Mo^{6+}).	14
Figura 7: Instrumentação para o estudo eletroquímico.	15
Figura 8: Esquema das etapas envolvidas na medida voltamétrica.	16
Figura 9: Aplicação do potencial para voltametria cíclica em a) varredura linear e b) potencial do tipo escada c) voltamograma para sistema reversível.	17
Figura 10: Aplicação do potencial para voltametria de pulso diferencial.	18
Figura 11: Aplicação do potencial para voltametria de onda quadrada.	19
Figura 12. Esquema da composição de um biossensor.	21
Figura 13: Delineamento dos ensaios experimentais para análise da canela.	25

QUADRO

Quadro 1: Principais tipos de canela (<i>Cinnamomum</i> sp).	7
--	---

TABELA

Tabela 1. Aplicações de biossensores enzimáticos a base de lacase na avaliação antioxidante.	22
---	----

ARTIGO: Evaluation of Antioxidant Potential of Commercial Cinnamon Samples and Its Vasculature Effects

FIGURAS

Figure 1: DP voltammograms of different pHs obtained for nonmodified carbon paste electrode in 0.1 M phosphate buffer (a) and biosensor with 0.1 M sodium acetate buffer (b) for cinnamon. For pH 9.0 (—), pH 7.0 (---), pH 5.0 (- - -), and pH 3.0 (.....). 43

Figure 2: Differential pulse voltammetry (DPV). Inset: square wave voltammetry (SWV) of cinnamon commercial samples (0.01%). Samples A (—), B (---), and C (- - -) and second scans (.....). 44

Figure 3: Mass spectrum (ESI(+)-MS) from cinnamon samples 15 (a) and 7 (b). 50

Figure 4: Vasodilatory effects of cinnamon samples 7 and 15 (cin7 and cin15) in endothelium-intact rat aortas precontracted with phenylephrine (0.1 μ M) in the absence or presence (30min) of the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME (100 μ M). The data points represent the mean \pm SEM (n = 5 – 6) of the relaxing effect expressed as a percentage. Significant difference ***p < 0:001. 51

Figure 5: Vascular contraction induced by phenylephrine (0.1 μ M) in endothelium-intact rat aortas exposed or not to hypochlorite (5 μ M OCl⁻, 60min). Some arteries were treated with cinnamon samples (cin7 and cin15) concomitantly to oxidative stimulus with OCl⁻ at different concentrations (a) 100 μ g/mL and (b) 500 μ g/mL. Vertical bars represent the mean \pm SEM values of the maximum contractile effect (n = 5 – 7 for all protocols). Significant difference #p < 0:001 compared to control. ***p < 0:001 and *p < 0:05 compared to OCl⁻ treatment. &p < 0:05 between groups cin7 and cin15. 52

TABELAS

Table 1: Solvents for cinnamon extraction. 42

Table 2: DPPH, ABTS, *Folin* AG, and EI correlation matrix for cinnamon species. 45

Table 3: Percentage of decay for ABTS, DPPH, *Folin*, EI, and gallic acid equivalents for cinnamon species. 45

Table 4: Antioxidant capacity of cinnamon samples using carbon paste 47

modified electrode.

Table 5: Metabolites present in cinnamon samples (*Cinnamomum*) with antioxidant property. 48

ANEXOS

Anexo 1 - MORENO, E. K. G., THOMAZ, D. V., MACHADO, F. B., LEITE, K. C. S., RODRIGUES, E. S. B., FERNANDES, CARVALHO, M. F., OLIVEIRA, M. T., CAETANO, M. P., PEIXOTO, C. E. C., ISECKE, B. G., GIL, E.S., MACÊDO, I.Y.L. Antioxidant study and electroanalytical investigation of selected herbal samples used in folk medicine. *International Journal of Electrochemical Science*, 14(1), 838–847, 2019. 77

Anexo 2 – BATISTA, E. A., SILVA, G. N. M., SGOBBI, L. F., MACHADO, F. B., MACEDO, I. Y., E. K. MORENO, NETO, J. R., SCALIZE, P. S. and GIL, E. S. Enzymatic Electroanalytical Biosensor Based on *Maramiellus colocasiae* Fungus for Detection of Phytomarkers in Infusions and Green Tea Kombucha. *Biosensors*, 11, 91, 2021. 78

Anexo 3 – FABIO B. MACHADO, ISAAC Y. L. DE MACÊDO, HERICLES M. CAMPOS, **EMILY K. G. MORENO**, MARLON F. B. SILVA, JERONIMO R. DE OLIVEIRA NETO, RUIVER R. FEITOSA RAMALHO, ABADIA DOS R. NASCIMENTO, BONIEK G. VAZ, LUIZ CARLOS DA CUNHA, PAULO CÉSAR GHEDINI, VICTOR C. DICULESCU, ERIC DE S. GIL. Antioxidant activity of thirty-six peppers varieties and vasorelaxant of selected varieties. *Food Bioscience*, 41, 100989, 2021. 79

Anexo 4 - ISAAC YVES LOPES DE MACÊDO, NATHALIE DUPUY, VITOR H. DOS S. BRITO, ERIC DE SOUZA GIL, GIOVANNA N. DE M. E SILVA, EMILY K. G. MORENO, IVO M. DEMIATE, MARNEY P. CEREDA. Modified Cassava Starches' Identification through Mid-Infrared Spectroscopy and Exploratory Analysis. *Analítica*, 4, 126–140, 2023. 80

Anexo 5 - Trabalho apresentado no 13° Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos. Evaluation of antioxidant capacity of *Cinnamomum* sp. by electroanalytic and spectrophotometric methods. Novembro de 2019, Campinas - SP. 81

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Absorbância
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ACh	Acetilcolina
AH	Antioxidante
AIP	Potencial de ionização adiabática
BHA	Hidroxianisol butilado
BHT	Hidroxitolueno butilado
[Ca ²⁺]	Concentração de cálcio
CAT	Catalase
CPE	Eletrodo de pasta de carbono
CV	Voltametria cíclica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DPV	Voltametria de pulso diferencial
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
<i>Epa</i>	Potencial anódico
<i>Epc</i>	Potencial catódico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FC	<i>Folin-Ciocalteu</i>
FT	Fenóis totais

GP	Galato de propila
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona
H	Hidrogênio
HAT	Transferência de átomo de hidrogênio
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IE	Índice eletroquímico
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
i_{pa}	Corrente de pico anódico
i_{pc}	Corrente de pico catódico
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LC	Cromatografia líquida
LC/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LDL-c	Lipoproteína de baixa densidade
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintases
NRF2	Fator nuclear derivado de eritróide 2
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NQO1	NADPH desidrogenase quinona 1
OCl^-	Hipoclorito

O ₂	Oxigênio
pH	Potencial hidrogeniônico
QR	Quinona redutase
QTOF	Analisador híbrido Quadrupole-Time of Flight
SAT	Saturado
SEM	Erro padrão da média
SET-PT	Transferência de elétron único seguida de transferência de prótons
SET	Transferência eletrônica única
SOD	Superóxido dismutase
SPLET	Transferência seqüencial de elétrons com perda de prótons
SWV	Voltametria de onda quadrada
TBHQ	Terciobutil hidroquinona
TMC	Quelação de metais de transição
UV/VIS	Ultravioleta/visível
γ-GCS	Gama-glutamilcisteína sintetase

RESUMO

O grande interesse no estudo dos alimentos antioxidantes é devido, principalmente, a prevenção aos danos fisiológicos causados por processos oxidativos. A canela (*Cinnamomum* sp.) é uma especiaria mundialmente utilizada na culinária e tem ganhado destaque por suas propriedades farmacológicas, tais como anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, cardiovasculares dentre outras. Dada a importância de determinar a capacidade antioxidante em relação ao efeito terapêutico, este estudo tem como objetivo avaliar o perfil antioxidante de amostras comerciais de canela por métodos espectrofotométricos, eletroquímicos e atividade vasorrelaxante. Os métodos espectrofotométricos realizados foram os ensaios de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), 2,2'-azinobis (Ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) e *Folin-Ciocalteu*. Para os experimentos eletroquímicos, foram utilizados sistema com três eletrodos, composto por eletrodo de pasta de carbono, fio de platina e Ag/AgCl/KCl_{sat}, representando os eletrodos de trabalho, auxiliar e de referência, respectivamente. Os métodos eletroanalíticos utilizados foram a voltametria de pulso diferencial, voltametria de onda quadrada e voltametria cíclica. A reatividade vascular foi avaliada em anéis da artéria aorta de ratos machos da linhagem *Wistar*, utilizando artérias com endotélio vascular intacto e sem endotélio. A via da sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS) e o inibidor N-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) foram utilizados nesta análise. A correlação entre a abordagem eletroquímica e os fenóis totais calculados pelos métodos ABTS, DPPH e *Folin-Ciocalteu* foram 0,63, 0,70 e 0,73, respectivamente, sendo 1 uma correlação ideal. A correlação entre os métodos espectrofotométricos foi de 0,83. Para os resultados eletroquímicos, observou-se um perfil semelhante, com pico anódico *c.a.* $E_{pa1} = 0,1$ V, indicativo de compostos polifenólicos com alto poder antioxidante. Além disso, foi aplicado aos extratos selecionados, biossensor em eletrodo de pasta de carbono utilizando a enzima lacase, obtida pelo fungo *Marasmiellus* sp. e foi observado melhora de sinal de até 4 vezes no perfil antioxidante quando comparado ao eletrodo sem a modificação. As amostras foram analisadas por espectrometria de massas e os principais marcadores químicos encontrados foram cumarina, cinamaldeído e eugenol. Ensaio farmacológico mostraram que essas amostras também promoveram um efeito vasorrelaxante significativo associado ao potencial antioxidante. Desta forma, a canela apresentou alta capacidade antioxidante, corroborando os resultados obtidos em outros estudos, destacando sua importância como alimento funcional.

Palavras chaves: antioxidante, voltametria, biossensor, vasorrelaxante, *Cinnamomun* sp.

ABSTRACT

The great interest in the study of antioxidants is mainly the prevention of physiological damage caused by oxidative processes. Cinnamon (*Cinnamomum* sp.), is a spice used worldwide in cooking and has gained prominence for its pharmacological properties, such as anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, cardiovascular, among others. Given the importance of determining the antioxidant capacity in relation to therapeutic methods, this study aims to evaluate the antioxidant profile of commercial cinnamon samples by spectrophotometric, electrochemical and vasorelaxant methods. The spectrophotometric methods performed were 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and *Folin-Ciocalteu*. For the electrochemical experiments, a three-electrode system was used, consisting of carbon paste electrode, platinum wire, and Ag/AgCl/KCl_{sat}, representing the working, auxiliary, and reference electrodes, respectively. The electroanalytical methods used were differential pulse, square wave, and cyclic voltammetries. Vascular reactivity was evaluated in aortic artery rings from male *Wistar* rats, using arteries with intact vascular endothelium and without endothelium. The endothelial nitric oxide synthase (eNOS) pathway and the inhibitor N-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME) were used in this analysis. The correlation between the electrochemical approach and total phenols by the ABTS, DPPH, and *Folin-Ciocalteu* methods were 0.63, 0.70, and 0.73, respectively, with 1 being an ideal correlation. The correlation between spectrophotometric methods was 0.83. For the electrochemical results, a similar profile was observed, with anodic peak $a.c E_{pa1} = 0.1$ V, indicative of polyphenolic compounds with high antioxidant power. In addition, a biosensor on a carbon paste electrode was applied to the selected extracts using laccase enzyme, obtained by the fungus *Marasmiellus* sp. and a signal improvement of up to 4 times in the antioxidant profile was observed when compared to the electrode without modification. The samples were analyzed by mass spectrometer, and the main chemical markers found were coumarin, cinnamaldehyde, and eugenol. Pharmacological assays showed that these samples also promoted a significant vasorelaxant effect associated to the antioxidant potential. Thus, cinnamon showed a high antioxidant capacity, in agreement with the results obtained in other studies, emphasizing its importance as a functional food.

Keywords: antioxidant, voltammetry, biosensors, vasorelaxant, *Cinnamomun* sp.

A canela é uma especiaria mundialmente consumida devido seu sabor e aroma peculiares (KAWATRA & RAJAGOPALAN, 2015). Possui abundância de compostos polifenólicos com elevada capacidade de neutralizar as espécies reativas de oxigênio (EROs) (LIANG *et al.*, 2019), e assim, tem sido estudada para a prevenção e como adjuvante no tratamento para diversas enfermidades devido suas propriedades farmacológicas anti-inflamatória, antibacteriana (HADI *et al.*, 2020), antilipidêmica, antiaterosclerótica (NAYAK, CHINTA & JETTI, 2017), antifúngica (TRAN *et al.*, 2020), cardiovasculares (NYADJEU *et al.*, 2013), antioxidante, dentre outras (BEHBAHANI *et al.*, 2020).

Os antioxidantes são compostos capazes de reduzir o dano celular causado pelas EROs por meio da diminuição dos processos oxidativos no organismo (BACCHETTI *et al.*, 2018). Assim, este trabalho teve como destaque a avaliação do perfil antioxidante de amostras comerciais de canela e seus efeitos na atividade vasodilatadora.

A capacidade antioxidante de produtos naturais é tradicionalmente avaliada por ensaios de sequestro radicalar como 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), radical 2,2'-azinobis (Ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico) (ABTS) (DRAVIE *et al.*, 2020; GHOORA *et al.*, 2020) e *Folin-ciocalteau* (ESCARPA, 2012) que permitem estudar o efeito dos antioxidantes presentes nas amostras por meio da descoloração dos radicais. Embora esta técnica seja amplamente utilizada para esta finalidade e bem conceituada pela literatura, possui diversas desvantagens, principalmente relacionadas ao preparo minucioso das amostras e a possibilidade de superestimar os antioxidantes devido a opacidade do meio e precipitação de compostos (ESCARPA, 2012; SCHAICH *et al.*, 2015).

Visando metodologias alternativas que possam trazer bons resultados e evitar essas limitações, a eletroquímica tem ganhado destaque no cenário analítico, principalmente devido a abundância de compostos bioativos presentes em produtos naturais, a possibilidade de miniaturização dos ensaios, sustentabilidade, baixo limite de detecção e alta sensibilidade do método (PACHECO *et al.*, 2013; HOYOS-ARBELÁEZ *et al.*, 2018).

A voltametria é a técnica eletroquímica mais empregada para análises quantitativas e qualitativas, a fim de avaliar o perfil de oxidorredução de produtos naturais. As técnicas

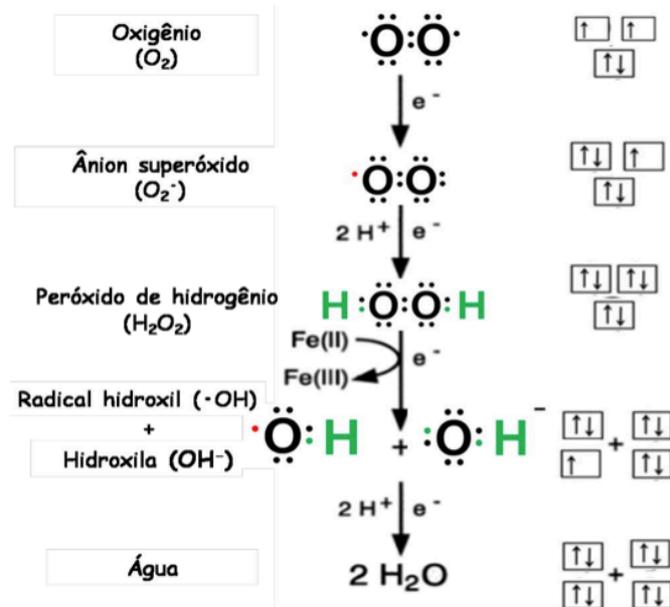
mais utilizadas são voltametria cíclica (CV, do inglês, cyclic voltammetry), voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês, differential pulse voltammetry) e voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês, square wave voltammetry) (PACHECO *et al.*, 2013). A eletroanálise apresenta diversas possibilidades de inovações, sendo o biossensor, um sensor eletroquímico que utiliza um sistema de reconhecimento baseado em um processo biológico que traduz informações de reações bioquímicas, para um sinal químico ou físico detectável (ČIŽMEK *et al.*, 2019; TOMAC *et al.*, 2020).

Para a análise do melhor e pior resultados dos extratos, testou-se o efeito vasodilatador sob influência do endotélio e a liberação de substâncias vasoativas como o óxido nítrico (OLIVEIRA, 2018). O efeito cardioprotetor ocorre pela vasodilatação a partir da prevenção da proliferação de células musculares lisas (remodelamento vascular), inibição da agregação plaquetária e da adesão de células leucocitárias, resultando assim na regulação da pressão arterial (NASEEM, 2005).

1.1 Balanço oxidativo, alimentação e patogênese

As Espécies Reativas a Oxigênio (EROs) são formadas durante o metabolismo aeróbico e estão presentes nas funções fisiológicas como regulação do crescimento celular, produção de energia, sinalização intracelular e fagocitose (PAULETTI *et al.*, 2019). São compostos altamente reativos formados a partir de sucessivas reduções de O_2 (Figura 1). Esse grupo inclui o radical hidroxila ($\bullet OH$), ânion superóxido ($O_2\bullet$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, em excesso no organismo, estão relacionados a vários prejuízos à saúde, como doenças degenerativas, peroxidação lipídica e danos em proteínas, carboidratos e ao DNA (KIM *et al.*, 2015; MÜNDEL *et al.*, 2017; TEJERO *et al.*, 2019).

Figura 1. Formação das espécies reativas de oxigênio.



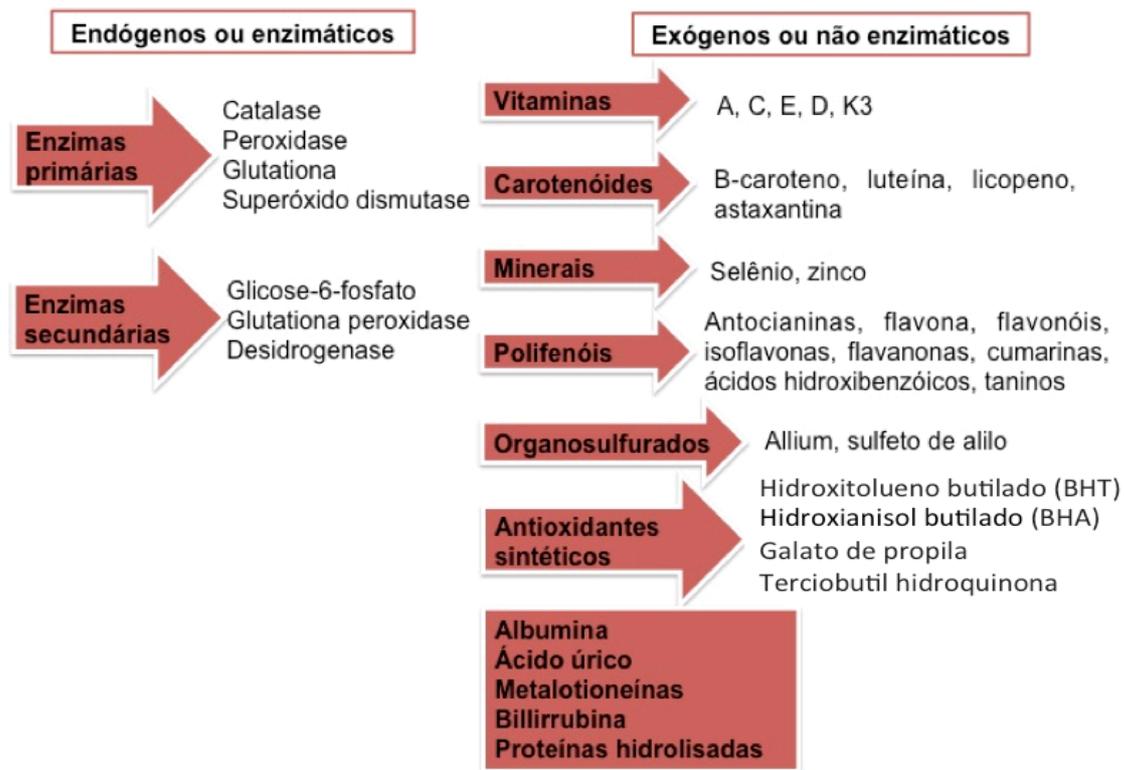
Fonte: GOMES, 2017.

O desequilíbrio de EROs no organismo, causado pela exposição a radiação ultravioleta, radiação ionizante, tabagismo, inflamação ou mesmo disfunções metabólicas, promove o estresse oxidativo (DROGE, 2002; NITA & GRZYBOWSKI, 2016) que está relacionado a doenças como hipertensão, obesidade, doença coronariana, catarata, diabetes, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, câncer entre outras. Diversos estudos sugerem que essas enfermidades são potencialmente minimizadas pela ingestão de antioxidantes, presentes em alimentos e especiarias funcionais, sendo esta, uma estratégia eficiente para diminuir EROs no organismo (AHMAD *et al.*, 2014; MOHARRAM & YOUSSEF, 2014).

1.2 Antioxidantes

Os antioxidantes são compostos com elevada estabilidade oxidativa que são capazes de prevenir reações de degradação oxidativa através da estabilização de compostos radicalares (BACCETTI *et al.*, 2018). Os antioxidantes são classificados quanto a sua origem em endógenos ou enzimáticos, que são aqueles produzidos pelo próprio organismo, formando um mecanismo de proteção natural contra EROs, e antioxidantes exógenos ou não enzimáticos, que podem ser de origem natural ou sintética (Figura 2) (RAMADAN-HASSANIEN, 2008; MOHARRAM & YOUSSEF, 2014).

Figura 2. Antioxidantes endógenos e exógenos.



Fonte: Adaptada de MAQSOUDELOU *et al.*, 2019.

O uso de antioxidantes sintéticos é amplamente difundido na indústria de alimentos com o objetivo de aumentar o tempo de conservação dos produtos, por meio da prevenção da oxidação lipídica e, conseqüente, desenvolvimento de características organolépticas desagradáveis conhecidas como *off-flavours* (SOARES *et al.*, 2012). São utilizados tanto na aplicação direta do composto à formulação, quanto por meio da formação de um filme de cobertura, sendo os mais utilizados os compostos BHT (Hidroxitolueno Butilado), BHA (Hidroxianisol Butilado), terciobutil hidroquinona (TBHQ) e o galato de propila (GP). Contudo, a indústria alimentícia tem buscado cada vez mais métodos naturais para a conservação dos alimentos, a fim de se utilizar alternativas mais seguras e menos alergênicas (SINGH *et al.*, 2007).

O uso de antioxidantes exógenos é frequentemente necessário, uma vez que os antioxidantes endógenos não são suficientes para um controle rigoroso e eficiente das reações oxidativas. Assim, essa suplementação pode ocorrer tanto por produtos farmacêuticos e nutracêuticos, quanto pela alimentação, por meio da ingestão de frutas, legumes, hortaliças e cereais integrais que possuem em sua composição diferentes grupos químicos, o qual destaca o grupo dos polifenóis. Além disso, a adição de

antioxidantes de origem natural em produtos alimentares tem se tornado cada vez mais popular devido à sua importância em melhorar a conservação nutricional e a qualidade de vida dos consumidores (KOLARZYK *et al.*, 2017; VARÌ *et al.*, 2017).

Outra forma de classificar os antioxidantes é pelo seu mecanismo de ação, sendo divididos em: transferência de átomo de hidrogênio (HAT, do inglês, Hydrogen Atom Transfer), transferência eletrônica única (SET, do inglês, Single Electron Transfer), transferência de elétron único seguida de transferência de prótons (SET-PT, do inglês, Single Electron Transfer Followed by Proton Transfer), transferência sequencial de elétrons com perda de prótons (SPLET, do inglês, Sequential Proton Loss Electron Transfer) e quelação de metais de transição (TMC, do inglês, Transition Metals Chelation) (RAJAN & MURALEEDHARAN, 2017).

No HAT, as EROs são neutralizadas pela reação direta do antioxidante fenólico, formando um radical de antioxidante fenólico. O mecanismo SET possui potencial de ionização adiabática (AIP, do inglês, Adiabatic Ionization Potential) como parâmetro numérico. O mecanismo do SET-PT ocorre em duas etapas. Primeiramente, uma molécula antioxidante fenólica reage com EROs, formando radicais catiônicos e aniônicos do antioxidante fenólico. Posteriormente, o radical catiônico do antioxidante fenólico se decompõe em um radical fenólico e próton. O mecanismo SPLET também consiste em duas etapas. Os íons criados pela dissociação do antioxidante fenólico na forma de anião e próton reagem com o radical livre. Nesta reação, uma forma radical do antioxidante fenólico e uma molécula neutra são formadas. Na TMC, os ânions de polifenóis são capazes de quelar metais pesados. Essa quelação de metal ocorre principalmente devido à presença de hidroxilas desprotonadas nos polifenóis (RAJAN & MURALEEDHARAN, 2017).

1.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos, também chamados de polifenóis, são formados pelo metabolismo secundário das plantas e compreende uma importante fonte de antioxidantes naturais que podem ser encontrados em verduras, frutas, leguminosas, cereais e especiarias funcionais (BACCHETTI *et al.*, 2018). São eficientes na captura de EROs e espécies reativas de nitrogênio (SOUSA *et al.*, 2007; PISOSCHI & NEGULESCU, 2011) e também estão relacionadas às características organolépticas de produtos naturais como cor, sabor e aroma (RICE-EVANS *et al.*, 1997), além de conferir proteção contra patógenos, agentes externos e estabilidade oxidativa (ARRIBAS *et al.*, 2012).

Estudos *in vitro* mostram que a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos está intimamente relacionada ao seu comportamento redox e às reações de transferência de elétrons (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2015). Podem ocorrer por inativação de EROs, inibição da peroxidação lipídica, proliferação celular, angiogênese, oxidação do DNA, ligação de eletrófilos, indução de enzimas protetoras e apoptose, e doação de moléculas de H (CHIORCEA-PAQUIM *et al.*, 2020).

Os compostos fenólicos são geralmente formados pela via fenilpropanoide, através da desaminação dos aminoácidos tirosina e fenilalanina em ácidos cinâmicos (TSAO, 2010). A oxidação destes compostos ocorre nos grupos hidroxila, com influência de substituintes químicos ligados aos anéis aromáticos como glicosídeos e ésteres (CORREIA, 2005; CHIORCEA-PAQUIM *et al.*, 2020). Os flavonoides, derivados de cumarinas, tocoferóis, ácido cinâmico e ácidos orgânicos polifuncionais, é o grupo com maior abundância de fenóis (CHIORCEA-PAQUIM *et al.*, 2020).

Além da capacidade antioxidante, os compostos fenólicos também são reconhecidos por suas propriedades anti-inflamatórias, antimutagênicas, anticarcinogênicas, antialérgicas e atividades enzimáticas, auxiliando efetivamente na defesa contra doenças relacionadas ao estresse oxidativo (PATIL & MASAND, 2018).

Dentre os produtos naturais contendo compostos fenólicos, as especiarias funcionais têm despertado bastante interesse nas pesquisas científicas, pois além de serem usadas na culinária, são amplamente aplicadas na medicina popular, devido suas propriedades conservadoras e terapêuticas, como a canela (LIANG *et al.*, 2019).

1.4 Canela

A canela compreende um grupo de mais de 250 espécies, cultivadas comercialmente em regiões tropicais e subtropicais da Índia, China, África e América do Sul (WANG & YANG, 2009; JAYAPRAKASHA & RAO, 2011; WANG, VANGALAPATI *et al.*, 2012). É conhecida e utilizada em todo o mundo, seu uso teve início pelos chineses cerca de 2.800 anos a.C., e durante muito tempo foi considerada mais valiosa que o ouro. *Cinnamomum* sp., seu nome científico, é derivado da Indonésia, *kayu manis*, que significa “madeira doce” e assim ela pode ser descrita, com sabor doce a levemente picante (NEGRAES, 2003; KAWATRA & RAJAGOPALAN, 2015).

A ANVISA definiu por meio da RDC nº 276 de 2005 o conceito de especiarias como produtos compostos por partes de uma ou mais espécies vegetais que incorporem sabor

ou aroma tanto a alimentos quanto bebidas. Assim, a canela é considerada uma especiaria, pois é obtida a partir da extração da parte interna da casca de pequenas árvores do gênero *Cinnamomum* (ANVISA, 2005).

A especiaria pertence a família *Lauraceae*, a *Cinnamomum zeylanicum*, também conhecida como canela verdadeira, canela do ceilão ou canela mexicana, *Cinnamomum burmanni*, *Cinnamomum loureirii* e *Cinnamomum aromaticum*, também conhecida como canela cassia e canela da China são as espécies mais utilizadas (KAWATRA & RAJAGOPALAN, 2015) (Quadro 1).

Quadro 1. Principais tipos de canela (*Cinnamomum* sp).

	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	<i>Cinnamomum burmanni</i>	<i>Cinnamomum loureiroi</i>	<i>Cinnamomum aromaticum</i>
País de origem	Siri Lanka	Indonésia	Vietnã	China
Sabor	Ligeiramente doce.	Picante.	Picante e doce.	Picante e amargo.
Cor	Castanho avermelhado claro a médio.	Castanho avermelhado escuro.	Castanho avermelhado escuro.	Castanho avermelhado escuro.
Características especiais	Menor teor de cumarina.	Baixo custo, alto teor de cumarina e aroma forte.	Aroma forte, picante, alto teor de cumarina.	Sabor forte, alto teor de cumarina.

Fonte: Adaptado de KALLEL *et al.*, 2019.

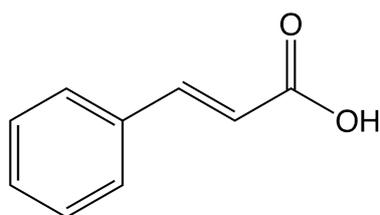
Catequinas e procianidinas são encontradas na casca da canela, que apresenta aspecto seco, com ausência de periderme e do parênquima cortical externo (RAO & GAN, 2014). Importantes componentes biológicos como cinamaldeído, cuminaldeído, terpenos e benzaldeído também estão presentes nesta estrutura (KOKATE *et al.*, 1994), enquanto que nas frutas e flores, o principal componente encontrado é o acetato de trans-cinamila (JAYAPRAKASHA & RAO, 2011).

Os óleos essenciais da canela, presentes na casca e nas folhas, possuem abundância dos compostos cinamaldeído e trans-cinamaldeído (SALMAN *et al.*, 2015). As

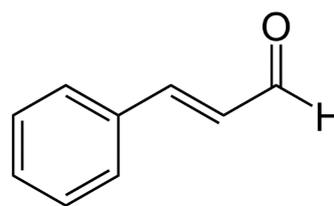
cumarinas e eugenol também estão presentes no óleo da casca da canela (YERER *et al.*, 2020). Estudos *in vitro* demonstraram que esses óleos essenciais ricos em compostos fenólicos possuem significativo efeito antioxidante, quando comparado com o BHT, antioxidante sintético e a vitamina C (KALLEL *et al.*, 2019).

As espécies de *Cinnamomum sp.* possuem grande destaque na culinária mundial, não apenas por seu sabor e aroma peculiares, mas também por suas propriedades conservantes (GENG *et al.*, 2011; LIANG *et al.*, 2019). Além disso, farmacologicamente, a canela possui atividade antimicrobiana comprovada devido aos componentes ácido cinâmico, ácido benzoico, cinamaldeído e benzaldeído presentes em sua estrutura (Figura 3) (WANG *et al.*, 2013; ZAIDI *et al.*, 2015; VASCONCELOS *et al.*, 2018; HADI *et al.*, 2020).

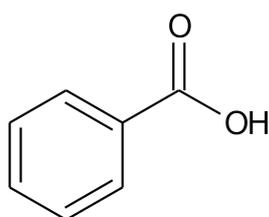
Figura 3. Estrutura química dos componentes da canela relacionados a atividade antimicrobiana.



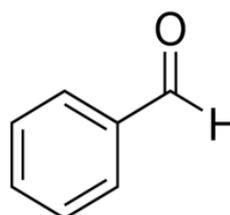
Ácido cinâmico



Cinamaldeído



Ácido benzóico



Benzaldeído

A canela tem sido estudada como ferramenta para o tratamento da COVID-19, doença viral que provoca hiperinflamação e excessiva produção de EROs, devido suas propriedades anti-inflamatórias. Estudos com ratos diabéticos demonstraram que a canela em pó foi capaz de restaurar as atividades de enzimas antioxidantes como glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) (BEJI *et al.*, 2018; YAKHCHALI *et al.*, 2021).

Enzimas antioxidantes endógenas como glutatona (GSH), gama-glutamilcisteína sintetase (γ -GCS), fosfato de dinucleotídeo de adenina (NADPH) desidrogenase quinona 1 (NQO1) e NADPH: Quinona Redutase (QR) tiveram seus níveis aumentados com o extrato etanólico da canela. Além dos cinamaldeídos, o fator nuclear derivado de eritróide 2 (NRF2) e seus genes NQO1 e γ -GCS foram ativados pelos compostos lignana e flavonol no epitélio pulmonar humano normal e na linhagem celular Beas-2B de estresse oxidativo induzido por As (III). Esses indicativos sugerem que as propriedades anti-inflamatórias da canela poderiam potencializar o tratamento da COVID-19 (GUNAWARDENA *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2019; YAKHCHALI *et al.*, 2021).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a canela também se destaca por seus efeitos antioxidante e antiproliferativa (KOPPIKAR *et al.*, 2010; BEHBAHANI *et al.*, 2020), imunomoduladora (GRUENWALD, FREDER, & ARMBRUESTER, 2010), antifúngica (AHMED *et al.*, 2019; TRAN *et al.*, 2020), nematocida (KONG *et al.*, 2007), atua na melhora da toxicidade de toxinas químicas presentes no fígado, rins e sangue (DORRI, HASHEMITABAR & HOSSEINZADEH, 2018), anti-hiperglicêmica e anti-hiperlipidêmica (LU *et al.*, 2011, MOLLAZADEH & HOSSEINZADEH, 2016), anti-aterosclerótica (NAYAK, CHINTA & JETTI, 2017) e anti-hipertensiva (NYADJEU *et al.*, 2013).

Essas propriedades destacam os diversos benefícios da inserção da canela em uma dieta saudável, caracterizam o alimento como especiaria funcional e justificam a investigação mais aprofundada dos efeitos cardiovasculares da canela (CHENG *et al.*, 2009).

1.5 Atividade vasorrelaxante

Dentre as principais desordens crônicas, a hipertensão se destaca, afetando em média 25% da população mundial e causando cerca de 7 milhões de óbitos anualmente (FAGARD, 2012; GUEVARA *et al.*, 2018). O controle da pressão arterial se torna urgente e cada vez mais, tem-se buscado compostos nutricionais e bioativos para promoção da saúde e auxílio aos tratamentos medicamentosos (GALASSO *et al.*, 2019).

Cinnamomum cassia foi avaliada em um estudo animal com ratos Sprague Dawley para a doença cardíaca isquêmica. O efeito vasorrelaxante da canela foi atribuído ao composto cinamaldeído, capaz de inibir os canais de cálcio do tipo L (ALVAREZ-COLLAZO *et al.*, 2014). Além disso, os componentes ativos cinamaldeído e ácido cinâmico apresentaram capacidade de induzir a produção de óxido nítrico (NO, do inglês,

Nitric Oxide), que associada às propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias são consideradas cardioprotetores (SONG *et al.*, 2013).

Os efeitos cardioprotetores do NO ocorrem pela vasodilatação, prevenção da produção de células musculares lisas, inibição da agregação plaquetária e da adesão de células leucocitárias que melhoram o fluxo sanguíneo e conseqüentemente, regulam a pressão arterial (NASEEM, 2005). O NO deriva da oxidação da L-arginina em L-citrulina, com reação catalizada pelas enzimas óxido nítrico sintases (NOS) que apresentam como isoformas óxido nítrico sintase induzida (iNOS), óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), sendo que esta é dependente de íons Ca^{2+} , também é capaz de produzir NO (REGOLI; GOBEIL-JUNIOR, 2015; OLIVEIRA, 2018).

A concentração de cálcio [Ca^{2+}] é parâmetro fundamental na manutenção do tônus da musculatura lisa presente nos vasos sanguíneos. Quando os canais de cálcio voltagem dependentes são bloqueados, ocorre redução da [Ca^{2+}] intracelular e conseqüente vasodilatação. Desta forma, ocorre uma redução da resistência vascular periférica, diminuindo assim, a pressão arterial (OLIVEIRA, 2018).

A musculatura lisa vascular é influenciada por fatores de relaxamento e constrição sintetizados no endotélio. Efeitos vasodilatadores são obtidos pela liberação de agonistas como bradicinina, acetilcolina (ACh) e substância P pelo NO, enquanto que os efeitos vasoconstritores estão presentes quando são liberadas angiotensina e noradrenalina. A regulação do tônus vascular irá depender da resposta vasomotora aos estímulos de NO, prostaciclina e Fator Hiperpolarizante (OLIVEIRA, 2018).

A disfunção endotelial, caracterizada pela baixa disponibilidade de NO, ocorre devido a um desequilíbrio entre sua produção ou a transformação do NO em peroxinitrito (NOO^{\cdot}). Essa diminuição de NO também pode ocorrer devido ao aumento do estresse oxidativo que acelera a degradação do composto, bem como o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como moléculas de adesão leucocitária, endotelina-1, angiotensina II, comumente liberadas no estado inflamatório crônico que reduzem a expressão da eNOS (CHERICONI *et al.*, 2005; NYADJEU *et al.*, 2013).

O nível reduzido de NO promove aumento da permeabilidade do endotélio pela maior proliferação de células musculares lisas na camada média. Desta forma, ocorre maior facilidade de aderência de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c) para o espaço subendotelial, que se apresenta como precursor ao desenvolvimento da aterosclerose (NASEEM, 2005).

1.6 Avaliação da capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante de produtos naturais, seja de extrato ou composto isolado, é tradicionalmente analisada por métodos espectrofotométricos, como testes com os radicais DPPH e ABTS que relaciona a eliminação dos radicais, através de sua descoloração, com o poder antioxidante do produto analisado (DRAVIE *et al.*, 2020; GHOORA *et al.*, 2020). Outro método espectrofotométrico bastante utilizado é o *Folin-Ciocalteu* que pode ser usado para avaliar a quantidade de fenóis totais (FT) presente nas amostras (ESCARPA, 2012).

Embora os métodos espectrofotométricos estejam bem estabelecidos na literatura, eles apresentam várias limitações, principalmente relacionadas às interferências de moléculas que absorvem na mesma faixa que os reagentes DPPH, ABTS e *Folin-Ciocalteu*. Além disso, é necessário um preparo apropriado das amostras, pois fatores como precipitação, suspensão de partículas grandes e opacidade do meio alteram a leitura da absorvância e podem levar a uma superestimação de FT (ESCARPA, 2012; XIE & SCHAICH, 2014; SCHAICH *et al.*, 2015).

Assim, são necessários testes complementares ou mesmo alternativos, como os métodos eletroanalíticos, para avaliar a capacidade antioxidante de amostras complexas. Ademais, esse método é eficiente para elucidação do perfil oxiredutor dos produtos estudados (LEITE *et al.*, 2018; DAVID *et al.*, 2019).

1.6.1 DPPH

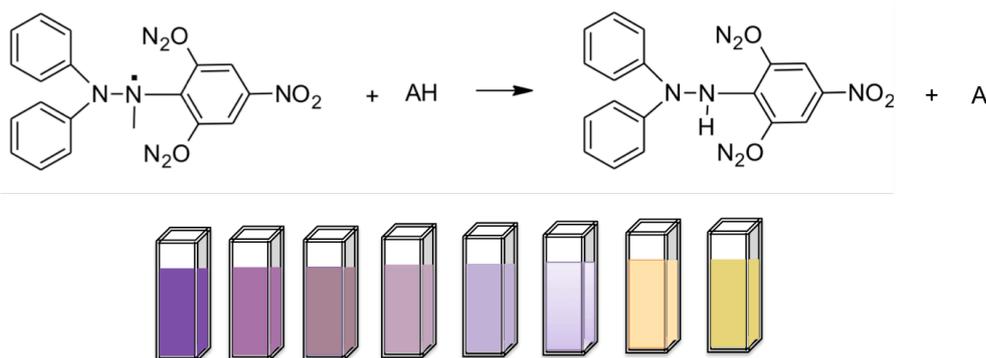
O radical DPPH foi descoberto em 1922 (GOLDSCHMIDT & RENN, 1922) e foi utilizado como eficiente reagente para mensurar o potencial de eliminação de radicais livres ou doações de hidrogênio (H) de produtos antioxidantes pela primeira vez em 1958 por Blois (1958). Desde então, o ensaio DPPH tem sido eficientemente empregado em produtos naturais, principalmente devido à sua alta estabilidade e baixo custo (HAN *et al.*, 2017; YEO & SHAHIDI, 2019).

Esta técnica consiste na medição espectrofotométrica em absorvância de 515 ~ 520 nm da capacidade de determinado produto antioxidante de estabilizar o elétron desemparelhado do átomo de nitrogênio do DPPH, o qual sofre redução ao receber um átomo de H proveniente do antioxidante. Esta reação resulta na formação do difenil-picril-hidrazina (Fig. 4) com alteração na coloração do radical DPPH que varia de violeta para amarelo pálido (DAWIDOWICZ, WIANOWSKA & OLSZOWY, 2012b; FOTI, 2015).

Compostos fenólicos ou polifenóis são ótimos doadores de H e, portanto, são potentes antioxidantes que podem reagir tanto por via de transferência eletrônica única ou transferência de átomo de H, podendo ainda ocorrer simultaneamente (Foti, 2015; LEOPOLDINI *et al*, 2004; Xie & SCHAICH, 2014).

Apesar da versatilidade da técnica e das vantagens do ensaio DPPH, este pode ser influenciado pelo Potencial Hidrogeniônico (pH), polaridade do solvente utilizado e os compostos coexistentes na amostra como pigmentos, ácidos naturais e íons metálicos (DAWIDOWICZ & OLSZOWY, 2012a; DAWIDOWICZ *et al.*, 2012b; PEKAL & PYRZYNSKA, 2015; YEO *et al.*, 2019). Além disso, o ensaio com DPPH pode subestimar a capacidade antioxidante total da amostra devido a limitação em avaliar a contribuição antioxidante de espécies hidrofílicas (ARNAO, 2000; ALAM *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2020).

Figura 4. Reação de estabilização do reagente DPPH pelo antioxidante (AH).



Fonte: Adaptada de Oliveira, 2015.

1.6.2 ABTS

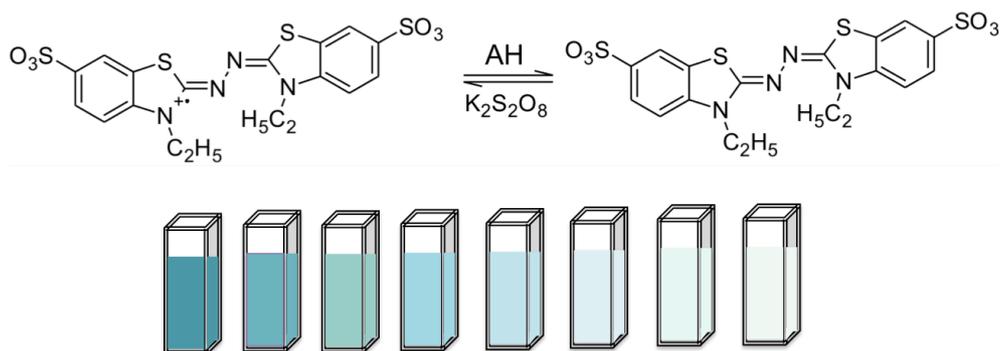
O ensaio com radical ABTS também é muito utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de produtos naturais (RE *et al.*, 1999; ILYASO *et al.*, 2020). Baseia-se na remoção do cátion $ABTS^+$, obtido por meio enzimático ou químico, pela ação do antioxidante que promove descoloração do composto cromóforo variando da cor azul-esverdeada para incolor (ARNAO, 2000). A formação do cátion $ABTS^+$ é comumente formada por reação com persulfato de potássio que reage estequiometricamente ABTS/persulfato de potássio com relação 1:0,5 (Figura 5) (HENRIQUEZ *et al.*, 2002; ILYASO *et al.*, 2020).

O potencial antioxidante da amostra é medido por espectrofotômetro em absorvâncias máximas de 414, 645, 734 e 815 nm (MILLER *et al.*, 1993; ARNAO, 2000), com variações devido ao efeito solvatocrômico em diferentes solventes, por exemplo, metanol (744-745 nm), etanol (753 nm) e propanol-1 (757 nm), sendo recomendada a leitura em 730-734 nm devido as possíveis interferências de muitos compostos que podem subestimar a capacidade antioxidante em comprimentos de onda mais baixos DAWIDOWICZ & OLSZOWY, 2013; DONG *et al.*, 2015).

A redução do radical orgânico ABTS⁺ para ABTS pelo antioxidante resulta em um decréscimo na absorvância e uma descoloração. Desta forma, amostras que em pequenas concentrações promovem perda da coloração do meio reacional, possuem maior potencial antioxidante (CANO & ARNAO, 2017; MARÍN *et al.*, 2019).

Apesar das desvantagens gerais de métodos colorimétricos, o ensaio com ABTS é vantajoso, pois é aplicado tanto para amostras hidrossolúveis quanto lipossolúveis. Além disso, possui excelente estabilidade com resultados reprodutíveis e solubilidade adequada tanto para compostos lipofílicos como hidrofílicos (APAK, 2019; ILYASO *et al.*, 2020).

Figura 5. Reação de estabilização do reagente ABTS com persulfato de potássio pelo antioxidante (AH).



Fonte: Adaptada de Borges *et al.*, 2011.

1.6.3 Folin-Ciocalteu

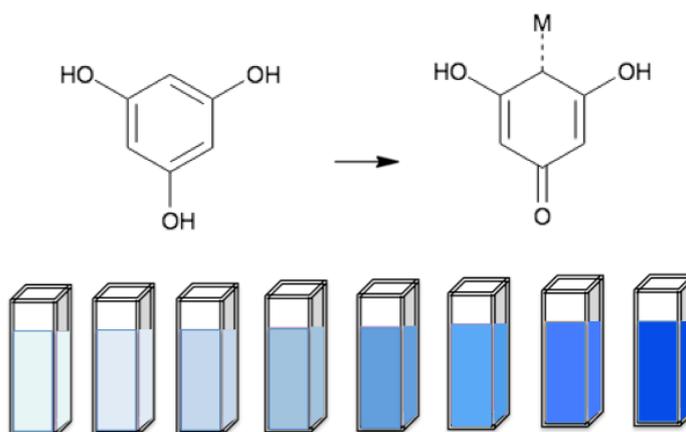
Folin-Ciocalteu (FC) está entre os ensaios mais antigos utilizados para a rápida e fácil determinação de FT em produtos naturais (SINGLETON *et al.*, 1999; HAO *et al.*, 2020). Este reagente, formado pela mistura dos compostos ácidos fosfotungstíco e

fosfomolibídico, promove a oxidação de compostos fenólicos, resultando em molibdênio azul e tungstênio azul (NACZK & SHAHIDI, 2004).

A coloração azul do complexo metálico reduzido (Figura 6) é quantificada por espectrometria UV-VIS em comprimento de onda de 765 nm e avaliada a partir de prévia curva de calibração do ácido gálico. O resultado obtido é expresso em concentração do ácido gálico por grama da amostra (NACZK e SHAHIDI, 2004; ABDEL AZEEM *et al.*, 2020; MARSOUL *et al.*, 2020).

Embora o ensaio colorimétrico FC seja muito utilizado e consolidado na literatura, apresenta várias limitações. Cerca de 50 compostos orgânicos comumente encontrados em produtos naturais podem interferir com o reagente. Além disso, devido o FC ser preparado em água ou solventes orgânicos polares, outra limitação da técnica é a avaliação apenas de compostos fenólicos hidrofílicos da amostra (ABDEL AZEEM *et al.*, 2020).

Figura 6. Reação de redução do reagente *Folin-Ciocalteu* (W^{6+} , Mo^{6+}).



Fonte: Adaptada de Oliveira *et al.*, 2009.

1.7 Estudos eletroquímicos

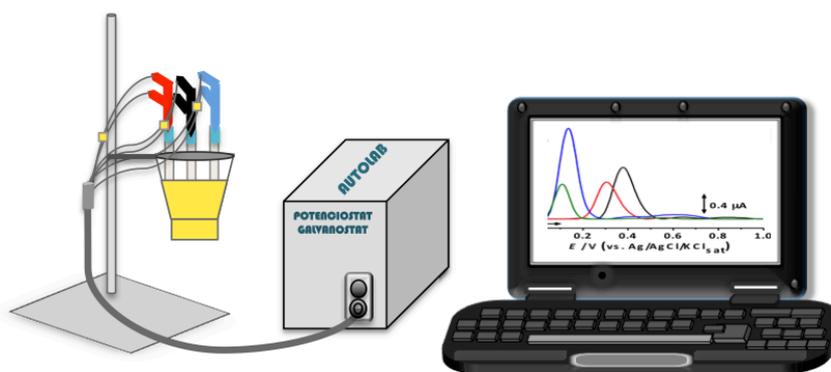
A eletroquímica é um método analítico de variada aplicabilidade. Estudos demonstram sua efetividade na avaliação da capacidade antioxidante (MACEDO *et al.*, 2017; LEITE *et al.*, 2018), identificação e doseamento de fármacos (HOYOS-ARBELÁEZ *et al.*, 2018), e ainda apresenta grande possibilidade de inovação (MACEDO *et al.*, 2016).

Apresenta como vantagens a abundância de propriedades eletroativas presentes nas substâncias químicas, seletividade, grande sensibilidade, baixos limites de detecção, versatilidade dos experimentos, possibilidade de miniaturização dos ensaios sem perda de performance analítica, baixo custo, rapidez nas análises e sustentabilidade (ESCARPA, 2012; PACHECO *et al.*, 2013; HOYOS-ARBELÁEZ *et al.*, 2018).

Dentre as técnicas eletroanalíticas, a voltametria se destaca por possibilitar estudos qualitativos e quantitativos, bem como a elucidação do perfil redox de determinado produto químico através do estudo dos fenômenos que ocorrem na interface entre o eletrodo de trabalho e a solução. Esta técnica é considerada dinâmica, pois se baseia na aplicação da corrente elétrica (i) em função de um potencial (E) aplicado, ou seja, $i = f(E)$ e o gráfico obtido é chamado de voltamograma (SKOOG, 2002; GIL, 2007).

Os estudos são realizados em uma célula eletroquímica com solução tampão, a qual assegura condutividade elétrica no meio reacional. O sistema pode ser composto por dois, três ou quatro eletrodos, sendo o de três eletrodos o mais utilizado, formado por eletrodos de trabalho, referência e contra-eletrodo, também chamado de eletrodo auxiliar (Figura 7). Desta forma, as informações sobre o analito são obtidas pela medida da magnitude da corrente elétrica presente entre os eletrodos de trabalho e contra-eletrodo, quando se aplica uma diferença de potencial entre os eletrodos de trabalho e referência (PACHECO *et al.*, 2013).

Figura 7. Instrumentação para o estudo eletroquímico.



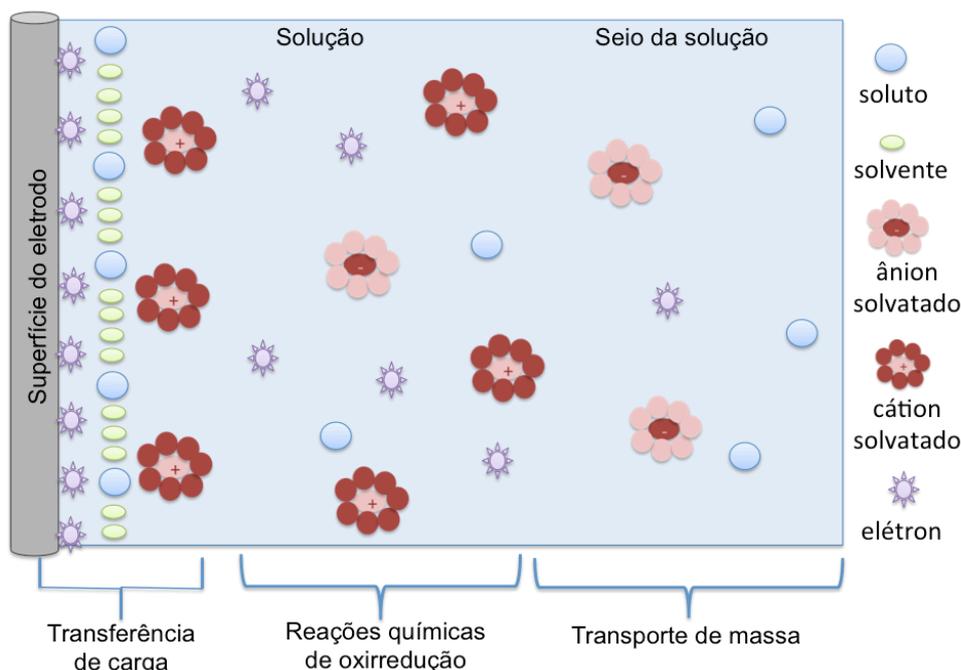
Fonte: Figura do autor.

O eletrodo de trabalho, inicialmente formado por mercúrio na técnica da polarografia, é onde ocorre as reações eletroquímicas, sendo geralmente formado por um material inerte como platina, ouro, mercúrio, carbono em pasta, carbono vítreo ou, ainda

mais sensíveis, compostos de materiais nano-estruturados e com biomoléculas nos biossensores. O eletrodo auxiliar, responsável pela drenagem do excesso de corrente elétrica, é normalmente constituído de platina, mas também pode ser formado por ouro ou carbono vítreo e o eletrodo de referência, responsável por manter potencial constante tem o $\text{Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ 3 M como mais utilizado (LIU *et al.*, 2012; PACHECO *et al.*, 2013).

A magnitude dos fenômenos que ocorrem entre a espécie analisada, o eletrodo de trabalho e o meio reacional pode ser explicada a partir dos fenômenos que transportam a espécie eletroativa do seio da solução até a interface eletrodo-superfície, processo conhecido como transporte de massa. Ocorre também a transferência de carga, formada pelas trocas de elétrons na superfície do eletrodo e por fim, as reações químicas que podem suceder ou preceder a transferência eletrônica (Figura 8), podendo ser reações homogêneas como protonação, dimerização etc, ou reações heterogêneas como adsorção, dessorção, decomposições catalíticas ou cristalização (PACHECO *et al.*, 2013).

Figura 8. Esquema das etapas envolvidas na medida voltamétrica.



Fonte: Adaptada de BAZANT *et al.*, 2011.

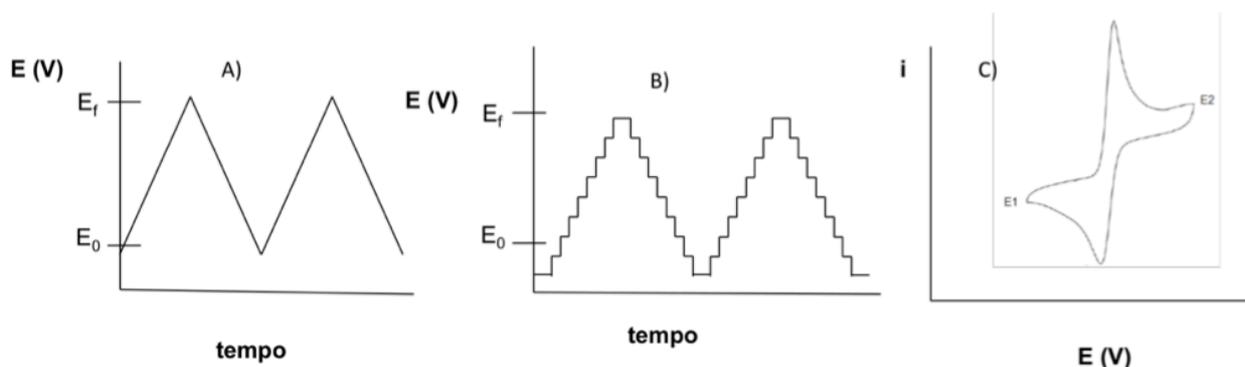
As técnicas voltamétricas mais utilizadas para avaliação da capacidade antioxidante e comportamento redox dos polifenóis naturais são CV, DPV e SWV que se diferenciam pela aplicação de potencial e obtenção do sinal analítico (BALDEÓN *et al.*, 2015; PIOVESAN *et al.*, 2015; HOYOS-ARBELÁEZ *et al.*, 2018).

1.7.1 Voltametria cíclica

Dentre as técnicas mais comumente utilizadas para a obtenção de informações qualitativas, está a CV (Figura 9), utilizada para a triagem do perfil de oxirredução de um composto químico, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e reações de processos adsorptivos (SKOOG *et al.*, 2009). É baseada na varredura linear ou em escada de um potencial com forma triangular em função do tempo. O potencial é aplicado sobre o eletrodo de trabalho e retorna ao potencial de partida (PACHECO *et al.*, 2013).

A inversão dos potenciais é chamada de ciclização do potencial de partida, que resulta na formação de voltamogramas que possibilitam a observação dos picos de oxidação (anódica) e de redução (catódica) (SKOOG *et al.*, 2009).

Figura 9. Aplicação do potencial para voltametria cíclica em A) varredura linear e B) potencial do tipo escada C) voltamograma para sistema reversível.



Fonte: Pacheco *et al.*, 2013.

Estudos de voltametria cíclica foram utilizados para avaliar a capacidade antioxidante de diversas especiarias como anis, anis estrelado, pimenta branca, funcho, cardamomo, cravo, coentro, noz-moscada, pimenta da Jamaica, canela, baunilha e gengibre. O método utilizado mostrou-se eficiente para uma triagem rápida da capacidade antioxidante de amostras de origens variadas. A canela apresentou 39.8 ± 1.4 e 44.9 ± 1.5 (mmol Trolox/g de extrato seco) para os extratos hidroetanólicos e etanólicos, respectivamente (PRZYGODZKA *et al.*, 2014). Os principais antioxidantes da canela são cinamaldeído e eugenol (YERER *et al.*, 2020).

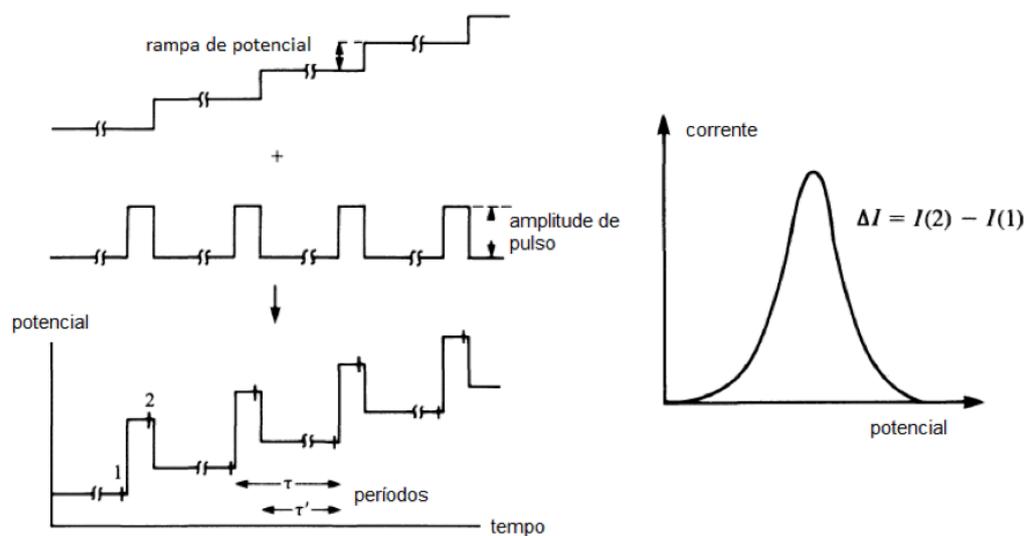
1.7.2 Voltametria de pulso diferencial

Outra técnica de grande importância para a eletroquímica é a DPV (Figura 10), a qual se caracteriza pela escolha de um potencial inicial sem presença de corrente faradáica. Nessas condições, são aplicados pequenos pulsos com duração normalmente entre 5 e 100 ms e amplitude fixa sobreposta a uma rampa de potencial crescente, onde são medidas as correntes antes (S_1) e depois (S_2) da aplicação do pulso. O voltamograma, formado por pico de corrente gaussiana, é obtido pela diferença entre essas duas correntes, a qual permite a correção da corrente capacitiva (SKOOG *et al.*, 2009).

Desta forma, a DPV possibilita melhor resolução dos picos anódicos com sensibilidade maior que a CV, apresentando limites de detecção da ordem de 10^{-8} mol L⁻¹. A área obtida por voltamograma é diretamente proporcional à concentração do analito, segundo equação 1, onde n = número de elétrons envolvido na reação redox, F = constante de Faraday (coulombs), A = área do eletrodo (cm²), D = coeficiente de difusão (cm²s⁻¹), C = concentração do analito (mmol L⁻¹), t_m = tempo entre a leitura final e inicial de corrente (s) (PACHECO *et al.*, 2013).

$$\text{Equação 1: } i_p = \frac{nFAD^{1/2}C}{\sqrt{\pi t_m}} \left(\frac{1-\sigma}{1+\sigma} \right)$$

Figura 10. Aplicação do potencial para voltametria de pulso diferencial.



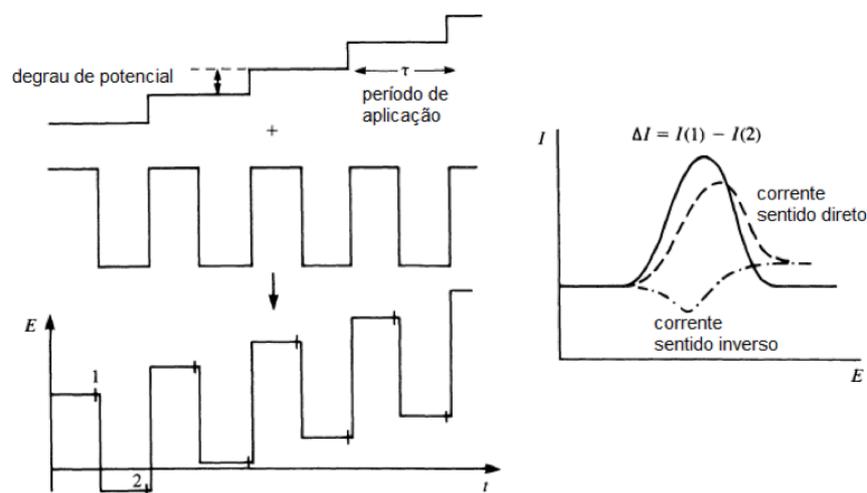
Fonte: Pacheco *et al.*, 2013.

A técnica de DPV foi utilizada para a determinação quantitativa de eugenol em produto farmacêutico. As correntes de pico foram lineares na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-7}$ a $1,7 \times 10^{-5}$ M e apresentaram limite de detecção e limite de quantificação de $7,0 \times 10^{-9}$ e $2,3 \times 10^{-8}$, respectivamente (YILDIZ *et al.*, 2017). A DPV também demonstrou sua confiabilidade e eficiência na avaliação da capacidade antioxidante de diversas fontes naturais como frutas vermelhas (MACEDO *et al.* 2017), mel (OLIVEIRA NETO *et al.*, 2017), pimentas (MACHADO *et al.*, 2021) e plantas medicinais (LEITE *et al.*, 2018).

1.7.3 Voltametria de onda quadrada

Outra possibilidade de análise eletroquímica é a SWV (Figura 11), que compreende uma variação de potencial em forma de onda quadrada sobreposta a um degrau de potencial, em que um pulso completo de onda quadrada corresponde a um degrau da escada. Desta maneira, a corrente é demonstrada no sentido da oxidação (positivo) e da redução (negativo), gerando um pico para cada um dos processos, o que possibilita a análise do processo de oxidação e redução simultaneamente em um único escaneamento da amostra (JANEIRO & OLIVEIRA-BRETT, 2005).

Figura 11. Aplicação do potencial para voltametria de onda quadrada.



Fonte: Pacheco *et al.*, 2013.

A eficiência da SWV foi avaliada em estudos para determinação de cafeína e teobromina no cacau amazônico, foram construídas curvas analíticas com limites de detecção e quantificação de $0,027 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,093 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, para cafeína e $0,025$ e $0,085 \mu\text{mol L}^{-1}$ para teobromina. A técnica SWV demonstrou ser uma

boa ferramenta analítica para o controle de qualidade de cacau e chocolate fermentado (GOMES JÚNIOR *et al.*, 2019).

A partir destas técnicas eletroquímicas, a intensidade da corrente elétrica gerada pode ser relacionada a concentração de determinado analito, espécies eletroativas da amostra (DEDE *et al.*, 2014; MACEDO *et al.*, 2016).

1.8 Sensores eletroquímicos

Na eletroquímica, o eletrodo de trabalho atua como um sensor químico, definido pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês, International Union of Pure and Applied Chemistry) como um dispositivo capaz de transformar a informação obtida por reações químicas em um sinal analítico mensurável. A abrangência e capacidade desse sensor químico nas análises está diretamente relacionada ao material ao qual é formado (THÉVENOT *et al.*, 2001).

Eletrodos sólidos, formados de platina, ouro, prata, níquel, cobre e carbono, possuem baixa corrente capacitiva e ampla faixa de potencial, são indicados tanto para análises em compostos inorgânicos como orgânicos, contudo, matrizes complexas podem limitar seu uso devido a processos adsortivos (STRADIOTTO *et al.*, 2003; MUSTAFA *et al.*, 2015).

Para compostos orgânicos mais complexos como matrizes vegetais, os eletrodos a base de pasta de carbono são os mais indicados, pois permitem a renovação da superfície do eletrodo a cada etapa do processo sem a necessidade de exaustiva etapa de limpeza. Eletrodos de pasta de carbono são formados por uma mistura simples de pó de grafite com agente aglutinante, normalmente óleo mineral (ŠVANCARA *et al.*, 2012). Além disso, são possíveis diversas inovações a partir da adição de modificadores, o que resulta em Eletrodos Quimicamente Modificados (EQM) que apresentam sensibilidade e seletividade aumentada, quando comparada aos eletrodos não modificados (CHETANKUMAR *et al.*, 2020; MADHUCHANDRA *et al.*, 2020; VAJDLE *et al.*, 2020).

Os EQM podem se diferenciar em imunossensores que são eletrodos que possuem antígeno (Ag) e/ou anticorpo (Ab) em sua constituição; genossensores, formados com fragmentos de DNA (do inglês, Deoxyribonucleic Acid), EQM com semicondutores que aumentam a sensibilidade e a gama de compostos analisados, eletrodos biomiméticos que mimetizam sistemas específicos como enzima-substrato e/ou antígeno-anticorpo e os eletrodos enzimáticos, também chamados de biossensores (MANZANARES-PALENZUELA *et al.*, 2015; BUORO *et al.*, 2017; BEITOLLAHI *et al.*, 2018; BRITO *et al.*,

2020).

Ye *et al* (2019) em seu artigo de revisão destacou que os biossensores eletroquímicos possuem alta sensibilidade, rápido tempo de resposta e facilidade de miniaturização. Desta forma, é uma ferramenta promissora para pesquisa da capacidade antioxidante e também têm sido utilizados na triagem de medicamentos e pesquisa de toxicidade.

1.8.1 Biossensores

Biossensor é um sensor eletroquímico que traduz informações de reações bioquímicas, obtidas em processos biológicos, para um sinal químico ou físico detectável (ČIŽMEK *et al.*, 2019; TOMAC *et al.*, 2020). É formado por um sistema de biorreconhecimento como célula, anticorpo, enzima, aptâmero ou DNA que se conecta a um transdutor que pode ser eletroquímico, colorimétrico, fluorescente, piezoelétrico ou de reflectância, a qual produz um sinal amplificado, proporcional à concentração do analito, através de um software (Figura 12) (SGOBBI, 2016).

Figura 12. Esquema da composição de um biossensor.



Fonte: Adaptada de Oliveira & Pereira, 2016.

Os transdutores eletroquímicos compõem a maioria dos biossensores e se diferenciam em voltamétricos, onde uma rampa de potencial é aplicada em função do tempo; potenciométricos que medem o potencial elétrico ou acúmulo de cargas no eletrodo de trabalho em relação ao eletrodo de referência (CHAUBEY *et al.*, 2002); impedimétricos que avaliam alterações nas propriedades condutoras dos eletrodos modificados, a partir da impedância (OGNJANOVIĆ *et al.*, 2020). Ainda, amperométricos que apresentam potencial constante e a medida da corrente elétrica obtida de reações bioquímicas são correlacionadas à concentração de espécies eletroativas no analito (SGOBBI, 2016; RAMONAS *et al.*, 2019).

De acordo com o processo de biorreconhecimento, os biossensores eletroquímicos também se dividem em sensores de afinidade e dispositivos biocatalíticos. Os

biossensores de afinidade adquirem sinal analítico por meio da interação entre o analito e o componente biológico como anticorpos e ácidos nucleicos, enquanto que nos biossensores catalíticos, o componente biológico produz espécies eletroativas a partir do reconhecimento e reação com o alvo, exemplificado pelas células, tecidos e principalmente as enzimas (RONKAINEN *et al.*, 2010).

Biossensores enzimáticos podem ser formados por hidrolases, transferases, liases, ligases, isomerases ou oxidorreduções que são o grupo de maior interesse para estudos eletroquímicos e estão relacionados a processos de oxidorredução, transporte de elétrons, prótons e oxigênio, respiração e fermentação. São pertencentes a este grupo a glicose – oxidase, tirosinase, catalase, peroxidase e lacase (LOPEZ *et al.*, 2020).

As lacases são encontradas em plantas, insetos e produzidas por fungos basidiomicetos como o *Marasmiellus* sp. Essas enzimas utilizam O₂ para oxidar compostos aromáticos fenólicos e não fenólicos, reduzindo-os à água. Os estudos de biossensores enzimáticos utilizando lacases ocorrem em duas etapas com oxidação bioquímica seguida de redução eletroquímica dos produtos gerados no processo (MACÊDO *et al.*, 2017; JESUS, 2019).

O biossensor enzimático a base de lacase é seletivo, sensível, permite miniaturização dos experimentos, possui baixo custo e facilitada etapa de construção do eletrodo e pré-tratamento da amostra. Além disso, grande vantagem está na redução da passivação do eletrodo devido ao acúmulo de produtos poliméricos secundários em sua superfície e possui grande aplicabilidade, sendo possível analisar tanto resíduos, medicamentos ou alimentos (Tabela 1) (LIU *et al.*, 2019; MOHTARA *et al.*, 2019).

Tabela 1. Aplicações de biossensores enzimáticos a base de lacase na avaliação antioxidante.

Avaliação anti - oxidante	Amostra	Transdutor	Modificação	Faixa linear	Limite de detecção	Referência
Polifenol total	Extrato de frutas vermelhas	CV, DPV, SWV	Lac/CPE	0.01-3.5 µM	0.01 µM	Macêdo <i>et al.</i> , 2017.
Polifenol	Cerveja	CV, EIS	Lac/AgNPs/cM WCNT /PANI/GE	0.1-500 µM	0.1 µM	Rawal <i>et al.</i> , 2011.

Avaliação anti - oxidante	Amostra	Transdutor	Modificação	Faixa linear	Limite de detecção	Referência
Polifenol	Suco de fruta	CV, CA	Tyr(Lac)/GO/MWCNTs	1-300 μ M para ThL 1-340 μ M para Tyr	0.3 μ M for ThL 0.5 μ M for Tyr	Vlamidis <i>et al.</i> , 2017.
Polifenol total	Extrato de folhas de chá	CV, EIS	Lac/Fe ₃ O ₄ NPs/cMWCNT/PA NI/GE	0.1-10 μ M 10-500 μ M	0.03 μ M	Rawal <i>et al.</i> , 2012.
Fenol	Chá	CV	CLEC Lac/ β -CDEP/PVP gel/Au cathode	50-1000 μ M	50 μ M	Roy <i>et al.</i> , 2005.
Catequina e ácido cafeico	Vinho tinto	CV	DPEM /Lac/Pt electrode	2.0-14 μ M	1.0 \times 10 μ M	Gomes <i>et al.</i> , 2004
Catecol	Água	CV, DPV	Lac /GONs/EDOT	0.036-0.35 μ M, 0.35-2.5 μ M	0.032 μ M	Maleki <i>et al.</i> , 2017.
Polifenol total	Extrato de plantas	CV	Tyr/prepared electrode Lac/MWCNTs/CHI	0.91 μ M 12.1 μ M	23.3 μ M	Diaconu <i>et al.</i> , 2010.

CV: cyclic voltammetry; DPV: Diferencial pulse voltammetry; SWV: Square wave voltammetry; Lac: laccase; Tyr: tyrosinase; CA: chronoamperometry; GCE: glassy carbon electrode; CPE: carbon paste electrode.

Os biossensores enzimáticos a base de lacase são ferramentas importantes na avaliação da capacidade antioxidante de produtos naturais, podendo potencializar as análises (MOHTARA *et al.*, 2019). Além disso, estudos espectrofotométricos como DPPH (YEO & SHAHIDI, 2019), ABTS (ILYASO *et al.*, 2020) e *Folin-Ciocalteu* (HAO *et al.*, 2020), também fornecem essa informação a partir de diferentes abordagens, o que favorece uma avaliação mais precisa e abrangente, a partir da correlação das diferentes metodologias analisadas. Os estudos para avaliação da capacidade antioxidante de produtos naturais apresentam diversas aplicações e são estratégias interessantes no estudo dos efeitos vasodilatadores destes compostos (OLIVEIRA, 2018).

2.1 Objetivo geral

Determinar a capacidade antioxidante de amostras comerciais de canela por métodos espectrofotométricos convencionais, voltamétricos e verificar a atividade vasorrelaxante dos extratos selecionados.

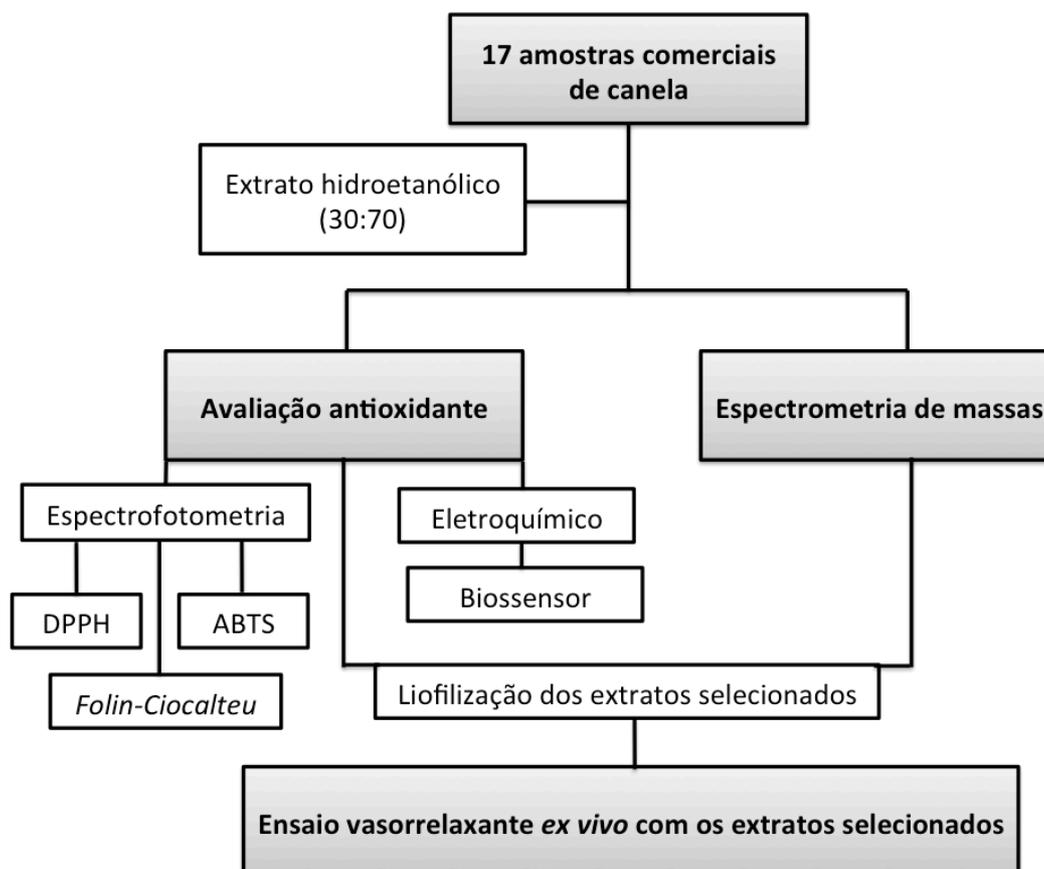
2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade antioxidante via métodos clássicos espectrofotométricos, DPPH, ABTS e *Folin-Ciocalteu* de diferentes amostras de canela;
- Determinar a capacidade antioxidante via DPV, utilizando o índice eletroquímico, de diferentes amostras de canela;
- Avaliar o perfil eletroquímico dos compostos por CV e SWV;
- Identificar os principais constituintes presentes nas amostras de canela, por espectrometria de massas;
- Correlacionar e comparar os constituintes identificados com o potencial antioxidante;
- Aplicar biossensor a base de lacase extraída do fungo *Marasmiellus colocasiae* em amostras de canela para avaliar a capacidade antioxidante da canela;
- Avaliar a ação vasorrelaxante *ex vivo* para os extratos selecionados;
- Correlacionar a capacidade antioxidante das amostras comerciais de canela pelos diferentes métodos analisados.

3.1 Delineamento experimental

Os estudos foram conduzidos com 17 amostras comerciais de canela originárias de diferentes países. Foi realizado estudo do melhor solvente extrator e o extrato hidroetanólico (30:70) foi escolhido para os demais experimentos. A capacidade antioxidante da canela foi avaliada por espectrofotometria, com ensaios de sequestro radical de DPPH, ABTS e *Folin-Ciocalteu*. Também foram realizados experimentos eletroquímicos e aplicação de biossensor. A espectrometria de massas foi utilizada nos extratos com o melhor e pior resultado e estes foram liofilizados para o ensaio vasorrelaxante *ex vivo*, conforme descrito no fluxograma da figura 13.

Figura 13: Delineamento dos ensaios experimentais para análise da canela.



Fonte: Figura do autor.

3.2. Reagentes e Padrões

Todas as soluções eletrolíticas foram utilizadas com pureza analítica e foram diluídas em água destilada Milli-Q (condutividade $\leq 0,1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) (Millipore S. A., Molsheim, França). O ácido gálico, etanol e os padrões de DPPH, ABTS e *Folin-Ciocalteu* foram adquiridos da Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

3.3 Preparação das amostras

Dezessete amostras comerciais de canela em pó foram adquiridas de empresas brasileiras e de outros países como Costa Rica, Espanha, Estados Unidos da América, Grécia, Indonésia e Portugal.

As frações de extração foram preparadas com 100 mg das amostras comerciais de canela em pó e 10 mL de diferentes proporções de água e etanol, sendo 100: 0, 70:30, 50:50, 30:70 e 0: 100 (água: etanol), respectivamente. As amostras foram agitadas por 1 min em vortex, seguido por 10 min em ultrassom Limp Sonic[®] e 5 min em centrifugação a 2500 rpm na centrífuga Spinlab[®].

Para evitar a presença de etanol nos ensaios farmacológicos (o que poderia danificar os tecidos vasculares), as amostras 7 e 15, que apresentaram o melhor e pior resultados da capacidade antioxidante, respectivamente, foram liofilizadas e ressuspensas em água destilada (100 mg/mL). A liofilização foi realizada em um liofilizador Genesis SQ Super XL-70 de 25 L da SP Científica. Para o procedimento, a amostra foi congelada a -60 graus a uma pressão de 380 Torr (0,5 bar). Depois que a amostra foi completamente congelada, a pressão foi reduzida para 100 mTorr (0,0001333 bar) e mantida nessa pressão e temperatura por 72 h. Em seguida, a temperatura foi aumentada para -10 graus, mantendo a mesma pressão e temperatura por 72 h.

3.4 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos entre 7 e 8 semanas de idade, pesando entre 210-240 g. Os animais foram fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal de Goiás e mantidos no biotério da Faculdade de Farmácia da respectiva universidade. Os animais foram mantidos sob ciclo claro (7h – 19 h) e escuro (19 h – 7 h) à temperatura de $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, com livre acesso à ração e água. Todos os experimentos foram realizados de

acordo com a Sociedade Brasileira de Zootecnia e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa local (Protocolo CEUA/UFG 116/19).

3.5 Ensaios eletroquímicos

Os experimentos voltamétricos foram realizados em potenciostato/galvanostato μ Autolab III[®] integrado ao software NOVA 2.1 (Metrohm). As medições foram feitas em uma célula eletroquímica de compartimento único de 5 mL com um sistema de 3 eletrodos, consistindo de um eletrodo de pasta de carbono, um eletrodo Ag/AgCl/KCl_{sat} 3M e um fio de platina (adquirido em Lab Solutions, São Paulo, Brasil), representando o eletrodo de trabalho, referência e auxiliar, respectivamente.

As condições experimentais para CV foram: faixa de varredura de 0 a 1 e taxa de varredura de 100 mV.s⁻¹. Para o SWV foram: amplitude de pulso de 50 mV, com frequência de 50 Hz e aumento de potencial de incremento 2 mV, correspondendo a uma taxa de varredura de 100 mV.s⁻¹. Para a DPV, as condições experimentais foram: amplitude de pulso de 50 mV, largura de pulso de 0,5 s e taxa de varredura de 10 mV.s⁻¹. Os voltamogramas DPV tiveram linha de base corrigidos e todos os dados foram analisados e tratados no software Origin 9.0[®].

Todos os experimentos foram feitos à temperatura ambiente (21 ± 1 ° C) em triplicata (n = 3) e foi realizado estudo de pH com solução tampão fosfato e tampão acetado de sódio nos pHs 3,0, 5,0, 7,0, e 9,0. Para os estudos voltamétricos com eletrodo não modificado o eletrólito principal utilizado foi tampão fosfato 0,1 M pH 7,0.

3.5.1 Índice Eletroquímico

O índice eletroquímico (EI, do inglês, Electrochemical Index) leva em consideração os principais parâmetros voltamétricos, como Potencial de Pico Anódico (E_{pa}) e corrente de pico anódico (I_{pa}). Com base no fato de que em E_{pa} mais baixa, a capacidade de doação de elétrons é maior (parâmetro termodinâmico) e quanto maior o I_{pa} (parâmetro cinético), maior o número de espécies eletroativas, o EI foi calculado pela equação 2:

$$\text{Equação 2:} \quad EI = \sum_{i=1}^n \frac{I_{pan}}{E_{pan}}$$

Onde, em um voltamograma com n picos, I_{pan} e E_{pan} são a corrente e o potencial de n picos, respectivamente.

3.5.2 Biossensor

Um extrato bruto de lacase, *Marasmiellus colocasiae* (CCIBT 3388), obtido e desenvolvido conforme descrito em trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa (Batista *et al.*, 2020), foi usado para preparar o biossensor otimizado. Resumidamente, 50 μ L de extrato bruto enzimático foram misturados com 70 mg de grafite (Sigma Aldrich®) e deixados secar em temperatura ambiente por 1 h. Em seguida, foram adicionados 30 mg de óleo mineral, o agente aglutinante, e misturado rigorosamente de forma a obter uma pasta homogênea. Essa pasta final foi utilizada para preencher a cavidade do eletrodo que tinha 2 mm de diâmetro e 0,5 mm de profundidade.

As condições experimentais para DPV foram: amplitude de pulso de 50 mV, largura de pulso de 0,5 s, taxa de varredura de 10 mV.s⁻¹ e faixa de varredura de 1 a 0 V. Todos os experimentos foram feitos em temperatura ambiente (21 \pm 1 ° C) em triplicata ($n = 3$) e o eletrólito principal utilizado foi o tampão de acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0.

3.6 Ensaios espectrofotométricos

3.6.1 Ensaio de eliminação de radical DPPH

A atividade sequestrante de radicais foi feita usando o reagente DPPH, de acordo com procedimentos bem estabelecidos (MACÊDO *et al* 2017; LEITE *et al*, 2019). Uma mistura de 2,7 mL de solução etanólica de DPPH (0,1 mM) e 0,3 mL de etanol foi preparada como um controle em branco, onde a absorbância final a 517 nm foi *c.a* 0,7. O etanol foi usado para ajustar a linha de base ($A = 0,00$).

Para os experimentos, 300 μ L da porção etanólica foram substituídos pelo extrato das 17 amostras de canela preparados em solvente 30:70 (água: etanol), e pelos padrões quando a curva de calibração foi realizada. As medidas foram analisadas usando espectrômetro UV-vis (modelo V-530, Jasco, Inc., Easton, MD, EUA). Cada ensaio foi realizado em triplicata. A atividade antioxidante foi expressa em IC₅₀ conforme indicado na Equação 3, onde 50% da solução da amostra é capaz de produzir descoloração em relação ao controle branco (etanol) após cinco minutos de transferência da alíquota da

amostra para o radical DPPH. As amostras foram analisadas em uma cubeta de vidro de caminho óptico de 1 cm em temperatura ambiente.

$$\text{Equação 3: } \% \text{ AA} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

Onde % de absorvância (AA) é a porcentagem de atividade antioxidante, A_{DPPH} é a absorvância da solução com o radical formado sem a presença de uma amostra. A_{test} é a absorvância observada na presença do radical com o analito, e IC_{50} é a quantidade de extrato em g/mL das amostras testadas necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50%.

3.6.2 Ensaio de eliminação de radical ABTS

O ensaio do radical ABTS foi realizado de acordo com a literatura (LEITE *et al.*, 2018), formado a partir da reação de 5,0 mL de solução ABTS em água (7 mM) com 88 μL de solução de persulfato de potássio em água (140 mM), incubados na ausência de luz por 16 horas. Em seguida, 2 mL da solução de radical preparada foram diluídos em etanol para 150 mL, obtendo-se uma solução com absorvância c.a. 0,7 em um comprimento de onda de 734 nm.

Para os experimentos, 300 μL do extrato etanólico foram adicionados ao tubo de ensaio contendo 2,7 mL de radical ABTS, assim os tubos foram cobertos com Parafilm® e mantidos no escuro por 20 min. A absorvância foi monitorada com o espectrofotômetro UV-vis (modelo V-530, Jasco, Inc., Easton, MD, EUA). Todos os testes foram realizados em triplicata. A porcentagem de decaimento expressa por absorvância a 734 nm foi calculada como indicado na Equação 4:

$$\text{Equação 4: } \% \text{ AA} = (A_{\text{ABTS}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{ABTS}} \times 100$$

Onde % AA é a porcentagem de atividade antioxidante, A_{ABTS} é a absorvância da solução com o radical formado sem a presença de uma amostra. A_{test} é a absorvância observada na presença do radical com o analito, e IC_{50} é a quantidade de extrato em g/mL das amostras testadas necessária para diminuir a concentração inicial de ABTS em 50%.

3.6.3 Ensaio de fenóis totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados pelo método espectrofotométrico de *Folin-Ciocalteu* (FC) (SINGLETON & ROSSI, 1965; SINGLETON, ORTHOFER & LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). As amostras de canela foram preparadas na concentração de 1%, alíquota de 50 µL do extrato foi adicionada em um tubo de ensaio contendo 1 mL de água destilada e 250 µL do reagente FC. Após 5 min, foram adicionados 750 µL de uma solução de Na₂CO₃ a 20% e 2950 µL de água destilada. A mistura foi incubada na ausência de luz por 60 min, obtendo absorvância de c.a 0,7 em um comprimento de onda de 765 nm. A quantificação de compostos fenólicos em amostras de canela foi realizada em triplicata e expressa por meio de equivalentes de ácido gálico em µM, a partir de uma curva de calibração obtida nas mesmas condições para análise da amostra, onde obteve-se linearidade.

3.7 Espectrometria de massa

As amostras foram dissolvidas em metanol na concentração de 500 ppm, preenchidas em uma seringa de 500 µL (Hamilton) e infundidas diretamente usando uma bomba de seringa a uma taxa de fluxo de 3 µL/min, e analisadas em um Q-Exactive Orbitrap (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) equipado com uma fonte Electrospray Ionization (ESI). As análises foram realizadas no modo negativo (ESI (-)-MS) e positivo (ESI (+)-MS), e faixa de massa de 100-1000 Da. A identificação dos principais metabólitos detectados nas amostras de canela foi realizada utilizando plataformas de desreplicação online (MetFrag, PubChem e CFM-ID). Uma avaliação dos metabólitos de amostras de canela foi realizada por injeção direta de amostras não tratadas em um sistema de espectrometria de massa.

3.8 Estudos em artérias isoladas de ratos

Os ratos (n= 5-7 para cada protocolo diferente) foram anestesiados, eutanasiados (punção cardíaca e exsanguinações) e a aorta torácica foi removida, limpa e cortada em anéis (± 3-4 mm de comprimento), colocados em banho de órgãos (10 mL) entre dois estribos de aço inoxidável e conectados a um sistema computadorizado e uma unidade de aquisição de dados WinDaq Resource (DATAQ Instruments, Akron, OH, EUA) para medir a tensão isométrica vascular. A câmara vascular isolada foi completada com

solução salina fisiológica com a seguinte composição: 130 mM de NaCl, 1,2 mM de KH_2PO_4 , 4,7 mM de KCl, 14,9 mM de NaHCO_3 , 1,2 mM de MgSO_4 , 1,6 mM de CaCl_2 e 5,5 mM de glicose, em pH 7,4 e gaseificada com uma mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2) a 37°C.

Os anéis vasculares foram primeiramente preparados para um tônus basal de 1,5 g antes de permitir que se equilibrassem na solução de banho de órgãos. A integridade das células endoteliais foi demonstrada pela presença de relaxamento (mínimo 80% de relaxamento) à acetilcolina (1 μM) após a pré-contração estimulada com fenilefrina (0,1 μM). Após o equilíbrio, curvas de concentração-resposta cumulativa para as amostras de canela (0–380 $\mu\text{g/mL}$, liofilizadas e diluídas em água destilada) foram geradas usando anéis aórticos isolados com endotélio funcional pré-contraído com fenilefrina (0,1 μM).

Para os estudos vasculares, foram utilizadas apenas as amostras de canela que apresentaram a melhor e a pior capacidade antioxidante (amostra 7 e 15, respectivamente). Além disso, a fim de verificar a contribuição relativa do óxido nítrico no endotélio para o relaxamento vascular induzido por amostras de canela, os mesmos protocolos foram repetidos após o tratamento (30 min) com inibidor da sintase de óxido nítrico N-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME, 100 μM).

Em outra série de experimentos, a contração vascular induzida pelo agonista adrenérgico (fenilefrina, 0,1 μM) foi investigada em vasos controles ou após estímulo de estresse oxidativo caracterizado pela adição de hipoclorito (OCl^-) na solução do banho de órgãos na concentração de 5 μM (60 min). Após 60 min, as artérias com endotélio intacto foram contraídas novamente com fenilefrina (0,1 μM) e o nível de contração foi medido. Além disso, algumas artérias foram tratadas com amostras de canela (amostras 7 e 15) em duas concentrações diferentes (100 e 500 $\mu\text{g/mL}$) ao mesmo tempo que o estímulo de estresse oxidativo com OCl^- (tratamento com 5 μM de OCl^- e as amostras de canela por 60 minutos).

3.9 Análise estatística

Para a análise dos dados dos ensaios eletroquímicos e de eliminação de radicais foi utilizado o software estatístico Origin 9.0. Uma matriz de correlação foi realizada para os parâmetros antioxidantes avaliados, ou seja, ABTS, DPPH, *Folin Ciocalteu* e EI. A análise de ANOVA foi realizada para os ensaios de eletrodos não modificados e modificados com a hipótese nula de médias iguais e 0,05 de valor significativo.

Nos estudos vasculares, os valores foram expressos como média \pm SEM (Standard error of the mean, do inglês, erro padrão da média). As comparações entre os grupos foram realizadas usando ANOVA de uma via (pós-teste: Newman–Keuls) com 0,05 de valor significativo. As análises foram realizadas no GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (San Diego, CA, EUA).

Os resultados referentes a esta tese estão na forma de artigo que segue as normas da Revista “Oxidative Medicine and Cellular Longevity”.

Artigo – Evaluation of Antioxidant Potential of Commercial Cinnamon Samples and Its Vasculature Effects

Autores: Emily Kussmaul Gonçalves Moreno, Isaac Yves Lopes de Macêdo, Erica Aparecida Batista, Fabio Bahls Machado, Gabrielle Ramos Santos, Daniela Medrado Lopes Andrade, Matheus Lavorenti Rocha, Nerilson Marques Lima, Boniek Gontijo Vaz e Eric de Souza Gil.

Revista: Oxidative Medicine and Cellular Longevity

Situação: [Publicado](#).

Evaluation of antioxidant potential of commercial cinnamon samples and its vasculature effects

Emily K. G. Moreno,¹ Isaac Y. L de Macêdo,¹ Erica A. Batista,¹ Fabio B. Machado,¹ Gabrielle R. Santos,¹ Daniela M. L. Andrade,¹ Matheus L. Rocha,¹ Nerilson M. Lima,² Boniek G. Vaz,² and Eric S. Gil¹

¹ College of Pharmacy, Federal University of Goiás (UFG), 74605-170, Brazil.

² Institute of Chemistry, Federal University of Goiás (UFG), 74690-900, Brazil.

Correspondence should be addressed to Eric S. Gil; ericsgil@ufg.br

Abstract

Growing concerns on free radicals are the oxidative processes associated with physiological damage. The consumption of functional foods and use of plants with antioxidant capacity is widespread. Given the importance of determining antioxidant capacity in relation to the therapeutic effect, this study aimed to evaluate cinnamon extract (*Cinnamomum* sp.) in commercial samples by spectrophotometric and voltammetric methods, and assess the vascular activity of some samples. The spectrophotometric methods performed were DPPH (1,1-diphenyl-2-picrihydrazine), ABTS (2,21-azinobis- (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), and Folin-Ciocalteu radical sequestration assays. For the electrochemical experiments, a three-electrode system was used, consisting of carbon paste electrode, platinum wire and Ag/AgCl/KCl_{sat}, representing the working, auxiliary and reference electrodes, respectively. The electroanalytical methods used were differential pulse, square wave, and cyclic voltammetries. The extracts were prepared in hydroalcoholic solution. A calibration curve with gallic acid was calculated to quantify their equivalent amounts in the analyzed extract. The correlation between the electrochemical approach and the total phenols calculated by the ABTS, DPPH and Folin-Ciocalteu methods was 0.63, 0.7 and 0.73 respectively, with 1 being an ideal directly proportional correlation. The correlation between spectrophotometric methods was 0.83. A biosensor was developed in a carbon paste electrode using the enzyme laccase, obtained by the fungus *Marasmiellus colocasiae*. It was observed that the antioxidant profile of the cinnamon samples had an analytical sign improvement of up to 4 times when compared with the electrode without the modification. The samples were analyzed by mass

spectrometer and the main chemical markers found were coumarin, cinnamaldehyde, and eugenol. Pharmacological trials showed that these samples also induce a significant vasorelaxant effect associated to antioxidant potential on vascular injury induced by oxidative stress. Thus, cinnamon showed a high antioxidant capacity, in agreement with the results obtained in other studies, emphasizing its importance as a functional food.

1. Introduction

Reactive oxygen species (ROS) are highly reactive compounds formed from successive reductions of O_2 present in the body's natural physiological functions such as regulation of cell growth, energy production and phagocytosis [1]. This group includes the hydroxyl radical ($\cdot OH$), superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) that in excess in the body are related to several health prejudice, such as degenerative diseases, lipid peroxidation and damage in enzymes, proteins, carbohydrates and DNA [2,3,4]. Moreover, up to 70% of the ROS produced can be transformed to reactive chlorine species such as hypochlorous acid (HOCl) and hypochlorite (OCl^-) in the vasculature through the action of some enzymes (vascular peroxidase 1 and myeloperoxidase), leading to greater injuries in the cardiovascular system [5,6].

A strategy for decreasing ROS in the body is the intake of antioxidants that are compounds capable of preventing oxidative degradation reactions through the stabilization of radical compounds [7]. The addition of antioxidants from natural origin in food products has become increasingly popular due to its importance in improving nutritional conservation and the quality of life for consumers [8,9].

Cinnamon species belongs to the *Lauracea* family group that has eugenol and coumarins in their composition, which are phenolic compounds with high antioxidant power. Moreover, it also has proven antimicrobial activity due to the components cinnamaldehyde, cinnamic acid, aromatic aldehyde, benzoic acid and benzaldehyde present in its structure [10,11,12,13].

The antioxidant capacity of natural products, whether of extract or isolated compound, is traditionally analyzed by spectrophotometric methods such as the radical 1,1-diphenyl-1-picryl-hydrazil (DPPH), the radical 2,2'-azinobis (3 -ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and Folin-Ciocalteu, which relate the discoloration of radicals with the antioxidant power of the analyzed product [14,15,16,17].

Although colorimetric methods are well established in the literature, they have several limitations, mainly related to interferences of molecules that absorb in the same

range. In addition, there is a need for efficient pre-preparation of the samples, since factors such as precipitation, suspension of large particles and the opacity of the medium alter the absorbance reading [18,19].

Comparatively, electroanalytical methods are a promising alternative for analyzing the antioxidant capacity of complex samples due to their high sensitivity, analysis speed, low cost and low reagents consumption, generally non-toxic. This technique is based on the correlation between the redox reaction of the antioxidant capacity and its detectable electrical properties [20,21].

An alternative to improve the electrochemical results is the development of a biosensor, which uses biological reactions to detect specific components of a sample [22,23]. A biosensor can be formed by an enzyme such as laccase that coupled to a transducer results in a signal proportional to the concentration of the analyte investigated [24,25,26].

Given the importance of determining antioxidant capacity in relation to the therapeutic effect, this study aimed to evaluate cinnamon extract (*Cinnamomum* sp.) in commercial samples by spectrophotometric and voltammetric methods.

2. Materials and Methods

2.1 Reagents and natural products

All electrolyte solutions were used with analytical purity and were diluted in distilled Milli-Q water (conductivity $\leq 0.1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) (Millipore S. A., Molsheim, France). Gallic acid, ethanol and the standards of DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu were purchased from Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Seventeen commercial samples of powdered cinnamon were acquired from local businesses in Brazil, and other countries such as Costa Rica, Greece, Portugal, Spain, and United States of America.

2.2 Samples preparation

Extraction fractions were prepared with 100 mg of the commercial samples of powdered cinnamon and 10 mL of different proportions of water and ethanol, being 100:0,

70:30, 50:50, 30:70 and 0:100 (water: ethanol), respectively. The samples were vortexed for 1 min, followed by 10 min in ultrasound and 5 min in centrifugation at 2500 rpm.

In order to avoid the presence of ethanol in the pharmacological assays (which could damage the vascular tissues), the samples 7 and 15 were lyophilized and re-suspended in distilled water (100 mg/mL). Lyophilization was performed in a 25 L Genesis SQ Super XL-70 lyophilizer from SP Científica. For the procedure, the sample was frozen at -60 degrees at a pressure of 380 Torr (0.5 bar). After the sample was completely frozen, the pressure was reduced to 100 mTorr (0.0001333 bar) and held at that pressure and temperature for 72 h. Then the temperature was increased to -10 degrees, keeping the same pressure and temperature for 72 h.

2.3 Electroanalytical tests

The voltammetric experiments were performed in μ Autolab III® potentiostat / galvanostat integrated with NOVA 2.1 software (Metrohm). The measurements were made in a 5 mL single compartment electrochemical cell with a 3-electrode system, consisting of a carbon paste electrode, an Ag / AgCl / KCl_{sat} 3M electrode and a platinum wire (Purchased from Lab solutions, São Paulo, Brazil), representing the working, reference and auxiliary electrode, respectively. The experimental conditions for DPV were: pulse amplitude of 50 mV, pulse width 0.5 s and scan rate of 10 mV.s⁻¹. The experimental conditions for the SWV were: pulse amplitude of 50 mV, with a frequency of 50 Hz and a potential increase of 2 mV, corresponding to a scanning rate of 100 mV.s⁻¹. The experimental conditions for CV were: scan range from 0 to 1 and scan rate of 100 mV.s⁻¹. The DPV voltammograms were corrected with the baseline-corrected and all data were analyzed and treated in the Origin 9.0 software.

All experiments were done at room temperature (21 ± 1 °C) in triplicate (n = 3) and the main electrolyte used was 0.1 M phosphate buffer (PB) pH 7.0.

2.4 Electrochemical Index

The electrochemical index (EI) takes into account major voltammetric parameters, such as anodic peak potential (E_{pa}), and anodic peak current (I_{pa}). Based on the fact that in lower E_{pa}, the electron donation ability is greater (thermodynamic parameter) and the higher the I_{pa} (kinetic parameter), the greater the number of electroactive species, EI was calculated using the Equation 1:

$$EI = \sum_{i=1}^n \frac{I_{pan}}{E_{pan}} \quad (1)$$

Where, in a voltammogram with n peaks, I_{pan} and E_{pan} are the current and the potential of the n peak, respectively.

2.5 Biosensor

The fungus *Marasmiellus colocasiae* CCIBT 3388, isolated in Domingos Martins-ES/2005, was obtained from the Basidiomycete Culture Collection (CCB) of the São Paulo Institute of Botany. The identification of the obtaining source ex situ of genetic heritage, with the information contained in the records, is in accordance with § 1 of the Article 22 of the Decree No. 8.772 of 2016. The crude enzymatic extract from *Marasmiellus colocasiae*, developed as described in previous work of our research group [27], was used to prepare the optimized biosensor.

Briefly, 50 µL of enzymatic crude extract was mixed with 70 mg of graphite (Sigma Aldrich®) and left to dry at room temperature for 1 h. Then, 30 mg of mineral oil, the agglutinating agent was added and rigorously mixed in order to achieve a homogenous paste. This final paste was used to fill the cavity of the electrode that was 2 mm in diameter and 0.5 mm in depth. The experimental conditions for DPV were: pulse amplitude of 50 mV, pulse width 0.5 s, scan rate of 10 mV.s⁻¹, and scan range from 1 to 0 V. All experiments were done at room temperature (21 ± 1 °C) in triplicate, and the main electrolyte used was 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0.

2.6 DPPH radical scavenging assay

The radical scavenging activity was done using the DPPH reagent, according to well-established procedures [24]. A mixture of 2.7 mL of DPPH ethanolic solution (0.1 mM) and 0.3 mL of ethanol was prepared as a blank control, where the final absorbance at 517 nm was a.c. 0.7. Ethanol was used to adjust the baseline (A = 0.00).

For the experiments, 300 µL of ethanolic portion was replaced by the extract and by the standards when the calibration curve was performed. The measurements were analyzed using UV-vis spectrometer (model V-530, Jasco, Inc., Easton, MD, USA). Each trial was performed in triplicate. The antioxidant activity was expressed as IC₅₀ as indicated in Equation 2, where 50% of the sample solution is capable of producing discoloration compared to the white control (ethanol) after five min of transferring the

sample aliquot to the DPPH radical. The samples were analyzed in a 1 cm optical path cuvette at room temperature.

$$\% \text{ AA} = [(ADPPH - A_{\text{test}}) / ADPPH] \times 100 \quad (2)$$

Where % AA is the percentage of antioxidant activity, ADPPH is the absorbance of the solution with the radical formed without the presence of a sample. A_{test} is the absorbance observed in the presence of the radical with the analyte, and IC₅₀ is the amount of extract in g/mL of the tested samples needed to decrease the initial ABTS concentration by 50%.

Linearity was observed in the calibration curves of gallic acid with the regression equation.

2.7 ABTS radical scavenging assay

The ABTS radical assay was conducted according to literature [20], formed from the reaction of 5.0 mL of ABTS solution in water (7 mM) with 88 μL of potassium persulfate solution in water (140 mM), incubated in the absence of light for 16 hours. Then, 2 mL of the prepared radical solution were diluted in ethanol to 150 mL, obtaining a solution with an absorbance a.c. 0.7 at a wavelength of 734 nm.

For the experiments, 300 μL of the ethanol extract was added to the test tube containing 2.7 mL of ABTS radical, thus the tubes were covered with Parafilm® and kept in the dark for 20 min. The absorbance was monitored with the same spectrophotometer used for DPPH assay. All tests were performed in triplicate. The decay percentage expressed by absorbance at 734 nm was calculated as Equation 3:

$$\% \text{ AA} = (A_{\text{ABTS}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{ABTS}} \times 100 \quad (3)$$

Where % AA is the percentage of antioxidant activity, A_{ABTS} is the absorbance of the solution with the radical formed without the presence of a sample. A_{test} is the absorbance observed in the presence of the radical with the analyte, and IC₅₀ is the amount of extract in g/mL of the tested samples needed to decrease the initial ABTS concentration by 50%.

Linearity was observed in the calibration curves of gallic acid with the regression equation.

2.8 Total phenolic assay

The total phenolic compounds were determined by Folin-Ciocalteu (FC) spectrophotometric method. Cinnamon samples at a concentration of 1% was prepared, aliquot of 50 μL of the extract was added in a test tube containing 1 mL of distilled water and 250 μL of the FC reagent. After 5 min, 750 μL of a 20% Na_2CO_3 solution and 2950 μL of distilled water were added. The mixture was incubated in the absence of light for 60 min, obtaining absorbance of *a.c.* 0.7 at a wavelength of 765 nm. The quantification of phenolic compounds in cinnamon samples was carried out in triplicate and expressed by means of gallic acid equivalents in μM , from a calibration curve obtained under the same conditions for sample analysis [28,29].

2.9 Mass spectrometry analysis

A metabolic assessment of cinnamon samples was performed by direct injection of untreated samples into a mass spectrometry system. The samples were dissolved in methanol at concentration of 500 ppm, filled into a 500 μL syringe (Hamilton) and infused directly using a syringe pump at a flow rate of 3 $\mu\text{L}/\text{min}$, and analyzed on an Q-Exactive Orbitrap (Thermo Scientific, Bremen, Germany) equipped with an Electrospray Ionization (ESI) source. The analyses were performed in negative (ESI (-)-MS) and positive (ESI (+)-MS) mode, and mass range of 100-1000 Da. The identification of the main metabolites detected in the cinnamon samples was performed using online dereplication platforms (MetFrag, PubChem and CFM-ID).

2.10 Studies in isolated arteries

Male Wistar rats (7-8 weeks old, 210–240 g) from the central bioterium of the Federal University of Goiás were used in this protocol. All experiments were carried out in agreement with the Brazilian Society of Laboratory Animal Science and were approved by the local Ethics in Research Committee (Protocol CEUA/UFG 116/19). The rats ($n=5-7$ for each different protocol) were anaesthetized, killed (cardiac puncture and exsanguinations) and the thoracic aorta was removed, cleaned and cut into rings ($\pm 3-4$ mm in length),

placed in an organ bath (10 mL) between two stainless-steel stirrups and connected to a computerized system and a WinDaq Resource (DATAQ Instruments, Akron, OH, USA) data acquisition unit to measure vascular isometric tension. The isolated vascular chamber was completed with physiological salt solution with the following composition: 130 mM NaCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 4.7 mM KCl, 14.9 mM NaHCO_3 , 1.2 mM MgSO_4 , 1.6 mM CaCl_2 and 5.5 mM glucose, at pH 7.4 and gassed with carbogenic gas (95% O_2 and 5% CO_2) at 37 °C.

The vascular rings were firstly stretched to a basal tone of 1.5 g before allowing them to equilibrate in the bathing solution. The endothelial cells integrity was demonstrated by the presence of relaxation (minimum 80% of relaxation) to acetylcholine (1 μM) after being precontracted with phenylephrine (0.1 μM). After equilibration, cumulative concentration–response curves for the cinnamon samples (0–380 $\mu\text{g/mL}$, lyophilized and diluted in distilled water) were generated using isolated aortic rings with functional endothelium that had been pre-contracted with phenylephrine (0.1 μM). For the vascular studies, only the cinnamon samples that showed the best and the worst antioxidant activity were used (sample 7 and 15, respectively). Furthermore, in order to verify the relative contribution of endothelium nitric oxide to the vascular relaxation induced by cinnamon samples, the same protocols were repeated after treatment (30 min) with nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME, 100 μM).

In other series of experiments, the vascular contraction induced by adrenergic agonist (phenylephrine, 0.1 μM) was investigated in controls vessels or after oxidative stress stimulus characterized by the addition of hypochlorite (OCl^-) in the bath solution at concentration of 5 μM (60 min) [6, 30]. After 60 min, arteries with intact endothelium were contracted again with phenylephrine (0.1 μM) and the level of contraction was measured. In addition, some arteries were treated with cinnamon samples (samples 7 and 15) in two different concentrations (100 and 500 $\mu\text{g/mL}$) at the same time as the oxidative stress stimulus with OCl^- (treatment with 5 μM OCl^- plus cinnamon samples for 60 min).

2.11 Statistical analysis

For the electrochemical and radical scavenging assays data analysis, the Origin 9.0 statistical software was used. A correlation matrix was performed for the antioxidant parameters evaluated, *i.e.* ABTS, DPPH, Folin Ciocalteu and EI. Anova analysis was performed for the unmodified and modified electrode assays with the null hypothesis of equal averages and 0.05 of significant value.

In the vascular studies, values were expressed as mean \pm SEM. Comparisons among groups were performed using one-way ANOVA (post-test: Newman–Keuls) with 0.05 of significant value. Analyses were carried out using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (San Diego, CA, USA).

3. Results and Discussion

3.1 Solvent extraction

Cinnamon is constituted by several components of different polarities [31], for this reason, water and ethanol were evaluated to investigate the effectiveness of cinnamon extraction using a pool of all samples. Extractions were analyzed through the EI ($\mu\text{A/V}$) of the cinnamon for each solvent (Table 1).

Table 1. Solvents for cinnamon extraction.

W/E	100:0 (v/v)	70:30 (v/v)	50:50 (v/v)	30:70 (v/v)	0:100 (v/v)
EI ($\mu\text{A/V}$)*	38.62 \pm 28.4	50.17 \pm 5.9	45.64 \pm 46.5	57.33 \pm 4.6	59.24 \pm 24.2

W: percentage of water / E: percentage of ethanol

*Mediam values \pm RSD

Samples with higher concentration of ethanol demonstrated better extraction than aqueous solution because ethanol can be considered a bipolar solvent that dissolves most slightly non-polar and polar organic compounds, that make up most of the molecules with antioxidant action [32].

Results obtained in this work corroborates with the literature that describes a better cinnamon extraction with a combination of both solvents than when used separately [33]. The solvents of water: ethanol in the proportions of 70:30 (v/v), 30:70 (v/v), and 0:100 (v/v) presented EI higher than 50 $\mu\text{A/V}$ without significant statistical differences. Therefore, the solvent water: ethanol 30:70 (v/v) was chosen for the further experiments.

3.1.1 Cinnamon characterization

In order to evaluate the redox profile of *Cinnamon* samples, electrochemical experiments were performed with a pool of all samples. The electrolytic support was studied from pH 3.0 to pH 9.0 (Figure 1). This is an important parameter to be evaluated, once it allows the electron flow for the passage of current in the reaction medium [34].

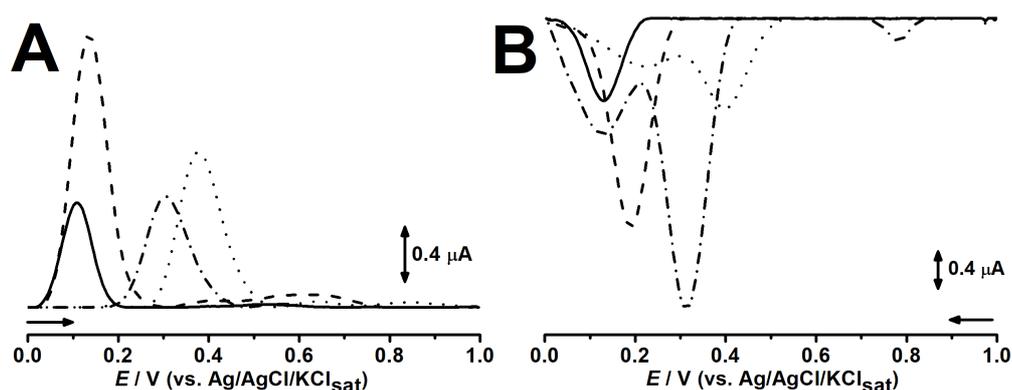


Figure 1. DP voltammograms of different pHs obtained for non-modified carbon paste electrode in 0.1 M phosphate buffer (A) and biosensor with 0.1 M sodium acetate buffer (B) for cinnamon. For pH 9.0 (—), pH 7.0 (---), pH 5.0 (- - -) and pH 3.0 (.....).

The non-modified carbon paste electrode presented a better resolution and sensitivity in the pH 7.0, in agreement with Souza-Sartori [35], which demonstrated that phenolic compounds are better solubilized in a pH range of extraction between 6.0 to 8.0. For the modified electrode with the laccase enzyme obtained from the fungus *Marasmiellus colocasiae*, the signal increased in the pH 5.0. According to literature, laccase enzyme is often used in pH conditions ranging from 3.5-5.5 [36,37]. Therefore, these electrolytic supports were used in the further analysis.

The figure 2 shows the voltammetry profiles of commercial cinnamon samples.

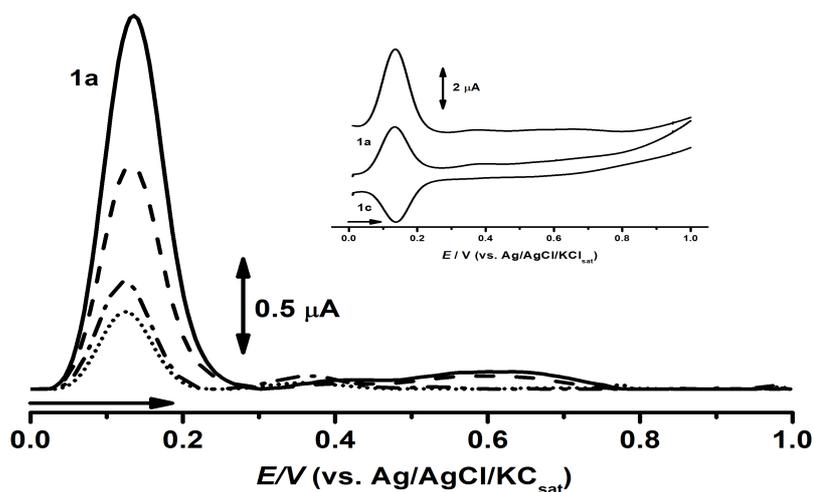


Figure 2. Differential pulse voltammetry (DPV), Inset: square wave voltammetry (SWV) of cinnamon commercial samples (0.01%). Samples A (—), B (---), C (- - -), second scans (.....).

Amongst the evaluated samples, a similar profile was observed, where an anodic peak *c.a.* $E_{pa1} = 0.1$ V was present. Anodic peaks in potentials *c.a.* $E_{pa1} = 0.2$ V or in lower values are indicative of polyphenol compounds [38]. Due to the low overpotential values seen in this compounds oxidation process it can be inferred that these compounds have high antioxidant capacity and the same can be said about the other samples [24].

The intensity of the peak varied in a decreasing order from sample A, B and C. These samples were chosen because they represent the highest, median and lowest results of EI, originated from Paraná (BRA), Goiás (BRA), and Lisboa (PRT), respectively. Since the intensity of the anodic peak is correlated with the concentration of the sample by the Cottrell equation [39], sample A likely has the highest amount of antioxidant compounds and sample C likely has the lowest amount.

The reversibility of the anodic peak *c.a.* $E_{pa1} = 0.1$ V was also observed for all samples analysis, corroborating the presence of polyphenol compounds in these samples. Moreover, samples A and B presented a second slight anodic peak *c.a.* $E_{pa2} = 0.6$ V and sample C in *c.a.* $E_{pa2} = 0.4$ V, these anodic peaks can be correlated to other phenolic compounds present in lesser quantities [20,40].

3.2 Antioxidant capacity

The variables of antioxidant capacity were compared and evaluated by the spectrophotometric methods ABTS, DPPH, and Folin-Ciocalteu with electrochemical

experiments through the EI values for all samples. A correlation matrix was calculated (Table 2).

Table 2. DPPH, ABTS, Folin AG and EI correlation matrix for cinnamon species.

	ABTS	DPPH	Folin AG	EI
ABTS	1	0.83	0.5	0.62
DPPH	0.83	1	0.62	0.7
Folin AG	0.5	0.62	1	0.73
EI	0.62	0.7	0.73	1

A high correlation coefficient of approximately 0.7 was seen between EI and DPPH/ABTS/Folin-Ciocalteu, which shows that despite the difference in methodologies, being the first electroanalytical and the latter scavenging, the inferences about the redox process of the antioxidant capacity are closely related. The EI correlation between modified and non-modified electrodes was 0.62. Moreover, the correlation coefficient between ABTS and DPPH was also high (*c.a.* 0.8).

The total phenol of cinnamon was expressed by gallic acid equivalents. Hence, a calibration curve with concentrations from 4.97 μM to 166.66 μM for gallic acid was constructed in order to get the linear equation $Y = 4.34e^{-7} + 1.20e^{-8}X$ (Intercept SD = $6.10e^{-23}$, Slope SD = $5.68e^{-25}$), obtaining $R^2 = 0.99$. The samples of cinnamon with greatest gallic acid quantity were samples 3 and 7, corresponding to 0.17 and 0.19 AG (g/g ext), respectively (Table 3).

Table 3. Percentage of decay for ABTS, DPPH, Folin, EI and Gallic acid equivalents for cinnamon species.

Sample	ABTS (% of SD decay)		DPPH (% of SD decay)		Folin (% of SD increase)		EI ($\mu\text{A/V}$)	SD	AG (g/g extract)	SD
1	96.73	4.84	67.20	3.36	0.24	0.07	7.77	0.39	0.09	0.04
2	69.86	3.49	62.61	3.13	0.35	0.05	6.13	0.31	0.07	0.00
3	80.64	4.03	65.42	3.27	0.70	0.09	11.86	0.59	0.17	0.07

4	94.06	4.70	74.30	3.71	0.51	0.05	6.07	0.30	0.06	0.02
5	88.75	4.44	70.55	3.53	0.32	0.08	7.37	0.37	0.08	0.07
6	90.52	4.53	73.85	3.69	0.77	0.12	7.37	0.37	0.08	0.00
7	97.55	4.88	79.03	3.95	0.87	0.03	12.84	0.64	0.19	0.05
8	95.05	4.75	83.29	4.16	0.94	0.06	8.81	0.44	0.11	0.00
9	97.02	4.85	77.86	3.89	0.55	0.04	9.14	0.46	0.12	0.04
10	75.92	3.80	60.91	3.05	0.59	0.04	6.20	0.31	0.06	0.05
11	96.42	4.82	71.63	3.58	0.89	0.06	9.47	0.47	0.12	0.06
12	47.33	2.37	41.78	2.09	0.37	0.02	4.73	0.24	0.03	0.00
13	92.71	4.64	81.89	4.09	0.48	0.07	8.38	0.42	0.10	0.01
14	68.67	3.43	51.11	2.56	0.06	0.00	3.39	0.17	0.02	0.00
15	72.39	3.62	41.69	2.08	0.34	0.06	4.93	0.25	0.03	0.02
16	82.32	4.12	51.58	2.58	0.59	0.00	4.98	0.25	0.03	0.02
17	87.13	4.36	59.10	2.95	0.65	0.06	6.68	0.33	0.07	0.02

According to the Folin-Ciocalteu method, total phenols are more present in the cinnamon samples 7 and 8, which corroborates with the electrochemical studies that also showed a higher EI for the sample 7. Likewise, the results obtained for both methodologies also showed agreement for the sample with the lowest antioxidant capacity, represented by the cinnamon sample 14.

3.3 Biosensor

The table 4 shows results obtained from the carbon paste electrode modification using the laccase enzyme of the fungus *Marasmiellus colocasiae*.

Table 4. Antioxidant capacity of cinnamon samples using carbon paste modified electrode.

Sample	Unmodified electrodes (μA)	SD	Modified electrodes (μA)	SD	Signal increase (Modified Signal/Unmodified Signal)	Signal increase (%)
1	-0.47	0.34	-1.02	0.34	2.17	216.56
2	-0.67	0.56	-1.85	0.14	2.78	277.78
3	-1.01	0.72	-2.07	0.14	2.05	204.95
4	-0.93	0.62	-1.57	0.31	1.69	169.00
5	-0.68	1.08	-1.67	0.36	2.47	247.04
6	-1.23	0.01	-1.43	0.01	1.16	116.26
7	-0.72	0.848	-1.39	0.21	1.93	192.79
8	-0.57	0.52	-0.91	0.13	1.61	160.85
9	-0.47	0.41	-0.91	0.21	1.91	190.93
10	-0.50	0.66	-1.08	0.17	2.16	216.43
11	-0.75	0.19	-1.08	0.19	1.44	144.19
12	-0.68	0.60	-1.51	0.12	2.21	221.08
13	-0.66	0.55	-1.29	0.28	1.97	196.95
14	-0.70	0.45	-1.33	0.23	1.91	191.37
15	-0.61	0.26	-1.19	0.09	1.95	194.76
16	-0.38	2.19	-1.55	0.44	4.12	412.23
17	-1.13	4.96	-2.42	1.24	2.14	214.16

ANOVA test probability $p = 6.12 \times 10^{-6}$ and F value = 38.41 shows that modified and unmodified values were statistically different.

The enzymatic biosensor of *Marasmiellus colocasiae* produces biochemical oxidation followed by an electrochemical reduction detected amperometrically that allows the detection of polyphenols. Thus, the modified electrode showed improvement in all samples, with a signal increase of up to 4 times, due to the laccase's ability to oxidize the phenolic compounds present in the cinnamon [41,42].

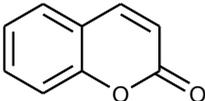
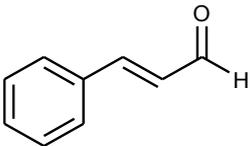
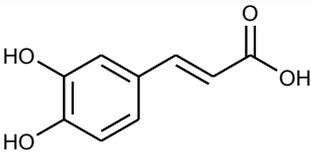
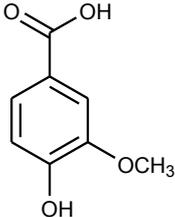
Corroborating the spectrophotometric data of the Folin-Ciocalteu assay with the *Marasmiellus colocasiae* biosensor, the biosensor presented better results in 7 and 8, confirming the previous results in the other electrochemical and spectrophotometric

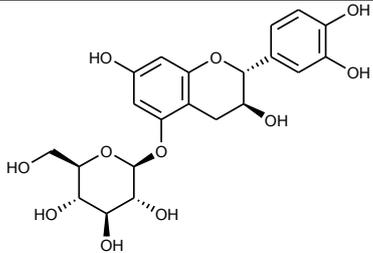
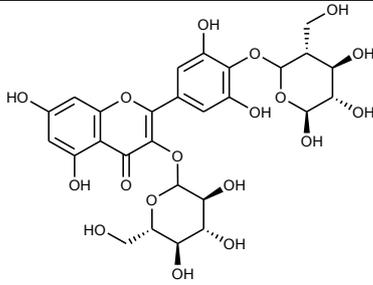
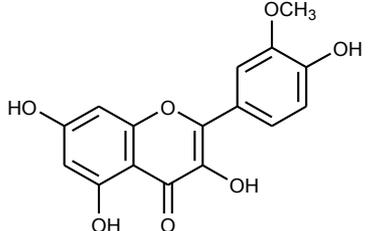
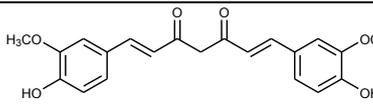
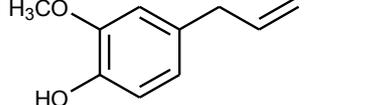
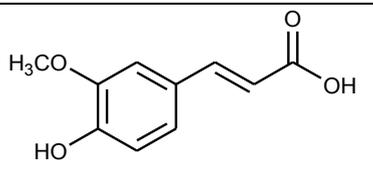
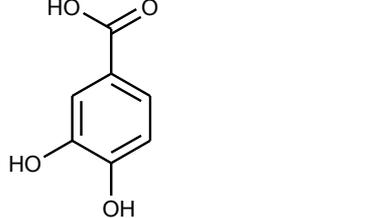
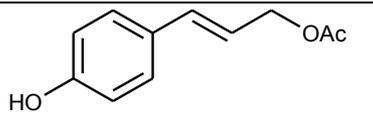
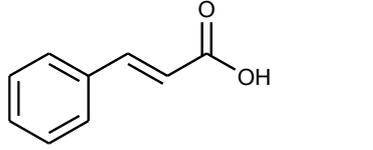
methods, through the amplification of the signal promoted by the enzyme, used as an auxiliary electrochemical tool in the detection of phenolic compounds present in cinnamon [27].

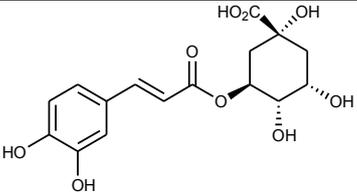
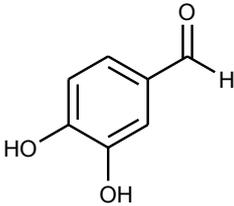
3.4 Mass spectrometry analyses

The purpose of this study was to annotate compounds that contribute to antioxidant potential from cinnamon samples based on their mass to charge ratios (m/z) and elemental composition obtained through Orbitrap mass analyzer, as well as chemotaxonomy data reported in literature. Hence, cinnamon samples were analyzed by High-resolution mass spectrometry (HRMS) in order to identify the main chemical markers and associate with their antioxidant activity. A wide range of phenolic compounds such as flavonoids, coumarin, phenolic acids and cinnamic acid derivatives were annotated by MS analyses, which have recognized antioxidant activity [43]. Fifteen antioxidant compounds reported in cinnamon were annotated in the current study, conforming Table 5.

Table 5. Metabolites present in cinnamon samples (*Cinnamomum*) with antioxidant property.

Ion mode	m/z	Empirical formula	Compound name	Chemical structure	Reference
ESI(+) MS	147.04	C ₉ H ₆ O ₂	Coumarin		[44,45]
ESI(+) MS	133.06	C ₉ H ₈ O	Cinnamaldehyde		[46,47]
ESI(+) MS	181.07	C ₉ H ₈ O ₄	Caffeic acid		[48]
ESI(+) MS	169.05	C ₈ H ₈ O ₄	Vanillic acid		[49]

ESI(+) MS	453.17	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	Catechin 3'- glucoside		[50]
ESI(+) MS	645.16	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₈	Myricetin derivative		[51]
ESI(+) MS	317.21	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	Isorhamnetin		[50,52]
ESI(+) MS	369.24	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	Curcumin		[53]
ESI(-) MS	165.06	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	Eugenol		[44,54,55]
ESI(-) MS	195.05	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	Ferulic acid		[56,57]
ESI(+) MS	153.02	C ₇ H ₆ O ₄	Protocatechuic acid		[56]
ESI(-) MS	191.06	C ₁₁ H ₁₂ O ₃	Coumaryl acetate		[58]
ESI(-) MS	147.04	C ₉ H ₈ O ₂	Cinnamic acid		[59]

ESI(-)MS	353.09	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Chlorogenic acid		[60]
ESI(-)MS	137.02	C ₇ H ₆ O ₃	3,4-Dihydroxybenzaldehyde		[60]

The major peak in terms of % area peak from the cinnamon samples belonged to Coumarin at m/z 147.04. The applied spectrometric study allowed inferring the substances responsible for antioxidant potential from cinnamon samples. Therefore, Mass spectrometry is a rapid and sensitive technique that can be applied to identification of bioactive compounds in cinnamon samples.

In figure 3, it is possible to identify the chemical markers from the cinnamon samples, which are the compounds: Coumarin of m/z 147.04 [M+H] identified in high intensity and the Cinnamaldehyde of m/z 133.06 [M+H], identified in low intensity [31]. The antioxidant compounds belonging to phenolic acids class (m/z 353.27) were detected in high concentration in the samples. Furthermore, it is possible to observe differences in ion intensity between samples 7 and 15 analyzed at the same concentration, which implies the variation of their metabolic content and antioxidant potential.

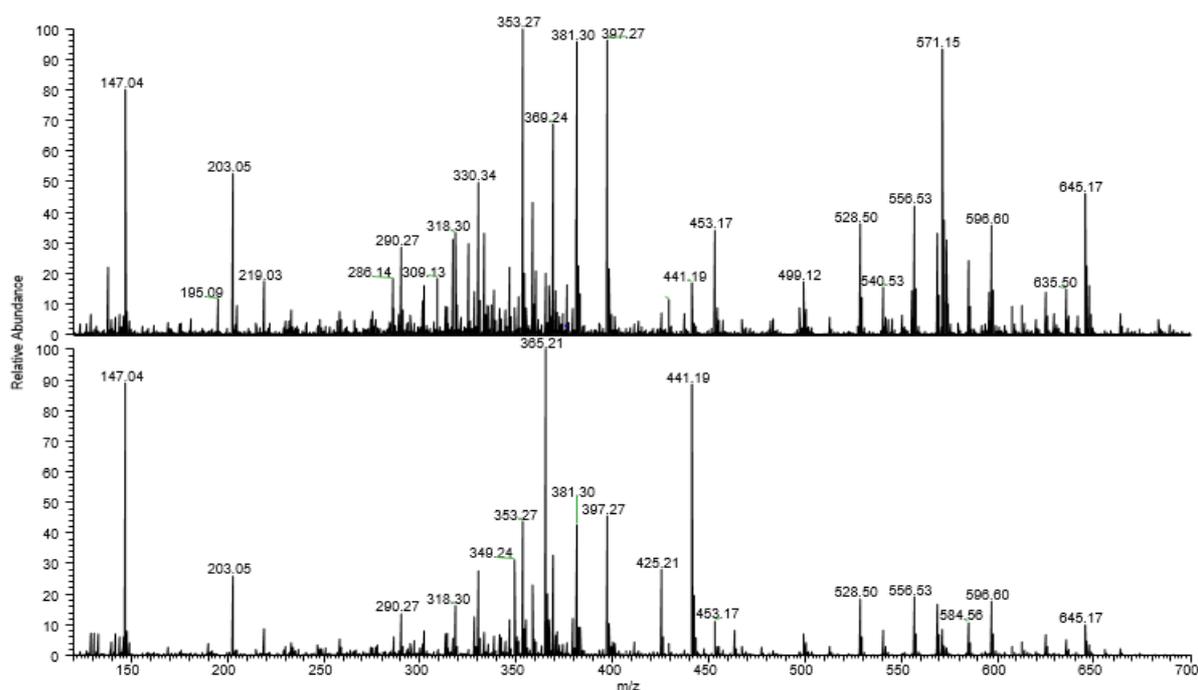


Figure 3. Mass spectrum (ESI(+)-MS) from cinnamon samples 15 (a) and 7 (b).

3.5 Study of vascular reactivity

Many studies indicate that antioxidant-rich foods intake (mainly red wines, teas, seasoning, fruits and vegetables) is linked with a protective action on the cardiovascular system in humans and animals [61,62]. They produce, among several effects, vascular dilation in animals or patients, which could help control blood pressure levels [63,64]. The present data showed that the both cinnamon sample tested induce a significant vasodilatory effect on isolated arteries at a very low concentration.

As shown in figure 4, the cinnamon samples 7 and 15 added cumulatively (0–380 µg/mL) to the bath solution on the endothelium-intact arteries pre-contracted with phenylephrine induced concentration-dependent vasodilation. The maximum effect for sample 7 (cin7) and sample 15 (cin15) was 95.8 ± 7.1 % (n=6) and 92.1 ± 6.4 % (n=6), respectively. This finding shows that endothelial nitric oxide production is the most important mediator to induce vascular dilation, since L-NAME (nitric oxide synthase inhibitor) almost abolished the vasorelaxant effect of both samples (8.2 ± 4.6 %; n=5 and 5.6 ± 3.8 %; n=5, respectively).

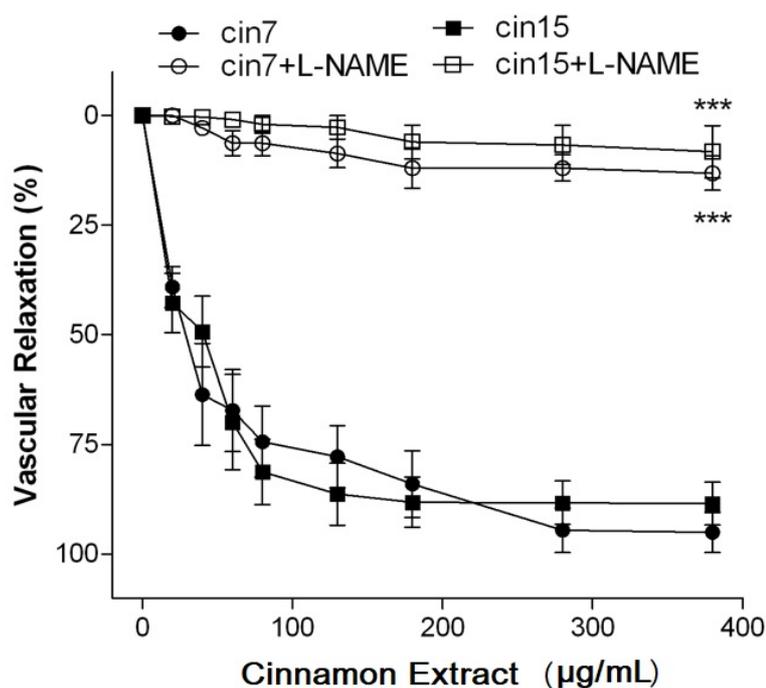


Figure 4. Vasodilatory effects of cinnamon samples 7 and 15 (cin7 and cin15) in endothelium-intact rat aortas pre-contracted with phenylephrine (0.1 µM) in the absence or presence (30min) of the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME (100 µM). The data points represent the mean \pm SEM (n=5-6) of the relaxing effect expressed as a percentage. Significant difference ***P<0.001.

The reactive chlorine species are well known by their high injuriousness in the cardiovascular system, leading to endothelial cells dysfunction, chronic and local inflammation and impairment of endothelium-dependent vasorelaxation [6,65]. In various pathological disorders of the cardiovascular system that generate an active inflammation (e.g., diabetes, hypertension, infarction, atherosclerosis, etc.), the reactive chlorine species (OCl^-) can range high concentrations, reaching micromolar levels in the tissues affected and local circulation [30].

In terms of vascular contraction, the treatment with OCl^- increased the contractile effect induced by adrenergic stimulation from 1.13 ± 0.12 g (n=7) to 2.07 ± 0.13 g (n=5). The concomitant treatment with cinnamon sample 7 and 15 at low concentration (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) reduced the vascular contraction induced by phenylephrine to 0.90 ± 0.12 g (n=6) and 1.51 ± 0.13 g (n=6), respectively. However, the effect of sample 7 was more significant than sample 15, and it presented the level of contraction significantly smaller as compared to sample 15 (Figure 5A). At the highest concentration (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) the two cinnamon samples inhibited the action of OCl^- with similar efficacy (Figure 5B).

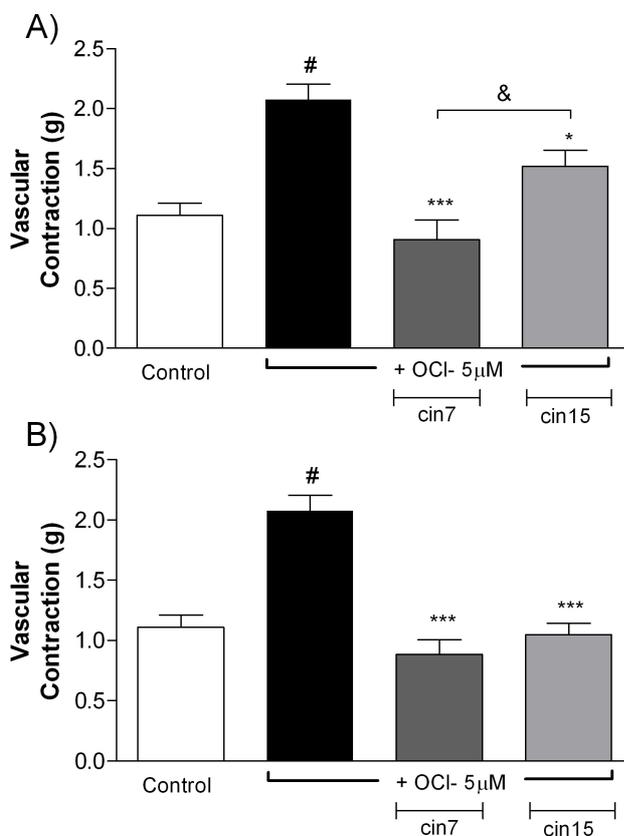


Figure 5. Vascular contraction induced by phenylephrine (0.1 μM) in endothelium-intact rat aortas exposed or not to hypochlorite (5 μM OCl^- , 60 min). Some arteries were treated with

cinnamon samples (cin7 and cin15) concomitantly to oxidative stimulus with OCl^- at different concentrations (A) 100 $\mu\text{g/mL}$ and (B) 500 $\mu\text{g/mL}$. Vertical bars represent the mean \pm SEM values of the maximum contractile effect (n=5-7 for all protocols). Significant difference #p<0.001 compared to control. ***p<0.001; *p<0.05 compared to OCl^- treatment. &p<0.05 between groups cin7 and cin15.

4. Conclusions

This article evaluates the antioxidant capacity and activity of cinnamon, an important product worldwide consumed. This topic is very relevant, since the damage caused by free radicals is increasingly present in our population and can be reduced in our body by the ingestion of natural products rich in antioxidant compounds.

Cinnamon, although much studied for its antimicrobial property, is still little studied as a vasorelaxant. In addition, the electrochemical assays that generate the electrochemical index, as well as the use of a laccase-based biosensor from the fungus *Marasmiellus colocasiae* are unprecedented and therefore represent a great innovation in the present work.

The antioxidant capacity of cinnamon samples was investigated through spectrophotometric and voltammetric methodologies. A high correlation coefficient of approximately 0.7 was found between EI and DPPH, ABTS, and Folin-Ciocalteu, which demonstrates a close relationship of the redox process of the antioxidant capacity in all methodologies. Electrochemical experiments evidenced high antioxidant quality of cinnamon due to the low oxidative potentials. Moreover, these results were significantly improved in a biosensor with the carbon paste modified electrode using the laccase enzyme. Thus, these methodologies are efficient to study antioxidant capacity of natural products and emphasized the importance of cinnamon in a diet. The sample with the most potent antioxidant activity (7) and the least potent one (15) had similar vasodilatory activities, and both induce the nitric oxide production by endothelial cells. Furthermore, both samples tested reduced the oxidative injury evoked by OCl^- , but the sample 7 seems to be more efficient at low concentration.

Author's declaration of contribution

Emily K. G. Moreno: Conceptualization, Supervision, Methodology, Software, Validation, Design, Formal analysis and Writing - Original Draft and Writing - Review & Editing. Isaac Y. L. de Macêdo: Methodology, Software, Validation, Design and Writing - Review & Editing. Erica A. Batista: Methodology and Writing - Review & Editing. Fabio B. Machado: Methodology and Writing - Review & Editing. Gabrielle R. Santos: Methodology. Daniela M. L. Andrade: Methodology and Writing - Review & Editing. Matheus L. Rocha: Conceptualization and Writing - Review & Editing. Nerilson M. Lima: Methodology and Writing - Review & Editing. Boniek G. Vaz: Methodology and Writing - Review & Editing. Eric S. Gil: Funding, Conceptualization, Writing - Review & Editing, Supervision and Project administration.

Conflicts of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Funding Statement

The authors wish to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal (CAPES) for their financial support and scholarships.

References

- [1] A. Pauletti, G. Terrone, T. Shekh-Ahmad et al., “Targeting oxidative stress improves disease outcomes in a rat model of acquired epilepsy,” *Brain*, vol. 142, no 7, pp. e39, 2019.
- [2] G. H. Kim, J. E. Kim, S. J. Rhie and S. Yoon. “The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases,” *Experimental Neurobiology*, vol. 24, no 4, pp. 325, 2015.
- [3] T. Münzel, T. G. G. Camici, C. Maack et al. “Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature: Part 2 of a 3-Part Series,” *J Am Coll Cardiol*, vol. 70, no. 2, pp. 212-229, 2017.

- [4] J. Tejero, S. Shiva and M. T. Gladwin. “Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation,” *Physiol Rev*, vol. 99, no. 1, pp. 311-379, 2019.
- [5] H. Li H, Z. Cao, G. Zhang, V. J. Thannickal and G. V. Cheng. “Vascular peroxidase 1 catalyzes the formation of hypohalous acids: characterization of its substrate specificity and enzymatic properties,” *Free Rad Biol Med*, vol. 53, no. 10, pp. 1954-1959, 2012.
- [6] T. Radovits, R. Arif, T. Bömicke et al. “Vascular dysfunction induced by hypochlorite is improved by the selective phosphodiesterase-5-inhibitor vardenafil,” *Eur J Pharmacol*, vol. 710, no. 1-3, pp. 110-119, 2013.
- [7] T. Bacchetti, I. Turco, A. Urbano, C. Morresi and G. Ferretti. “Fruit and vegetable intake and its relationship to dietary antioxidant capacity and markers of oxidative stress. A gender-related study,” *Nutrition*, NUT 10379, 2018.
- [8] E. Kolarzyk, A. Pietrzycka, J. Zając and J. Morawiecka-Baranek. “Relationship between dietary antioxidant index (DAI) and antioxidants level in plasma of Kraków inhabitants,” *Adv Clin Exp Med*, vol. 26, no. 3, pp. 393-399, 2017.
- [9] R. Vari, B. Scazzocchio and S. Del Papa S. 2017. “Dietary habits and gender differences,” *Italian J Gender Medicine*, vol. 3, no. 2, pp. 55-58, 2017.
- [10] Y. H. Wang, B. Avula, N. P. D. Nanayakkara, J. Zhao and I. A. Khan. “Cassia Cinnamon as a Source of Coumarin in Cinnamon-Flavored Food and Food Supplements in the United States,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 61, no. 18, pp. 4470-4476, 2013.
- [11] S. F. Zaidi, M. Aziz, J. S. Muhammad and M. Kadowaki. “Diverse pharmacological properties of Cinnamomum cassia: a review,” *Pak J Pharm Sci*, vol. 28, no. 4, pp. 1433-1438, 2015.
- [12] N. G. Vasconcelos, J. Croda and S. Simionatto. “Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review,” *Microbial Pathogenesis*, vol.120, pp. 198-203, 2018.
- [13] A. Hadi, M. S. Campbell, B. Hassani et al. “The effect of cinnamon supplementation on blood pressure in adults: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials,” *Clinical Nutrition ESPEN*, vol. 36, pp. 10-16, 2020.
- [14] E. E. Dravie, N. K .Kortei,E. K Essuman et al. “Antioxidant, phytochemical and physicochemical properties of sesame seed (*Sesamum indicum* L),” *Scientific African*, vol. 8, pp. e00349, 2020.
- [15] M. D. Ghoora, A. C. Haldipur and N. Srividya. “Comparative evaluation of phytochemical content, antioxidant capacities and overall antioxidant potential of select culinary microgreens,” *Journal of Agriculture and Food Research*, vol. 2, pp. 100046, 2020.

- [16] A. Marsoul, M. Ijjaali, I. Oumous, B. Bennani and A. Boukir. "Determination of polyphenol contents in *Papaver rhoeas* L. flowers extracts (soxhlet, maceration), antioxidant and antibacterial evaluation," *Materials Today: Proceedings*, vol. 31, supplement 1, pp. S183-S189, 2020.
- [17] S. M. Abdel Azeem, I. A. Al Mohesen and I. A. M. H. Ibrahim. "Analysis of Total Phenolic Compounds in Tea and Fruits Using Diazotized Aminobenzenes Colorimetric Spots," *Food Chemistry*, FOCH 127392, 2020.
- [18] J. Xie and K. M. "Re-evaluation of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 62, pp. 4251-4260, 2014.
- [19] K. M. Schaich, X. Tian and J. Xie, J. "Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays," *Journal of Functional Foods*, vol. 14, pp. 111-125, 2015.
- [20] K. C. de S. Leite, L. F. Garcia, G. S. Lobón et al. "Antioxidant activity evaluation of dried herbal extracts: an electroanalytical approach," *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 28, no. 3, pp. 325-332, 2018.
- [21] M. David, A. Serban, C. Radulescu, A. F. Danet and M. Florescu. "Bioelectrochemical evaluation of plant extracts and gold nanozyme-based sensors for total antioxidant capacity determination," *Bioelectrochemistry*, vol. 129, pp. 124-134, 2019.
- [22] I. Tomac, M. Šeruga and J. Labuda. "Evaluation of antioxidant activity of chlorogenic acids and coffee extracts by an electrochemical DNA-based biosensor," *Food Chemistry*, vol. 325, 126787, 2020.
- [23] L. Čižmek and S. Komorsky-Lovrić. "Electrochemistry as a screening method in determination of carotenoids in crustacean samples used in everyday diet," *Food Chemistry*, 125706, 2019.
- [24] I. Y. L. Macêdo, L. F. Garcia, J. R. Oliveira Neto et al. "Electroanalytical tools for antioxidant evaluation of red fruits dry extracts," *Food Chemistry*, vol. 217, pp. 326-331, 2017.
- [25] L. Liu, S. Anwar, H. Ding et al. "Electrochemical sensor based on F,N-doped carbon dots decorated laccase for detection of catechol," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 840, pp. 84-92, 2019.
- [26] L. G. Mohtara, P. Arandab, G. A. Messinab et al. "Amperometric biosensor based on laccase immobilized onto a nanostructured screen-printed electrode for determination of polyphenols in propolis," *Microchem. J.*, vol. 144, pp. 13-18, 2019.
- [27] É. A. Batista, G. N. M. Silva, L. F. Sgobbi et al. "Enzymatic Electroanalytical Biosensor Based on *Maramiellus colocasiae* Fungus for Detection of Phytomarkers in Infusions and Green Tea Kombucha," *Biosensors*, vol. 11, no. 3, pp. 91, 2021.

- [28] J. R. Oliveira-Neto, S. G. Rezende, G. S. Lobón et al. “Electroanalysis and laccase-based biosensor on the determination of phenolic content and antioxidant power of honey samples,” *Food Chemistry*, vol. 237, pp.1118-1123, 2017.
- [29] A. O. Olgun, D. Ozyurt, K. I. Berker, B. Demirata and R. Apak. “Folin-Ciocalteu spectrophotometric assay of ascorbic acid in pharmaceutical tablets and orange juice with pH adjustment and pre-extraction of lanthanum(III)-flavonoid complexes,” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 94, pp. 2401-2408, 2014.
- [30] C. Zhang, R. Patel, J. P. Eiserich et al. “Endothelial dysfunction is induced by proinflammatory oxidant hypochlorous acid,” *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 281, no. 4, pp. H1469-H1475, 2001.
- [31] Y. Liang, Y. Li, A. Sun and X. Liu. “Chemical compound identification and antibacterial activity evaluation of cinnamon extracts obtained by subcritical n- butane and ethanol extraction,” *Food Sci Nutr*, vol. 7, pp. 2186-2193, 2019.
- [32] C. R. Martins, W. A. Lopes and J. B. de Andrade. “Solubilidade das substâncias orgânicas,” *Quím. Nova*, vol. 36, no. 8, pp. 1248-1255, 2013.
- [33] M. Przygodzka, D. Zielińska, Z. Ciesarová, K. Kukurová and H. Zieliński. “Comparison of methods for evaluation of the antioxidant capacity and phenolic compounds in common spices” . *LWT - Food Science and Technology*, vol. 58, no. 2, pp. 321-326, 2014.
- [34] S. Ahmadpour, J. Tashkhourian and B. Hemmateenejad. “A chemometric investigation on the influence of the nature and concentration of supporting electrolyte on charging currents in electrochemistry,” *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 871, 114296, 2020.
- [35] J. A. de. Souza-Sartori, C. Scalise, A. S. Baptista, R. B. Lima, C. L. de. Aguiar. “Parameters of influence on extraction of phenolic compounds from sugarcane tops with total antioxidant activity” . *Bioscience Journal*, Vol. 29, no. 2, pp. 297-307, 2013.
- [36] J. Yang, Q. Lin, T. B. Ng, X. Ye and J. Lin. “Purification and characterization of a novel laccase from *Cerrena* sp. HYB07 with dye decolorizing ability,” *PLoS ONE*, vol. 9, no. 10, pp. 1- 13, 2014.
- [37] F. Zheng, Q. An, G. Meng, X. J. Wu, Y. C. Dai and J. Si. “A novel laccase from white rot fungus *Trametes orientalis*: Purification, characterization, and application,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 102, pp. 758-770, 2017.
- [38] M. J. Rebelo, R. Rego, M. Ferreira and M. C. Oliveira. “Comparative study of the antioxidant capacity and polyphenol content of Douro wines by chemical and electrochemical methods” . *Food Chemistry*, vol. 141, pp. 566-573, 2013.
- [39] J. C. Myland and K. B. Oldham. “Cottrell’ s equation revisited: an intuitive, but unreliable, novel approach to the tracking of electrochemical diffusion,” *Electrochemistry Communications*, vol. 6, no. 4, pp. 344-350, 2014.

- [40] S. N. Robledo, G. D. Pierini, C. H. D. Nieto, H. Fernández and M. A. Zon. “Development of an electrochemical method to determine phenolic monoterpenes in essential oils,” *Talanta*, vol. 196, pp. 362-369, 2019.
- [41] M. M. Rodríguez-Delgado, G. S. Alemán-Nava, J. M. Rodríguez-Delgado et al. “Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds,” *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 74, pp. 21-45, 2015.
- [42] A. M. Othman and U. Wollenberger. “Amperometric biosensor based on coupling aminated laccase to functionalized carbon nanotubes for phenolics detection,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 153, pp. 855-864, 2020.
- [43] M. Z. Shahid, H. Saima, A. Yasmin et al. “Antioxidant capacity of cinnamon extract for palm oil stability,” *Lipids in health and disease*, vol. 17, no. 1, pp. 1-8, 2018.
- [44] P. Azimi, R. Ghiasvand, A. Feizi, M. Hariri and B. Abbasi. “Effects of cinnamon, cardamom, saffron, and ginger consumption on markers of glycemic control, lipid profile, oxidative stress, and inflammation in type 2 diabetes patients,” *The Review of Diabetic Studies: RDS*, vol. 11, no. 3, pp. 258, 2014.
- [45] M. Goyal, H. Kaur, M. Bhandari et al. “Antioxidant and immune effects of water soluble polysaccharides isolated from *Cinnamomum verum* bark,” *Bio Nano Science*, vol. 8, no. 3, pp. 935-940, 2018.
- [46] L. Malsawmtluangi, B. P. Nautiyal, T. Hazarika, R. S. Chauhan and A. Tava. “Essential oil composition of bark and leaves of *Cinnamomum verum* Bertch. & Presl from Mizoram, North East India” . *Journal of Essential oil research*, vol. 28, no. 6, pp. 551-556, 2016.
- [47] Y. Q. Li, D. X. Kong and H. Wu. “Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon barks using GC-MS and FTIR spectroscopy,” *Industrial Crops and Products*, vol. 41, pp. 269-278, 2013.
- [48] E. Dvorackova, M. Snoblova, L. Chromcova, P. Hrdlicka. “Effects of extraction methods on the phenolic compounds contents and antioxidant capacities of cinnamon extracts,” *Food science and biotechnology*, vol. 24, no. 4, pp. 1201-1207, 2015.
- [49] B. Klejdus and J. Kováčik. “Quantification of phenols in cinnamon: A special focus on “total phenols” and phenolic acids including DESI-Orbitrap MS detection,” *Industrial Crops and Products*, vol. 83, pp. 774-780, 2016.
- [50] C. H. Yang, R. X. Li and L. Y. Chuang. “Antioxidant activity of various parts of *Cinnamomum cassia* extracted with different extraction methods,” *Molecules*, vol. 17, no. 6, pp. 7294-304, 2012.
- [51] V. Sharma and L. J. M. Rao. “An overview on chemical composition, bioactivity and processing of leaves of *Cinnamomum tamala*,” *Critical reviews in food science and nutrition*, vol. 54, no. 4, pp. 433-448, 2014.

- [52] H. B. Li, C. C. Wong, K. W. Cheng and F. Chen. "Antioxidant properties *in vitro* and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 41, no. 3, pp. 385-390, 2008.
- [53] G. S. El-Baroty, H. H. Abd El-Baky, R. S. Farag and M. A. Saleh. "Characterization of antioxidant and antimicrobial compounds of cinnamon and ginger essential oils," *African journal of biochemistry research*, vol. 4, no. 6, pp. 167-174, 2010.
- [54] A. Chakraborty, V. Sankaran, M. Ramar and D. R. Chellappan. "Chemical analysis of leaf essential oil of *Cinnamomum verum* from Palni hills, Tamil Nadu," *Journal of Chemical and Pharmaceutical Science*, vol. 8, no. 3, pp. 476-479, 2015.
- [55] U. K. Sharma, A. K. Sharma and A. K. Pandey. "Medicinal attributes of major phenylpropanoids present in cinnamon," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 16, no. 1, pp. 1-11, 2016.
- [56] S. F. Nabavi, A. Di Lorenzo, M. Izadi et al. "Antibacterial effects of cinnamon: From farm to food, cosmetic and pharmaceutical industries," *Nutrients*, vol. 7, no. 9, pp. 7729-7748, 2015.
- [57] I. Gulcin, R. Kaya, A. C. Goren et al. "Anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts: Polyphenol contents analysis by LC-MS/MS," *International Journal of Food Properties*, vol. 22, no. 1, pp. 1511-1526, 2019.
- [58] C. Y. Lin, T. F. Yeh, S. S. Cheng and S. T. Chang. "Complementary relationship between trans-cinnamaldehyde and trans-cinnamyl acetate and their seasonal variations in *Cinnamomum osmophloeum* ct. cinnamaldehyde," *Industrial Crops and Products*, vol. 127, pp. 172-178, 2019.
- [59] F. Song, H. Li, J. Sun and S. Wang. "Protective effects of cinnamic acid and cinnamic aldehyde on isoproterenol-induced acute myocardial ischemia in rats," *J Ethnopharmacol*, vol. 150, no. 1, pp. 125-30, 2013.
- [60] D. R. A. Muhammad and K. Dewettinck. "Cinnamon and its derivatives as potential ingredient in functional food—A review," *International journal of food properties*, vol. 20, no. 2, pp. 2237-2263, 2017.
- [61] H. Li and U. Förstermann. "Red wine and cardiovascular health," *Circulation Research*, vol. 111, pp. 959-961, 2012.
- [62] C. G. Souza, D. M. L. Andrade, J. B. R. Jordão et al. "Radical Scavenger Capacity of Jaboticaba Fruit (*Myrciaria cauliflora*) and Its Biological Effects in Hypertensive Rats," *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2017, Article ID 2383157, 2017.
- [63] E. Porteri, D. Rizzoni, C. De Ciuceis et al. "Vasodilator effects of red wines in subcutaneous small resistance artery of patients with essential hypertension," *American Journal of Hypertension*, vol. 23, no. 4, pp. 373-378, 2010.

[64] D. L. M. Andrade, C. F. Reis, P. F. S. Castro et al. “Vasorelaxant and Hypotensive Effects of Jaboticaba Fruit (*Myrciaria cauliflora*) Extract in Rats,” *Evid Based Complement Alternat Med*, vol. 2015. Article ID 696135, 2015.

[65] M. J. Davies, C. L. Hawkins. “The role of myeloperoxidase in biomolecule modification, chronic inflammation, and disease,” *Antioxid Redox Signal* vol. 32, pp. 957-981, 2020.

5.1 Conclusão

A capacidade antioxidante de amostras comerciais de canela foi avaliada por diferentes abordagens metodológicas, utilizando solução hidroetanólica (A:E) 30:70 e solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, que apresentaram melhor extração dos grupos fenólicos. Foram empregados métodos clássicos espectrofotométricos como ABTS, DPPH e *Folin-Ciocalteu* e o método alternativo de eletroquímica, utilizando voltametrias de CV, DPV e SWV.

Foram observados picos anódicos c.a. $E_{pa}=0,1$ V em todas as amostras, indicativo de compostos polifenólicos com alta capacidade antioxidante e as amostras também apresentaram perfis reversíveis de oxidação. Os resultados foram significativamente melhorados com a aplicação de biosensor, utilizando eletrodo modificado de pasta de carbono com a enzima lacase, obtida do fungo *Marasmiellus colocasiae* em tampão de acetato de sódio 0,1 M pH 5,0.

Os resultados espectrofotométricos obtidos por ensaios de ABTS, DPPH, *Folin-Ciocalteu* e o índice eletroquímico calculado apresentaram correlação estatística de 0,63, 0,7 e 0,73, respectivamente, sendo 1 uma correlação ideal e os métodos espectrofotométricos apresentaram correlação de 0,83, evidenciando que os testes foram eficientes para avaliar a capacidade antioxidante das amostras de canela.

Os estudos espectrofotométricos e voltamétricos indicaram a amostra 7 para maior capacidade antioxidante e a amostra 15 como amostra menos potente, indicando que ocorre variação expressiva dos produtos comerciais, o que ressalta a importância do controle de qualidade de drogas vegetais. Além disso, é importante destacar que a sazonalidade, ritmo circadiano e características específicas do desenvolvimento das plantas interferem na produção de seus metabólitos secundários.

A partir destes resultados, foram realizados testes farmacológicos para avaliação da atividade vasorrelaxante das amostras com melhor e pior potencial antioxidante. As amostras de canela analisadas apresentaram atividades vasodilatadoras semelhantes, e ambas induziram a produção de NO pelas células endoteliais e reduziram a lesão oxidativa provocada pelo OCI^- , mas a amostra 7 mostrou-se mais eficiente em baixa concentração.

Uma ampla variedade de compostos bioativos foram verificados nas amostras de canela analisadas por espectrometria de massas, sendo a cumarina e o cinamaldeído os compostos majoritários, mas também foram encontrados flavonoides, ácidos cinâmicos e ácidos fenólicos, totalizando 15 marcadores químicos com conhecida propriedade antioxidante. Além disso, houve variação das intensidades destes compostos entre as amostras 7 e 15, o que enfatiza mais uma vez a necessidade de escolher produtos naturais seguros e de boa qualidade.

Desta forma, a canela apresentou alta capacidade e atividade antioxidante, corroborando os resultados obtidos em outros estudos. As metodologias utilizadas apresentaram boa correlação, o que indica que os processos redox foram avaliados de forma semelhante pelas diferentes abordagens, e portanto, são eficientes para estudar as propriedades antioxidantes de produtos naturais e evidenciam a importância da canela como alimento funcional.

5.2 Perspectivas

Aplicar a metodologia utilizada no presente trabalho, análise espectrofotométrica com ensaios de sequestro radicalar, voltamétrica, biossensor e estudo da atividade vasorrelaxante para avaliação do potencial antioxidante de outros produtos naturais e estudar o uso de compostos secundários da canela com alta capacidade antioxidante como cumarina, cinamaldeído e eugenol na conservação de alimentos para aplicação na indústria alimentícia.

- ABDEL AZEEM, S. M.; AL MOHESEN, I. A.; IBRAHIM, A, M. H. Analysis of Total Phenolic Compounds in Tea and Fruits Using Diazotized Aminobenzenes Colorimetric Spots. **Food Chemistry**, v. 332, n. 1, 127392, 2020.
- AHMAD, S.; ARSHAD, M. A., IJAZ, S.; KHURSHID, U., RASHID, F., AZAM, R. Review on methods used to determine antioxidant activity. **International Journal of Multidisciplinary Research and Development**, v. 1, n.1, p. 41-44, 2014.
- AHMED, J.; ALTUN, E.; AYDOGDU, M.O.; GUNDUZ, O.; KERAI, L.; REN, G.; EDIRISINGHE, M. Anti-fungal bandages containing cinnamon extract, **Int. Wound J**, v. 16 n. 3, p. 730–736, 2019.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143-152, 2013.
- ALVAREZ-COLLAZO, J.; ALONSO-CARBAJO, L.; LÓPEZ-MEDINA, A. I.; ALPIZAR, Y. A.; TAJADA, S.; NILIUS, B. *et al.* Cinnamaldehyde inhibits L-type calcium channels in mouse ventricular cardiomyocytes and vascular smooth muscle cells. **Pflugers Arch**, v. 466, p. 2089-2099, 2014.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n.10, p. 2202-2210, 2010.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 276 - Regulamento Técnico para especiarias, temperos e molhos. Brasília (Brasil) : Diário Oficial da União, 2005.
- APAK, R. Current Issues in Antioxidant Measurement. **J. Agric. Food Chem**, v. 67, p. 9187–9202, 2019.
- ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. **Trends Food Sci. Technol.** v. 11, p. 419, 2000.
- ARRIBAS, A. S.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, M.; CHICHARRO, M. The role of electroanalytical techniques in analysis of polyphenols in wine. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 34, p. 78–96, 2012.

AZEEM, A. S. M.; MOHESEN, A. I. A.; IBRAHIM, M. H. A. Analysis of Total Phenolic Compounds in Tea and Fruits Using Diazotized Aminobenzenes Colorimetric Spots. **Food Chemistry**, 2020.

BACCHETTI, T., TURCO, I., URBANO, A., MORRESI, C., FERRETTI, G. Fruit and vegetable intake and its relationship to dietary antioxidant capacity and markers of oxidative stress. A gender-related study. **Nutrition**, 2018.

BACCHETTI, T.; TURCO, I.; URBANO, A.; MORRESI, C. FERRETTI, G. Fruit and vegetable intake and its relationship to dietary antioxidant capacity and markers of oxidative stress. a gender-related study, **Nutrition**, 2018.

BALDEÓN, E. O.; ALCAÑIZ, M.; MASOT, R.; FUENTES, E. M.; BARAT, J. M.; GRAU, R. Voltammetry pulse array developed to determine the antioxidant activity of camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaug) and tumbo (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey) juices employing voltammetric electronic tongues. **Food Control**, v. 54, p. 181–187, 2015.

BAZANT, M. Z.; STOREY, B. D.; KORNYSHEV, A. A. Double layer in ionic liquids: overscreening versus crowding, **Phys. Rev. Lett**, v. 106, n. 4, 2011.

BEHBAHANI, B. A; FALAH, F.; ARAB, F. L; VASIEE, M.; YAZDI, F. T. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative activities of *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil, **Evid. Based Complement. Altern. Med**, Ecam, 2020.

BEITOLLAHI, H.; NEKOOEI, S.; TORKZADEH-MAHANI, M. Amperometric immunosensor for prolactin hormone measurement using antibodies loaded on a nano-Au monolayer modified ionic liquid carbon paste electrode. **Talanta**, v. 188, 2018.

BEJI, R. S.; KHEMIR, S.; WANNES, W. A.; AYARI, K. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant influences of the spice cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) in experimental rats, **Braz. J. Pharm. Sci.** v. 2, p. 54, 2018.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

BORGES, L. L., LÚCIO, T. C., GIL, E. S., BARBOSA, E. F. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, p. 1-20, 2011.

BUORO, R. M.; BACIL, R. P.; SANZ, C. G.; CAMPOS, O. S.; SERRANO, S. H. P. Biomimetic behavior and nanomolar detection of hydrogen peroxide on an electrochemically pre-treated hematin modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 250, p. 169–178, 2017.

CANO, A.; ARNAO, M. B. ABTS/TEAC (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)/Trolox[®] - Equivalent Antioxidant Capacity) radical scavenging mixed-mode assay. In *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity*; **John Wiley & Sons**, Ltd.: Chichester, UK, p. 117–139, 2017.

CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Mediated biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 6–7, p. 441-456, 2002.

CHEN, X.; LIANG, L.; HAN, C. Borate suppresses the scavenging activity of gallic acid and plant polyphenol extracts on DPPH radical: A potential interference to DPPH assay. **LWT**, 109769, 2020.

CHENG, S. S.; LIU, J. Y. ; HUANG, C. G.; HSUI, Y. R.; CHEN, W. J.; CHANG, S. T. Insecticidal activities of leaf essential oils from *Cinnamomum osmophloeum* against three mosquito species. **Bioresource Tech**, v. 100, n. 1, p. 457–464, 2009.

CHERICONI, S.; PRIETO, J. M.; IACOPINI, P.; CIONI, P.; MORELLI, I. *In vitro* activity of the essential oil of *Cinnamomum zeylanicum* and eugenol in peroxyxynitrite-induced oxidative processes. **J Agric Food Chem**, v. 53, p. 4762-4765, 2005.

CHETANKUMAR, K.; SWAMY, B. E. K.; SHARMA, S. C. Fabrication of voltammetric efficient sensor for catechol, hydroquinone and resorcinol at MgO modified pre-treated carbon paste electrode. **Materials Chemistry and Physics**, 123231, 2020.

CHIORCEA-PAQUIM, A.; ENACHE, T. A.; DE SOUZA GIL, E.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Natural phenolic antioxidants electrochemistry: Towards a new food science methodology. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 2020.

ČIŽMEK, L.; KOMORSKY-LOVRIĆ, Š. Electrochemistry as a screening method in determination of carotenoids in crustacean samples used in everyday diet. **Food Chemistry**, 2019.

CORREIA, H. S. N. *Agrimonia eupatoria* L. e *Equisetum telmateia* Ehrh. Perfil Polifenólico e Capacidade de Captação de Espécies Reativas de Oxigenio. Dissertação de Mestrado. Universidade de Coimbra, 2005.

DAVID, M.; SERBAN, A.; RADULESCU, C.; DANET, A. F.; FLORESCU, M. Bioelectrochemical evaluation of plant extracts and gold nanozyme-based sensors for total antioxidant capacity determination. **Bioelectrochemistry**, 129, 124–134, 2019.

DAWIDOWICZ, A. L.; OLSZOWY, M. Mechanism change in estimating of antioxidant activity of phenolic compounds. **Talanta**, v. 97, p. 312-317, 2012a.

DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D.; OLSZOWY, M. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). **Food Chemistry**, v. 131, n. 3, p. 1037-1043, 2012b.

DAWIDOWICZ, A.L.; OLSZOWY, M. The importance of solvent type in estimating antioxidant properties of phenolic compounds by ABTS assay. **Eur. Food Res. Technol**, v. 236, p. 1099–1105, 2013.

DE BRITO, A. R.; TAVARES, I. M. DE C.; DE CARVALHO, M. S.; DE OLIVEIRA, A. J.; SALAY, L. C.; SANTOS, A. S. FRANCO, M. Study of the interaction of the lactase enzyme immobilized in a carbon nanotube matrix for the development of the chemically modified carbon paste electrode. **Surfaces and Interfaces**, 2020.

DE JESUS, B. Caracterização de lacases produzidas por fungos basidiomicetos de origem marinha e terrestre e aplicação biotecnológica na descoloração de corante têxtil / Bruno de Jesus Fontes. -- Rio Claro, p. 81, 2019.

DE OLIVEIRA NETO, J. R.; REZENDE, S. G.; LOBÓN, G. S.; GARCIA, T. A.; MACEDO, I. Y. L.; GARCIA, L. F.; ALVES, V. F.; TORRES, I. M. S.; SANTIAGO, M. F.; SCHMIDT, F.; DE SOUZA G., E. Electroanalysis and laccase-based biosensor on the determination of phenolic content and antioxidant power of honey samples. **Food Chemistry**, 2017.

DEDE, E.; SAGLAM, Ö.; DILGIN, Y. Sensitive Voltammetric Determination of Niclosamide at a disposable pencil graphite electrode. **Electrochimica Acta**, v. 127, p. 20–26, 2014.

DIACONU, M.; LITESCU, S. C.; RADU, G. L. Laccase-MWCNT-chitosan biosensor—A new tool for total polyphenolic content evaluation from in vitro cultivated plants, **Sensor. Actuat. B** v. 145, p. 800-806, 2010.

DONG, J. W.; CAI, L.; XING, Y.; YU, J.; DING, Z. T. Re-evaluation of ABTS•+ Assay for Total Antioxidant Capacity of Natural Products. **Nat. Prod. Commun.** 2015.

DORRI, M.; HASHEMITABAR, S.; HOSSEINZADEH, H. Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) as an antidote or a protective agent against natural or chemical toxicities: a review, **Drug Chem. Toxicol**, v. 41, n. 3, p. 338–351, 2018.

DRAVIE, E. E.; KORTEI, N. K.; ESSUMAN, E. K.; TETTEY, C. O.; BOAKYE, A. A.; HUNKPE, G. Antioxidant, phytochemical and physicochemical properties of sesame seed (*Sesamum indicum* L). **Scientific African**, 2020.

DROGE, W. “Free radicals in the physiological control of cell function,” **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47–95, 2002.

ESCARPA, A. Food electroanalysis: Sense and simplicity. **The Chemical Record**, v. 12, p. 72-91, 2012.

FAGARD, R. H. Resistant hypertension. **Heart**, v. 98, n. 3, p. 254 - 261, 2012.

FOTI, M. C.; DAQUINO, C.; GERACI, C. Electron-Transfer Reaction of Cinnamic Acids and Their Methyl Esters with the DPPH• Radical in Alcoholic Solutions. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 69, n. 7, p. 2309-2314, 2014.

GALASSO, C.; GENTILE, A.; OREFICEI, IANORA, A.; BRUNO, A.; NOONAN, D. M. *et al.* Microalgal derivatives as potential nutraceutical and food supplements for human health: a focus on cancer prevention and interception. **Nutrients**, v. 11, n. 6, p. 1226, 2019.

GENG, S.; CUI, Z.; HUANG, X.; CHEN, Y.; XU, D.; XIONG, P. Variations in essential oil yield and composition during *Cinnamomum cassia* bark growth. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 1, p. 248–252, 2011.

GHOORA, M. D.; HALDIPUR, A. C.; SRIVIDYA, N. Comparative evaluation of phytochemical content, antioxidant capacities and overall antioxidant potential of select culinary microgreens. **Journal of Agriculture and Food Research**, 2020.

GIL, E. S. Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos. São Paulo: Ed. **Pharmabooks**, p. 485, 2007.

GOLDSCHMIDT, S.; RENN, K.; ZWEIWEITIGER, STICKSTOFF. Über das α , α -Diphenyl- β -trinitrophenyl-hydrazyl. (IV. Mitteilung über Amin-Oxydation). **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)**, v. 55, n. 3, p. 628-643, 1992.

GOMES, B. R.; BEZERRA. Análise da produção de Espécies reativas de Oxigênio e Nitrogênio durante a febre e a antipirese em ratos. **Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular)** - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

GOMES, P. C. G. J.; DOS SANTOS, V. B.; LOPES, A. S.; DE SOUZA, J. P. L.; PINA, J. R. S.; CHAGAS, G. C. A. J.; MARINHO, P. S. B. Determination of theobromine and caffeine in fermented and unfermented Amazonian cocoa (*Theobroma Cacao* L.) beans using square wave voltammetry after chromatographic separation. **Food Control**, 2019.

GOMES, S. A. S. S.; NOGUEIRA, J. M. F.; REBELO, M. J. F. An amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine, **Biosens. Bioelectron**, v. 20, p. 1211-1216, 2014.

GUEVARA, S. L. R.; PARRA, D. I.; ROJAS, L. Z. “Teaching: individual” to increase adherence to therapeutic regimen in people with hypertension and type-2 diabetes: protocol of the controlled clinical trial ENURSIN. **BMC Nurs**, v. 18, n. 1, p. 22, 2019.

GUNAWARDENA, D.; KARUNAWEERA, N.; LEE, S.; VAN DER KOOY, F.; HARMAN, D.G.; RAJU, R.; BENNETT, L.; GYENGESI, E.; SUCHER, N. J.; MÜNCH, G. Anti-inflammatory activity of Cinnamon (*C. zeylanicum* and *C. cassia*) extracts - identification of E- cinnamaldehyde and o-methoxy cinnamaldehyde as the most potent bioactive compounds, **Food Funct.** v. 6 n. 3, p. 910–919, 2015.

HADI, A. *et al.*, The effect of cinnamon supplementation on blood pressure in adults: A systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials, **Clinical Nutrition**, ESPEN.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. **Oxford, UK: Oxford University Press**, 2015.

HAN, C.; JIN, P.; LI, M.; WANG, L.; ZHENG, Y. Physiological and transcriptomic analysis validates previous findings of changes in primary metabolism for the production of phenolic antioxidants in wounded carrots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 33, p. 7159-7167, 2017.

HAO, Z.; ZHENG, Q.; JIN, L.; ZHOU, S.; CHEN, H.; LIU, X.; LU, C. Rapid measurement of total polyphenol content in tea by kinetic matching approach on microfluidic paper-based analytical devices. **Food Chemistry**, 128368, 2020.

HENRIQUEZ C, ALIAGA C, LISSI E. Formation and decay of the ABTS derived radical cation: A comparison of different preparation procedures. **Int J Chem Kin**, v. 34,12, p. 659-665, 2002.

HOYOS-ARBELÁEZ, J.; BLANDÓN-NARANJO, L.; VÁZQUEZ, M.; CONTRERAS-CALDERÓN, J. Antioxidant capacity of mango fruit (*Mangifera indica*). An electrochemical study as an approach to the spectrophotometric methods. **Food Chemistry**, v. 266, p. 435–440, 2018.

ILYASOV, I. R.; BELOBORODOV, V. L.; SELIVANOVA, I. A.; TEREKHOV, R. P. ABTS/PP Decolorization Assay of Antioxidant Capacity Reaction Pathways. **Int. J. Mol. Sci**, v. 21, p. 1131, 2020.

JANEIRO, P.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Solid State Electrochemical Oxidation Mechanisms Of Morin in Aqueous Media. **Electroanalysis**, v. 17, n. 9. 2005.

JAYAPRAKASHA, G. K.; RAO, L. J. M. Chemistry, Biogenesis, and Biological Activities of *Cinnamomum zeylanicum*. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 6, p. 547–562, 2011.

KALLEL, I.; HADRIC, B.; GARGOURI, B.; CHAABANE, A.; LASSOUED, S.; GDOURA, R.; BAYOUDH, A.; BEN MESSAOUD, E. Optimization of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* blume) essential oil extraction: evaluation of antioxidant and antiproliferative effects, Evid. Based Complement. **Altern. Med**, 6498347, 2019.

kallikrein – kinin system. **Vascular Pharmacology**, v. 64, p. 1–10, 2015.

KAWATRA, P.; RAJAGOPALAN, R. Cinnamon: Mystic powers of a minute ingredient. **Pharmacognosy Research**, v. 7, p. S1–S6, 2015.

KIM, G. H. *et al.* The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Experimental Neurobiology**, v. 24, n. 4, p. 325, 2015.

KOKATE, C. K.; PUROHIT, A. P.; GOKHALE, S. B. **Pharmacognosy**. Terpenoids. Nirali Prakashan, Pune, p. 334–336, 1994.

KOLARZYK, E.; PIETRZYCKA, A.; ZAJĄC, J. MORAWIECKA-BARANEK, J. Relationship KONG, J. O.; LEE, S.M.; MOON, Y. S.; LEE, S. G.; AHN, Y. J. Nematicidal activity of cassia and cinnamon oil compounds and related compounds toward *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae). **J. Nematol**, v. 39, n. 1, p. 31– 36, 2007.

KOPPIKAR, S. J.; CHOUDHARI, A. S.; SURYAVANSHI, S. A.; KUMARI, S.; CHATTOPADHYAY, S.; KAUL-GHANEKAR, R. Aqueous cinnamon extract (ACE-c) from the bark of *Cinnamomum cassia* causes apoptosis in human cervical cancer cell line (SiHa) through loss of mitochondrial membrane potential. **BMC Cancer**, v. 10, n. 1, p. 210, 2010.

LEITE, K. C. DE S. Caracterização eletroquímica e avaliação da capacidade antioxidante de extratos secos de drogas vegetais. 2019. 76. **Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)** - Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

LEITE, K. C. DE S.; GARCIA, L. F.; LOBÓN, G. S.; THOMAZ, D. V.; MORENO, E. K. G.; CARVALHO, M. F.; ROCHA, M. L.; SANTOS, W. T. P.; GIL, E. S. Antioxidant activity evaluation of dried herbal extracts: anelectroanalytical approach. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 28, n. 3, p. 325–332, 2018.

LEOPOLDINI, M.; MARINO, T.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 108, n. 22, p. 4916-4922, 2004.

LI, A. L.; LI, G. H.; LI, Y. R.; WU, X. Y.; REN, D. M.; LOU, H. X.; WANG, X. N.; SHEN, T. Lignan and flavonoid support the prevention of Cinnamon against oxidative stress related diseases, **Phytomedicine**, v. 53, p. 143–153, 2019.

LIANG, Y.; LI, Y.; SUN, A.; LIU, X. Chemical compound identification and antibacterial activity evaluation of cinnamon extracts obtained by subcritical n-butane and ethanol extraction. **Food Science & Nutrition**, 2019.

LIU, A.; WANG, K.; WENG, S.; *et al.* Development of electrochemical DNA biosensors. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 37, p. 101–111, 2012.

LIU, L.; ANWAR, S.; DING, H.; XU, M.; YIN, Q.; XIAO, Y.; BI, H. Electrochemical sensor based on F,N-doped carbon dots decorated laccase for detection of catechol. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 2019.

LOPEZ, J. C.; ZON, M. A.; FERNÁNDEZ, H.; GRANERO, A. M. Development of an enzymatic biosensor to determine eugenol in dental samples. **Talanta**, v. 210, p. 120647, 2020.

LU, Z.; JIA, Q.; WANG, R.; WU, X.; WU, Y.; HUANG, C.; LI, Y. Hypoglycemic activities of A and B-type procyanidin oligomer-rich extracts from different Cinnamon barks. **Phytomedicine**, v. 18, n. 4, p. 298–302, 2011.

MACEDO, I. Y. L. *et al.* Differential pulse voltammetric determination of albendazole and mebendazole in pharmaceutical formulations based on modified sonogel carbon paste electrodes with perovskite-type LaFeO₃ nanoparticles. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 163, n. 8, p. B428-B434, 2016.

MACEDO, I. Y. L.; GARCIA, L. F.; OLIVEIRA-NETO, J. R.; LEITE, K. C. S.; FERREIRA, V. S.; GHEDINI, P. C.; GIL, E. S. Electroanalytical tools for antioxidant evaluation of red fruits dry extracts. **Food Chemistry**, v. 217, p. 326-331, 2017.

MACHADO, F. B.; MACÊDO, I. Y. L.; CAMPOS, H. M.; MORENO, E. K. G., SILVA, M. F. B.; NETO, J. R. O.; GIL, E. S. Antioxidant activity of thirty-six peppers varieties and vasorelaxant of selected varieties. **Food Bioscience**, v. 41, p. 100989, 2021.

MADHUCHANDRA, H. D.; KUMARA SWAMY, B. E.; SUNIL KUMAR NAIK, T. S. Pretreated carbon paste electrode sensor for Adrenaline: A voltammetric study. **Chemical Data Collections**, v. 28, p. 100388, 2020.

MALEKI, N.; KASHANIAN, S.; MALEKI, E.; NAZARI, M. A novel enzyme based biosensor for catechol detection in water samples using artificial neural network, **Biochem. Eng. J**, v. 128, p. 1-11, 2017.

Manzanares-Palenzuela, C. L.; Martín-Fernández, B.; Sánchez-Paniagua, L. M.; López-Ruiz, B. Electrochemical genosensors as innovative tools for detection of genetically modified organisms. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 66, p. 19–31, 2015.

MAQSOU DLOU, A.; ASSADPOUR, E.; MOHEBODINI, H. *et al.*, Improving the efficiency of natural antioxidant compounds via different nanocarriers, **Advances in Colloid and Interface Science**, 2019.

MARÍN, F. R.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J.; ARNAO, M. B. A colorimetric method for the determination of different functional flavonoids using 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) and peroxidase. **Prep. Biochem. Biotechnol**, p. 1–7, 2019.

MARSOUL, A.; IJJAALI, M.; OUMOUS, I.; BENNANI, B.; BOUKIR, A. Determination of polyphenol contents in *Papaver rhoeas* L. flowers extracts (soxhlet, maceration), antioxidant and antibacterial evaluation. **Materials Today: Proceedings**, 2020.

Medicine, v. 26, p. 33–65, 2005.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V. MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clin Sci**, v. 84, n. 4, p. 407-12, 1993.

MOHARRAM, H. A.; YOUSSEF, M. M. Methods for determining the antioxidant activity: a review. Alex. **Journal of Food Science & Technology**. v. 11, n.1, p. 31-42, 2014.

MOHTARA, L. G.; ARANDAB, P.; MESSINAB, G. A.; NAZARENOA, M. A.; PEREIRAB, S. V.; RABAB, J. F. BERTOLINO, A. Amperometric biosensor based on laccase immobilized onto a nanostructured screen-printed electrode for determination of polyphenols in propolis, **Microchem. J.** v. 144, p. 13–18, 2019.

MOLLAZADEH, H.; HOSSEINZADEH, H. Cinnamon effects on metabolic syndrome: a review based on its mechanisms, Iran. **J. Basic Med. Sci**, v. 19, n. 12, p. 1258–1270, 2016.

MÜNDEL, T.; CAMICI, G. G.; MAACK, C.; BONETTI, N. R.; FUSTER, V.; KOVACIC, J. C. Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature: Part 2 of a 3-Part Series. **J Am Coll Cardiol**, v. 70, p. 212–229, 2017.

MUSTAFA, H. N. A.; ISA, I. M.; ALI, N. M.; HASHIM, N.; MUSA, M.; GHANI, S. A. Amperometric detection of hydroquinone at modified ionic liquid graphene composite paste electrode, Int. **J. Electrochem. Sci.** v. 10, p. 9232–9245, 2015.

NASEEM, K. M. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. **Molecular Aspects of**

NAYAK, I.N.; CHINTA, R.; JETTI, R. Anti-atherosclerotic potential of aqueous extract of *Cinnamomum zeylanicum* bark against glucocorticoid induced atherosclerosis in wistar rats, **J. Clin. Diagn. Res.** v. 11, n. 5, p. Fc19–fc23, 2017.

- Negraes, P. **Guia A-Z de Plantas**: condimentos. São Paulo: Bei Comunicação, p.103-106, 2003.
- NITA, M.; GRZYBOWSKI, A. The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1–23, 2016.
- NYADJEU, P.; NGUELEFACK-MBUYO, E. P.; ATSAMO, A. D.; NGUELEFACK, T. B.; DONGMO, A. B.; KAMANYI, A. Acute and chronic antihypertensive effects of *Cinnamomum zeylanicum* stem bark methanol extract in L-NAME-induced hypertensive rats, BMC Complement. **Alter. Med**, v. 13, n. 27, p. 6882, 2013.
- OGNJANOVIĆ, M.; STANKOVIĆ, V.; KNEŽEVIĆ, S.; ANTIĆ, B.; VRANJEŠ-DJURIĆ, S.; STANKOVIĆ, D. M. TiO₂/APTES cross-linked to carboxylic graphene based impedimetric glucose biosensor. **Microchemical Journal**, v. 158, 105150, 2020.
- OLIVEIRA, A. C.; VALENTIN, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BACHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais de antioxidantes. **Química Nova**. v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.
- OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.1, p.36-44, 2015.
- OLIVEIRA, A E F; PEREIRA, A. C. **Biossensores e a industria alimentar**, 2016. Disponível em: <<http://qnint.s bq.org.br/novo/index.php?hash=tema.97> acessado em 20/03/2021>
- OLIVEIRA, T. S.; OLIVEIRA, L. M.; OLIVEIRA, L. P.; COSTA, R. M. D.; TOSTES, R. C. Activation of PI3K/Akt pathway mediated by estrogen receptors accounts for estrone-induced vascular activation of cGMP signaling. **Vascular Pharmacology**, v. 110, p. 42–48, 2018.
- PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltamétricas: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.
- PATIL, V. M.; MASAND, N. Anticancer potential of flavonoids: Chemistry, biological activities, and future perspectives. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 59, p. 401–430, 2018.

PAULETTI, A.; TERRONE, G.; SHEKH-AHMAD et al. Targeting oxidative stress improves disease outcomes in a rat model of acquired epilepsy. **Brain**, 2019.

PEKAL, A.; PYRZYNSKA, K. Effect of pH and metal ions on DPPH radical scavenging activity of tea. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 66, n. 1, p. 58-62, 2015.

PIOVESAN, J. V.; JOST, C. L.; SPINELLI, A. Electroanalytical determination of total phenolic compounds by square-wave voltammetry using a poly(vinylpyrrolidone)- modified carbon-paste electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 216, p. 192–197, 2015.

PISOSCHI, A. M.; NEGULESCU, G. P. Methods for total antioxidant activity determination: A Review. **Biochemistry and Analytical Biochemistry**, v. 1, n. 1, p. 52- 63, 2011.

PRZYGODZKA, M. ZIELINSKA, D. CIESAROVÁ, Z. *et al.* Comparison of methods for evaluation of the antioxidant capacity and phenolic compounds in common spices. **LWT - Food Science and Technology**, v.58, n. 2, p. 321–326, 2013.

RAJAN, V. K.; MURALEEDHARAN, K. (2017). A computational investigation on the structure, global parameters and antioxidant capacity of a polyphenol, Gallic acid. **Food Chemistry**, v. 220, p. 93–99, 2017.

RAMADAN-HASSANIEN, M. F. Total antioxidant potential of juices, beverages and hot drinks consumed in Egypt screened by DPPH *in vitro* assay. **Grasas Y Aceites**, 59 (3), Julio-Septiembre, p. 254-259, 2008.

RAMONAS, E.; RATAUTAS, D.; DAGYS, M.; MEŠKYS, R.; KULYS, J. Highly Sensitive Amperometric Biosensor Based on Alcohol Dehydrogenase for Determination of Glycerol in Human Urine. **Talanta**, 2019.

RAO, P. V.; GAN, S. H. Cinnamon: a multifaceted medicinal plant. **Evid Based Complement Altern Med**, 2014.

RAWAL, R.; CHAWLA, S.; PUNDIR, C. S. D. An amperometric biosensor based on laccase immobilized onto Fe₃O₄NPs/cMWCNT/PANI/Au electrode for determination of phenolic content in tea leaves extract, **Enzyme Microb. Technol**, v. 51, p.179-185, 2012.

Rawal, R.; Chawla, S.; Pundir, C. S. D. Polyphenol biosensor based on laccase immobilized onto silver nanoparticles/multiwalled carbon nanotube/polyaniline gold electrode, **Anal. Biochem**, v. 419, p. 196-204, 2011.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231–1237, 1999.

REGOLI, D.; JR, F. G. Critical insights into the beneficial and protective actions of the RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure- antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933–956, 1996.

RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 5, p. 1747-1763, 2010.

ROY, J. J.; ABRAHAM, T. E.; ABHIJITH, K. S.; KUMAR, P. V. S.; THAKUR, M. S. Biosensor for the determination of phenols based on Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC) of laccase, **Biosens. Bioelectron.** v. 21, p. 206-211, 2005.

SALMAN, A.; TEKIN, B.; BERENJIAN, A.; CINEL, L.; DEMIRKESEN, C. Facial discoid dermatosis: a further case of a novel entity. **J Dermatol**, v. 42, n. 11, p. 1132e3, 2015.

SCHAICH, K. M.; TIAN, X.; XIE, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 111–125, 2015.

SGOBBI, L. F. **Desenvolvimento de um biossensor mimético descartável para pesticidas organofosforados e carbamatos para o controle de qualidade de águas de abastecimento.** Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 120.2016.

SHREAZ, S.; WANI, W.A.; BEHBEHANI, J.M. *et al.* Cinnamaldehyde and its constituents, a novel class of antifungal agents. **Fitoterapia**, v. 12, p. 116- 31, 2016.

SINGH, G. *et al.* A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. **Food And Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1650-1661, 2007.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods Enzymol**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CBCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental.** 6.ed. Porto Alegre, RS, v.2, p.1056, 2009.

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

SOARES, D. J. *et al.* Processos Oxidativos na Fração Lipídico de Alimentos. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 30, p. 263-272, 2012.

SONG, F.; LI, H.; SUN, J.; WANG, S. Protective effects of cinnamic acid and cinnamic aldehyde on isoproterenol-induced acute myocardial ischemia in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 150, p. 125-130, 2013.

SOUSA, C. M. M. *et al.* Fenóis Totais E Atividade Antioxidante De Cinco Plantas Medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical Sensors: A Powerful Tool in Analytical Chemistry. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 14, n. 2, p. 159-173, 2003.

ŠVANCARA, I.; KALCHER, K.; WALCARIUS, A.; VYTRÁS, K. Electroanalysis with Carbon Paste Electrodes, CRC Press, Taylor & Grancis Group, **Boca Raton**, 2012.

TEJERO, J.; SHIVA, S.; GLADWIN, M. T. Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation. **Physiol Rev**, v. 99, p. 311–379, 2019.

THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification¹. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 1–2, p. 121-131, 2001.

TOMAC, I.; ŠERUGA, M.; LABUDA, J. Evaluation of antioxidant activity of chlorogenic acids and coffee extracts by an electrochemical DNA-based biosensor. **Food Chemistry**, 126787, 2020.

TRAN, H. N. H.; GRAHAM, L.; ADUKWU, E. C. In vitro antifungal activity of Cinnamomum zeylanicum bark and leaf essential oils against *Candida albicans* and *Candida auris*, **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v.104, n. 20, p. 8911–8924, 2020.

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, v. 2, n. 12, p. 1231–1246, 2010.

VAJDLE, O.; ŠEKULJICA, S.; GUZSVÁNY, V.; NAGY, L.; KÓNYA, Z.; IVIĆ, M. A.; ANOJČIĆ, J. Use of carbon paste electrode and modified by gold nanoparticles for selected macrolide antibiotics determination as standard and in pharmaceutical preparations. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 114324, 2020.

VANGALAPATI, M.; SATYA, N. S.; PRAKASH, D. S.; A VANIGADDA, S. A review on pharmacological activities and clinical effects of cinnamon species. **Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci**, v. 3, n. 1, p. 653–663, 2012.

VARI, R.; SCAZZOCCHIO, B.; DEL PAPA, S. Dietary habits and gender differences. **Italian J Gender Medicine**, v. 3, n.2, p. 55-58, 2017.

- VASCONCELOS, N. G.; CRODA, J.; SIMIONATTO, S. Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 120, p. 198–203, 2018.
- VLAMIDIS, Y.; GUALANDI, I.; TONELLI, D. Amperometric biosensors based on reduced GO and MWCNTs composite for polyphenols detection in fruit juices, **J. Electroanal. Chem.** v. 799, p. 285-292, 2017.
- WANG, R.; WANG, R.; YANG, B. Extraction of essential oils from five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 10, n. 2, p. 289–292, 2009.
- WANG, Y. H.; AVULA, B.; NANAYAKKARA, N. P. D.; ZHAO, J.; KHAN, I. A. Cassia Cinnamon as a Source of Coumarin in Cinnamon-Flavored Food and Food Supplements in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 10, p. 516-524, 2013.
- XIE, J.; SCHAICH, K. M. Re-evaluation of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 4251–4260, 2014.
- YAKHCHALI, M.; TAGHIPOUR, Z.; ARDAKANI, M. M.; VAGHASLOO, M. A.; VAZIRIAN, M.; SADRAI, S. Cinnamon and its possible impact on COVID-19: The viewpoint of traditional and conventional medicine. **Biomedicine & Farmacotherapy**, v. 143, p. 112221, 2021.
- YE, Y.; JI, J.; SUN, Z.; SHEN, P.; SUN, X. Recent advances in electrochemical biosensors for antioxidant analysis in foodstuff. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 115718, 2019.
- YEO, J.; SHAHIDI, F. Critical re-evaluation of DPPH assay: Presence of pigments affects the results. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2019.
- YERER, M. B.; DAYAN, S.; HAN, M. I.; SHARMA, A.; TULI, H. S.; SAK, K. Nanoformulations of coumarins and the hybrid molecules of coumarins with anticancer effects. **Anti Cancer Agents Med. Chem**, 2020.
- YILDIZ, G.; AYDOGMUS, Z.; CINAR, M.; EMIN, S.; FILIZ; OZTURK, T. Electrochemical oxidation mechanism of eugenol on graphene modified carbon paste electrode and its analytical application to pharmaceutical analysis. **Talanta**, v. 173, p. 1–8, 2017.
- ZAIDI, S. F.; AZIZ, M.; MUHAMMAD, J. S.; KADOWAKI, M. Diverse pharmacological properties of *Cinnamomum cassia*: a review. **Pak J Pharm Sci**, v. 28, 2015.

Anexo 1 – artigos publicados

Int. J. Electrochem. Sci., 14 (2019) 838 – 847, doi: 10.20964/2019.01.82

**International Journal of
ELECTROCHEMICAL
SCIENCE**
www.electrochemsci.org

Antioxidant Study and Electroanalytical Investigation of Selected Herbal Samples Used in Folk Medicine

Emily Kussmaul Gonçalves Moreno¹, Douglas Vieira Thomaz¹, Fábio Bahls Machado¹, Karla Carneiro Siqueira Leite¹, Edson Silvio Batista Rodrigues¹, Morgana Alecrim Fernandes¹, Murilo Ferreira Carvalho¹, Mayk Teles de Oliveira¹, Marcos Pereira Caetano¹, Carlos Eduardo da Cunha Peixoto¹, Bruna Guimarães Isecke¹, Eric de Souza Gil¹ and Isaac Yves Lopes de Macêdo^{1,}*

¹ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Rua 240, S/n - Setor Leste Universitário, Goiânia - GO, 74605-170, Brazil.

*E-mail: isaacyvesl@gmail.com

Received: 13 October 2018 / *Accepted:* 22 November 2018 / *Published:* 30 November 2018

The growing concern regarding oxidative-related cell damage has guided a myriad of investigations concerning the applicability of herbal mater to mop up reactive oxygen species generation. In this sense, the consumption of functional foods and the use of plants with antioxidant capacity are well understood in folk medicine. Thus, this work was intended to electroanalytically study tea and tincture preparations of selected herbs used in folk medicine in order to better understand their redox features. Henceforth, samples of *Cinnamomum zeylanicum* (CZB), *Pterodon emarginatus* (PER) (PES), *Cotyledon orbiculata* (COL), *Syzygium aromaticum* (SAF), *Commiphora myrrha* (CML), *Cyrtopodium punctatum* (CPR), *Uncaria tomentosa* (UTR) and *Brosimum gaudichaudii* (BGR) were also analyzed in colorimetric tests of radical scavenging activity ABTS and DPPH. Differential pulse voltammetry (DPV) measurements were performed using a potentiostat/galvanostat. A carbon paste electrode, Pt wire and the Ag/AgCl/KCl_{sat} 3 M were used as working, counter and reference electrodes, respectively. The results evidenced that CZB, PER, SAF, CML and BGR presented better antioxidant features in a tincture form, probably due to better aglycone solubilization in hydroethanolic solutions, while CPR and UTR presented better antioxidant activity in aqueous preparations because of the polyphenolic components. The highest observed peak amongst all analyzed samples was that of SAF, attesting to its high content of electroactive compounds, while BGR, COL and PER showed good distribution of all anodic peak, being all correlated to phenolic metabolites. Therefore, the antioxidant activity of these preparations changes heavily according to the employed extraction fluids, and this activity can be assessed either by electrochemical or colorimetric techniques, henceforth rendering reproducible results.

Keywords: Tea, Herbal Medicine, DPPH, ABTS, Voltammetry.

Article

Enzymatic Electroanalytical Biosensor Based on *Maramiellus colocasiae* Fungus for Detection of Phytomarkers in Infusions and Green Tea Kombucha

Érica A. Batista ¹, Giovanna N. M. Silva ¹ , Livia F. Sgobbi ² , Fabio B. Machado ¹, Isaac Y. Macedo ¹, Emily K. Moreno ¹, Jerônimo R. Neto ¹, Paulo S. Scalize ³ and Eric S. Gil ^{1,*} 

- ¹ Faculdade de Farmácia (FF), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia 74605-170, Brazil; eriquitasto2@gmail.com (É.A.B.); giovannamellonutri@gmail.com (G.N.M.S.); famafarm@yahoo.com.br (F.B.M.); isaacyvesl@gmail.com (I.Y.M.); milykussmaul@gmail.com (E.K.M.); jeronimoneto8@gmail.com (J.R.N.)
- ² Instituto de Química (IQ), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia 74690-900, Brazil; livia.fsgobbi@gmail.com
- ³ Escola de Engenharia Civil e Ambiental (EECA), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia 74605-220, Brazil; pscalize.ufg@gmail.com
- * Correspondence: ericsgil@gmail.com

Abstract: In this work, we developed an enzymatic voltammetric biosensor for the determination of catechin and gallic acid in green tea and kombucha samples. The differential pulse voltammetry (DPV) methodology was optimized regarding the amount of crude enzyme extract, incubation time in the presence of the substrates, optimal pH, reuse of the biosensor, and storage time. Samples of green tea and kombucha were purchased in local markets in the city of Goiânia-GO, Brazil. High performance liquid chromatography (HPLC) and Folin-Ciocalteu spectrophotometric techniques were performed for the comparison of the analytical methods employed. In addition, two calibration curves were made, one for catechin with a linear range from 1 to 60 μM ($I = -0.152 * (\text{catechin}) - 1.846$), with a detection limit of 0.12 μM and a quantification limit of 0.38 μM and one for gallic acid with a linear range from 3 to 60 μM ($I = -0.0415 * (\text{gallic acid}) - 0.0572$), with a detection limit of 0.14 μM and a quantification limit of 0.42 μM . The proposed biosensor was efficient in the determination of phenolic compounds in green tea.

Keywords: quality control; polyphenoloxidase enzymes; kombucha; green tea; electrochemical biosensor



Citation: Batista, É.A.; Silva, G.N.M.; Sgobbi, L.F.; Machado, F.B.; Macedo, I.Y.; Moreno, E.K.; Neto, J.R.; Scalize, P.S.; Gil, E.S. Enzymatic Electroanalytical Biosensor Based on *Maramiellus colocasiae* Fungus for Detection of Phytomarkers in Infusions and Green Tea Kombucha. *Biosensors* **2021**, *11*, 91. <https://doi.org/10.3390/bios11030091>

Received: 7 February 2021

Accepted: 9 March 2021

Published: 22 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Over the years, biosensor technology has drawn attention to the agri-food sector due to the high demand for analyses associated with contamination, adulteration, additives, allergens, and food packing problems in foodstuff [1,2]. In this scenario, electrochemical biosensors are attractive analytical tools that take advantage of remarkable attributes, such as easy-to-operate, sensitive, simple-to-construct, and fast responsive devices for monitoring safety and quality of food [3–7]. Among the components in foodstuffs, phenolic compounds have been highlighted since they provide added value, owing to their well-known health benefits and their function as stabilizers [8]. There is an increasing trend in the food industry regarding formulation enrichment with polyphenols for food and beverage. In the midst of polyphenol-rich drinks, teas deserve to be emphasized since they have been used for thousands of years, such as green tea (*Camellia sinensis*), a functional food known in traditional Chinese medicine. It has beneficial bioactive substances that assist in the reduction of body fat and systemic arterial hypertension, and it has antioxidant, hypoglycemic, anticholisteremic, hypolipidemic, and thermogenic activities [9].

Consumed mainly by infusion, decoction or fermentation, black tea and kombuchas have polyphenolic phytomarkers, predominantly flavonols and phenolic acids. The fer-



Contents lists available at ScienceDirect

Food Bioscience

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fbio



Antioxidant activity of thirty-six peppers varieties and vasorelaxant of selected varieties

Fabio Bahls Machado^{a,*}, Isaac Yves Lopes de Macêdo^a, Hericles Mesquita Campos^b, Emily Kussmaul Gonçalves Moreno^a, Marlon Fernando Batista Silva^c, Jerônimo Raimundo de Oliveira Neto^a, Ruver Rodrigues Feitosa Ramalho^d, Abadia dos Reis Nascimento^e, Boniek Gontijo Vaz^d, Luiz Carlos da Cunha^a, Paulo César Ghedini^b, Victor Constantin Diculescu^f, Eric de Souza Gil^a

^a Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^b Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^c Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^d Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^e Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^f National Institute of Materials Physics, Atomistilor 405 A, Magurele, Romania

ARTICLE INFO

Keywords:

Capsicum
Electrochemical index
Food antioxidants
Vasodilator

ABSTRACT

Peppers are consumed all over the world, have several benefits to human health, such as antioxidant properties that can prevent diseases related to free radicals such as cardiovascular, inflammatory diseases, cancer, among others. This work aimed to evaluate the antioxidant capacity (AOC) of 36 varieties of peppers through ABTS and DPPH radical scavenging, electroanalytical assays, and to verify the vasorelaxant properties of selected samples. The greater the amount of capsaicin found in the extracts, the higher the AOC the greater the vasorelaxation. Naga had the highest scoring for antioxidant capacity, pout showed the lowest antioxidant capacity, vase pyramid intermediate level, whereas the capsaicin content followed the same trend. Extracts from all pepper varieties studied presented vasorelaxant properties in independent and dependent endothelial pathways.

1. Introduction

Spices have been used for thousands of years to add flavor to food, where, *Capsicum* fruits holds the title of oldest culinary spice (Cordell & Oscar, 1993). Indeed, the American pepper species of the *Capsicum* genus have been consumed for more than 7000 years in Mexico (Carvalho et al., 2006). The species of *Capsicum* genus markedly differ in terms of size, color, flavor, pungency and nutritional composition (Neitzke, 2012). Owing to their biological and chemical properties, peppers have been used as raw material by food (SCOVILLE., 1912), pharmaceutical, cosmetic (Baenas et al., 2019) and military industries (Ochoa-Alejo, 2006).

Capsaicinoids are the main active constituents responsible for the spicy and pungent taste in peppers. Capsaicinoids are secondary metabolites of peppers found in the placental part of their fruits and in a smaller amount in the seeds and pericarp (Asnin & Park, 2015). The

peppers also contains capsinoids, such as capsate and dihydrocapsate, which despite the analogous structure, are non-spicy compounds (Jiang, 2019). Capsaicin and dihydrocapsaicin encompass up to 50% and 25% of the total capsaicinoids, respectively, therefore dictating the pungency of hot peppers.

The pepper market is very diversified, ranging from food spices to personal defense and medicinal products. The pungency is an important attribute to assess the quality of peppers (Asnin & Park, 2015). In this sense, the Scoville Heat Units (SHU), becomes an important ally because it is used to classify the pungency of peppers and foods (SCOVILLE, 1912, pp. 453–454). The therapeutic properties of capsaicin are well established being mostly related to the capsaicinoids pungency (Janssens & Hursel, 2014). For instance, the consumption of chilli peppers is related to improvements in cardiovascular function (Moreno-Ramírez et al., 2019; Spence, 2019). In fact, experiments verifying the vasorelaxing actions of peppers, confirmed the capsaicin dose-dependency,

* Corresponding author.

E-mail address: famafarm@yahoo.com.br (F.B. Machado).

<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100989>

Received 8 October 2020; Received in revised form 9 March 2021; Accepted 10 March 2021

Available online 20 March 2021

2212-4292/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Article

Modified Cassava Starches' Identification through Mid-Infrared Spectroscopy and Exploratory Analysis

Isaac Yves Lopes de Macêdo ¹, Nathalie Dupuy ², Vitor H. dos S. Brito ³, Eric de Souza Gil ¹,
Giovanna N. de M. e Silva ¹, Emily K. G. Moreno ¹, Ivo M. Demiate ⁴ and Marney P. Cereda ^{5,*}

¹ Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiânia 74605-170, Brazil; isaacyvesl@gmail.com (I.Y.L.d.M.); ericsgil@ufg.br (E.d.S.G.)

² Aix Marseille University, Avignon Univ, CNRS, IRD, IMBE, 13397 Marseille, France; nathalie.dupuy@univ-amu.fr

³ Postgraduate Program in Biotechnology, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande 79117-900, Brazil; britovhs@gmail.com

⁴ Department of Food Engineering, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa 84030-900, Brazil

⁵ TECSAPP, Campo Grande 79017-180, Brazil

* Correspondence: mpcereda@gmail.com

Abstract: Different starch properties may cause alterations in the foodstuff's external appearance. However, modification processes in starches are usually secretive. The use of chemically modified starches is regulated by international standards, which makes it important to identify its presence and type. Mid-infrared spectroscopy (MIR)-modified starches' identification can be hindered by the presence of excess glucose. This research investigates types of modification in commercial starches and in approaches that circumvent MIR's limitations with exploratory analysis. It also considers that enzymatic hydrolysis (α -amylase and amyloglucosidase) can highlight the points of modification in the structure, which can be detected with infrared assays. To determine if sour cassava starch (FCS) is modified and check its type, six samples were selected: a native one, three of the most common cassava modified starches (etherified, esterified, and FCS), and two laboratory processed samples (Acid, Oxidized). The results showed that the sour cassava starch showed similarities with a commercial ester and an oxidized cassava starch, which may be due to the formation of a graft, corresponding to what the literature has already reported for corn starch treated with lactic acid and gamma radiation.

Keywords: amylase; glucose; oxidized starch; ether; dialysis



Citation: de Macêdo, I.Y.L.; Dupuy, N.; Brito, V.H.d.S.; Gil, E.d.S.; Silva, G.N.d.M.e.; Moreno, E.K.G.; Demiate, I.M.; Cereda, M.P. Modified Cassava Starches' Identification through Mid-Infrared Spectroscopy and Exploratory Analysis. *Analytica* **2023**, *4*, 126–140. <https://doi.org/10.3390/analytica4020011>

Academic Editor: Marcello Locatelli

Received: 18 March 2023

Revised: 12 April 2023

Accepted: 17 April 2023

Published: 24 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

As discussed by Cereda, Vilpoux, and Demiate (2003) [1], starch modifications should always be considered in relation to physical or chemical modifications. According to National Starch (1997) [2], unmodified native starch granules are easily hydrated, can swell quickly, have greater friability, and produce a slightly dense, elastic, and cohesive paste. Very often, natural or native starch is not the most suitable for specific processes. Native starch can be modified to supply amylaceous products with the necessary properties for specific uses.

Cereal starch, as well as starches of tropical origin, all have the amylose polymers formed by glucose molecules and bound by α -D-glycosidic links that give them a straight-line configuration; and amylopectin, a graft polymer with α -1,4 and α -1,6 links, of higher molecular weight (Figure 1) [1]. However, on this common basis, starch extracted from cereals may have specific and different functional properties, which lead to different uses. For example, cereal starch gels have more consistency, less transparency, and greater retrogradation than cassava starch gel, which is more viscous, transparent, and retrogrades less. The starch modifications alter its application properties with little to no change in

Anexo 5 - Resumo apresentado em congresso



13 SLACA

Simpósio Latino Americano
de Ciência de Alimentos

O FUTURO DOS ALIMENTOS

Certificado

10 a 12 de Novembro de 2019

Certificamos que o trabalho intitulado

EVALUATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY OF *Cinnamomum* sp. BY ELECTROANALYTIC AND SPECTROPHOTOMETRIC METHODS

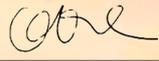
de autoria de

Emily Kussmaul Goncalves Moreno, Erica Batista, Gabrielle Ramos, Isaac Macêdo, Fabio Machado, Eric Gil

foi apresentado na categoria Oral no 13° SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos: "O Futuro do Alimento", realizado de 10 a 12 de novembro de 2019, Campinas - São Paulo - Brasil.


Dr. Mário Roberto Maróstica Jr.
Coordenador do Comitê de Programação


Dr. Juliano Lemos Bicas
Coordenador do Comitê Científico


Dra. Gláucia Maria Pastore
Presidente do Evento

Certification by Galoá

