



UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA

STEPHEN RATHINARAJ BENJAMIN

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ELETROANALÍTICOS
PARA AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE**

Goiânia

2016

STEPHEN RATHINARAJ BENJAMIN

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ELETROANALÍTICOS
PARA AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título Doutor em Inovação Farmacêutica.

Orientador: Prof. Dr. Eric de Souza Gil

Goiânia

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA

Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Profª. Drª. Valéria de Oliveira

Sub-Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

Goiânia-GO

2016

**Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA

Aluno: Stephen Rathinaraj Benjamin

Orientador: Prof. Dr. Eric de Souza Gil

Prof. Dr. Eric de Souza Gil / Presidente

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

Prof. Dr. Ricardo Neves Marreto / Membro Titular

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

Prof. Dr. Paulo César Ghedini / Membro Titular

Professor adjunto do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás,
ICB/UFG.

Prof. Dr. Flavio Colmati Junior / Membro Titular

Professor Titular do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, IQ/UFG.

Prof. Dr. Severino Carlos Bezerra de Oliveira / Membro Titular

Professor adjunto do Departamento de Química da Universidade Federal Rural de
Pernambuco, UFRPE.

Prof^a. Dr^a. Kennia Rocha Rezende / Membro Suplente

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

Prof. Dr. Wallans Torres Pio dos Santos / Membro Suplente

Professor adjunto do Departamento de Farmácia da Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri, UFVJM.

***Dedico este trabalho aos meus
pais e aos meus irmãos.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço com profunda gratidão ao Deus Todo-Poderoso por sua ajuda invisível e bênção para o cumprimento deste trabalho. Gostaria de agradecer a muitas pessoas que fizeram esta tese possível.

Em particular, eu gostaria de agradecer sinceramente com carinho e humildade, o privilégio de ter tido como supervisor o Prof. Dr. Eric de Souza Gil, do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG) e coordenador do Laboratório de Análises Farmacêuticas e Ambientais (LAFAM), Goiânia. Serei sempre grato por sua orientação, críticas construtivas e da supervisão constante. Seus valiosos conselhos e encorajamento prestado em todas as fases da investigação feita pela pesquisa tornando o trabalho mais fácil, interessante e significativo. Não teria sido possível concluir meu doutorado sem o seu encorajamento e devoção.

Também quero agradecer pela ajuda e conselhos da Coordenadora do Doutorado Prof^a Dr^a Valéria de Oliveira, em Inovação Farmacêutica- PPGIF. Sua orientação e apoio será sempre lembrados por mim.

Agradeço também ao Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha, responsável pelo grupo de pesquisa em Inovação Farmacêutica, pela correção do meu trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFG. Agradeço também a CAPEs (Coordenadoria Aperfeiçoamento Pessoal Ensino Superior) pela bolsa concedida e aos serviços prestados.

Presto meus sinceros agradecimentos a Prof^a Dr^a. Maria Teresa Freitas Bara, ao Prof Flávio Marques Lopes, a Prof^a Dr^a. Mariângela Fontes Santiago pelas suas valiosas sugestões e o apoio necessário e infra-estrutura básica para a realização do trabalho de pesquisa no Departamento de Farmácia da UFG.

Ao Fernando Lino, Monah Marques Magalhães, Fábio de Lima, Esterlucia Monteiro de castro lobo e José Leonardo Rodrigues de Souza por toda ajuda e companheirismo na execução desta tese.

Eu gostaria de agradecer a todos os membros e amigos do LAFAM Laboratório de Análise Farmacêutica e Ambientais do Departamento de Farmácia, que conheci

durante este período na UFG. São pessoas boas que compartilharam comigo a rotina no laboratório por um curto período de tempo, mas que deixarão lembranças agradáveis.

Agradeço também ao prof. Drº. Flávio Colmati Júnior do Instituto de Química (IQ) da UFG e aos seus orientandos pela amizade e colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

Eu gostaria de aproveitar esta oportunidade para oferecer meus sinceros agradecimentos a um número de pessoas sem cuja ajuda não seria possível a realização dessa tese. Meus pais e familiares sempre foram uma fonte importante de incentivo e apoio. Nada que eu possa dizer pode justificar como me sinto sobre o apoio deles ao longo de toda a minha vida.

SUMÁRIO.....	VII
TABELAS, FIGURAS E ANEXOS.....	VIII
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	XI
RESUMO.....	XV
ABSTRACT.....	XVI
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 BALANÇO ANTIOXIDANTE.....	2
1.2 COMPOSTOS FENÓLICOS.....	3
1.2.1 Fenóis Simples.....	4
1.2.2 Polifenóis.....	6
1.3.FONTES NATURAIS DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	17
1.4.FONTES SINTÉTICAS DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	22
1.5.MÉTODOS PARA ANÁLISE DE ANTIOXIDANTES.....	22
1.5.1 Ensaio Espectrofotométrico.....	23
1.5.2 Métodos cromatográficos.....	27
1.5.3 Métodos Eletroquímicos.....	27
2 OBJETIVOS.....	43
3 MÉTODOS.....	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5 CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXOS.....	76

Tabela 1 - Classificação simplificada de compostos fenólicos	4
Tabela 2 - Ácidos fenólicos encontrados em plantas	5
Tabela 3 - Derivados mais comuns do ácido hidroxicinâmico	6
Tabela 4 - Estrutura química das flavonas	8
Tabela 5 - Estrutura química dos flavonóis	9
Tabela 6 - Estrutura química dos flavanóis	9
Tabela 7 - Estrutura química das flavanonas	10
Tabela 8 - Estrutura química das isoflavonas	10
Tabela 9 - Estrutura química das antocianinas	11
Table 10 - Composição dos eletrodos de pasta de carbono modificados com extrato bruto da lacase e diferentes materiais	50
Figura 1 - Estruturas químicas de ácidos fenólicos. a) Ácidos hidroxibenzóicos, b) Ácidos hidroxicinâmicos	5
Figura 2 - Estrutura básica dos flavonóides	7
Figura 3 - Estruturas químicas de flavonóides.	7
Figura 4 - Subgrupos maiores de flavonóides, juntamente às suas estruturas gerais e benefícios à saúde	12
Figura 5 - Divisão dos taninos hidrolisáveis	14
Figura 6 - Estrutura química de tanino condensado	15
Figura 7 - Biossíntese da dihidroxifenilalanina a partir da tirosina	16

- Figura 8 - Frutos vermelhos reconhecidamente ricos em 18
polifenóis
- Figura 9 - Padrão de potenciais aplicados ao eletrodo de 30
trabalho na voltametria cíclica. Potencial inicial na
região anódica, potencial de inversão na região
catódica e potencial final em região anódica
- Figura 10 - Descrição de processos reversíveis e irreversíveis 32
usando voltamogramas de voltametria cíclica
- Figura 11 - Padrão do potenciais de pulso em voltametria de 33
pulso diferencial. Voltametria de pulso diferencial. (a)
Esquema de aplicação de potenciais; (b) Perfil
esquemático $I-E$
- Figura 12 - Padrão de potencial aplicado no eletrodo de trabalho 35
em voltametria de Onda Quadrada. (a),
Voltamograma de Onda Quadrada (I vs E) indicando a
corrente total (ΔI) ; (b), anódica ou de oxidação I_1 e
catódica ou de redução I_2
- Figura 13 - Voltamogramas de pulso diferencial para amostras de 37
vinhos tinto (-----) e branco (- - -). Picos de corrente
anódica (1a, 2a, 3a) e ombro anódico (1a,s)
- Figura 14 - Voltamograma esquemático com parâmetros 39
eletroquímicos para obtenção do índice eletroquímico

- Anexo 1 - Electroanalysis for Quality Control of Acerola 80
(*Malpighia emarginata*) Fruits and their Commercial Products. Stephen Rathinaraj Benjamin, Jerônimo Raimundo de Oliveira Neto, Isaac Yves Lopes de Macedo, Maria Teresa Freitas Bara, Luiz Carlos da Cunha, Luiz Alcir de Faria Carvalho, Eric de Souza Gil; *Food Analytical Methods*, January 2015, Volume 8, Issue 1, pp 86-92.
- Anexo 2 - Carbon paste based biosensors for antioxidant 88
capacity. Luane Ferreira Garcia; Flávio Marques Lopes, Mariângela Fontes Santiago; Stephen Rathinaraj Benjamin; Jhébica Cavalcante de Souza Golveia; Eric de Souza Gil. *International Journal of electrochemical science*, 2015, Volume 10, pp 5650-5660.
- Anexo 3 - Electrochemical behavior and determination of major 100
phenolic antioxidants in selected coffee samples. Stefani Garcia Rezende; Jerônimo Raimundo Oliveira-Neto; Carolina de Fátima Reis; Stephen Rathinaraj Benjamin, Matheus Lavorenti Rocha; Eric de Souza Gil. *Food Chemistry*, 2016, Volume 190, pp 506–512.

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

E	Potencial
E^0	Potencial padrão
R	Constante dos gases
N	Número de elétrons
F	Constante de Faraday
a_i	Atividade iônica
T	Temperatura termodinâmica
C	Coulomb
nm	Nanômetros
$U \text{ mL}^{-1}$	Unidade de atividade enzimática por mililitro
$U \text{ L}^{-1}$	Unidade de atividade enzimática por litro
μA	Microampére
μM	Micromolar
pM	Picomolar
V	Volts
L	Litro
%	Porcentagem
mg	Miligrama
Kg	Quilograma

cm	Centímetro
m	Metro
AA	Ácido Ascórbico
ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
CAPEs	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COX 1	Ciclo-oxigenase 1
COX 3	Ciclo-oxigenase 3
CRAC	<i>Ceric Reducing Antioxidant Capacity</i>
DAD	Detector de arranjo de diodos
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DOPA	3,4-di-hidroxifenilalanina
ELB	Eletrodeposição de Langmuir-Blodgett
EM	Espectrometria de massa
EPC	Eletrodo de Pasta de Carbono
EPCL	Eletrodo de Pasta de Carbono com Lacase
EPCL-DCN	Pasta de carbono com lacase suportado em nanotubos de carbono ativados com DNA

ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ESNC	Eletrodo Sonogel de Carbono
EC ₅₀	Concentração Efetiva 50%
EI	Índice Eletroanalítico
E _{pa}	Potencial de pico anódico
FC	Folin–Ciocalteu
FT	Fenóis totais
GA	Ácido gálico
GAE	Equivalente de ácido gálico
ICO	<i>International Coffee Organization</i>
IEQ	Índice eletroanalítico quantitativo
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
I _{pa}	Corrente de pico anódico
LAFAM	Laboratório de Análises Farmacêuticas e Ambientais
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de quantificação
PG	Propil galato
PN	Produtos naturais
pH	Potencial hidrogeniônico
R _{eq}	Equivalentes de rutina
rpm	Rotações por minuto

TBHQ	Terc-butil-hidroquinona
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
UFG	Universidade Federal de Goiás
USP	<i>United States Pharmacopoeia</i>
VC	Voltametria cíclica
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial
VOQ	Voltamograma de Onda Quadrada
ΔE_p	Varição de potencial de pico

Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para avaliação da capacidade antioxidante

Benjamin S.R.¹

¹Laboratório de Análises Farmacêuticas e Ambientais (LAFAM), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás.

RESUMO

Neste trabalho foram realizados ensaios de atividade antioxidante em amostras de acerola, café, bem como de outros extratos secos de frutos vermelhos, empregando-se eletrodos convencionais de pasta de carbono (EPC), bem como biossensores de EPC modificados com extrato bruto de lacase (EPCL), partindo de *Pycnoporus sanguineus* (atividade 2019 U L⁻¹) em diferentes composições com e sem uso de agentes modificadores, visando avaliar melhor sistema. Para além consolidar o uso de métodos eletroanalíticos, *i.e.* voltametria cíclica (VC), voltametria de onda quadrada (VOQ) e pulso diferencial (VDP), na análise de produtos naturais, seja para avaliar perfil antioxidante, seja para inferir sobre classes de antioxidantes presentes nas amostras, pode-se neste estudo avaliar o papel de diferentes agentes modificadores. O biossensor constituído de nanotubos de carbono ativado com DNA (EPCL-DNA) apresentou o melhor nível de sensibilidade 0,0549 µA/µM e um limite de detecção (LOD) de 1,2 µM no intervalo de concentração de 20-140 µM de rutina. Além disso, o biossensor mostrou ter uma excelente estabilidade ao longo de 10 dias e reprodutibilidade (RSD < 5%). Para a avaliação da sua capacidade de detecção, os resultados obtidos foram comparados com outras técnicas eletroanalíticas usando como base analítica amostras do café comercial de diferentes países. O EPCL-DNA foi empregado para determinar a quantidade de fenol total nas amostras de café (expressa pelo equivalente de rutina). Com isso, foi possível propor os EPCL como ferramenta analítica para a detecção dos fenóis. A determinação quantitativa desses compostos foi realizada através da construção de curvas de calibração para VPD e o índice eletroquímico foi proposto para estimar o potencial antioxidante entre diferentes amostras. Também foi investigado o uso de EPC para o controle de qualidade de diferentes produtos obtidos a partir da acerola, empregando VPD para a quantificação de ácido ascórbico (AA) em todas as amostras, onde os limites de detecção (LD) e o Limite de quantificação (LQ) foi de 0,31 e 0,96 µM respectivamente e com uma excelente taxa de recuperação entre 97,4-102,2%. Os ensaios de DPPH foram utilizados para comparar a atividade antioxidante nas amostras de café e acerola. O método de Folin-Ciocalteu foi usado para estimar a atividade antioxidante da rutina nas amostras de café. Pode concluir-se que os métodos propostos apresentaram vantagens, como a simplicidade na preparação das amostras e a rapidez do ensaio da capacidade antioxidante.

Palavras-Chave: eletrodo de pasta de carbono; voltametria de pulso diferencial; DPPH; atividade antioxidante; biossensor.

Development and evaluation of electro analytical methods of antioxidant capacity**Benjamin S.R.¹**

¹Laboratório de Análises Farmacêuticas e Ambientais (LAFAM), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás.

ABSTRACT

This study investigated the antioxidant activity using biosensors based on carbon paste electrode (CPE) modified with crude extract of laccase (*Pycnoporus sanguineus*, activity 2019 U L⁻¹) in different compositions. The biosensor consists of carbon nanotubes activated with DNA (CPEL-DNA: CN) showed the best sensitivity level, 0.0549 $\mu\text{A} / \mu\text{M}$ and 1.2 μM detection limit (LOD) in the concentration range of 20-140 μM of rutin. This biosensor showed excellent stability over 10 days and reproducibility (RSD <5%). This biosensor was used to determine the total amount of phenol in coffee samples (expressed by the equivalent rutin) using electroanalytical technique. For the evaluation of its detection capability, the results were compared with other electroanalytical techniques using analytical basis as samples of commercial coffee from different countries. The CPL-DNA: CN was used to determine the total amount of phenol in coffee samples (expressed by the equivalent rutin). Thus, it was possible to propose the CPL as an analytical tool for the detection of phenols. In this research, we developed several studies using different CPE to investigate the antioxidant natural product profile such as coffee samples, dry extracts of acerola, obtained by cyclic voltammetry (CV), differential pulse voltammetry (DPV) and square wave voltammetry (SWV), which allowed to conclude classes of antioxidants present in the samples. The quantitative determination of these compounds was performed using the standard addition method by differential pulse voltammetry and electrochemical index (*EI*) has been proposed for estimating the oxidizing potential between different samples. Carbon paste electrode was also investigated using the different quality control samples commercialized produced from acerola employing DPV for the quantification of ascorbic acid (AA) in all samples, where the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) was 0.31 and 0.96 μM and with excellent recovery between 97.4 to 102.2%. The DPPH tests were used to compare the antioxidant activity in coffee and acerola samples. The Folin-Ciocalteu method was used to estimate the antioxidant activity of rutin from coffee samples. These methods proposed had advantages such as simplicity of sample preparation and the speed of the analysis of antioxidant capacity.

Keywords: carbon paste electrode, differential pulse voltammetry, DPPH, antioxidant activity, biosensor.

1. INTRODUÇÃO

Vários estudos sobre a propagação de doenças sugerem que uma das formas de prevenção é o consumo de produtos naturais (PN), fonte de substâncias com alto poder antioxidante, incluindo determinados tipos de frutas, chás, legumes e grãos reduz significativamente a incidência de doenças crônicas e patologias relacionadas ao envelhecimento. Estes benefícios estão associados à presença de ativos de reconhecida capacidade antioxidante. O estudo da ação antioxidante e a determinação destes ativos são úteis para avaliação da eficácia e controle de qualidade destes compostos ou produtos, requerendo diferentes métodos analíticos, os quais podem ser destacados os métodos colorimétricos, biológicos e eletroquímicos, dentre vários outros métodos instrumentais.

As técnicas eletroquímicas apresentam vantagens para caracterização detalhada de fitoantioxidantes, pois fornecem parâmetros físico-químicos capazes de mostrar não apenas o potencial redox, mas também números de elétrons envolvidos na etapa de transferência de carga (n), mecanismos de transferência de carga e influência de prótons, constantes de reação, etc.

Entretanto, atualmente, Os métodos mais usados para determinação de atividade antioxidante não são eletroquímicos, são métodos espectrofotométricos, dentre eles o ABTS (2,2'-azinobis-(3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), o DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e o método de Folin-Ciocalteu. Eles são métodos eficientes para essa determinação e já consagrados pelo uso, mas apresentam algumas limitações é a baixa de sensibilidade e especificidade.

Os métodos eletroanalíticos, por sua vez, representam uma alternativa para determinação da atividade antioxidante em amostras complexas. Esses métodos simples, baratos e “limpos”, por utilizarem pouca quantidade de reagentes, sendo a maioria deles não tóxicos. A voltametria é uma das técnicas eletroanalíticas que pode ser utilizada para a determinação da atividade antioxidante. Esta técnica estuda os fenômenos que ocorrem na interface entre o eletrodo e solução e se baseia em três parâmetros que ocorrem durante a eletrólise: a corrente elétrica, a voltagem e o tempo.

Algumas variações na forma de se aplicar o potencial ao eletrodo determinam variações nas técnicas eletroanalíticas, dentre elas voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial (VPD) e a voltametria de onda quadrada (VOQ).

Neste estudo, foi proposto um índice eletroanalítico quantitativo (IEQ), determinado com base nos principais parâmetros da voltametria, no potencial de oxidação e na intensidade de corrente de picos observados. Para a proposição do IEQ, uma quantidade selecionada de amostras de café e de acerola a partir de diferentes fontes foi utilizada a fim de avaliar e comparar as taxas obtidas para eles e, conseqüentemente, avaliar a influência de vários fatores, como: a região de produção, atividade antioxidante da variedade e o tipo de amostra.

Nestas análises, foram utilizados métodos estabelecidos para a determinação da atividade antioxidante e também métodos eletroanalíticos, ainda considerado inovador para esta finalidade e desenvolvimento amplo.

1.1 BALANÇO ANTIOXIDANTE

Estudos epidemiológicos revelam que dietas ricas em produtos naturais, como frutos e vegetais, evitam o envelhecimento precoce e auxiliam na prevenção de diversas doenças crônicas degenerativas causadas pelo estresse oxidativo, como câncer, aterosclerose, diabetes, asma, rinite, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (SHA LI *et al.* 2013; PERTUZATTI *et al.* 2014; LOPÉZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013; DENG *et al.* 2013; MORALES-SOTO *et al.* 2014).

O estresse oxidativo é uma condição de desequilíbrio metabólico que pode ser decorrente do aumento da produção endógena de radicais livres e/ou da ineficiência intrínseca dos sistemas naturais de defesa antioxidantes. O dano oxidativo atribuído aos radicais livres, e/ou espécies reativas de oxigênio (ERO) sobre biomoléculas específicas que compõe sistemas fisiológicos vitais são responsáveis pelos efeitos deletérios ao organismo (BLOMHOFF *et al.* 2010; LAIDLER *et al.* 2003).

Os radicais livres e em especial as ERO podem ser gerados a partir de agentes externos e internos (fatores endógenos e exógenos). A produção endógena de radicais livres derivados do oxigênio, ocorre naturalmente nos processos metabólicos essenciais, principalmente no metabolismo energético mitocondrial, nas bioconversões catalíticas hepáticas e nos quadros infecciosos de causas parasitárias ou não. Além da geração endógena de radicais, agentes externos como a poluição ambiental, a radiação ionizante, substâncias tóxicas e irritantes, o consumo excessivo de álcool e uso de entorpecentes constituem agentes de risco (EVANS *et al.* 1999; GORDON, 2012).

Uma grande variedade de compostos antioxidantes, endógenos ou provenientes da dieta, compõe um sistema eficiente e complexo na defesa do organismo à ação dos radicais livres. Este sistema antioxidante constitui-se de uma grande variedade de compostos bioativos tais como: vitaminas (A, C, E, K), glutathiona, sais minerais, metaloproteínas, enzimas (SOD-superóxido Dismutase) e polifenóis. Este sistema é composto por macromoléculas e moléculas de baixo peso molecular, elementos enzimáticos e não-enzimáticos que atuam simultaneamente em prol da homeostase do balanço oxidativo (SHA LI *et al.* 2013).

A atividade antioxidante de um composto é atribuível a qualquer substância que mesmo presente em concentrações menores que o substrato oxidável seja capaz de diminuir ou inibir sua capacidade como agente oxidante. Tais substâncias podem atuar diretamente, neutralizando a ação dos radicais livres e prevenindo a oxidação de biomoléculas específicas. Por sua vez, as moléculas de baixo peso molecular podem também contribuir indiretamente atuando no sistema enzimático antioxidante seja restaurando, seja ativando enzimas (BLOMHOFF, 2010; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

Dentre os antioxidantes exógenos, os compostos fenólicos, flavonóides e antocianinas presentes em frutos (PERTUZATTI *et al.* 2014; SHA LI *et al.* 2013), vegetais (DENG *et al.* 2013), cereais (SHA LI *et al.* 2013), microalgas e fungos comestíveis (SHA LI *et al.* 2013), vinhos, infusões de plantas medicinais (LI *et al.* 2014; SHA LI *et al.* 2013), extratos, alimentos funcionais, entre outros produtos naturais. Destacam-se pelo poder redutor e o comportamento redox reversível, o qual os tornam capazes não apenas de neutralizar ROS, como também, de regenerar biomoléculas endógenas do sistema antioxidante (SHA LI *et al.* 2013).

1.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

Em seu processo evolutivo as plantas selecionaram mecanismos moleculares, principalmente na via do chiquimato, que as tornaram capazes de produzir uma enorme variedade de compostos fenólicos como metabólitos secundários. Apesar de não serem essenciais aos processos primários de crescimento e desenvolvimento esses metabólitos são de grande importância na interação da planta com o ambiente. Essa característica única e típica das plantas produz uma gama vasta e diversificada de compostos fenólicos ubíquos no Reino vegetal, e incomuns em bactérias, fungos e algas (CHEYNIER *et al.* 2013).

Dessa forma, tal característica satisfaz uma gama muito ampla de papéis fisiológicos em plantas. Estas vias produzem uma enorme quantidade de estruturas monoméricas e poliméricas. A grande variedade estrutural de compostos fenólicos naturais pode ser agrupada em duas classes principais (tabela 1): fenóis simples e polifenóis.

Tabela 1- Classificação simplificada de compostos fenólicos

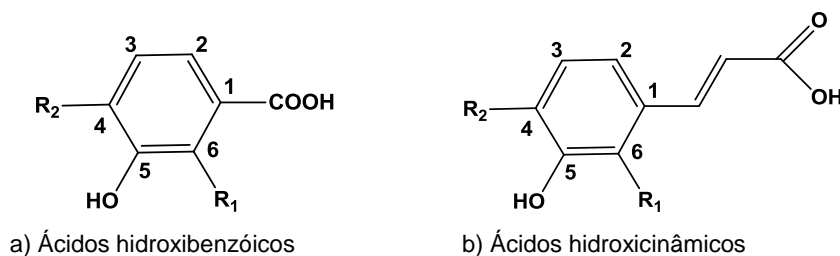
Classificação dos níveis estruturais dos compostos fenólicos		
Fenóis Simples	Ácidos fenólicos	
	Ácidos cinâmicos	
Polifenóis	Flavonóides	Flavonas
		Flavonóis
		Flavanonas
		Flavanóis
	Taninos	Isoflavonóides
		Antocianinas
		Hidrolizáveis
		Condensados
Melaninas		

1.2.1 Fenóis Simples

Os fenóis simples são quimicamente compostos fenólicos, uma classe de compostos químicos que consistem em um grupo hidroxila ligado diretamente a um grupo hidrocarboneto aromático.

Os fenóis simples são monômeros de compostos presentes em muitos tecidos vegetais (BRIELMANN, 1999). Dentre estes, os ácidos fenólicos podem ser classificados como derivados de ácidos hidroxibenzoicos (C_6-C_1) e hidroxicinâmicos (C_6-C_3) (KING; YOUNG, 1999) (figura 1). Eles são caracterizados por possuírem um anel de benzeno, um grupo ácido carboxílico e um ou mais grupos hidroxilo e metoxilo na molécula, proporcionando propriedades antioxidantes tanto como alimento para o organismo, sendo por isso indicados para o tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e outras doenças (KERRY; ABBEY, 1997; BRAVO, 1998; CROFT 1998; FERGUSON; HARRIS, 1999).

Figura 1 - Estruturas químicas de ácidos fenólicos. a) Ácidos hidroxibenzóicos, b) Ácidos hidroxicinâmicos.



Os ácidos fenólicos são divididos em dois grupos: i) O primeiro grupo consiste em ácido benzóico, que possui sete átomos de carbono (C1 -C6); ii) O segundo grupo é formado por ácidos cinâmicos (figura 1-b) que têm nove átomos de carbono (C3 -C6). O primeiro grupo, são os ácidos fenólicos simples encontrados na natureza; fórmulas e as suas designações são apresentadas na figura 1-a.

Ácidos fenólicos, além de estarem presentes na sua forma natural, também podem ligar-se entre si ou com outros compostos. O mais importante destes ácidos conjugados são derivados de ácido caféico, ácido quínico e ácido clorogénico, ácido elágico, verbacósido etc.

Alguns exemplos de compostos do grupo do ácido benzóico incluem os ácidos gálico, p-hidroxibenzóico, protocatecuico e vanílico (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006a). O nível de ácidos hidroxibenzóicos e seus derivados em plantas comestíveis é muito baixo com exceção de certos frutos vermelhos, rabanete preto e cebolas (MANACH *et al.* 2004). As estruturas químicas das principais classes de ácidos fenólicos estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2 - Ácidos fenólicos encontradas em plantas

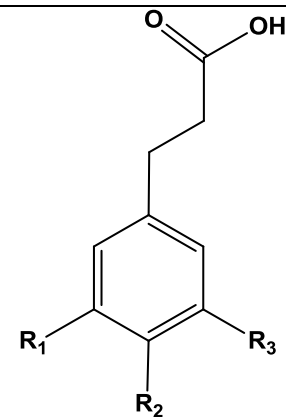
	Composto	R ₁	R ₂	R ₃
		Ácido gálico	OH	OH
	Ácido parahidroxibenzóico	H	OH	H
	Ácido protocatecuico	H	OH	OH
	Ácido vanílico	H	OH	OCH ₃

Já o segundo grupo é formado por ácidos hidroxicinâmicos (figura 1-b), sendo estes mais comumente encontrados no reino vegetal, inclusive de plantas comestíveis, que os

hidroxibenzóicos (MANACH, 2004; WROLSTAD, 2004). Os ácidos hidroxicinâmicos mais comuns são o caféico, cinâmico, p-cumárico, ferúlico, 5-hidroxiferúlico e o sinápico (tabela 3), com a maioria das plantas contendo no mínimo três desses compostos (VERMERRIS, NICHOLSON, 2006a).

Os ácidos hidroxicinâmicos encontrados nas plantas são normalmente glicosilados ou esterificados. Contudo, as formas livres são encontradas nos alimentos processados que receberam tratamento a quente, fermentação ou congelamento (MANACH *et al.* 2004). O ácido caféico, na forma livre e esterificada (isto é ácido clorogênico), compreende cerca de 75-100% do conteúdo de ácidos hidroxicinâmicos encontrados na maioria das frutas (MANACH *et al.* 2004). Embora os derivados de ácido hidroxicinâmico (tabela 3) possam estar presentes em todo o fruto, as maiores concentrações são encontradas na porção externa, no pericarpo (MANACH *et al.* 2004).

Tabela 3 - Derivados mais comuns do ácido hidroxicinâmico

	Composto	R ₁	R ₂	R ₃
	Ácido caféico	H	OH	OH
Ácido cinâmico	H	H	H	
Ácido ferúlico	H	OH	OCH ₃	
Ácido 5-hidroxiferúlico	OH	OH	OCH ₃	
Ácido p-cumárico	H	OH	H	
Ácido sinápico	OCH ₃	OH	OCH ₃	

1.2.2 Polifenóis

O termo "polifenóis" faz referência aqueles com mais de um anel fenólico. Essas estruturas químicas promovem proteção contra UV e conferem as cores laranja, vermelha, azul e roxa presentes em diversos tecidos vegetais (CHEYNIER *et al.* 2013), decorrentes da conjugação dos elétrons nos anéis fenólicos.

Os polifenóis incluem dentre outras classes, os flavonoides, taninos e melaninas (BRAVO, 1998).

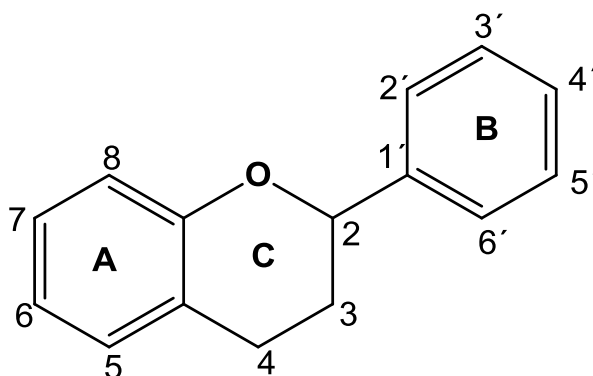
1.2.2.1 Flavonóides

Os flavonóides correspondem ao grupo de compostos fenólicos mais diversificado e onipresente no reino vegetal incluindo várias subclasses de compostos que, além de

possuírem similaridade estrutural, se destacam pela alta atividade antioxidante deste grupo.

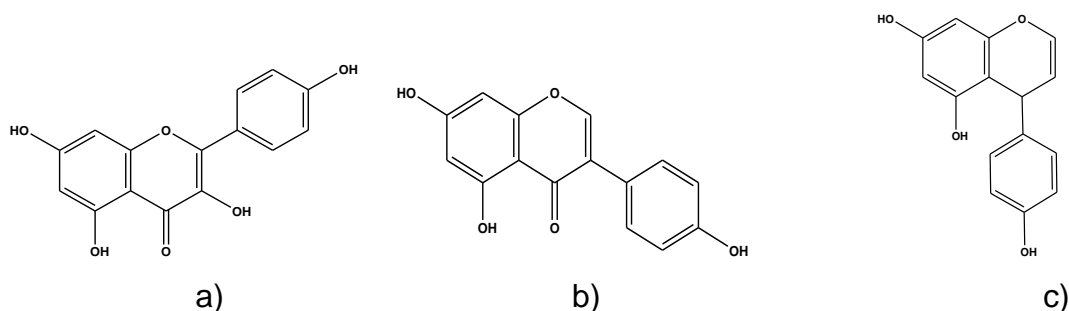
Os flavonóides e seus conjugados formam um grande grupo de moléculas naturais com mais de 10.000 estruturas diferentes identificadas e presentes em produtos naturais. Esse grupo de substâncias pode ser encontrado nos mais diversos tecidos vegetais, tanto no interior das células quanto na superfície dos diferentes órgãos da planta. A estrutura molecular básica dos flavonóides consiste de um esqueleto difenilpropano ($C_6-C_3-C_6$) com dois anéis benzênicos (A e C) ligados por um heterociclo oxigenado (B) (URQUIAGA; LEIGHTON, 2000) como pode ser verificado na figura 2. De forma geral, as antocianinas são os pigmentos responsáveis pelas colorações vermelha, azul e lilás comumente encontradas nas plantas. E as antoxantinas, por sua vez, apresentam coloração que varia de branca a amarela.

Figura 2 - Estrutura básica dos flavonóides



Dependendo da posição de ligação do anel aromático à porção benzopirano, este grupo pode ser dividido em três classes principais (figura 3): flavonóides (2-fenilbenzopiranos), isoflavonóides (3-fenilbenzopiranos) e neoflavonóides (4-fenilbenzopiranos).

Figura 3 - Estruturas químicas de flavonóides. a) 2-fenilbenzopiranos; b) 3-fenilbenzopiranos (isoflavonóides); c) 4-fenilbenzopiranos

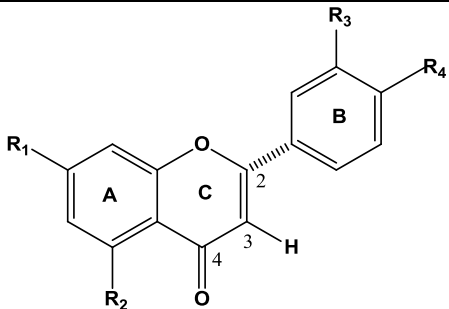


O 2-fenilbenzopiranos (flavonóides, propriamente dito), constituem o grupo de compostos fenólicos mais comuns e distribuído no reino vegetal podendo ser subclassificado em antoxantinas e antocianinas. Além disso, devido à complexidade estrutural desses compostos naturais, a classe das antoxantinas pode ainda ser subdividida em quatro classes correspondentes aos grupos estruturais: flavonas, flavonóis, flavanóis e isoflavonóides (KING; YOUNG, 1999).

1.2.2.1.1 FLAVONAS

As flavonas constituem a subclasse de antoxantinas que diferenciam-se estruturalmente dos demais flavonóides por apresentarem insaturação e grupamento cetona nas posições 2 e 4 do anel C, respectivamente (COWAN, 1999). Na tabela 4 são mostradas as estruturas químicas das flavonas apigenina e luteolina, dois dos representantes mais conhecidos desses flavonóides sendo encontrados, em elevado teor, em alimentos como salsa e azeitonas (KING; YOUNG, 1999).

Tabela 4 - Estrutura química das flavonas

	Flavonas	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Luteolina	OH	OH	OH	OH	OH
Apigenina	OH	OH	H	OH	OH

1.2.2.1.2 FLAVONÓIS

Os flavonóis são a subclasse mais disseminada de flavonóides na natureza. Estruturalmente, diferenciam-se das demais antoxantinas pela presença dos grupos enol e cetona, respectivamente, nas posições 3 e 4 do anel C que compõe a estrutura molecular básica dos flavonóides (COWAN, 1999). Na tabela 5 são mostradas as estruturas químicas de representantes de flavonóis. Dentre a grande variedade de flavonóis, os principais compostos e mais conhecidos são a quercetina, o kampferol e a miricetina. As cebolas, as maçãs, couves e os chás, de modo geral, são considerados alimentos ricos nessas espécies moleculares (KING; YOUNG, 1999).

Tabela 5 - Estrutura química dos flavonóis

Flavonóis	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Quercetina	OH	OH	OH	OH	H
kaempferol	OH	OH	H	H	H
Miricetina	OH	OH	OH	OH	OH

1.2.2.1.3 FLAVANÓIS

Os flavanóis são antoxantinas que se diferenciam estruturalmente das demais subclasses pela presença de um grupo hidroxila na posição 3 e insaturação na ligação das posições 3 e 4, ambos do anel C, na estrutura molecular básica dos flavonóides (EVANS et al. 1997). Os representantes moleculares mais amplamente estudados são a catequina e a epicatequina (tabela 6) que diferem apenas pela posição planar do grupo OH do carbono 3. Na natureza, esses flavanóis podem estar associados com moléculas de ácido gálico, como ocorre nos chás de forma geral, ou formando polímeros de taninos condensados como ocorre em frutos, legumes e grãos (KING; YOUNG, 1999).

Tabela 6 - Estrutura química dos flavanóis

Flavanóis	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Catequinas *	OH	OH	OH	OH
Epicatequinas **	OH	OH	OH	OH

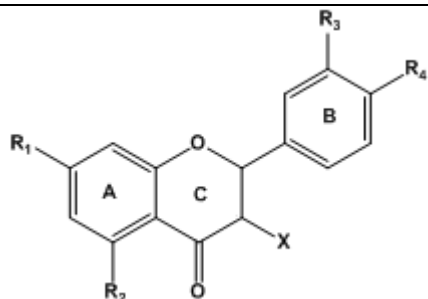
1.2.2.1.4 FLAVANONAS (FLAVANONÓIS E DI-HIDROFLAVONÓIDES)

As flavanonas são caracterizadas pela ausência da dupla ligação (olefínica) nos carbonos 2 e 3, possibilitando o posicionamento do anel B em posição R ou S. Também é caracterizado pela ausência de hidroxila na posição 3. Na tabela 7 são mostradas as estruturas químicas das flavanonas. As flavanonas são intermediários biossintéticos da maioria das classes de flavonóides. Podem possuir sabor amargo ou doce, devido as

configurações estereoquímicas, agindo como defesa a herbivoria e, ao mesmo tempo, como alimento (SANTANA, 2008).

Tabela 7- Estrutura química das flavanonas

Flavanonas	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	X
Taxifolina	OH	OH	OH	OH	OH
Naringenina	OH	OH	H	OH	H

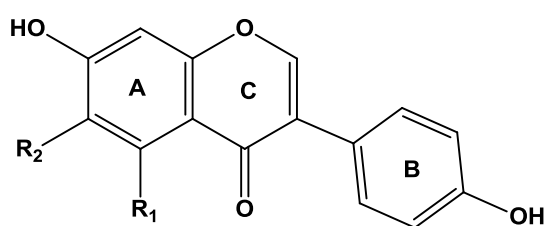


1.2.2.1.5 ISOFLAVONAS

As isoflavonas são antoxantinas que diferenciam-se das demais subclasses por apresentarem o anel B, da estrutura molecular básica dos flavonóides, ligado na posição 3 do anel C, diferentemente, das demais classes que liga-se na posição 2 dessa mesma estrutura (EVANS *et al.* 1997). Na tabela 8 são mostradas as estruturas químicas das isoflavonas. As Isoflavonas são os flavonóides mais comumente encontrados em leguminosas, especialmente nos grãos de soja, onde a genisteína e a daidzeína são as substâncias mais conhecidas (KING; YOUNG, 1999).

Tabela 8 - Estrutura química das isoflavonas.

Isoflavonóides	R ₁	R ₂
Daidzeína	H	H
Genisteína	OH	H



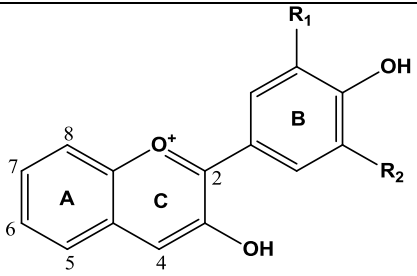
1.2.2.1.6 ANTOCIANINAS

Antocianinas são um grupo de pigmentos solúveis em água responsáveis pelas colorações vermelha e lilás presentes em flores e frutos. Esses flavonóides são considerados o grupo mais importante de compostos fenólicos presentes em alimentos, os quais apresentam múltiplos padrões de substituição. O termo antocianina refere-se ao glicosídeo da antocianidina substituída na posição 3 e/ou 5 com carboidratos como

glicose, galactose, arabinose e di e trissacarídeos (KRENN *et al.* 2007). Na tabela 9 são apresentadas as estruturas químicas das antocianinas.

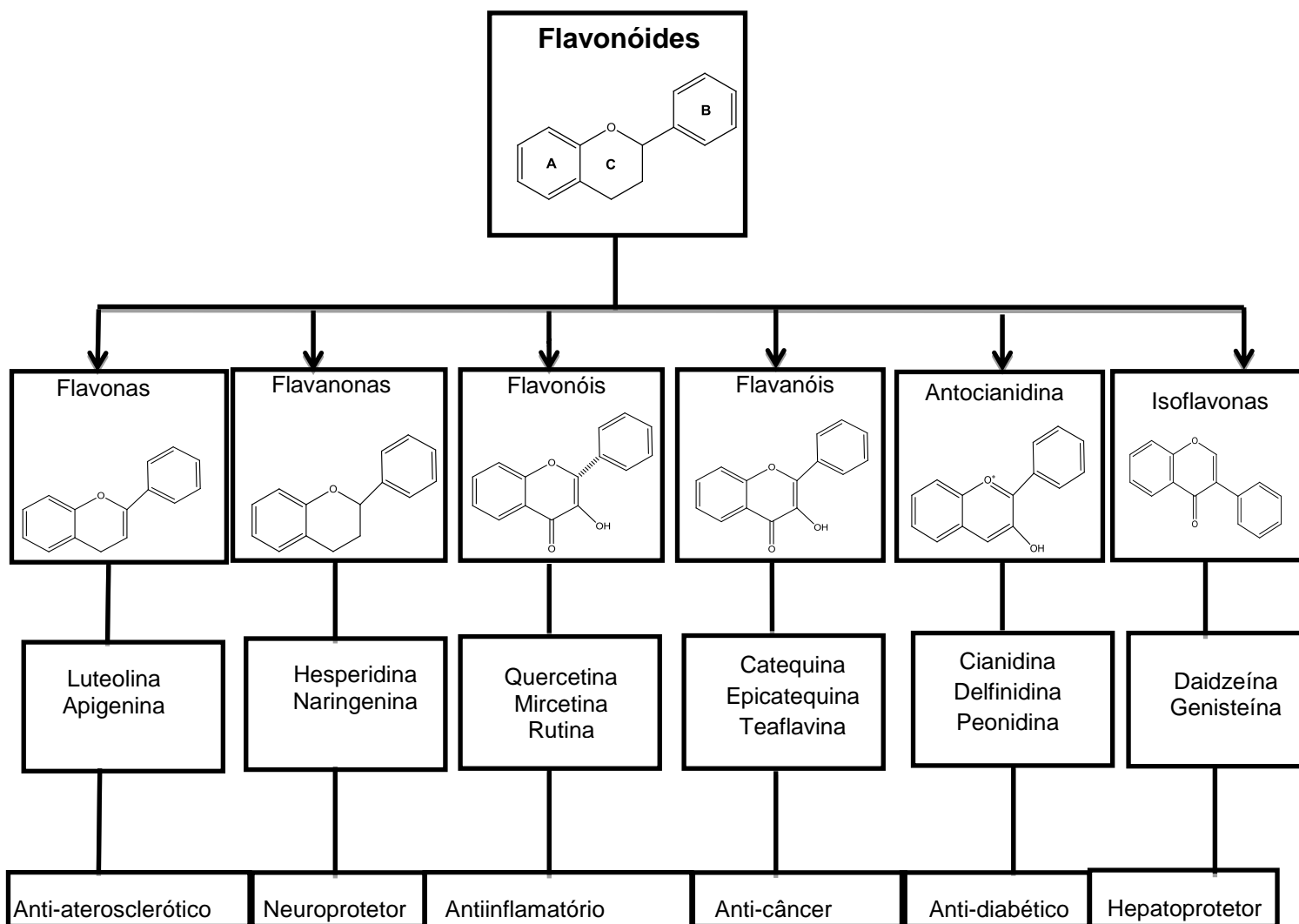
A coloração das antocianinas depende de fatores químicos do meio incluindo o pH, presença de íons metálicos e diferenças no padrão de substituição dos carboidratos (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006). Esses compostos podem existir em uma variedade de formas químicas que resultam em compostos coloridos ou incolores com base nas condições do meio (MANACH *et al.* 2004). Em valores de pH menores que três, antocianinas são vermelhas e tornam-se incolores no intervalo de pH de 4 a 5 com o cátion *flavílio* sofrendo conversão a base carbinol (pseudobase). Em valores de pH superiores a seis, uma coloração azul/lilás é formada devido à presença de uma base quinoidal (bases anidra) (MANACH *et al.* 2004; KRENN *et al.* 2007).

Tabela 9 - Estrutura química das antocianinas

	Antocianinas	R ₁	R ₂
	Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	HO	
Peonidina	OMe	H	

Como já foi dito, as propriedades dos flavanóides que beneficiam a saúde são muitas e estão em função da sua natureza, na figura 4 é mostrado um gráfico que associa para cada grupo de flavanóides os seus benefícios.

Figura 4 - Subgrupos de flavonóides, juntamente às suas estruturas gerais e benefícios à saúde.



1.2.2.2 Taninos

Taninos são polifenóis de origem vegetal com pesos moleculares de 500-3000 unidades de massa atômica. Os taninos compreendem uma das categorias mais numerosas e amplamente distribuídas no reino vegetal, com mais de 8000 estruturas conhecidas (LIAO *et al.* 2003). Taninos são polifenóis de origem vegetal com pesos moleculares de 500-3000 unidades de massa atômica.

Nas plantas superiores, compreendem dois grandes grupos de metabólitos secundários: os taninos hidrolisáveis e as proantocianidinas também conhecidas como taninos condensados. Recentemente, uma terceira classe de taninos, os florotaninos, foi isolada a partir de vários gêneros de algas. Os florotaninos são constituídos quase que inteiramente por subunidades de floroglucinol ligados, em alguns casos, ligações do tipo C-C e em outros por C-O-C (LIAO *et al.* 2003).

Os taninos hidrolisáveis são clivados por ácidos, bases e, em alguns casos, por enzimas hidrolíticas (tanase) em açúcares, geralmente D-glucose ou outros polióis, e um ácido fenólico. Os galotaninos, por exemplo, são ésteres de poligaloil, ou seja, ácido gálico (HAGERMAN *et al.* 1981).

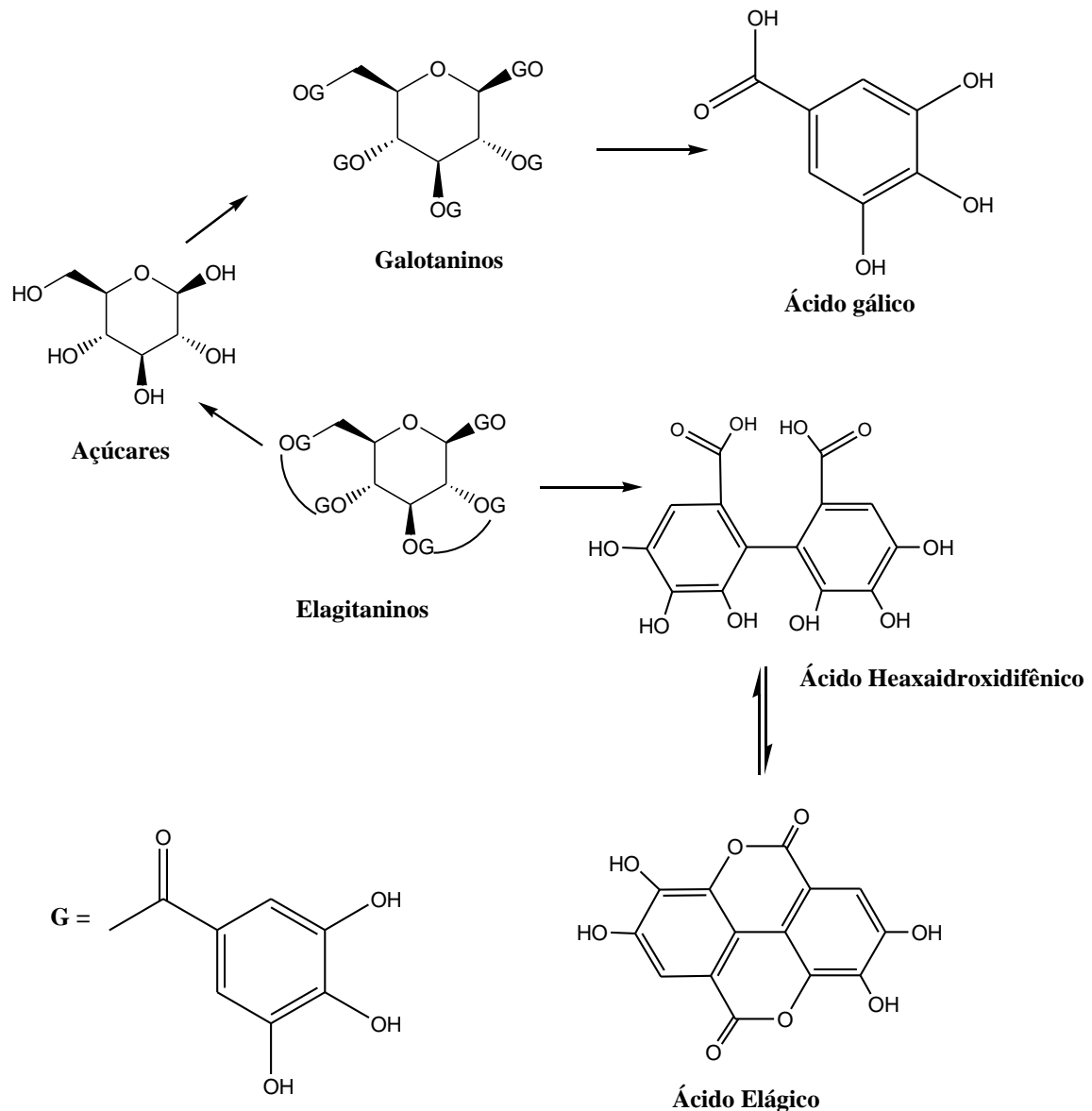
Os elagitaninos, num sentido mais restrito, podem ser definidos como ésteres hexahidroxidifenoil de carboidratos enquanto, numa definição mais ampla, pode abranger também compostos derivados de novas transformações oxidativas (HARVEY, 2001).

Os elagitaninos são taninos formados por ésteres de ácido hexaidroxidifenólico e polióis (glicose ou ácido quínico). Quando expostos a ácidos ou bases, as ligações éster são hidrolisadas e os ácidos hexaidroxidifênicos liberados sofrem rearranjos espontâneos para formar ácido elágico, sendo então denominados taninos hidrolisados (BUENDIA *et al.* 2010). Os monômeros de elagitaninos podem rapidamente se polimerizar e formar outros dímeros, trimeros e oligômeros. Os taninos vegetais têm a capacidade de se complexar com proteínas e carboidratos (CHUNG *et al.* 1998).

1.2.2.2.1 TANINOS HIDROLISÁVEIS

Os taninos hidrolisáveis contêm um núcleo central de polialcoóis como a glicose e grupos hidroxila que estão parcialmente ou completamente esterificados pelo ácido gálico (galotaninos) ou pelo ácido hexaidroxidifênico (elagitaninos). Após a hidrólise por ácidos, bases ou por determinadas enzimas, os galotaninos convertem-se em glicose e ácido gálico. Por sua vez, o ácido hexaidroxidifênico dos elagitaninos sofre lactonação para produzir ácido elágico (CHUNG *et al.* 1998). O esquema da hidrólise dos taninos é apresentado na figura 5.

Figura 5 - Divisão dos taninos hidrolisáveis.

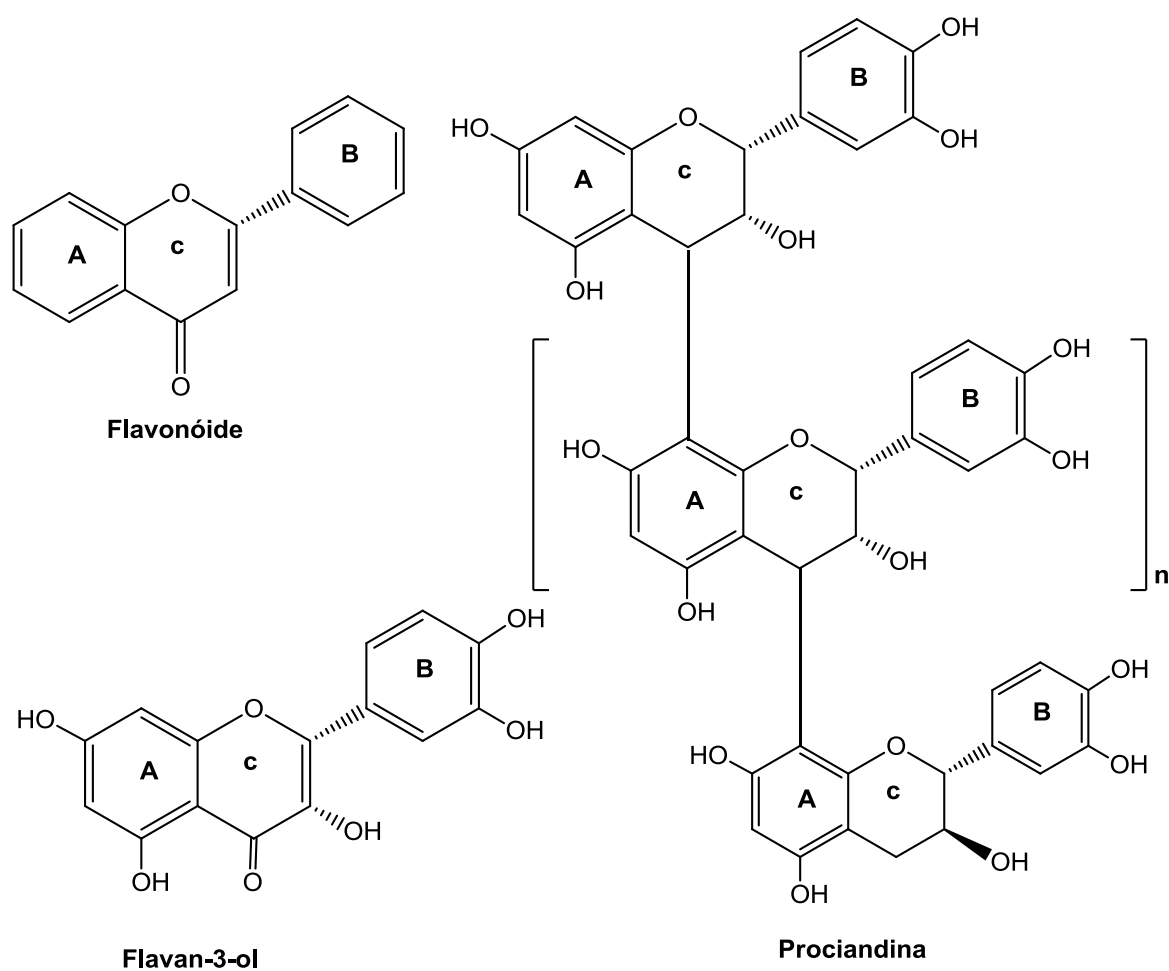


Fonte: Mueller-Harvey, 2001.

1.2.2.2.2 TANINOS CONDENSADOS

Os taninos condensados são estruturas mais complexas que os taninos hidrolisáveis. Suas estruturas completas devem ainda ser determinadas. Os polímeros conhecidos como flavonas são popularmente conhecidos como taninos condensados. Os taninos condensados são largamente distribuídos nas frutas, vegetais, forragens, plantas, cacau, vinho tinto e certos tipos de grãos como sorgo, painço e legumes (CHUNG *et al.* 1998).

Figura 6- Estrutura química de tanino condensado.



Fonte: Mueller-Harvey, 2001.

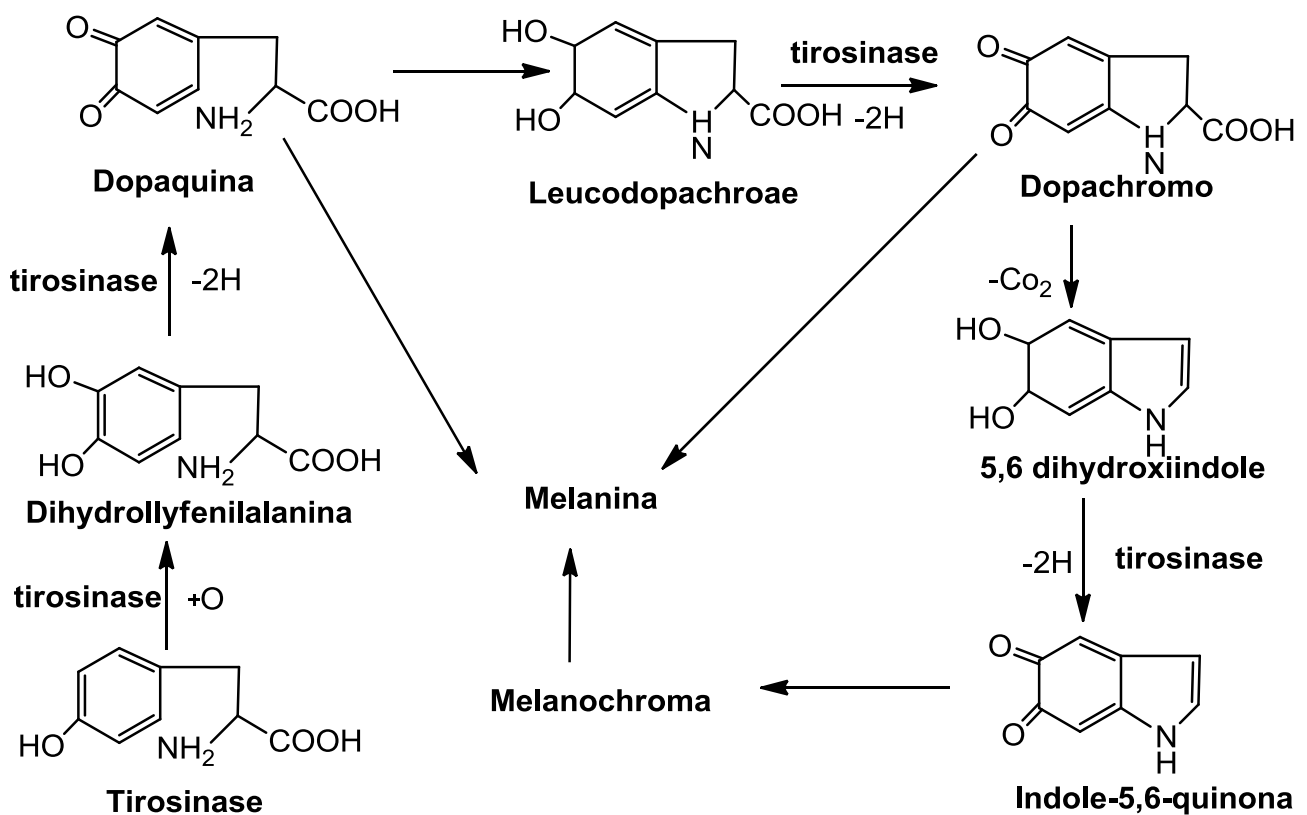
Esses compostos consistem em oligômeros ou polímeros de flavonóides com unidades de flavan-3-ol (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006). As unidades de monômeros são ligadas por condensação oxidativa na posição quatro do anel C e a posição seis ou oito do anel A entre duas unidades adjacentes de flavonóis. Apresentado o esquema geral de condensação na figura 6.

1.2.2.3 Melaninas

As melaninas são pigmentos de elevado peso molecular formados pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos e geralmente são de coloração castanho-escuro ou negro. Em geral, eles são polímeros conjugados de ortodihidroxi-fenóis.

Uma classificação mais geral de tais compostos contém três tipos principais de tais polímeros: as eumelaninas (pretas ou castanhas) que são produzidos durante o processo de oxidação de tirosina e/ou fenilalanina de 3,4-di-hidroxi-fenilalanina (DOPA) e dopaquinona, que sofre uma ciclização ulterior para 5,6-dihidroxi ou 5,6-dihidroxi-2-carboxílico; as feomelaninas (amarelo, vermelho ou marrom) que são inicialmente sintetizadas como eumelaninas, mas a DOPA sofre cisteinilação diretamente ou mediada pela glutatona que então polimeriza; e as alomelaninas (pretas), o grupo mais heterogeneo de polímeros, que surge pela oxidação/polimerização de dihidroxinaftaleno ou tetrahidroxinaftaleno, ácido homogentísico, gamaglutaminil-4-hidroxi-benzeno, ácido 4-hidroxi-fenilacético e catecóis (CHEYNER *et al.* 2013). O esquema da síntese descrita da melanina é mostrado na figura 7.

Figura 7 - Biossíntese da dihidroxi fenilalanina a partir da tirosina.



Fonte: Esquema adaptado de Mason, 1959 e Pawelek e Körner, 1980.

1.3. FONTES NATURAIS DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A natureza fornece a mais diversificada fonte de compostos bioativos, dos quais se destacam aqueles com atividade antioxidante, cujo estudo é de grande importância econômica e científica. (CARVALHO-SILVA *et al.* 2014; GÜNDÜZ; OZDEMIR, 2014). Dentre os produtos naturais ricos em antioxidantes, destacam-se vários chás, fitoterápicos, frutos, em especial os frutos vermelhos (GRUÈRE *et al.* 2006).

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do planeta. Cerca de um terço das florestas tropicais do mundo está na região da Amazônia brasileira que possui aproximadamente 44% do total de espécies frutíferas conhecidas (ALMEIDA, AMARAL; SILVA, 2004; CARVALHO-SILVA *et al.* 2014; NASCIMENTO, 2004). Entretanto, o Brasil se enquadra na terceira posição como maior exportador mundial de frutos, atrás da China e Índia, respectivamente. Por sua vez, as exportações brasileiras de frutos, sucos e polpas cresce cerca de 16% ao ano, sendo que este crescimento pode aumentar em função de pesquisas vinculadas as propriedades funcionais de frutos ora negligenciados (IBRAF, 2009).

1.3.1 Frutos Vermelhos

Sabendo-se da importância do consumo de frutos na dieta humana para combate ao estresse oxidativo e proteção da saúde do homem contra doenças degenerativas, como câncer, diabetes e prevenção de doenças neuro e cardio degenerativas, diversos estudos de caráter prospectivos estão em andamento visando obter informações farmacológicas de princípios ativos presentes nesses frutos (CHEN *et al.* 2013; HARASYM; OLEDSKY, 2014; HUR *et al.* 2014; PERTUZATTI *et al.* 2014).

Os frutos vermelhos são particularmente, de grande interesse devido ao elevado teor de derivados fenólicos (antocianinas, ácidos fenólicos, flavonóides), principais responsáveis pela atividade antioxidante e propriedades terapêuticas atribuídas à dieta rica nesses alimentos funcionais (CARVALHO-SILVA *et al.* 2014; GÜNDÜZ; OZDEMIR, 2014). Alguns dos frutos vermelhos que podem ser destacados são o mirtilo (gênero *Vaccinium*), o açaí (*Euterpe oleracea*), o camu-camu (*Myrciaria dúbia* - HBK - McVaugh), a acerola (*Malpighia marginata* DC) e o café (gênero *Coffea*), apresentados na figura 8.

Figura 8 - Frutos vermelhos reconhecidamente ricos em polifenóis.



a) Mirtilo vermelho



b) Açaí



c) Camu-camu



c) Acerola



d) Café

1.3.1.1 Mirtilo vermelho

Apesar de não ser um fruto nativo, o mirtilo vermelho (*Ericaceae*) é de grande importância econômica e científica pelos benefícios que traz à saúde do homem. Este fruto e seus derivados são tidos como alimentos funcionais devido ao alto teor de flavonóides bioativos. Os principais flavonóides encontrados no mirtilo vermelho (figura 8-a) são antocianinas, glicosídeos flavonóides e as proantocianidinas poliméricas. Outros componentes potencialmente benéficos incluem os triterpenóides; as catequinas, os ácidos β -hidroxibutíricos, com o ácido cítrico, málico, glucurônico, quínico e benzóico; e os ácidos cinâmicos substituídos, dentre eles o ácido elágico e o ascórbico.

Em diversos estudos, o mirtilo vermelho tem mostrado conteúdo fenólico total superior e de maior diversidade (ácidos fenólicos, flavonóis, antocianinas e proantocianidinas) que muitas espécies de frutas comuns. A quercetina e a miricetina são compostos fenólicos que se destacam pela sua quantidade presentes em frutos frescos (Yan *et al.* 2002; Vvedenskaya *et al.* 2004).

1.3.1.2 Açaí

O açaizeiro (*Euterpe oleracea*) é uma árvore frutífera nativa de toda a região amazônica. É cultivado ocasionalmente sendo a sua produção de caráter essencialmente extrativa, principalmente, nos estados do Pará, principal centro produtor, Amapá,

Maranhão, Mato Grosso, Tocantins e em alguns países das Américas do sul (Venezuela, Colômbia, Equador, Suriname e Guiana) e central (Panamá). Botanicamente, o açaí pertence à família *Arecaceae* (*Palmae*), subfamília *Ceroxylineae* e gênero *Euterpe*. O açaizeiro produz bagas roxas, nas quais, a polpa apresenta excelentes características nutritivas e terapêuticas. (HENDERSON; GALEANO, 1996; OLIVEIRA *et al.* 2002).

A sua composição nutricional pode variar entre os frutos e com os métodos de processamento, mas de acordo com CLAY e CLEMENT (1993), os frutos de açaí, geralmente, contêm ~12,5% de proteína, ~10,0% de lipídeos, ~1% açúcares, 0,05% cálcio, 0,03% de fósforo e traços de ferro e vitaminas A e B1. Além disso, os frutos contêm, embora em pequenas quantidades, tocoferol (vitamina E) e ácido ascórbico (vitamina C), as quais podem certamente contribuir para a capacidade antioxidante total de sucos derivados do açaí.

Na sua composição fitoquímica, foram encontradas quantidades mínimas de cianidina-3-arabinose em extratos congelados de polpa. Na casca, o teor de antocianinas foi de 263 mg/100 g (BOBBIO *et al.* 2000). A quantidade total de antocianinas na polpa foi 0,5 mg/g e de outros flavonóides foram 3,5 mg/g de extrato seco de polpa. Também POZOIFRAN *et al.* (2004) relataram que os principais antioxidantes fenólicos no açaí são o ácido ferúlico seguido pela epicatequina, ácido parahidroxibenzóico, ácido gálico, (+)-catequina e ácido vanílico variando de 17 a 212 mg/L de polpa fresca.

Nos últimos anos, a polpa do açaí tem recebido muita atenção devido à sua capacidade antioxidante, às suas propriedades funcionais e ao seu emprego como ingrediente na culinária. Neste caso, sua polpa é consumida em uma variedade de bebidas e alimentos (SCHAUSS 2010; SCHAUSS *et al.* 2006).

A qualidade da polpa de açaí, em termos de produção e controle de qualidade, é classificada com base no teor de sólidos totais, em grosso (>14%), médio (>11%) e fino (>8%) (MUÑIZ-MIRET *et al.* 1996).

1.3.1.3 Camu-Camu

O camu-camu (*Myrciaria dúbia* (HBK) McVaugh) é um pequeno arbusto de ocorrência natural em áreas amazônicas de inundação periódica, tal como as terras baixas ao redor de rios e lagos (RODRIGUES *et al.* 2004). Seu fruto é uma baga de formato arredondado com diâmetro médio de 2,5 cm. Durante o processo de amadurecimento, a sua coloração varia de verde até vermelho ou lilás (ARRUDA *et al.* 2011).

Os frutos do camu-camu são considerados fontes significantes de diferentes compostos bioativos, principalmente, compostos fenólicos. Além disso, devido ao seu elevado teor de ácido ascórbico na polpa e casca, bem como a presença de carotenóides, o camu-camu é considerado alimento de alto valor nutricional de acordo com o Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) (JUSTI *et al.* 2000). Este fruto é considerado uma das mais ricas fontes de vitamina C no Brasil com teor de 2700 mg/100g de polpa, em média, (SMIDERLE; SOUSA, 2008) apresentando maior conteúdo que a acerola (1125-1790 mg/100 g de polpa fresca) (TORRONEN *et al.* 2003; VISENTAIMER *et al.* 1997) e o caju do nordeste e sudoeste brasileiro (106-121 mg/100 g) (ASSUNÇÃO; MERCADANTE, 2003).

1.3.1.4 Acerola

A acerola (*Malpighia marginata* DC) pertence à família *Malpighiaceae* e compreende 30 espécies de arbustos nativos do oeste da Índia. Este pode ser encontrado também nas Américas central e do sul, incluindo o Brasil, devido à sua boa adaptação ao solo e clima (ASENJO *et al.* 1980). A planta de acerola sustenta frutos pequenos trilobados avermelhados semelhantes a bagas. A polpa é suculenta e refrescante com doce aroma frutificado.

Além das espécies *Malpighia glabra* L. e *Malpighia puniceifolia* L., eventualmente há sinônimos, recentemente trabalhos de taxonomia levaram à apuração de *M. marginata* DC (BARBALHO *et al.* 2011).

O fruto da acerola é principalmente conhecido pelo seu alto conteúdo de vitamina C, que varia de 3 a 46 g por kg de polpa, sendo uma das mais importantes fontes dessa vitamina (VENDRAMINI; TRUGO 2000; ITOO *et al.* 1990).

Seu papel como antioxidante tem sido particularmente importante nos últimos anos porque a maioria das doenças cardiovasculares tem sua origem no estresse oxidativo causado por ERO. A vitamina C é considerada um dos mais potentes e menos tóxicos antioxidantes naturais (figura 8-d).

O fruto também contém carotenoides e bioflavonóides justificando assim seu alto valor nutricional e seu uso em potencial como antioxidante.

1.3.1.5 Café

O cafeeiro é um arbusto natural da Etiópia que, dependendo da espécie e das condições climáticas, pode atingir de 2 a 4 m de altura exibindo flores brancas e aroma característicos. De acordo com a classificação taxonômica, o cafeeiro pertence ao Reino:

Plantae, Divisão: *Magnoliophyta*, Classe: *Magnoliopsida*, Ordem: *Gentianales*, Família: *Rubiaceae* e Gênero: *Coffea*. Os cafeeiros foram reunidos em dois gêneros, conforme as estruturas florais, o *Psilanthus* Hook e *Coffea* L (MELO; SOUSA, 2011).

O gênero *Coffea* divide-se em quatro seções: *Eucoffea*, *Marcarocoffea*, *Argocoffea* e *Paracoffea*. Entre essas seções a de maior importância econômica é a *Eucoffea*, que apresenta 24 espécies, que são as mais cultivadas para o consumo do café (MELO; SOUSA, 2011).

Desde que chegou ao Brasil, no século XVIII, a cultura do café se expandiu do sudeste para as demais regiões resultando na atual diversidade da cafeicultura brasileira. O país produz grande variedade de grãos que resulta em produtos de diferentes qualidades ao contrário dos demais países produtores (MELO; SOUSA, 2011).

Atualmente, o café é uma das bebidas mais consumidas no mundo, principalmente devido às suas propriedades antioxidantes, aos seus efeitos estimulantes e seu sabor e aroma característicos. As suas propriedades antioxidantes devem-se sobretudo à variedade e quantidade de compostos fenólicos.

Em termos de valor comercial, este é a mais importante *commodity* após o petróleo. De acordo com a *International Coffee Organization* – ICO (2012), a produção total de café na safra de 2011-2012 foi cerca de 131,3 milhões de sacas (60 kg), com cerca de 33,1% produzido no Brasil. Os maiores produtores mundiais de café são Brasil, Vietnam, Indonésia e Colômbia enquanto os maiores consumidores são os EUA, Alemanha, Japão, Itália e França, respectivamente (ICO, 2012).

Existem cinco grupos de compostos químicos no café. São eles os carboidratos, compostos nitrogenados (cafeína), polifenóis (ácido clorogênico), compostos voláteis e ácidos carboxílicos (KYLIC *et al.* 2001; McCAMEY *et al.* 1990).

O café representa uma das mais ricas fontes de cafeína. Cujas concentrações variam com a variedade de café utilizado. Os polifenóis são os componentes majoritários do café contribuindo para o aroma, uma importante qualidade do café como bebida.

Estimativas indicam mais de 800 compostos aromáticos, incluindo polifenóis, foram identificados no café. Os principais compostos fenólicos presentes no café apresentam-se como ácidos clorogênicos, os quais são ácidos hidroxicinâmicos. O ácido clorogênico compreende cerca de 7–15% do total de café seco (isto é aproximadamente 100–300 mg/xícara) (CAMBRONY, 1998; GORDON, 2012). Esses compostos são solúveis em água e contribuem para a acidez do café, conferindo um sabor ligeiramente amargo e forte.

O teor médio de cafeína na variedade Robusta é aproximadamente o dobro da Arábica (isto é uma xícara de café Arábica contém 71 – 120 mg enquanto a Robusta contém 131 – 220 mg de cafeína).

1.4. FONTES SINTÉTICAS DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A demanda de compostos antioxidantes, principalmente nas indústrias de alimentos e farmacêuticas, bem como os benefícios à saúde a eles atribuídos têm levado a intensos trabalhos de *screening* sobre fontes naturais desses compostos. Entretanto, para suprir as suas necessidades de produção, a indústria recorre ao uso de antioxidantes fenólicos sintéticos como o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), propil galato (PG) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ) (ADITIVOS; INGREDIENTES, 2013; RAMALHO; JORGE, 2006).

Entretanto, o aumento da preocupação do consumidor com relação à sua saúde alimentar exige, por parte da indústria, uma melhora na qualidade dos alimentos que produz, inclusive quanto ao uso de antioxidantes sintéticos. Diversos estudos indicam que os antioxidantes de origem sintética estão relacionados com danos à saúde de animais, como: aumento hepático, redução de crescimento, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, problemas pulmonares, ganho de peso, efeitos tóxicos e mutagênicos (ENDICT, 2011).

Nesse sentido, o uso destes antioxidantes sintéticos em produtos destinados para consumo humano é limitado. No Brasil, o uso destes antioxidantes é controlado pelo Ministério da Saúde que limita a concentração a 200 mg/kg para o BHA e 100 mg/g para o TBHQ. Em outros países, como o Canadá e a União Européia, não é permitido o uso de TBHQ em alimentos e medicamentos (ADITIVOS e INGREDIENTES, 2013; RAMALHO; JORGE, 2006).

Dessa forma, existe grande interesse na substituição de antioxidantes sintéticos por naturais o que despertou intensa procura por materiais vegetais brutos para a identificação de novos antioxidantes (ENDICT, 2011). Diversos estudos indicam que os extratos naturais são mais efetivos que a maioria dos antioxidantes sintéticos (ADITIVOS e INGREDIENTES, 2013; ENDICT, 2011). A atividade antioxidante de extratos naturais e plantas é atribuída principalmente a compostos fenólicos.

1.5. MÉTODOS PARA ANÁLISE DE ANTIOXIDANTES

O interesse na pesquisa por substâncias com potencial capacidade antioxidante em produtos naturais, sobretudo aqueles de consumo frequente pela população têm sido crescente (LUBOMILA *et al.* 2004; FERREIDON *et al.* 2008; LOPÉZ-ALARCÓN;

DENICOLA, 2013). Assim, a avaliação da capacidade antioxidante têm igualmente sido um campo de pesquisa muito explorado. De modo, que uma vasta gama de métodos e protocolos de ensaio têm sido propostos, a destacar os métodos espectrométricos, eletroquímicos e cromatográficos (MOLYNEUX, 2004; LOPÉZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

1.5.1 Ensaios Espectrofotométricos

De modo geral os métodos espectrofotométricos são classificados em: colorimétricos (comprimentos de onda visível) e espectrometria ultravioleta.

Os métodos de DPPH e ABTS são considerados ensaios colorimétricos (comprimento de onda maior que 500 nm). Estes ensaios podem ser classificados com base no seu princípio analítico. Este pode envolver a transferência de prótons (HAT) ou elétrons (TE) (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

O mecanismo que envolve a transferência de prótons (HAT) caracteriza-se pela competição termodinâmica entre os substratos e antioxidantes pelo radical peroxila, proveniente da decomposição de azocompostos, e conseqüente formação de sondas fluorescentes que são monitoradas e interpretadas em curvas cinéticas. São ensaios deste tipo: o ensaio de inibição da auto-oxidação da lipoproteína de baixa densidade, o ORAC e TRAP (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Os métodos com transferência de elétrons (TE) são reações do tipo redox que apresentam variação da coloração correlacionada com a concentração de espécies antioxidantes presentes na amostra. Estes ensaios exigem um controle das condições do meio devido à possibilidade de influenciar a capacidade de redução dos antioxidantes em análise. São ensaios deste tipo: DPPH, FRAP, CUPRAC. método de Folin-Ciocalteu (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Sob uma perspectiva analítica, apesar de grande variedade de métodos *in vitro* e *in vivo* disponíveis para avaliação da capacidade antioxidante de materiais biológicos, nenhum deles tem aplicação geral devido às limitações intrínsecas de cada método em cada área de pesquisa (HUANG; OU; PRIOR, 2005; AMARE, 2012; ARNAO, 2000).

Os métodos mais comumente usados, em virtude de sua praticidade, rapidez e melhor sensibilidade, são aqueles que empregam compostos cromógenos de natureza radicalar para simular espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio. Dentre estes, o método ABTS e o ensaio do DPPH são extensivamente utilizados com essa finalidade (AURELIA, MIHAELA; ANDREI, 2009, WIOLETTA *et al.* 2009; MARIA *et al.* 2010; ARNAO 2000; LOPÉZ-ALARCON; DENICOLA, 2013).

Os métodos ABTS e DPPH são as opções mais comuns para a avaliação da capacidade de antioxidantes neutralizarem radicais livres em matrizes de complexidade diversa. Entretanto, ressalta-se que ambos utilizam como substância padrão para os ensaios, radicais exógenos, cuja reatividade pode divergir bastante da esperada para espécies reativas comumente formadas em situações de stress oxidativo. Em ambos casos, os resultados são expressos em função de equivalentes de antioxidantes padrões, *i.e.* ácido L-ascórbico e trolox, os quais permitem obter curvas dose-resposta para fins de comparação (ARNAO 2000; HUANG, OU; PRIOR, 2005).

O reagente DPPH apresenta como vantagem ser mais estável que o ABTS, e de preparo mais rápido. Por sua vez, o DPPH é preparado em etanol, metanol ou outros solventes semi-polares, de modo que quando utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de substâncias com caráter demasiadamente lipofílico, o método não permite uma mensuração fidedigna.

Além disso, leituras à 515 nm geralmente superestimam a capacidade antioxidante total, pois condiz com o máximo de absorbância de vários polifenóis presentes em amostras reais. Apesar desses pontos analíticos críticos, a praticidade do método, rapidez e disponibilidade comercial ainda tem caráter decisório no emprego desse método ao invés do método ABTS que é bastante demorado (ARNAO, 2000; MOLYNEUX, 2004).

Assim, é possível encontrar uma grande quantidade de estudos que utilizam o ensaio DPPH na avaliação da capacidade antioxidante de extratos, frutos, bebidas, chás e diversos alimentos. Outrossim, comumente ambos ensaios apresentam estreita correlação com resultados obtidos para fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu, bem como para vários outros métodos baseados em mecanismos HAT ou TE. Isso deve-se em grande parte pela similaridade do mecanismo redox desses ensaios (HUANG, OU; PRIOR, 2005).

1.5.1.1 Ensaio de descoloração do cátion radical ABTS

Miller e colaboradores (1993) descreveram um ensaio colorimétrico para avaliação da capacidade antioxidante total com base no 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS) que forma o cátion radical estável $\cdot\text{ABTS}^+$, com coloração azul esverdeada e absorção máxima a 600 nm, quando incubado com peróxido de hidrogênio na presença de enzimas (peroxidase ou metamioglobina) ou óxidos de metais, como o dióxido de manganês (ALAM, BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2012; ALAGUMANIVASAGAM *et al.* 2012).

O ensaio de ABTS permite análise da capacidade antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos na amostra (ARNAO, 2000).

1.5.1.2 Ensaio DPPH

O método de DPPH foi desenvolvido por Marsden Blois, pesquisador da Universidade de Stanford, no final da década de 50 e posteriormente foi modificado por diversos autores (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER; BERSET, 1995; MOLYNEUX, 2004).

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é um radical relativamente estável amplamente utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de produtos naturais e alimentos. Inicialmente, acreditava-se que o ensaio DPPH ocorria mediante um mecanismo do tipo HAT, ou seja, com transferência de hidrogênio. Todavia, pesquisas recentes elucidaram que se trata de um mecanismo do tipo TE ou redox (MOLYNEUX P, 2004). Essa redução é proporcional à quantidade de antioxidantes e resulta na variação da coloração inicialmente púrpura a amarela (MOLYNEUX, 2004; HUANG, OU; PRIOR, 2005; OZCELIK *et al.* 2003; FRANKEL; MEYER, 2000).

O monitoramento da coloração ocorre através de medidas de absorvância espectrocopicamente determinadas a 517 nm após um período pré-determinado de incubação na ausência de luz. A capacidade antioxidante é expressa em termos de concentração efetiva (EC_{50}) que corresponde à concentração de amostra em análise necessária para reduzir a absorvância inicial em 50% em termos de um marcador biológico com capacidade antioxidante conhecida (ALAGUMANIVASAGAM *et al.* 2012; BRAND-WILLIAMS, CUVELIER; BERSET, 1995).

Inicialmente, este método colorimétrico proposto por Blois (1958) utilizou a cisteína como marcador biológico para avaliar a capacidade antioxidante. Entretanto, diversos pesquisadores verificaram a versatilidade do método quanto ao uso de diversos padrões moleculares antioxidantes (rutina, ácido gálico, alfatocoferol, quercetina, ácido ascórbico, cisteína, catequina, BHA, BHT e glutatona) como controles positivos e para fins comparativos dos resultados obtidos (ALAGUMANIVASAGAM *et al.* 2012; HUANG, OU; PRIOR, 2005).

Apesar da versatilidade do método, rapidez, fácil preparação e disponibilidade comercial, este ensaio apresenta determinadas limitações analíticas, *i.e.* substâncias cromóforas ou que precipitem no solvente empregado formando sistemas coloidais resultam em taxa de descoloração menor que a esperada, bem como se o antioxidante se quer for extraído no solvente de trabalho (ARNAO, 2000; MOLYNEUX 2004; ALAM, BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2012).

Além disso, muitos antioxidantes que apresentam cinética rápida com radicais piroxil podem apresentar uma cinética lenta ou ser inertes com o radical DPPH exigindo diferentes períodos de incubação como o ácido ascórbico (1,15 minutos) e a rutina (103 minutos). Ademais, a não linearidade para todo intervalo de concentrações de DPPH torna os resultados de EC_{50} arbitrários (HUANG, OU; PRIOR, 2005).

1.5.1.3 Folin Ciocalteu

O método de Folin Ciocalteu é uma técnica colorimétrica associada com o método espectrofotométrico UV-Vis para medir a concentração de grupos fenólicos hidroxilados em diferentes matrizes. Este método é descrito em várias farmacopéias e guias de referência e muito comum na rotina laboratorial de análise de alimentos, bebidas e outros produtos naturais para análise da concentração total de compostos fenólicos (BLAINSKI, LOPES; DE MELLO, 2013; VERZA *et al.* 2007; SOUSA *et al.* 2007).

Este método consiste na reação da mistura dos ácidos fosfomolibdínico e fosfotungstíco com os compostos fenólicos presentes na amostra formando o complexo cromóforo fosfotungstíco fosfomolibdênico de coloração azul. A sua absorvância máxima ocorre em 750 nm e depende da alcalinidade da solução empregada e da concentração de compostos fenólicos (BLAINSKI, LOPES; DE MELLO, 2013; VERZA *et al.* 2007; SOUSA *et al.* 2007).

Entretanto, o método apresenta alguns pontos críticos do ponto de vista analítico. Alguns deles são: a rápida decomposição do reagente em soluções alcalinas exigindo o uso de grandes volumes para completar a reação; a falta de especificidade da reação sendo as proteínas e os taninos interferentes importantes; o uso de solução alcalina pode precipitar o complexo provocando turbidez ao meio tornando a análise espectrofotométrica inviável (BLAINSKI, LOPES; DE MELLO, 2013; VERZA *et al.* 2007).

Apesar dos pontos críticos, acima citados, o método é consagrado pelo uso, principalmente para fins de caracterização, por ser um ensaio preciso e específico em virtude dos diferentes grupos de compostos fenólicos apresentarem coloração ligeiramente diferentes devido a diferenças no peso molecular e também apresentarem diferentes cinéticas de reação. Além disso, este método é robusto e pragmático ao ponto de pequenas alterações de adequação do método não comprometerem a sua efetividade (BLAINSKI, LOPES; DE MELLO, 2013; VERZA *et al.* 2007).

1.5.2 Métodos Cromatográficos

No início do século XX, a introdução de métodos analíticos de separação, principalmente a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, hifenados com diferentes métodos de detecção *in vitro* permitiu a triagem de compostos antioxidantes em alta resolução (NIEDERLANDER *et al.* 2008; VERZA *et al.* 2007).

Apesar de serem difíceis de implantar e controlar, esses sistemas combinam técnicas analíticas capazes de indicar a presença de antioxidantes em misturas complexas de forma rápida e menos laboriosa (NIEDERLANDER *et al.* 2008).

Dentre os ensaios cromatográficos de alta resolução baseados em detecção eletroanalítica, verifica-se uma crescente aplicação dos métodos hifenados CLAE-CUPRAC, CLAE-FRAP, CLAE-DTNB e enzimáticos na análise de extratos e alimentos (KARAÇELIK *et al.* 2015).

Nos sistemas baseados em métodos colorimétricos, o ABTS ou DPPH são adicionados ao fluxo pós-coluna que recebe os antioxidantes eluídos e separados por cromatografia. Dessa forma, são detectados por diminuição da absorbância no comprimento de onda do espectro visível (KARAÇELIK *et al.* 2015).

Dentre os métodos de triagem de alta resolução, o método hifenado CLAE-UV-ABTS tem se mostrado superior na sensibilidade, seletividade, rapidez e praticidade para análise da capacidade antioxidante de componente de vários extratos de plantas, alimentos e bebidas (KARAÇELIK *et al.* 2015).

Além disso, esses métodos têm sido combinados com outros métodos de detecção on-line (RMN, DAD, EM) para identificação rápida de seus constituintes ativos (NIEDERLANDER *et al.* 2008; KARAÇELIK *et al.* 2015).

De forma geral, os métodos de triagem analítica de alta resolução necessitam identificar e caracterizar padrões moleculares antioxidantes para, posteriormente, serem rastreados em amostras reais com base no seu modelo de oxidação (KARAÇELIK *et al.* 2015).

Métodos cromatográficos têm sido frequentemente utilizados para a análise de produtos naturais, principalmente devido à sua elevada capacidade de separação e sensibilidade para a detecção de componentes de misturas mais complexas.

1.5.3 Métodos Eletroquímicos

Considerando-se os diferentes mecanismos pelos quais um antioxidante atua (poder redutor, quelação e/ou capacidade de estabilizar radicais livres) a seletividade e a exatidão dos métodos convencionais (ex. métodos bioquímicos e colorimétricos) podem

ser comprometidos, necessitando o emprego de variados princípios analíticos, com métodos combinados ou alternativos (BUTERA *et al.* 2002).

Neste contexto, os métodos eletroquímicos surgem como excelente alternativa para a determinação da atividade antioxidante em uma diversidade de matrizes como bebidas, chás, suplementos antioxidantes, produtos naturais, extratos vegetais, dentre outras (CAMPANELLA *et al.* 2006).

Os antioxidantes são agentes redutores que facilmente se oxidam na superfície de eletrodos. Nesse sentido, os métodos eletroquímicos apresentam grande potencial na caracterização de compostos eletroativos mediante o estudo de suas propriedades redox na superfície do eletrodo. Essas possibilidades de caracterizar o mecanismo redox tornam esses métodos poderosas ferramentas analíticas para avaliação da capacidade antioxidante e determinação de diversos parâmetros físico-químicos (ARTEAGA JF *et al.* 2012; OLIVEIRA-ROBERTH *et al.* 2012; BLASCO, GONZÁLEZ e ESCARPA 2004; GONÇALVES *et al.* 2011).

Dentre esses parâmetros físico-químicos estão: os potenciais de oxirredução; as correntes faradaicas; constantes de equilíbrio; número de elétrons envolvidos no processo redox; tipo de mecanismo; avaliação da contribuição de grupos moleculares na atividade antioxidante; influência de prótons, íons cátions, ânions, meio eletrolítico e diferentes superfícies eletródicas no processo eletrocatalítico (BOLDUC MP *et al.* 2009; OLIVEIRA-ROBERTH *et al.* 2012; BLASCO, GONZÁLEZ; ESCARPA, 2004).

De modo geral, quando o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho atinge um determinado nível de polarização, este atua como catalisador da reação redox das espécies eletroativas na interface eletródica gerando parâmetros analíticos (potencial, corrente, mecanismos de reação, propriedades físico-químicas, relações estrutura-atividade) que permitem quantificar e caracterizar as espécies antioxidantes presentes na matriz (BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 1993; GIL 2007; MAKHOTKINA; KILMARTIN, 2012; OLIVEIRA-ROBERTH *et al.* 2012; ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2011; ARRIBAS, MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ; CHICHARRO, 2012; MANNINO *et al.* 1998; OLIVEIRA-FILHO, 2006; DICULESCU *et al.* 2012; BLASCO, GONZÁLEZ; ESCARPA, 2004).

Sendo assim, no que diz respeito à atividade antioxidante bem como ao controle de qualidade de diversos produtos, os métodos eletroquímicos encontram aplicação tanto no estudo de substâncias isoladas quanto em matrizes complexas (REIS *et al.* 2009; SÁ *et al.* 2014; LINO *et al.* 2014; ALVES *et al.* 2010).

Extratos vegetais e outros produtos naturais de composição heterogênea, a diversidade e complexidade de interações químicas entre os componentes aumentam

consideravelmente. Neste caso, a atividade antioxidante de extratos brutos ou parcialmente purificados é usualmente expressa em termos da composição de polifenóis totais. Entretanto, o emprego de diferentes técnicas que se complementam podem fornecer resultados mais refinados quanto à atividade antioxidante total e a capacidade de varredura de radicais da amostra, inclusive sugerindo classes de antioxidantes envolvidos (VELJKOVIC JN *et al.* 2013).

Assim, as técnicas eletroquímicas apresentam numerosas vantagens quando comparadas a outros métodos analíticos com a mesma finalidade. Algumas delas são: alta sensibilidade, boa seletividade, rapidez, simplicidade de análise, não há necessidade analítica de gerar ou adicionar espécies químicas oxidantes, baixo consumo de reagentes e, sobretudo, o elétron que é o agente oxidante dos métodos eletroquímicos tem reduzido impacto ambiental em comparação com os outros métodos disponíveis (GONÇALVES *et al.* 2011; BLASCO, GONZÁLEZ; ESCARPA, 2004; HE *et al.* 2009; HUANG, GAO; HAGEMAN, 2004; REIS *et al.* 2009; MANNINO *et al.* 1998).

Dentre as técnicas para análises de antioxidantes, tem destaque as espectrofométricas, e recentemente as técnicas voltamétricas, tais como: Voltametria Cíclica, Voltametria de Pulso Diferencial, Voltametria de Onda Quadrada, Amperometria, Coulometria, bem como o emprego de técnicas indiretas, como FRAP, CRAC (REIS *et al.* 2009; MAKHOTKINA; KILMARTIN, 2010; BLASCO, GONZÁLEZ; ESCARPA, 2004; OLIVEIRA-ROBERTH *et al.* 2012).

Os diferentes métodos eletroanalíticos são geralmente, realizados em uma cela eletroquímica composta por três eletrodos: trabalho, referência e auxiliar, imersos em solução eletrolítica. Dependendo da técnica eletroanalítica empregada, como será discutido a seguir, diferentes faixas de potencial são aplicados ao eletrodo de trabalho visando obter informações específicas no processo eletródico (BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 1993).

1.5.3.1 Técnicas Voltamétricas

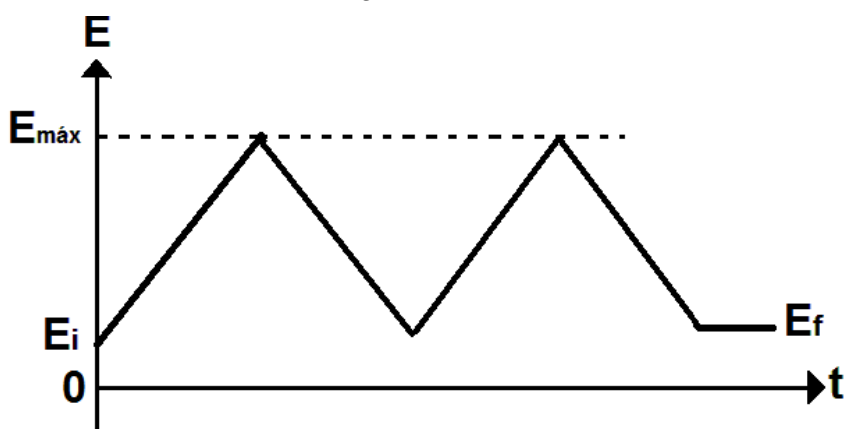
A voltametria é uma técnica eletroquímica que se baseia nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície. Essa técnica é classificada como dinâmica, pois a cela eletroquímica é operada na presença de corrente elétrica (i diferente de 0) que, por sua vez, é medida em função da aplicação controlada de um potencial. Assim, nessa técnica, as informações sobre o analito são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica que surge entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar ao se aplicar

uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência. (PACHECO; SEMAAN, 2013). A parte experimental deste trabalho envolve a utilização de três técnicas voltamétricas diferentes que são apresentadas logo a seguir. Assim, esta seção foi incluída, a fim de descrever os fundamentos gerais da voltametria e as características das técnicas aplicadas.

1.5.3.1.1 VOLTAMETRIA CÍCLICA

Na voltametria cíclica (VC), técnica eletroquímica comumente utilizada, o padrão de varredura do potencial aplicado ao eletrodo de trabalho é definido por três potenciais que caracterizam a técnica como cíclica. São eles: o potencial inicial; o potencial de retorno, no qual ocorre inversão do sentido da varredura de potencial e, por fim, o potencial final sendo que este pode ou não coincidir com o potencial inicial. O sentido da varredura é predefinido podendo ocorrer para a região anódica ou catódica. A figura 9 apresenta o caso onde o potencial inicial e final não coincidem (OLIVEIRA-BRETT, 1993).

Figura 9 - Padrão de potenciais aplicados ao eletrodo de trabalho na voltametria cíclica. Potencial inicial na região anódica, potencial de inversão na região catódica e potencial final em região anódica.



Adaptado: Brett e Oliveira-Brett, 1993.

A voltametria cíclica (VC) é uma das técnicas eletroquímicas mais empregadas no diagnóstico dos mecanismos de reações eletroquímicas visando identificar as espécies eletroativas analisando semiquantitativamente as suas velocidades de reação. Mediante essa análise obtém-se informações dos parâmetros elétricos relativo ao processo de oxido-redução da(s) substância(s) eletroativa(s) na superfície do eletrodo de trabalho (SCHUETZLE, D et al.1989).

Esses parâmetros elétricos são os potenciais de oxidação (E_{pa}) (processo anódico) e redução (E_{pc}) (processo catódico) com suas respectivas correntes de oxidação (I_{pa}) e redução (I_{pc}). De forma geral, o potencial de oxidação avalia a força termodinâmica da espécie eletroativa em análise, ou seja, o seu caráter redutor. Quanto menor o potencial de oxidação maior o caráter redutor da espécie eletroativa. Dessa forma, os antioxidantes que apresentam oxidação em baixos potenciais apresentam maior poder redutor e, conseqüentemente, são melhores antioxidantes (BLASCO, A. J *et al.* 2005).

Por sua vez, a corrente faradaica resultante dos processos de redução e oxidação devido à natureza eletroativa dos compostos fenólicos apresenta correlação quantitativa com a Lei de Faraday. Segundo esta lei fundamental da eletroquímica, a intensidade de corrente faradaica é proporcional à quantidade de espécies eletroativas presentes na solução em análise (MAKHOTKINA; KILMARTIN, 2012; Bott, A.W *et al.* 1993).

Além das informações relativas aos parâmetros redox, a voltametria cíclica permite avaliar o sistema quanto à reversibilidade do processo redox na superfície do eletrodo de trabalho. Nesse sentido, em sistemas eletroquimicamente reversíveis, o potencial formal corresponde à mediana entre os potenciais anódico e catódico, onde a diferença de potencial entre a oxidação e redução caracterizam processos reversíveis ($\Delta E < 59$ mV, $I_a/I_c = 1$), quase-reversíveis ($\Delta E = \text{anódico} - \text{catódico} > 59$ mV) e irreversíveis ($\Delta E \gg 59$ mV, $I_a/I_c \neq 1$) nas mesmas condições do meio (BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 1993; REIS *et al.* 2009).

Ademais, se o processo redox de transferência eletrônica for suficientemente rápido, os níveis de corrente anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) estabelecem uma relação de igual intensidade modular ($I_{pa}/I_{pc} = 1$) podendo ser correlacionadas com a concentração da espécie eletroativa de acordo com a equação de Randles-Sevick, para processos difusionais em sistemas reversíveis e irreversíveis controlados predominantemente por difusão (equações 1,2). (BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 1993; REIS *et al.* 2009):

Processo reversível

$$I_{p,a} = (2.69 \times 10^5) \times n^{\frac{3}{2}} \times A \times D^{\frac{1}{2}} \times v^{\frac{1}{2}} \times C \quad (1)$$

Em seguida é apresentada a equação que define o processo irreversível da reação redox.

Processo irreversível

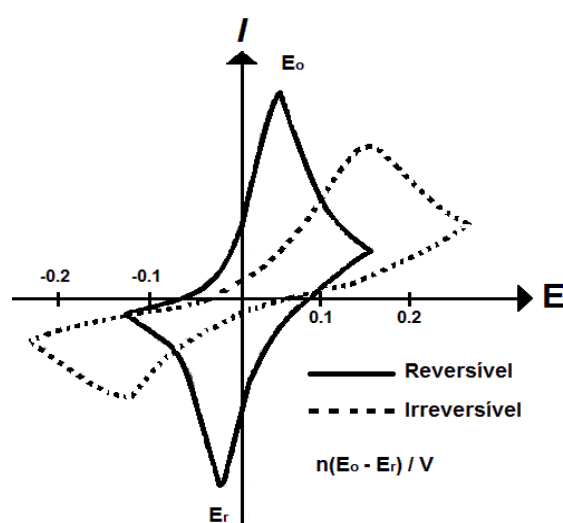
$$I_{p,a} = (2.69 \times 10^5) \times n (\alpha_c n^{\frac{1}{2}})^{\frac{1}{2}} \times A \times [o]_{\infty} \times D_o^{\frac{1}{2}} \times v^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

Onde: I = corrente (A),

n = número de elétrons envolvidos na reação,
 A = área do eletrodo (cm^2), para sistemas reversíveis ou irreversíveis,
 D = coeficiente de difusão da espécie eletroativa ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$),
 C = concentração da espécie eletroativa (mol cm^{-3}),
 v = velocidade de varredura (Vs^{-1}).

A figura 10, a seguir ilustra voltamogramas que permitem a classificação dos processos quanto à reversibilidade.

Figura 10 - Descrição de processos reversíveis e irreversíveis usando voltamogramas de voltametria cíclica.



Fonte: Brett e Oliveira-Brett, 1993.

Apesar dessa abordagem teórica, a composição do meio possui substâncias que podem alterar a superfície eletródica influenciando os potenciais redox e com possível ocorrência de reações acopladas aos processos eletroquímicos. Dentre essas, as reações de polimerização de fenóis na superfície do eletrodo podem formar filmes que alteram a área da superfície eletródica por bloqueio a passivação. Dessa forma, a correlação entre a atividade antioxidante e o potencial de redução nem sempre é uma tarefa simples e direta de se correlacionar (GATTRELL, M *et al.* 1993).

Além disso, meios eletrolíticos geram correntes capacitivas quando ocorre a polarização do eletrodo de trabalho. Dessa forma, o comportamento capacitivo do dispositivo contribui com correntes não faradaicas relacionadas com o acúmulo de cargas e não com o processo redox. De modo que os cátions e ânions presentes na solução migram sem transferir suas cargas resultando em voltamogramas (I vs E) com ausência

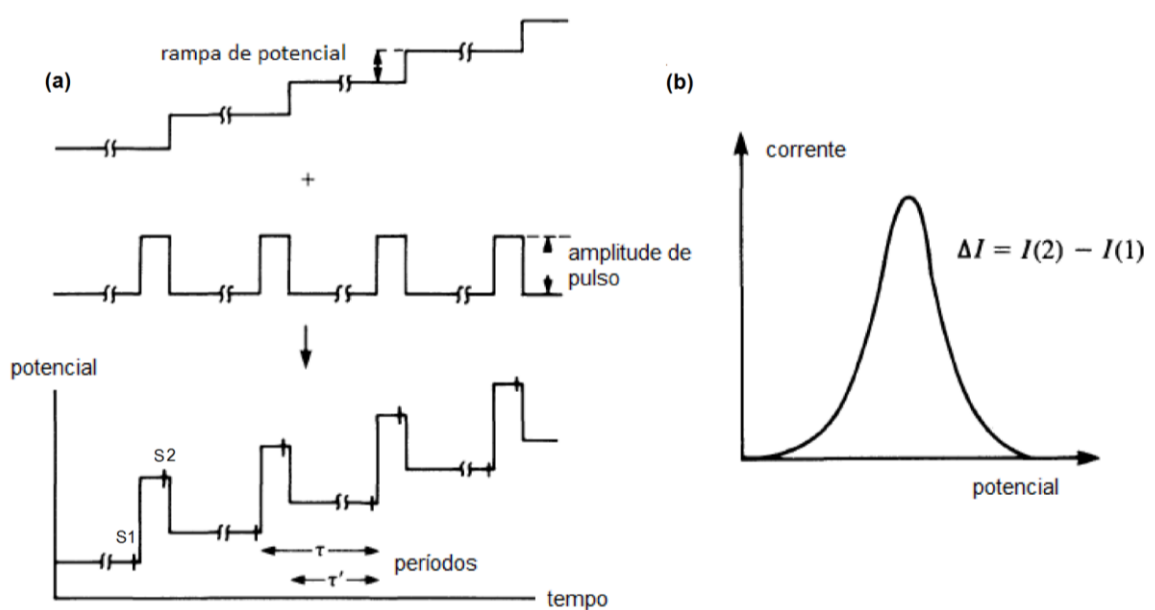
de picos. Outros sim, quanto mais resistivo for o meio eletrolítico maior o nível de corrente capacitiva observado (BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 1993).

1.5.3.1.2 VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL

A voltametria de pulso diferencial (VPD) é uma das técnicas disponíveis baseadas na aplicação de pulsos de potencial e representa uma poderosa ferramenta eletroanalítica. Diferentemente da voltametria cíclica, o padrão de potenciais aplicados ao eletrodo de trabalho é a combinação de dois tipos diferentes de pulsos, a medida da corrente obtida, é a diferença entre os pulsos S1 e S2. A corrente é medida duas vezes antes da aplicação do pulso de potencial S1 e depois no final da aplicação do pulso S2, como pode ser verificado na figura 11).

Figura 11 - Padrão do potenciais de pulso em voltametria de pulso diferencial.

Voltametria de pulso diferencial. (a) Esquema de aplicação de potenciais; (b) Perfil esquemático $I-E$.



Fonte: Brett e Oliveira-Brett 1993

Também na figura 11-a, um pulso de amplitude $(10/n$ mV) é aplicado com degrau (τ) no intervalo de potencial predefinido de forma incremental. Enquanto isso, pulsos de amplitudes $50/n$ mV são incrementados ao final do passo τ durante um período $(\tau - \tau')$. A vantagem analítica deste padrão combinado, em relação à voltametria cíclica, é o aumento na sensibilidade e conseqüente melhora nas características analíticas. Este ganho deve-se ao fato dos processos de transferência de cargas faradaicos (reação

redox) e capacitivos (reorganização de íons na dupla camada) apresentarem diferentes cinéticas em função do tempo (BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 1993).

Observando-se a figura 11-a, o ponto 1 é o momento de aplicação do sobre potencial (50/n mV) e o ponto 2, a leitura da corrente no fim do impulso. Como a corrente capacitiva extingue-se mais rapidamente que a faradaica, a corrente capacitiva é assim evitada nas mensurações. A figura 11-b ilustra um voltamograma VPD ($E_{vs} I$) típico de um processo redox faradaico onde a corrente capacitiva foi eliminada ($\Delta I = I_2 - I_1$) (BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 1993).

Em virtude desse aumento na sensibilidade analítica, a voltametria de pulso diferencial permite uma melhor observação dos processos de transferência de elétron permitindo diferenciar quando estes estão ou não acoplados a transferência de prótons e à formação de produtos eletroativos (DICULESCU *et al.* 2012). Além disso, confere uma melhor resolução de picos de corrente quando comparado com outras técnicas eletroanalíticas possibilitando dessa forma uma melhor caracterização (BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 1993; MASEK, ZABORSKI ; CHRZESCIJANSKA, 2011).

1.5.3.1.3 VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA

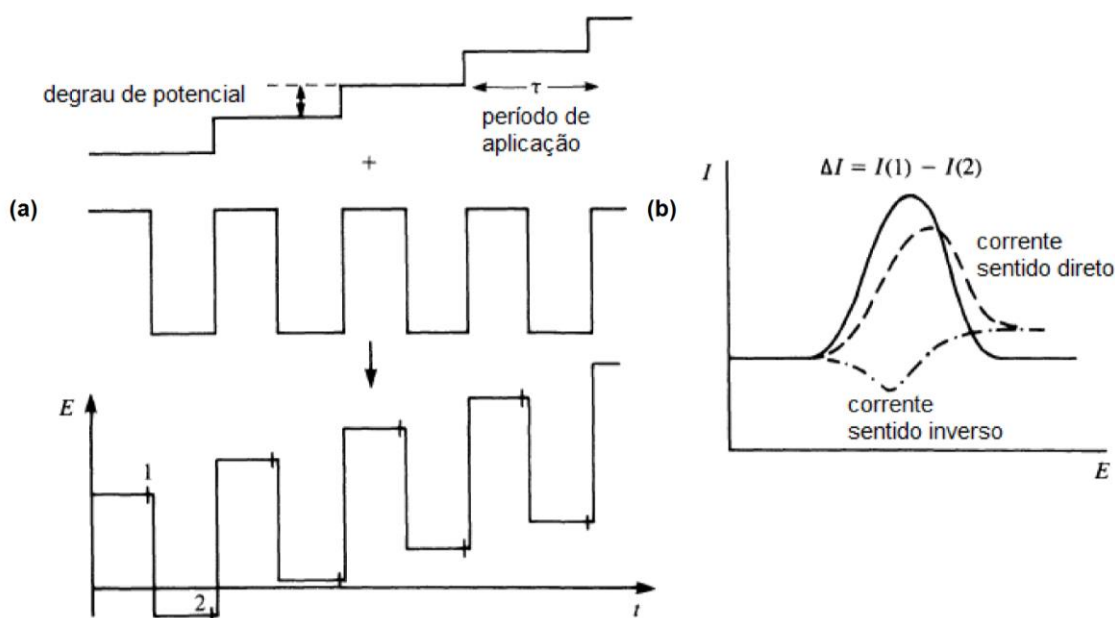
A Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) surgiu no início da década de 50 sendo Baker o seu pioneiro (PLAMBECK,JA *et al* 1982). Entretanto, devido a limitações no campo da eletrônica, esta técnica permaneceu durante décadas com pouca utilidade analítica devido à defasagem tecnológica do período. No entanto, com avanços no campo da eletrônica aplicada, recentemente tornou-se uma técnica eletroquímica de grande importância analítica (BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 1993).

Assim como a voltametria de pulso diferencial, a Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) é uma técnica de pulso, mas difere daquela no padrão de pulsos aplicados ao eletrodo de trabalho. O padrão de pulsos pode ser verificado na figura 12-a. Verifica-se a combinação de dois tipos de pulsos. O primeiro deles corresponde ao incremento de pulsos em potenciais incrementais de 2 mV e passo τ no intervalo de potenciais de trabalho predefinido. Somando a esse padrão, verifica-se a sobreposição de ondas quadradas com ciclos de oxidação e redução de período coincidente com o passo τ do primeiro padrão de impulsos. Dessa forma, como ilustrado na figura 12 as leituras analíticas são realizadas ao final de cada semi-ciclo de oxidação e redução, respectivamente.

Esse padrão confere a esta técnica algumas vantagens quando comparada com a Voltametria de Pulso Diferencial. A primeira delas e de importância analítica é a maior

velocidades de análise. Enquanto a VPD funciona com velocidades de varredura na ordem de 1 mVs^{-1} a 10 mVs^{-1} , a voltametria de onda quadrada permite atingir valores de 1 Vs^{-1} reduzindo, no mínimo 100 vezes, o tempo de análise. Isso confere grande potencial de aplicação da VOQ na detecção eletroquímica de eluentes provenientes de métodos cromatográficos, prática sofisticada de hifenação de métodos analíticos. Além disso, há um menor consumo de espécies eletroativas e conseqüentemente uma minimização de problemas relacionados com o bloqueio da superfície analítica quando comparado com a VPD (JANEIRO; OLIVEIRA-BRETT, 2005; BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 1993).

Figura 12- Padrão de potencial aplicado no eletrodo de trabalho em voltametria de Onda Quadrada. (a), Voltamograma de Onda Quadrada (I vs E) indicando a corrente total (ΔI); (b), anódica ou de oxidação I_1 e catódica ou de redução I_2 .



Fonte: Brett e Oliveira-Brett 1993.

Assim como na voltametria de pulso diferencial, a corrente capacitiva não é contabilizada de forma significativa. Dessa forma, a VOQ apresenta grande sensibilidade sendo inclusive superior à VPD dependendo do analito empregado, sobretudo para sistemas reversíveis e pela eliminação do fenômeno de bloqueio da superfície eletródica bem como pela remoção da corrente devido à redução do oxigênio molecular dissolvido na matriz analítica (BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 1993; DOGAN-TOPAL *et al.* 2010).

1.5.3.1.4 PERFIL VOLTAMÉTRICO

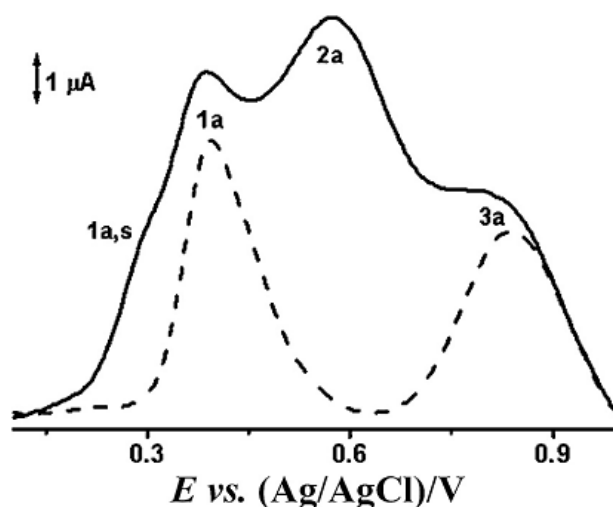
Na prática eletroanalítica a investigação do comportamento eletroquímico de substâncias antioxidantes, presentes em diferentes matrizes, é representada no voltamograma que apresenta perfil característico da intensidade de corrente em função do potencial e dos componentes eletroativos presentes.

Para fins de triagem analítica, geralmente, a voltametria cíclica é empregada para obter os parâmetros eletroquímicos, isto é valores de corrente e potencial para pico(s) anódico(s) e catódico(s), bem como avaliar a reversibilidade do sistema em algum par redox. Valores de potencial abaixo de 0,5 V, pH 7 são característicos para espécies com alto poder redutor, ou seja indicam a presença de espécies com alta capacidade antioxidante. Igualmente, sistemas reversíveis são mais promissores nestes casos específicos, pois pode-se inferir que a espécie antioxidante tenha capacidade de se regenerar. Por sua vez, os valores de potencial dizem respeito a aspectos termodinâmicos, os valores de pico de corrente, além de expressarem a cinética de transferência eletrônica, segundo a lei de Faraday ("Um mol de espécie eletroativa monovalente transfere um mol de elétrons"), nos dão uma idéia do quantitativo de espécies eletroativas, tais como são os antioxidantes e pro-oxidantes.

Caso haja confirmação de atividade antioxidante pela presença de picos de corrente no voltamograma cíclico, em potenciais baixos emprega-se a Voltametria de Pulso diferencial visando obter maior sensibilidade analítica em virtude da eliminação da contribuição de correntes capacitivas nas mensurações, isto se o bloqueio do eletrodo de trabalho não for um problema que comprometa os resultados analíticos.

A figura 13, a seguir, apresenta, para fins ilustrativos, dois voltamogramas obtidos por Voltametria de Pulso Diferencial para amostras de vinhos tinto e branco. Observa-se perfeitamente que as duas amostras apresentam perfis voltamétricos diferentes e característicos. O voltamograma obtido para vinho branco apresenta dois picos de corrente anódica em potenciais anódicos de ~400 mV e ~800 mV, com ~10 μA e ~6 μA , respectivamente. Já o tinto, apresenta três picos de oxidação bem definidos (~400 mV; 590 mV e 760 mV) e suas respectivas correntes de oxidação (11,5 μA , 13 μA e 7 μA), fato condizente com as diferenças entre processos de vinificação de cada estilo de vinho.

Figura 13- Voltamogramas de pulso diferencial para amostras de vinhos tinto (—) e branco (- - -).
Picos de corrente anódica (1a, 2a, 3a) e ombro anódico (1a,s).



Fonte: Lino *et al.* 2014.

Apesar das propriedades do meio eletrolítico influenciarem nas condições e conseqüentemente no potencial de oxidação, ele é característico para aquele meio e está relacionado com a estrutura molecular da espécie química. Dessa forma, o potencial de oxidação é uma propriedade intrínseca da molécula para aquele meio.

A intensidade de corrente obtida nos voltamogramas, diferentemente é uma propriedade extensiva por depender da quantidade de espécies eletroativas presentes no meio. Isto está de acordo com uma das leis mais fundamentais da eletroquímica, a Lei de Faraday. Em que, a intensidade de corrente é proporcional à quantidade de espécies eletroativas presentes (PLAMBECK, J.A 1982).

De acordo com o discorrido até aqui e observando novamente a figura 13, verificamos que a amostra de vinho tinto apresenta maiores níveis de correntes faradaicas que o vinho branco. Além disso, possui maior número de picos de oxidação, revelando dessa forma a maior quantidade de espécies antioxidantes presentes no vinho tinto em comparação com o vinho branco como foi demonstrado por diversos estudos (LINO *et al.* 2014; SÁ *et al.* 2014).

1.5.3.1.5 ÍNDICE ELETROQUÍMICO

Considerando as características eletroativas dos antioxidantes, a ideia de determinar um Índice Eletroquímico já havia sido proposta anteriormente (BLASCO, GONZÁLEZ; ESCARPA, 2004). Entretanto, essa tentativa limitou-se a uma classificação

com caráter qualitativo, baseada apenas no potencial redutor das espécies, negligenciando os aspectos quantitativos e cinéticos na contribuição da atividade antioxidante (REIS *et al.* 2009; BLASCO, GONZÁLEZ; ESCARPA, 2004; LINO *et al.* 2014).

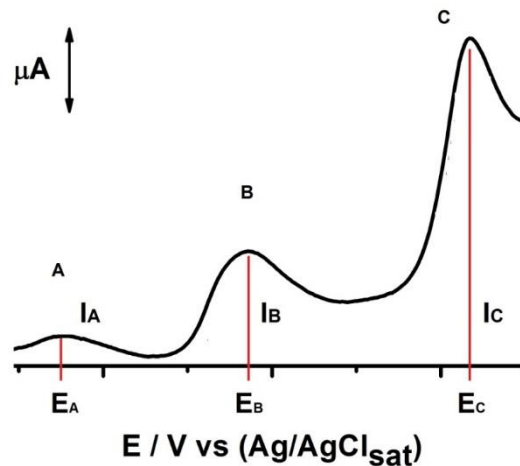
Nesse sentido, o índice eletroquímico (IE), obtido dos parâmetros eletroquímicos, potencial e corrente de pico do voltamograma, propõe uma visão mais ampla do conceito de atividade antioxidante levando em consideração não apenas o poder redutor da espécie antioxidante (aspecto termodinâmico, expresso por E_{pa}) como também a sua concentração e a cinética de transferência de elétrons (expresso por I_{pa}) (LINO *et al.* 2014).

Considerando que quanto menor é o valor do potencial redutor da espécie antioxidante, mais facilidade esta tem para se oxidar e melhor são suas características antioxidantes. Esta relação inversamente proporcional estabelece que espécies que sofrem eletrocatalise em baixos potenciais anódicos ($E_a < 0,5$ V, pH 7) apresentam boa atividade antioxidante. Caso contrário, a espécie não apresenta características antioxidantes notáveis (REIS *et al.* 2009; LINO *et al.* 2014; SÁ *et al.* 2014).

Além do baixo potencial de redução, a concentração de espécies antioxidantes também contribui e de forma diretamente proporcional para a atividade antioxidante. Quanto maior é a sua concentração, melhor a capacidade antioxidante. Sendo assim, e com base na Lei de Faraday, a intensidade de corrente anódica é proporcional à quantidade de espécies eletroativas presentes na matriz (REIS *et al.*, 2009; LINO *et al.* 2014; SÁ *et al.* 2014; ZOU *et al.* 2002).

A figura 14 apresenta um voltamograma de pulso diferencial, de caráter ilustrativo, para melhor compreensão dos parâmetros eletroquímicos utilizados na obtenção do índice eletroquímico.

Figura 14 - Voltamograma esquemático com parâmetros eletroquímicos para obtenção do índice eletroquímico



Fonte: Lino *et al.* 2014.

O voltamograma da figura 14 apresenta três picos de oxidação (A, B e C) com os respectivos parâmetros de corrente (I_A , I_B e I_C) e potencial (E_A , E_B e E_C) anódicos. Cada um desses picos anódicos tem uma contribuição para o cálculo do índice eletroquímico que é representado como a soma das razões entre a intensidade de corrente (μA) e o respectivo potencial de oxidação (mV), de acordo com a equação 3:

$$IE = \frac{I_A}{E_A} + \frac{I_B}{E_B} + \frac{I_C}{E_C} \quad (3)$$

Dessa forma quanto mais intensa a corrente anódica e quanto menor o potencial anódico de cada pico maior é a sua contribuição para a atividade antioxidante e, conseqüentemente, maior é o valor do índice eletroquímico (LINO *et al.* 2014).

1.5.3.2 Outros métodos: coulometria e CRAC

A coulometria é uma técnica que aplica um degrau de potencial ao sistema eletroquímico promovendo alterações que permitem fazer deduções sobre reações de eletrodo e suas velocidades. Essencialmente, este método eletroquímico baseia-se na mensuração da quantidade de carga e/ou corrente necessária para oxidar ou reduzir um analito de interesse em função do tempo (REIS *et al.* 2009; BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 1993).

Dessa maneira, devido ao fato do princípio analítico desta técnica fundamentar-se num processo faradaico, onde a proporcionalidade entre número de elétrons(n) fluindo pelo eletrodo e a quantidade molar de substância eletroativa envolvida são fundamentais,

este método exige que a reação apresente uma cinética rápida e máxima eficiência da reação eletrolítica (REIS *et al.* 2009).

Outras características da coulometria, como: eletrogeração do titulante reagente, sem a necessidade de preparar uma solução e padronizá-la possibilita a aplicação indireta em diferentes métodos, tais como: CLAE, Eletroforese Capilar e Sistemas de Injeção em Fluxo (FERREIRA; AVACA, 2008; REIS *et al.* 2009).

Outros métodos indiretos têm sido propostos, dentre eles, o método eletroanalítico CRAC (*Ceric Reducing Antioxidant Capacity*) tem se destacado pela facilidade analítica e boa correlação com outros métodos de determinação antioxidante (FERREIRA; AVACA, 2008).

O método de detecção CRAC baseia-se no poder de redução da amostra sobre o agente oxidante Ce^{4+} , fornecido pela solução ácida de sulfato de Cério (IV) e na cronoamperometria como técnica de detecção. Este método apresenta algumas vantagens como facilidade no pré-tratamento da amostra, simplicidade analítica, elevado poder oxidante do Ce^{4+} (1,29 V vs Ag/AgCl) sobre todos os antioxidantes e emprego de equipamentos mais baratos e evitando perdas (FERREIRA; AVACA, 2008; REIS *et al.* 200).

Uma desvantagem do método reside na perda de seletividade do método em amostras complexas pelo fato do Ce^{4+} ser um forte agente oxidante (MAGALHAES, L.M. *et al.* 2009).

1.5.3.3 Sensores e Biossensores Eletroquímicos

Os sensores eletroquímicos são definidos como dispositivos que transformam o efeito da interação analito-elétrodo num sinal útil. Podem ser estimulados eletricamente, e resultar numa interação espontânea na condição de corrente zero (HULANICKI, GLAB; INGMAN, 1991).

O desenvolvimento de técnicas analíticas eficientes para análise rápida de produtos farmacêuticos é importante para o controle de qualidade na indústria farmacêutica, devido às exigências durante o processo de produção.

Diversos tipos de elétrodos de trabalho têm sido utilizados para a detecção eletroquímica de fármacos em formulações farmacêuticas. Entre eles, os mais comercializados são mercúrio, platina, carbono vítreo e eletrodos de pasta de carbono (EPC). No entanto, a partir de um ponto de vista ecológico, o mercúrio é altamente tóxico, e sua disposição sustentável é muito difícil e cara. Em contrapartida, eletrodos sólidos de carbono e platina, para fins de estudos de redução podem não permitir potenciais

suficientemente baixos para que espécies sejam eletroativas. Por outro lado, em estudos de processos de oxidação podem apresentar dificuldade na repetibilidade das medições dada a inerente passivação da superfície eletródica.

Assim, tem sido incentivado a busca de eletrodos alternativos, modificando a superfície dos mesmos pelo uso de materiais convencionais, a fim de melhorar a sua sensibilidade e seletividade, bem como sua reprodutibilidade. Neste contexto, os eletrodos de carbono cerâmicos, com base nas vantagens sinérgicas de sol-gel como material inerte e materiais de carbono de boa estabilidade e condução elétrica, é considerado um precursor muito interessante para fazer eletrodos alternativos passíveis de modificação. Neste estudo, foi desenvolvido um novo material que pode ser usado como eletrodo de trabalho, chamado de electrodo sonogel de carbono (ESNC), este material apresenta alta sensibilidade (CRISPIM *et al.* 2015).

Os Eletrodos Sonogel de carbono (ESNC) têm sido um dos materiais de eletrodo mais ativamente estudados nos últimos anos devido às suas boas propriedades eletrônicas e mecânicas. O processo de sol-gel é uma transição do sistema sol para um sistema gel (CUBILLANA-AGUILERA *et al.* 2006). O termo sol se refere a uma dispersão de partículas coloidais (dimensão entre 01 e 100 nm) estável em um fluido, enquanto o termo gel indica que o sistema é formado pela estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou de cadeias poliméricas (gel polimérico) que imobiliza a fase líquida nos seus interstícios. Estas características conferem a estes materiais elevada estabilidade e versatilidade química, devido à agregação linear das partículas primárias, bem como maior área superficial. Comparados a outros eletrodos convencionais, o eletrodo de Sonogel apresenta ainda vantagens como a facilidade de confecção, baixo custo, boa reprodutibilidade, e ampla aplicação (RANDO *et al.* 2005). Em comparação com outros eletrodos convencionais, os ESNCs também oferecem vantagens como facilidade de fabricação, de baixo custo, boa reprodutibilidade e ampla aplicabilidade (CRISPIM *et al.* 2015).

Já os biossensores são dispositivos bioeletrônicos de análise química e especialmente projetados para determinar substâncias de interesse analítico. Estruturalmente, são constituídos pelos componentes de suporte, transdução elétrica e reconhecimento. Este último é responsável pela seletividade química do sistema, pode ser constituído por células, organelas, anticorpos, proteínas, enzimas, entre outros elementos de reconhecimento (CABAJ *et al.* 2009; CABAJ, SOLODUCHO; NOWAKOWSKA-OLEKSY, 2010; THÉVENOT *et al.* 1999). Assim, os biossensores podem ser considerados como dispositivos analíticos atraentes e promissores para a

detecção de compostos fenólicos devido às suas características únicas. Dentre estas características, a especificidade, a sensibilidade, o baixo custo, a miniaturização, a fácil automação, a rapidez da análise, a simplicidade de operação e fabricação são os seus diferenciais mais evidentes (GOMES, *et al.* 2004;. FUSCO *et al.* 2010).

Entretanto, apesar da importância dos componentes essenciais ao funcionamento do biossensor, a otimização da unidade de reconhecimento quanto a sua orientação constituem fatores cruciais para se obter uma melhor sensibilidade, boa estabilidade da superfície analítica, melhor acesso dos analitos de interesse e sobretudo a minimização de interações não específicas com outros agentes presentes na matriz (CABAJ *et al.* 2009).

O uso de enzimas imobilizadas a transdutores eletroquímicos permite ao biossensor maior estabilidade e possibilidade de reutilização do dispositivo, bem como bom desempenho e acessibilidade a análises *in situ* (CABAJ *et al.* 2009).

A arquitetura de proteína nos biossensores reúne uma grande variedade de processos de imobilização enzimática. De forma geral, esses processos de imobilização podem ser classificados em processos físicos (adsorção) e químicos (ligação covalente) e resultam em uma enorme variedade de técnicas de suporte, como as técnicas, camada por camada, eletrodeposição e de Langmuir-Blodgett (TLB), entre outras (CABAJ *et al.* 2009; CABAJ, SOLODUCHO; NOWAKOWSKA-OLEKSY, 2010).

Nesse sentido, o emprego de biossensores amperométricos eletroquímicos para a determinação do conteúdo de fenóis totais em diversos tipos de matrizes, inclusive matrizes complexas, constitui uma tecnologia analítica importante e ambientalmente responsável com a mínima geração de resíduos durante o processo analítico (MELLO; KUBOTA, 2007; PRIETO-SIMON *et al.* 2008; GIL; GISELLE, 2010).

O objetivo geral foi aplicar métodos eletroanalíticos para determinar a capacidade antioxidante em produtos naturais obtidos a partir de frutos vermelhos.

2.1 Objetivos Específicos

1. Comparar métodos eletroanalíticos e espectrométricos para determinar a capacidade antioxidante de produtos obtidos de frutos vermelhos, a destacar acerola e café.

2. Desenvolver e otimizar sensores e biossensores de pasta de carbono para quantificar compostos fenólicos.

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 Reagentes e soluções utilizados no desenvolvimento do trabalho.

Os reagentes utilizados foram de grau analítico e as soluções foram preparadas com água purificada pelo sistema Milli-Q (Modelo UV Plus Ultra low Organics Water). Foram preparadas em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) as soluções 0,1 mol L⁻¹ de vários compostos fenólicos (Sigma S/A). Preparou-se a solução de seringaldazina (marca Sigma), através da dissolução em etanol 99,8%(v/v) na concentração de 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹. Os reagentes empregados: ácido fosfórico e ácido sulfúrico (Carlo Erba); biftalato de potássio, nitrato de potássio, sulfato de potássio e ácido nítrico (Fluka); cloreto de potássio (Gibco); ácido clorídrico (Sigma); hidróxido de sódio (Aldrich); ácido acético, cloreto de sódio e hidróxido de potássio (Merck) são todos de pureza analítica e foram utilizados na preparação das soluções eletrolíticas. Foram utilizados para preparo do meio de cultura dos fungos: Glicose (marca: Isofar) e ágar-ágar microbiológico (marca: Merck) Utilizou-se como indutor de lacase, sulfato de cobre II (marca: Cromoline). Foram utilizadas como substrato na biossíntese de lacase, cascas de banana nanica (nome popular no centro-oeste do Brasil) ou caturra (nome popular no sul do Brasil)

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de alto grau de pureza e água deionizada obtida a partir de sistema de purificação da Millipore Milli-Q (condutividade ≤ 0,1 μ S cm⁻¹). Segue demais reagentes empregados: metanol grau HPLC, catecol, rutina e 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), reagente de Folin-Ciocalteu's obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Foram obtidos da Merck, Brasil: hidrogenofosfato de potássio (K₂HPO₄, 99%) e dihidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄, 99%) (Millipore S. A., Molsheim, France). Os reagentes de grau analítico: ácido fosfórico, H₃PO₄ e ácido sulfúrico, H₂SO₄ (Carlo Erba); biftalato de potássio, C₈H₅KO₄, nitrato de potássio, KNO₃, sulfato de potássio, K₂SO₄ e ácido nítrico, HNO₃ (Fluka); cloreto de potássio, KCl (Merck), ácido clorídrico, HCl (Sigma); hidróxido de sódio, NaOH (Aldrich); ácido acético, CH₃COOH foram usados para preparo de soluções.

As metodologias empregadas nos estudos abordados nesta tese são apresentadas a seguir, identificadas como anexos (1, 2, e 3).

3.2 ANEXO 1 - Electroanalysis for Quality Control of Acerola (*Malpighia emarginata*) Fruits and their Commercial Products.

3.2.1 Amostras

Os frutos de acerola foram cultivados usando técnicas da agricultura orgânica e convencional na região de Goiânia, GO, Brasil. As acerolas frescas (AF), foram recém-colhidas no estágio adequado de maturidade e foram adquiridos no mesmo município. Elas foram selecionadas com base na intensidade da cor vermelha, firmeza, e sabor agradável de ácido, que são indicativos da fase de maturação ótima do fruto. AF foram lavadas, embaladas em sacos de polietileno e armazenadas a 4°C até à análise. Os produtos comerciais obtidos a partir de acerola, ou seja, quatro extratos secos (aqui identificadas como DE1, DE2, DE3 e DE4) e duas polpas congeladas (FP1 e FP2), foram comprados nos mercados locais e drogarias em Goiânia.

Com o auxílio de um almofariz, uma quantidade adequada de AF foi macerada, o sumo resultante foi centrifugado a 1000 rpm e diluiu-se 1 mL do sobrenadante em 4 mL de uma solução de diluição preparada utilizando-se 2 mL de etanol e 2 mL de solução tampão fosfato 0,1 M (pH 5,0). As polpas FP1 e FP2 foram descongelados e filtradas, em seguida 1 mL de cada sumo resultante foi diluído com a solução de diluição acima mencionada. Preparou-se as soluções estoque DE1, DE2, DE3, e DE4 a partir da ultrasonificação de 1 g de cada amostra durante 20 minutos em 4 mL da solução de diluição. Os extratos resultantes foram centrifugados a 1000 rpm para obter uma solução do sobrenadante límpida. Todas as amostras foram mantidas em frascos de vidro escuro e analisadas imediatamente após extração.

3.2.2 Medidas eletroquímicas

As medidas eletroanalíticas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato μ Autolab Tipo III® (Eco-Chemie B.V., Utrecht, Holanda) integrado com o software GPES 4.9®. O dispositivo foi ligado a uma célula eletroquímica de 10 mL com um sistema de três elétrodos, constituído por: um elétrodo de pasta de carbono (GCE, $\varnothing = 2$ mm, com 75:25 w/w de grafite e óleo mineral), um fio de platina e um elétrodo de calomelano saturado (SCE), representando o eletrodo de trabalho, o contra eletrodo, e o eletrodo de referência, respectivamente. Todas as medidas de pH foram realizadas usando uma combinação de pH do eletrodo de vidro BlueLine (Schott Instruments GmbH, Mainz, Alemanha) acoplado a um medidor de pH digital PHS-3B (Nanjing T-Bota Sciotech Instruments & Equipment Co., Ltd., Nanjing, China).

Para as análises, os diferentes volumes (25 e 250 µl) de amostras (AF, FP1, FP2, DE1, DE2, DE3, e DE4) foram completados com uma alíquota de 5 mL da solução 0,1 M de tampão fosfato (pH 5,0) e colocadas na célula voltamétrica. Os voltamogramas cíclicos foram registados no intervalo de 0 a 1 V com velocidade de varredura de 100 mV/s. As condições experimentais para DPV consistiram em: amplitude de pulso de 50 mV, largura de pulso de 0,4s e velocidade de varredura de 5 mV/s. Os parâmetros de SWV para a determinação de AA (Ácido ascórbico) foram: frequência de 20 Hz, amplitude de 50 mV e pulso de potencial de 2 mV.

3.2.3 Medidas de CLAE-DAD

A determinação do AA em todas as amostras foi realizada no sistema CLAE (Shimadzu, Tokyo, Japan), que consiste em: uma bomba LC-20AT, desgaseificador DGU-20A5, detector de arranjo de diodos (DAD), coluna CTO-20 A e amostrador automático SIL-20A. A temperatura da coluna de separação foi estabelecida em 30°C. A separação dos analitos foi realizada usando coluna de aço inoxidável empacotada com ACE® C18 (250×4,6 mm, 5µm). Antes da utilização, a fase móvel foi filtrada através de filtros de membrana de 0,45 µm (Millipore, Milford, MA, USA) e degaseificada sob vácuo.

Os analitos foram separados por eluição isocrática e a fase móvel consistiu em uma solução de KH₂PO₄ 20 mM, preparada em água deionizada, a uma taxa de fluxo de 1mL/min. Subsequentemente, o pH foi ajustado para 3,0. Todos os solventes foram filtrados através de filtros de membrana (Millipore) 0,45 µm e desgaseificados durante 20 minutos usando limpador ultra-sônico (USC-2800, Unique, Indaiatuba, SP, Brazil). A detecção DAD foi realizada no comprimento de onda específico de 245 nm para AA, os dados cromatográficos foram obtidos e processados com o software da Shimadzu LC Solutions e os resultados foram obtidos por comparação com padrões externos. As soluções estoques de padrão do AA foram preparadas (1 mg/mL) em metanol e armazenado a -8 °C. Foram preparadas soluções-padrão diariamente por diluição com a fase móvel. A mistura foi centrifugada a 5000 rpm durante 5 min, filtrada através de uma membrana de difluoreto de polivinilideno (DFPV) (13 mm, 0,45 µm; Millipore) e foi analisada a amostra límpida obtida.

Para a análise da vitamina C, o volume da amostra injetada no CLAE foi de 20 µL. O pico de AA foi identificado por comparação das suas características espectrais UV-visível e do tempo de retenção obtido da solução padrão. O espectro UV de 200 a 700 nm foi registado para reforçar a identificação do AA.

A atividade antioxidante foi medida em termos da doação de hidrogênio ou a capacidade de eliminação de radicais usando o radical estável DPPH. A redução do radical é seguida por uma diminuição na absorbância a 517 nm. Uma alíquota de 2 mL da solução-mãe etanólica de cada amostra em estudo foi transferida para tubos de ensaio e adicionados 2 mL da solução 1 mM de DPPH. Os tubos foram cobertos com Parafilm® e mantidos no escuro durante 15 minutos. A absorbância a 517 nm foi medida com um espectrofotômetro de UV-vis (modelo V-530, Jasco, Inc., Easton, MD, EUA) e comparada com a curva de calibração do AA. Os resultados foram expressos em miligramas de AA por grama de amostra seca. Cada ensaio foi realizado em triplicata. Alternativamente, a quantidade de amostra necessária para reduzir a absorbância de DPPH por 50% (IC₅₀) foi também empregada para expressar a atividade antioxidante de todas as amostras.

3.3 ANEXO 2 - Carbon paste based biosensors for antioxidant capacity.

Para este estudo: Foram adquiridos da Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA) os seguintes reagentes: pó de grafite, nanotubos de carbono de múltiplas parede (MWCNT), Albumina de Soro Bovino (BSA), quitosano, e ácido desoxirribonucléico DNA. Foram adquiridos a partir da Merck (Darmstadt, Alemanha): sílica, dióxido de titânio e o óleo mineral. Os MWCNT foram ativadas por oxidação química em ebulição de ácido nítrico 50%.

Foi utilizado o Espectrofotômetro UV-visível Micronal (modelo B582) com célula de plástico de 1 cm para ensaios da atividade enzimática de lacase do fungo *Pycnoporus sanguineus*. Os experimentos eletroquímicos foram realizados no potenciostato/galvanostato Autolab (modelo PGSTAT 30) e no potenciostato μ Autolab disponível na Faculdade de Farmácia da UFG. A filtração do extrato bruto da lacase foi efetuada com auxílio da bomba de vácuo modelo WP111580, marca Millipore. Utilizou-se capela de fluxo laminar (Adquirida de Marconi: equipamentos para laboratório) para repique dos fungos e aplicação dos destes nos meios de biossíntese da lacase. Foi utilizada uma estufa de incubação com agitação Autoclave marca Bio-Eng, modelo A75, para esterilização dos meios de cultura dos fungos e meios de biossíntese da lacase.

O extrato bruto da lacase (2019 UL⁻¹) foi obtido por fermentação submersa utilizando cinco discos (7 mm de diâmetro) da *Pycnoporus sanguineus* (CCT-4518) em meio de crescimento contendo 12,8 g L⁻¹ de extrato de malte (HiMedia, Mumbai, Índia) e 0,005 g L⁻¹ CuSO₄.H₂O (Cromoline, São Paulo, Brasil). Utilizou-se como indutor de lacase, 50 mg L⁻¹ de 2,5-xilidina (Aldrich Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). O processo

de fermentação ocorreu sob agitação de 150 rpm, a 28 °C por 72h. O micélio foi separado por filtração e o extrato bruto utilizado como fonte de lacase.

3.3.1 Preparação das amostras de café

Os extratos de café torrado foram preparadas por infusão de duas gramas (2g) de cada amostra em 25 ml de água quente (100°C) por 10 minutos sob agitação. Depois, os extratos de café foram arrefecidos até à temperatura ambiente e filtrados com papel de filtro de 0,45 µm. A solução resultante foi diluída em solventes de qualidade analítica adequados de acordo com a experiência, a fim de se obter as soluções de ensaio. Para as medições eletroquímicas, foram diluídos 250 µL da solução resultante em 4 mL da solução de eletrólito, isto é, em 0,1 M de tampão fosfato de pH 5,0.

3.3.2 Preparação do biossensor

A imobilização foi realizada pela oclusão em diferentes compósitos de carbono em pó. Resumidamente, foram misturados 250 µl de extrato bruto da lacase com grafite em pó e a mistura com os diferentes modificadores foram secos à temperatura ambiente (Tabela 10). Em seguida, foi adicionado óleo mineral e a porção foi rigorosamente homogeneizada, a fim de se obter uma pasta uniforme.

Tabela 10- Composição dos eletrodos de pasta de carbono modificados com extrato bruto da lacase e diferentes materiais.

Biossensores	Grafite em pó (mg)	Extrato de lacase (2,5 U _{mL} ⁻¹) (μL)	Óleo Mineral (mg)	Glutaraldeído (μL)	Material
CPL	80	250	80	----	Pasta de carbono
CPL-BSA	80	250	80	15,0	ASB (5 mg)
CPL-C	80	250	80	15,0	Quitosana (5 mg)
CPL-S	80	250	80	15,0	Sílica (5 mg)
CPL-T	80	250	80	15,0	Dióxido de titânio (5 mg)
CPL-D	80	250	80	15,0	DNA (10 mg)
CPL-CN	80	250	80	15,0	Nanotubos de carbono (5 mg)
CPL-DnCN	80	250	80	15,0	Nanotubos de carbono (5 mg) e DNA (10 mg)
CPL-DCN	80	250	80	15,0	Nanotubos de carbono (5 mg) e DNA (10 mg)
CFE	---	250	----	15,0	Fibra de carbono

A pasta de carbono-Lacase (CPL) foi modificada com albumina de soro bovino (CPL-BSA), Quitosana (CPL- C), Sílica (CPL-S), Dióxido de titânio (CPL-T), DNA (CPL-D), Nanotubos de carbono (CPL-CN), Nanotubos de carbono não ativados com DNA (CPL-DnCN) Nanotubos de carbono ativados com DNA (CPL-DCN).

Uma porção adequada da pasta aglutinada foi utilizada para encher a cavidade de 2 mm de diâmetro e 0,5 mm de profundidade do capilar, originando o CPL como biossensor.

3.3.3 Ensaios eletroanalíticos

Os experimentos voltamétricos foram realizados em um potenciostato/galvanostato μ Autolab III® integrado ao software GPES 4,9®, Eco-Chemie, Utrecht, Países Baixos. As medidas foram realizadas em uma célula eletroquímica de 5,0 mL, com três eletrodos: um biossensor de pasta de carbono a base de lacase e modificadores ($\varnothing = 2$ mm), um fio de Pt e Ag/AgCl/ KCl_(sat.) 3M (ambos adquiridos a partir de soluções de laboratório, São Paulo, Brasil), representando o eletrodo de trabalho, o contra-eletrodo e eletrodo de referência, respectivamente. A pasta de carbono foi renovada mecanicamente antes de cada experiência, a fim de assegurar a reprodutibilidade dos resultados. As condições experimentais para a voltametria de pulso diferencial (VPD) foram: amplitude de pulso 50 mV, largura de pulso de 0,5 s e velocidade de varredura 5 mV s⁻¹. As condições experimentais para a voltametria cíclica (CV) foram: velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹ e intervalo de varredura de 0 a 1 V. Os voltamogramas da técnica DP tiveram suas linhas de base corrigidas, e em seguida, todos os dados foram analisados e tratados com o software Origin 8®. Todas as experiências foram realizadas à temperatura ambiente (21 ± 1°C) em triplicata (n = 3) e a solução de eletrólito principal utilizado foi o tampão de fosfato (PBS).

3.3.4 Ensaios espectrofotométricos

As medidas de absorvância foram realizadas com o espectrômetro Q798U2VS o (Quimis Aparelhos Científicos, São Paulo, Brasil). Todas as amostras foram analisadas numa célula vítrea de 1 cm à temperatura ambiente (21 ± 1°C).

3.3.4.1 Ensaio com o radical livre DPPH

Foram analisadas seguindo o método padrão a atividade de eliminação dos radicais livres de DPPH das diferentes amostras de café. Foram misturados 2,5 mL de uma solução etanólica de DPPH (0,1 mM) e uma alíquota de 0,5 mL de etanol puro para atingir o volume final de 3,0 mL que foi repetido para todas as amostras analíticas de café. A solução da reação foi incubada durante 5 minutos no escuro à temperatura ambiente e mediu-se a absorvância da solução no comprimento de onda de 517 nm, contra a atividade do branco (A ~ 0,7), enquanto que o etanol, o solvente utilizado para

preparar todas as soluções, foi utilizado para ajustar a linha de base ($A = 0,000$). A atividade antioxidante foi expressa como EC_{50} , que representa a quantidade de café para produzir 50% de descoloração de DPPH em contraste com o branco.

3.3.4.2 Ensaio de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu

Para a determinação do teor de polifenóis totais aplicou-se o método ajustado de Folin-Ciocalteu (FC). Em 100 μ L de amostras e soluções padrão de ácido gálico foram adicionados 2 mL de água e 0,5 mL de reagente fenólico de Folin-Ciocalteu, e em seguida, deixou-se reagir durante cinco minutos. Posteriormente foi adicionada 1,5 mL de solução de carbonato de sódio a 20% e completada com água destilada para o volume total de 10 mL. Após 1 h de reação à temperatura ambiente, no escuro, a absorbância da solução foi medida em 765 nm. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Os resultados são expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG), mg de AG para cada mL das amostras de café.

3.4 ANEXO 3 - Electrochemical behavior and determination of major phenolic antioxidants in selected coffee samples.

3.4.1 Amostras de café

As diferentes marcas comerciais das amostras de café torrado que foram investigadas neste trabalho foram compradas nos mercados locais de Goiânia-GO/Brasil; Coimbra/Portugal e Auckland/Nova Zelândia. As amostras de café foram identificadas de acordo com as novas formas de consumo tecnológico envolvida em três tipos principais: grânulos solúveis (SG, $n = 7$); poder para perfusão (PI, $n = 3$); cápsulas para café expresso (CE, $n = 21$), que foram classificadas em sub "Lungo ou lunghi" (G), regulares (R) e descafeinado (D). No fim de discriminar a origem, temos usado os códigos ISO (http://userpage.chemie.fu-berlin.de/diverse/doc/ISO_3166.html) em BR, PT, NZ, CO e IN, respectivamente para o Brasil, Portugal, Nova Zelândia, Colômbia e Índia.

3.4.2 Ensaio eletroanalítico

A fim de assegurar a reprodutibilidade dos resultados preparou-se a pasta de carbono mecanicamente antes de cada experiência para ser utilizada como eletrodo de trabalho. As condições experimentais para a voltametria de pulso diferencial (VPD) foram: amplitude de pulso de 50 mV, largura de pulso de 0,5 s e velocidade de varredura 5 mV s^{-1} . As condições experimentais para a voltametria cíclica (VC) foram: velocidade de

varredura de 100 mV s^{-1} e intervalo de varredura de 0 a 1 V. As condições experimentais para a voltametria de onda quadrada (VOQ) foram: frequência de 30 Hz, amplitude de pulso de 50 mV e velocidade de varredura efetiva de 100 mV s^{-1} . Os voltamogramas obtidos pela técnica de PD foram subtraídos e a linha de base corrigida e em seguida, todos os dados foram analisados e tratados com o software Origin 8. Todas as experiências foram realizadas à temperatura ambiente ($21 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) em triplicata ($n = 3$) e o principal eletrólito utilizado nas análises foi o tampão fosfato de pH 5.

3.4.3 Análises no CLAE

A determinação dos principais componentes do café: ácido caféico, o ácido clorogênico e cafeína em todas as amostras foram realizadas no sistema de CLAE Shimadzu (Shimadzu, Quioto, Japão) que consiste em uma bomba LC-20AT, DGU-20A5 degaseificador, detector SPD-M20A PDA, forno de coluna CTO-20A e mostrador automático de amostras SIL-20 A. A temperatura do forno da coluna foi ajustada para 30°C . A separação dos analitos foi realizada usando coluna de aço inoxidável empacotada com ACE[®]C18 (250 x 4,6mm x 5 μm). A fase móvel utilizada consistiu em uma mistura, a 80:20 v/v, de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 3,0) em etanol. A fase móvel foi filtrada antes da utilização através da membrana de Nylon 0,45 μm (Millipore, Milford, MA, EUA) e degaseificada em banho ultrasônico (Unique[®] USC-2800) durante 20 minutos. A taxa de fluxo foi de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e 20 μL de amostra foram utilizados para injeção no CLAE. Realizou-se a detecção em um comprimento de onda específico de 280 nm e os dados obtidos para padrões externos e as amostras foram processados e comparados no software LC Solutions. As soluções de ácido clorogênico, ácido caféico e cafeína (1 mg mL^{-1}) foram solubilizados em metanol e armazenadas a 8°C . Essas soluções estoque de trabalho foram preparadas por diluição diária numa fase móvel compatível com esses analitos.

Os resultados e discussão neste trabalho serão apresentados a partir dos artigos publicados referentes ao desenvolvimento científico deste trabalho.

Os resultados e discussão sobre sensores eletroquímicos a base de carbono são mostrados em três artigos publicados nas revistas "Food analytical methods" , "Food chemistry" e "International Journal of Electrochemical Sciences".

Os resultados e discussão sobre biossensores usando pasta de carbono modificado com o extrato bruto, fonte de enzima lacase é mostrado no artigo intitulado como: "Carbon paste based biosensors for antioxidant capacity", para detecção da capacidade antioxidante de diferentes amostras de café.

O trabalho desenvolvido e apresentado nesta tese, resumiu atividades executadas durante a pesquisa e permitiu visualizar o constante desenvolvimento dos biossensores amperométricos de pasta de carbono, ao avaliar a atividade antioxidante pelo conteúdo total de polifenóis, o que é frequente na pesquisa com lacase.

A análise dos resultados obtidos no presente trabalho, nas condições testadas, permitiu concluir que:

- O uso do índice eletroquímico mostrou ser uma ferramenta rápida e apropriada para expressar a atividade antioxidante de amostras de café e apresentou uma boa correlação com o método de sequestro do radical. Também é possível correlacioná-lo com os conteúdos de ácidos hidroxicinâmicos, a partir da CLAE, presentes nessas amostras, assim comprovando a eficácia do uso das técnicas eletroanalíticas na determinação do poder antioxidante dessa bebida.
- O índice eletroquímico aqui proposto está de acordo com os métodos tradicionais (DPPH) de capacidade antioxidante e da VPD, também foi empregado na quantificação do ácido ascórbico em todas as amostras de acerola e produtos comerciais. O baixo limite de quantificação e boa recuperação são consistentes com o alto nível de acurácia do método eletroanalítico, apresentou boa correlação comparada com a técnica de CLAE-DAD.
- A rotina foi escolhida como padrão entre os demais biossensores, como por exemplo, EPCL-DNA:CN, por apresentar o melhor desempenho. Dessa forma, este biossensor foi aplicado na avaliação da capacidade antioxidante e determinação total de fenol em amostras de café.
- O biopolímero com DNA confere grande estabilidade e boas propriedades elétricas aos biossensores lacase, enquanto os eletrodos de nanotubos aumentam a área eletroativa, levando a picos de altas correntes faradáicas.
- O biossensor e o método Folin Ciocalteu (FC) apresentaram resultados de valores de Fenóis Totais (FT) correlacionados. Além disso, o RSD% obtido para o biossensor foi menor, do que o obtido pelo método FC. Finalmente, como esperado para amostras de café o conteúdo de FT concordou com valores de EC_{50} obtidos para o ensaio de DPPH.

ADITIVOS E INGREDIENTES. Açúcares e xaropes em biscoitos e bolachas. Disponível em: http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/83.pdf. Acesso em 12/10/2013.

ALAGUMANIVASAGAM, G.; PASUPATHY, R.; KOTTAIMUTHU,A.;MANAVALAN,R. A. Review on In-vitro Antioxidant Methods, **International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences**,v.1, n.2,p.662-674, 2012.

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,p.143–152,2013.

ALMEIDA, S.; AMARAL, D.D.; SILVA A.S.L. Análise florística e estrutura de florestas de várzea no estuário amazônico. **Acta amazônica**, V.34, n.4,p. 513-524.2004.

ALVES, C. Q.; JORGE M. D.; JUCENI, P. D.; MARCUS, V. B.; ROSANE, M. A. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quimica Nova**, Salvador, v. 33, n. 10, p.2202-2210,2010.

AMARE, M.; ADMASSIE, S. Polymer modified glassy carbon electrode for the electrochemical determination of caffeine in coffee. **Talanta**, v. 93, n.15, p.122– 128. 2012.

ARNAO.; MARINO B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n.11, p. 419-421, 2000.

ARRIBAS,A.S.; FERNÁNDEZ,M.; CHICHARRO,M. The role of electroanalytical techniques in analysis of polyphenols in wine, **Trends in Analytical Chemistry**, v.34, p.78-96, 2012.

ARRUDA, A. S.; LIMA, R.G.; SILVA, R.M.; PEIXOTO, N. Desenvolvimento do camu-camu em diferentes substratos nas condições de Ipameri-GO. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, Goiania, v. 7, n. 12, p. 1-7, 2011.[article/view/444/pdf_139](#).

ARTEAGA, J.F.; RUIZ-MONTOYA, M.; PALMA, A.; ALONSO-GARRIDO, G.; PINTADO, S.; RODRÍGUEZ-MELLADO, J.M. Comparison of the simple cyclic voltammetry (CV) and DPPH assays for the determination of antioxidant capacity of active principles. **Molecules**, v.3,p.5126-5138.2012.

ASENJO, C.F. ACEROLA. IN: NAGY, S.; SHAW, P.E. (Ed.). **Tropical and subtropical fruits: composition, properties and uses**. Westport : AVI, 1980. p.341-374.

ASSUNÇÃO, R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.): variety and geographic effects. **Food Chemistry**, v. 81, n. 4, p. 495-502. 2003.

AURELIA M.P.; MIHAELA.C.C.; ANDREI.F.D. Total antioxidant capacity of some commercial fruit juices: electrochemical and spectrophotometrical approaches. **Molecules**, v.14, p.480-493, 2009.

BARBALHO, S.M.; DAMASCENO,D.C.; SPADA,A.P.; PALHARES,M.; MARTUCHI, K.A.; OSHIWA,M. Evaluation of Glycemic and Lipid Profile of Offspring of Diabetic Wistar Rats Treated with *Malpighia emarginata* Juice. **Experimental Diabetes Research**, v.17, n. 5, p.1-6, 2011.

BOLDUC M.P.; BAZINET, L.; LESSARD, J.; CHAPUZET, J.M.; VUILLEMARD, J.C. Electrochemical modification of the redox potential of pasteurized milk and its evolution during storage. **Journal of Agriculture Food and Chemistry**, v.54,p.4651–4657, 2006.

BLAINSKI, A.; LOPES, G. C.; MELLO, D.E.; J. C. P. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the determination of the total Phenolic content from *Limonium brasiliense* L. **Molecules**, v. 18,n.6, p. 6852-6865, 2013.

BLASCO, A. J.; GONZÁLEZ, M. C.; ESCARPA, A. Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse Voltammetry: towards an electrochemical index of natural antioxidants, **Analytica Chimica Acta**, v.511,p. 71–81,2004.

BLASCO, A. J.; ROGERIO, M. C.; GONZÁLEZ, M. C.; & ESCARPA, A. ‘Electrochemical Index’ as a screening method to determine “total polyphenolics in foods: A proposal. **Analytica Chimica Acta**, v.539,p. 237-244,2005.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**. v.29,p.1199-1200, 1958.

BLOIS, S.A note on free formation in biologically occurring quinones. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.18, n.1, p.165, 1955.

BLOMHOFF ,R. *et al.* The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. **Nutrition Journal**, v.9,n.3,p.1-11, 2010,

BOBBIO, F.O.; DRUZIAN, J.I.; ABRAM, P.A.; BOBBIO, P.A.; FADELLI, S. Fruits of açai palm (*Euterpe oleracea*) (Mart.) identification and quantification of the antocyanins. **Food Science and Technology**, v.20,p.32-37,2000.

BOSCH, M., ESPINOSA, A.J., RUIZ SÁNCHEZ, F., SÁNCHEZ ROJA, C.,BOSCH, O. Determination of paracetamol: Historical evolution Department of Analytical Chemistry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.42, p.291-321, 2006.

BOTT A.W. Practical problems in voltammetry 2. Electrode capacitance, **Current separation**,v.12,p.10-13,1993.

BÖYÜKBAYRAM, A. E., KIRALP, S., TOPPARE, L. & YAGCI, Y. Preparation of biosensors by immobilization of polyphenol oxidase in conducting copolymers and their use in determination of phenolic compounds in red wine. **Bioelectrochem**, v.69, p. 164-171, 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. Wiss.Technology,-Food Science and Technology**, v.28,p.25–30,1995.

BRASIL.Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Produção da extração vegetal e silvicultura,2007. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2007/comentario.pdf>.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, **Nutrition Reviews**, v.56,p.317-333,1998.

BRETT, C.M.A.; OLIVEIRA BRETT, A.M. (1993).Electrochemistry: Principles, Methods and Applications; Oxford Science Publications: Oxford.

BRIDSON, MD.; VERDCOURT, B. **Flora of Tropical East Africa: Rubiaceae**. (Part 2). Cape Town: Iziko Museums of Cape Town, p.415-747,1988.

BRIELMANN, H.; KAUFMAN, P.B.; CSEKE, L.J.; WARBER, S.; DUKE, J,A. **Natural Products from Plants**. CRC Press, p. 343 ,1999.

BUENDIA, B.; GIL, M.I., TUDELA, J.A.; GADY, A. L.; MEDINA, J.J.; SORIA, C.; LÓPEZ, J.B.;TOMÁS-BARBERÁN, F.A. HPLC -MS analysis of proanthocyanin oligomers and other phenolics in 15 strawberry cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.3916-3926, 2010.

BUTERA, D. L.; TESORIERE, F; DI GAUDIO, A.; BONGIORNO, M; ALLEGRA, A.M; PINTAUDI, R; KOHEN, R; LIVREA. ANTIO, M.A. Antioxidant activities of sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin.**Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.6895-6901.2002.

CABAJ, J., J.; SOLODUCHO, A.; NOWAKOWSKA-OLEKSY. Langmuir-blodgett film based biosensor for estimation of phenol derivatives. **Sensors Actuators B**, v.143, p. 508-515, 2010.

CABAJ, J.; SOLODUCHO, J.; CHYLA, A.; BRYJAK, J.;ZYNEK, K. The characterization of ordered thin films built of immobilized phenoloxidases. **Sensors and Actuators B**, v. 136, n.2, p. 425-431, 2009.

CAMBRONY,H.R.(1998).Arabusta and other interspecific fertile Hybrids. **Coffee volume 4 Agronomy**, Clarke, R.J.and Macrae, R .(Editors), New york,Elsevier Applied science Ltd.4.263-290.

CAMPANELLA, L; MARTINI,E;RITA, G;TOMASSETTI,M. Antioxidant capacity of dry vegetal extracts checked by voltammetric method. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v.4, p.135-144. 2006.

CARVALHO, I.S.; SILVA, R.*In vitro* Antioxidant Activity, Phenolic Compounds and Protective Effect against DNA Damage Provided by Leaves, Stems and Flowers of *Portulaca oleracea* (Purslane). **Natural Product Communications**, v.9,n.1,p.45-50,2014.

CARVALHO, J. E. U.; NASCIMENTO, W. M. O. Fruticultura na Amazônia: o longo caminho entre a domesticação e a utilização. *Esalq*, 2004. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/departamentos/lpv/download/Resumo%20Palestra%20Esalq.pdf>>.

CARVALHO, NASCIMENTO. J.A.; LUCENA, A. P. S.; MACIEL, J. X.; TAVARES, J. M. Antioxidant activity and phenolics content of selected Brazilian wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 30-36,2010.

CHEN, A. Y.; CHEN, Y. C. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. **Food Chemistry**, Berlim, v. 138, n. 4, p. 2099-2107, 2013.

CHEYNIER, V.; COMTEB,G.; KEVIN, M. D.; LATTANZIOD,V.; MARTENSE,S. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology And Biochemistry*. v.72, p. 1-20. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0981942813001745>>.

CHIN, Y.W.; CHAI, H.B.; KELLER, W.J.; KINGHORN, A.D. Lignans and other constituents of the fruits of *Euterpe oleracea* (Acai) with antioxidant and cytoprotective activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.17, p.7759-7764, 2008.

CHUNG, K.T.; WONG, T.Y.; WEI, C.I.; HUANG, Y.W.; LIN, Y. Tannins and human health: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.38,p.421-464,1998.

CLAY, W.; CLEMENT, C.R. Selected species and strategies to enhance income generation from Amazonian forests. Rome: FAO, 1993, p.67.

CRISPIM, D.V.F.S.; LINO,M.A.F; BENJAMIN,R.S; CUBILLANA-AGUILERA, L.M.; PALACIOS-SANTANDER, J.M.; GIL,E.S., Differential Pulse Voltammetric Determination of Paracetamol Formulations at a Sonogel-Carbon Electrode, **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 34,n.2,p.344-350,2015.

CROFT, K.D.The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of Science** , New York, v.854, p.435-442, 1998.

CUBILLANA-AGUILERA L.M.; PALACIOS-SANTANDER J.M.; NARANJO-RODRÍGUEZ I.; DE HIDALGO-HIDALGO CISNEROS J.L. Study of the influence of the graphite powder particle size on the structure of the sonogel-carbon materials. **Journal of Sol-Gel science technology**, v.40, p.55–64, 2006.

DENG,G.F.; LIN,X.; XIANG-RONG, X.; LI-LI, G.; JIE-FENG, X.; HUA-BIN, L. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 vegetables , **Journal of functional foods**, v.5,n.1,p.260-266,2013.

DICULESCU, V.; SANTANA, H.E.; GIL,E.S.; OLIVEIRA-BRETT, A.M. Methoxylation and glycosylation effect on the redox mechanism of citroflavones. **Electroanalysis**, v, 24, p. 1019–1026, 2012.

DOGAN-TOPAL, B.; OZKAN,S.;USLU,B. The Analytical Applications of Square Wave Voltammetry on Pharmaceutical Analysis, **The Open Chemical and Biomedical Methods Journal**, v.3,p. 56-73, 2010.

DWIVEDI, U.N.; SINGH, P.; PANDEY, V.P.; KUMAR, A. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, p. 117-128, 2011.

ENACHE, T.A.; OLIVEIRA BRETT, A.M. Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways, **Journal of electro analytical chemistry**, v.655, p.9–16, 2011.

EVANS, C.A.; MILLER, N, J.; PAGANDA,G. Antioxidant properties of phenolic compounds, **Trends of plant science**, v.2,n.4, p.152-159,1997.

FERGUSON, L.R.; HARRIS, P.J. Protection against cancer by wheat bran:. Role of dietary fiber and phytochemicals, **European Journal of Cancer Prevention** , Oxford, v.8, n.1, p.17-25, 1999.

FEREIDOON, S.; NICHOLE, C.; YING, Z.; MARIAN, N. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates, **Food Chemistry**, v. 109, p.144–148, 2008.

FERREIRA, I. C.; BARROS, L.; ABREU, R. M. Antioxidants in wild mushrooms. **Current Medicinal Chemistry**, v.16, n.12, p.1543–1560, 2009.

FERREIRA, R, Q.; AVACA, L.A. Electrochemical Determination of the Antioxidant Capacity: The Ceric Reducing/Antioxidant Capacity (CRAC) Assay. **Electroanalysis**. v.20, n.12, p. 1023-1029, 2008.

FERREYRA, M. L. F.; RIUS, S. P.; CASATI, P. Flavonoids: Biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**, v,28, n.3, p.1-15,2012. **Food Chemistry**, v.81, p.495-502, 2003.

FRANCO, M. N.; GALEANO-DIAZ, T.: LÓPEZ, O.; FERNANDEZ-BOLAÑOS, J.G.; SÁNCHEZ, J.; DE MIGUEL, C.; GIL, M. V.; MARTÍN-VERTEDOR, D. Phenolic compounds and antioxidant capacity of virgin olive oil. **Food chemistry**, v.163, n.15, p. 289-298, 2014.

FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S. The problems of using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80,p. 1925-1941,2000.

FREITAS, C.A.S.; MAIA, G.A.; COSTA, J.M.C.; FIGUEIREDO, R.W. SOUSA, P.H.M. Acerola: produção, composição, aspectos nutricionais e produtos. **Revista Brasileira Agrociência, Pelotas**, v. 12, n.4, p. 395-400, 2006.

FUSCO, M.; TORTOLINI, C.; DERIU, D.; MAZZEI, F. Laccase-based biosensor for the determination of polyphenol index in wine. **Talanta**, v.81,p. 235–240,2010.

GATTRELL, M.; KIRK ,D.W. A Study of Electrode Passivation during Aqueous Phenol Electrolysis. **Journal of The Electrochemical Society**,v.140,p.903 – 911, 1993.

GIL, E.S. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 2.ed. São Paulo: Editora Pharmabooks, 2007,p, 485.

GIL, E.S., Melo, G.R. Electrochemical biosensors in pharmaceutical analysis, **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**,v.46,p,375-391,2010.

GOMES, S.A.S.S.; NOGUEIRA ,J.M.F.; REBELO, M.J.F. An amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine. **Biosensors & Biorelectronics**,v.20,p.1211-1216,2004.

GONÇALVES, M.; RODRIGUES, J.; TRALHÃO, G.; MENDES, B. Actividade Biológica de Vinhos Portugueses: Correlação com Cor e com Teor de Antioxidantes. **Revista Portuguesa de Farmácia**, v.I LII,n.5,p.183,2011.

GOODMAN, L.S.G.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2010. p.1821.

GORDON, M.Significance of dietary antioxidants for health. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13,n.1. p.173-179,2012.

GRUÈRE, G.; GIULIANI, A.; SMALE, M. Marketing underutilized plant species for benefit of the poor: A conceptual framework. Environmental and Protection Technology (EPT) discussion paper No 154. Washington, DC: International Food Policy Research Institute, environment and production technology division, june 2006.

GÜNDÜZ, K.; OZDEMIR, E. The effects of genotype and growing conditions on antioxidant capacity, phenolic compounds, organic acid and individual sugars of strawberry. **Food Chemistry**, v.15, n.155, p.298-303, 2014.

GUPTA, A.; DWIVEDI, M.; MAHADI, A. A.; NAGANA GOWDA, G. A.; KHETRAPAL, C. L.; BHANDARI, M. Inhibition of adherence of multi-drug resistant E. coli by proanthocyanidin. **Urological research**, v. 40, n.2, p.143-150, 2012.

HAGERMAN, A.; BUTLER, L.G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. **Journal of biological chemistry**, v.256, p.4494-4497. 1981.

HARVEY, M. I. Analysis of hydrolysable tannins. **Animal Feed Science and Technology**, v.91, p.3-20, 2001.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HARASYM, J.; OLEDZKI, R. Effect of fruit and vegetable antioxidants on total antioxidant capacity of blood plasma. **Nutrition**, v. 30, n. 5, p. 511-517, 2014.

HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.8, p.2928-2935, 2005.

HE, J.B.; YUAN, S.J.; DU, J.Q.; HU, X.R.; WANG, Y. Voltammetric and spectral characterization of two flavonols for assay-dependent antioxidant capacity. **Bioelectrochemistry**, v. 75, p.110-116, 2009.

HENDERSON, A.; GALEANO, G. A revision of *Euterpe*, *Prestoea*, and *Neonilcholsonia* (Palmae). **Flora Neotropica**, Monograph v. 72, p.1 - 90, 1996.

HUANG, D. J., OU, B. X., PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.6, p.1841–1856, 2005.

HUANG, T.; GAO, P.; HAGEMAN, M.J. Rapid screening of antioxidants in pharmaceutical formulation development using cyclic voltammetry--potential and limitations. **Current Drug Discovery Technology**, V.1, p.173-179,2004.

HULANICKI, Adam; GLAB, Stanislav; INGMAN, Folke. Chemical sensors: definitions and classification. **Pure and applied chemistry**, 1991, vol. 63, no 9, p. 1247-1250

HUR, S.J.; LEE, S.Y.; KIM, Y.; CHOI,I.; KIM, G. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. **Food Chemistry**, v.160, n.1, p.346-56, 2014.

IBRAF, 2009.[online] Estatísticas: produção brasileiras de frutas 2009. São Paulo: Instituto Brasileiro de Frutas. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/estatisticas/Produ%C3%A7%C3%A3o%20Brasileira%20de%20Frutas%202009%20-%20Final.pdf>. Acesso em: 26 jun. 2012.

ICO.(2012). <<http://www.ico.org>> Accessed 29 November 2012.

INSTITUTO CRANBERRY (Estados Unidos) (Org.).Cranberry and Human health research review.2014.Disponível em: <www.cranberryinstitute.org/health_research/HHRv2.pdf>. Acesso em: 23 dez. 14.

ITOO, S.; AIBA, M.; ISHIHATA, K. Comparison of ascorbic acid content in acerola fruit from different production region depend on degree of maturity, and it's stability by processing. **Nipon Shokuhim Gakkaishi Kogyo** , Tokyo, v.37, p.726-729, 1990.

JUSTICE, K.C.; VISENTAINER, J.V.; SOUZA, N.E.; MATSUSHITA ,M. Nutritional composition and vitamin C stability in stored camu–camu (*Myrciaria dubia*) pulp. **Archives of Latin American Nutrition**, v. 50, no.4, p. 405-408, 2000.

KAHKONEN, M.P.; HOPIA, A.I.; VUORELA, H.J.; RAUHA, J.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T.S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.3954-3962,1999.

KARAÇELIK, A.K.; KÜÇÜK, M. ISKEFIYELI, Z.; AYDEMIR, S.; SMET, S.; MISEREZ, B.; SANDRA, P. Antioxidant components of *Viburnum opulus L.* determined by on-line HPLC–UV–ABTS radical scavenging and LC–UV–ESI-MS methods, **Food Chemistry**, v.175,p.106–114,2015.

KERRY, N.L.; ABBEY, M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. **Atherosclerosis, Limerick**, v.135, n.1, p.93-102, 1997.

KHASKHELI,A.R et al., Differential pulse voltammetric determination of paracetamol in tablet and urine samples at a micro-crystalline natural graphite–polystyrene composite film modified electrode. **Electrochimica Acta**, v.101,n.1,p.238–242, 2012.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v.99, p.213–218, 1999.

KRENN, L.; STEITZ, M.; SCHLICHT, C.; KURTH, H.; GAEDCKE, F. Anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts of berries in food supplements--analysis with problems. **Pharmazie**, V.62,n.11,p.803-812. 2007.

KY, C.L.; LOUARN,J.; DUSSERT,S.; GUYOT,B.;HAMON,S.; NOIROT,M.Caffeine, Trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *coffea arabica L.* and *C.Canephora P.Accessions*. **Food chemistry**,v.75,p.223-230,2001.

LAIDLER, K.J.; MEISER, J.H.; SANCTUARY, B.C. **Physical chemistry**, Chemical kineticsI and II. 4. ed. Boston: Houghton Mifflin, p. 361-493, 2003.

LI, A.N.; LI, S.; LI, H.B.; XU, D.P.; XU, X.R.; CHEN, P. Total phenolic contents and antioxidant capacities of 51 edible and wild flowers. **Journal of Functional Foods**, V.6, n. p.319–330. 2014.

LIAO,H.F.; CHEN,Y.Y.; LIU,J.J.; HSU,M.L.; SHIEH,H.J.; LIAO,H.J.; SHIEH,C.J.; SHIAO,M.S.; CHEN,Y.J. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenesis, tumor invasion, and metastasis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.7907-7912, 2003.

LICHTENTHÄLER, R.; RODRIGUES R.B.; MAIA, J.G.; PAPAGIANNOPOULOS, M.; FABRICIUS, H.; MARX, F.Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea Mart.* (Açaí) fruits.**Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56,n.1, p. 4162-4167, 2006.

LINO,F.M.A.; SÁ, A,L.Z.; TORRES, I.M.S.; ROCHA, M.L.; DINIS, T.C.P.; GHEDINI,P.C.; SOMERSET, V.S.; GIL, E.S. Voltammetric and spectrometric determination of antioxidant capacity of selected wines, **Electrochimica Acta**, v.128,p. 25–31,2014.

LIU, Y.; PINZÓN-ARANGO, P.A.; GALLARDO-MORENO, A.M.; CAMESANO, T.A. Direct adhesion force measurements between E. coli and human uroepithelial cells in cranberry juice cocktail. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.54,n.12,p.1744-1752, 2010.

LOPEZ-ALARCON, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays, **Analytica Chimica Acta**, v.763, n.6, p 1–10, 2013.

LUBOMILA, O.; JASINSKA, U.; OSINSKA, M.; SKAPSKA, S. Juices and beverages with a controlled phenolic content and antioxidant capacity. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v.13, n. 3, p.261-268, 2004.

LUBOMIR, S.; JOZEFCSOCHR, PETER T.; MIROSLAV, R.; DUSAN, BUSTI. Simultaneous Determination of paracetamol and penicillin V by square-wave voltammetry at a bare boron-doped diamond electrode. **Electrochimica Acta**, v.68, p.227-234, 2012.

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

MAKHOTKIN, O.; KILMARTIN, P.A. The phenolic composition of Sauvignon blanc juices profiled by cyclic voltammetry, **Electrochimica Acta**, v.83 ,p. 188-195,2012.

MAKHOTKIN, O.; KILMARTIN, P,A. The use of cyclic voltammetry for wine analysis: determination of polyphenols and free sulfur dioxide. **Analytica Chimica Acta**, v,668. p.155-165, 2010

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, p. 727–747,2004.

MANNINO, S.; BRENNAN, O.; BURATTI, S.; COSIO, M.S. A new method for the evaluation of the “antioxidant power” of wines. **Electroanalysis**, v.10,p, 908–912, 1998.

MARIA, G.M. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review, **Molecules**, v.15,p. 9252-9287, 2010

MARTYSIAK-ZUROWSKA, D.; WENTA, W. A.Comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk.**ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v.11,n.1,p. 83-89,2012.

MASON, H. S. (1959) in **Pigment Cell Biology** (Gordon, M., ed.), pp. 563-582, Academic Press, New York.

MASEK, A.; ZABORSKI, M.; CHRZESCIJANSKA, E. Electro oxidation of flavonoids at platinum electrode studied by cyclic voltammetry. **Food Chemistry**, v.127,p.699-704, 2011.

McCAMEY, D. A.; THORPE, T. M.; MCCARTHY, J. P. **Coffee Bitterness. In "Developments in Food Science**, v. 25, p.169-182. 1990.

MELLO, L.D.; KUBOTA.L.T. Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation.**Talanta**, v.72,p.335-348,2007.

MELO, B.; SOUSA, L. B. Biologia da reprodução de Coffea arabica L. e Coffea canepfora Pierre. **Revista Verde**, Mossoró, v. 6, n. 2, p. 1-7, 2011.

MELO, BENJAMIM DE.; SOUSA, LARISSA BARBOSA, DE.; BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE *Coffea arábica*. L. e *Coffea canephora* Pierre. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável: GRUPO VERDE DE AGRICULTURA ALTERNATIVA (GVAA)**, Mossoró, v. 6, n. 2, p.1-7, 2011. Trimestral. Disponível em: <<http://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/>>

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

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity.**Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219,2004.

MORALES-SOTO, A.; GARCIA-SALAS, P.; RODRIGUEZ-PEREZ, C.; JIMENEZ-SANCHEZ, C.; CADIZ-GURREA, M. L.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNANDEZ-GUTIERREZ, A. Antioxidant capacity of 44 cultivars of fruits and vegetables grown in andalusia. **Food Research International**, v.58,p. 35-46, 2014.

MULLER, F.L.; LUSTGARTEN, M.S.; JANG, Y.; RICHARDSON, A.; VAN, REMMEN. H. Trends in oxidative aging theories. **Free Radical Biology & Medicine**, v.43,n.4, p.477–503, 2007.

MUELLER-HARVEY, I. Analysis of hydrolysable tannins. **Animal Feed Science and Technology**, v.91, p.3-20, 2001

MUÑIZ-MIRET, N.; VAMOS, R.; HIRAOKA, M.; MONTAGNINI, F.; MENDELSON, R.O.The economic value of managing the açai palm (*Euterpe oleracea* L Mart.) in the floodplains of the Amazon estuary, Pará, Brazil. **Forest Ecology and Management**, v.87,p.163-173,1996.

NIEDERLANDER, H.A.G.; VAN BEEK, T.A.; BARTASIUTE, A.; KOLEVA, I.I. Antioxidant activity assays on-line with liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1210, p.121–134, 2008.

NOGUEIRA, O. L.; FIGUEIRÊDO, F. J. C.; MÜLLER, A. A. (Ed.). Açai. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, P.137, 2005. (Embrapa Amazônia Oriental. Sistemas de produção, 4). Euterpeinae). New York: New York Botanical Garden, 1996. 90p. (Flora Neotropica, 72).

OLIVEIRA BRETT, M.A.; FRANK-MICHAEL, M. Development and characterization of a small volume sonovoltammetric cell. **Electrochimica Acta**, v. 42, p. 945-949, 1997.

OLIVEIRA BRETT, A.M.; JANEIRO, P. Solid state electrochemical oxidation mechanism of morin in aqueous media. **Electroanalysis**, v.17, p. 733-738, 2005.

OLIVEIRA DE SOUZA M *et al.* Diet supplementation with açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. **Nutrition**, v.26, n.7-8, p.804-810, 2010.

OLIVEIRA, M. S. P.; CARVALHO, J. E. U.; NASCIMENTO, W. M. O.; MÜLLER, C. H. Cultivo do açazeiro para produção de frutos. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. 2002. 18 p. (Circular técnica, 26).

OLIVEIRA, M. S. P.; CARVALHO, J. E. U.; NASCIMENTO, W. M. O.; MÜLLER, C. H. PACHECO-PALENCIA LA, MERTENS-TALCOTT, S.; TALCOTT, S.T. Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil from açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.12, p.4631-4636, 2008.

OLIVEIRA, R.V.; ANDRADE, L.; FILHO, R.; QUEZIA, B. Development of a HPLC method to follow the degradation of phenol by electrochemical or photo electrochemical treatment, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.17, n.2, 369-373, 2006.

OLIVEIRA-ROBERTH, A.; SANTOS, D.; CORDEIRO, D.; LINO, F.M.A.; BARA, M.; GIL, E.S. Voltammetric determination of Rutin at Screen-Printed carbon disposable electrodes, **Central European Journal of Chemistry**, v.10, n.5, p.1609-1616, 2012.

OZCELIK, B.; LEE, J.H.; MIN, D.B. Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. **Journal of Food Science**, v. 68, n.2, p.487-490, 2003.

PACHECO-PALENCIA, L.A.; HAWKEN, P.; TALCOTT, S.T. Phytochemical antioxidant and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea Mart.*) as affected by clarification, ascorbic acid fortification and storage. **Food Research International**, v.40, p. 620-628. 2007.

PARLIAMENT, T. H.; (2000).An overview of coffee roasting. In Caffeinated Beverages: Health Benefits, Physiological Effects and Chemistry; Parliment TH, Ho CT, Schieberle P. (Eds.), ACS Symposium Series 754; American Chemical Society. Washington, DC, pp. 188- 201.

PARRAS, P.; MARTÍNEZ-TOMÉ, A. M.; JIMÉNEZ, M. A. M. Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. **Food Chemistry**, v.102, n.3, p.582–592, 2007.

PAWELEK, J.; KÖRNER, A.M. Dopachrome Conversion: A Possible Control Point in Melanin Biosynthesis. **Journal of Investigative Dermatology**, v.75, p. 192–195,1980.

PERTUZATTI, P.B.; BARCIA, M.T.; RODRIGUES, D.; CRUZ, P.N.; HERMOSÍN-GUTIERREZ, I.; SMITH, R.; GODOY, H.T. Antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic extracts of brazilian blueberries. **Food Chemistry**, v.164, n.1, p.81-88, 2014.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas, **Química Nova**, v. 25, n.1, p. 45-61, 2002.

PLAMBECK, J.A. Electroanalytical chemistry, Basic principles and applications, John wiley & Sons, New york,1982.

POZO-INSFRAN, D.; BRENES, C.H.; TALCOTT, S.T. Phytochemical composition and pigment stability of açai (*Euterpeoleracea Mart.*).**Journal of food chemistry**, v.52,n.6, p.1539-1545.2004.

PRIETO-SIMON, B.; CAMPAS,M.; MARTY,J.L.; NOGUER,T. Novel highly-performing immunosensor-based strategy for ochratoxin A detection in wine samples, **Biosens. Bioelectron**, v.23, p.995–1002, 2008.

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

REIS, N.S.; SERRANO, S.H.P.; MENEGHATTI, R., GIL, E.S., Métodos eletroquímicos usados para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais, **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 6, p. 949-53, 2009.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, **Free Radical Biology & Medicine**, v.20,n.7,p.933-956,1996.

ROCHA, E.M.S.; POGGERE, P.A.; LOPES, A.; THOMAZINI, M.H.; LENZ, G.F.; SILVA, L.C.; MARTIN, C.A. Quantificação de ácido ascórbico em frutos de acerola (*Malpighia sp*)-revisão bibliográfica. Anais do III ENDICT-Encontro de Divulgação Científica e Tecnológica, Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR, 19-21 outubro, 2011.

RODRIGUES, R.B.; MENEZES, H.C.; CABRAL, L.M.C.; DORNIER, M.; RIOS, G.M. REYNES, M. Evaluation of reverse osmosis and osmotic evaporation to concentrate camu–camu juice (*Myrcyaria dubia*). **Journal of Food Engineering**, v.63,n.1,p. 97–102, 2004.

ROGEZ, H.; Açai: preparo, composição e melhoramento da conservação. Belém, Brazil: EDUFPA; P.313, 2000.

ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v.92,p. 235–254, 2005.

SÁ, L.; HASHIM, M.A.A. Flexible Solid State EDLC from a Commercially Prepared Multiwalled Carbon Nanotubes and Hybrid Polymer Electrolytes. **Journal of Materials Science Research**, v.3, p.-21, 2014.

SANTANA, Merce Teodora Aguil, et al. Caracterização de diferentes marcas de sucos de uva comercializados em duas regiões do Brasil. Teses da Ciência e Agrotecnologia, 2008, vol. 32, no 3, p. 882-886.

SCANDALIO, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defense (review). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n.7, p. 995-1014, 2005.

SCHAUSS ,A.G. et al, Safety evaluation of an açai-fortified fruit and berry functional juice beverage (MonaVie Active(®)).**Toxicology**,v.278,p.46-54,2010.

SCHAUSS, A.G.; XIANLI, W.; RONALD, L, P.; BOXIN, OU.; DEJIAN, H.; JOHN, O.; AMIT, A.; GITTE, S,J.; AARON, N, H.; EDWARD, S.M. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (açai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n.22,p.8604-8610, 2006.

SCHAUSS, A.G.; WU, X.; PRIOR, R.L.; OU, B.; PATEL, D.; HUANG, D.; KABABICK, J.P. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (açai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.8598–8603, 2006a.

SCHUETZLE, D.; HAMMERLE,R. (1986) Fundamentals and Applications of Chemical Sensors, ACS Symposium Series 309, American Chemical Society, Washington DC, 1st Ed. pp 1-34.

SCHWERTZ, M, C.; MAIA, J. R. P.; SOUSA, R. F. S.; AGUIAR, J. P. L.; YUYAMA, L K, O.; LIMA, E, S. Efeito hipolipidêmico do suco de camu-camu em ratos. **Revista de Nutrição**, v.25, n.1, p.35-44, 2012.

SHA, LI.; SHU-KE, LI.; REN-YOU, GAN.; FENG-LIN, SONG.; LEI, KUANG.; HUA-BIN, LI. Antioxidant capacities and total phenolic contents of infusions from 223 medicinal plants.**Industrial Crops and Products**,v.51,p.289-298,2013.

SHINODA, S.; AOYAMA, T.; AOYAMA, Y.; TOMIOKA, S.; MATSUMOTO, Y.; OHE, Y. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of acetaminophen analgesia in japanese patients with chronic pain. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v.30, n.1, p.157-161, 2007.

SMIDERLE, O. J.; SOUSA, R. de C. P. de. Teor de vitamina C e características físicas do

camu-camu em dois estádios de maturação. **Revista Agro@ambiente On-line**, Boa Vista, v. 2, p. 61-63, 2008.

SINGH, S.; MISHRA, S. Aging and Nutrition: a review article. **Journal of nursing and health science**, v.1,n.4, p. 43-47. 2013.

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

THÉVENOT, D. R.; TÓTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Pure and Applied Chemistry**, v.71, n.12, p.2333-2348,1999.

TÖRRÖNEN, A. R.; MÄÄTTÄ, K. R.; KAMAL-ELDIN, A. High performance liquid chromatography (HPLC) analysis of phenolic compounds in berries with diode array and electrospray ionization mass spectrometric (MS) detection: Ribes species. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51. p. 6736-6744, 2003.

TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant photochemicals. **Journal of Chromtography B**, v.812,n.1-2,p. 85–99,2004.

TURNER, A.P.F. Biosensors: sense and sensibility, **Chemical Society Reviews**, v.42, p. 3184-3196, 2013.

URQUIAGA,I.; LEIGHTON, F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress, **Biological Research**, v.33, n. 2, p. 55-64,2000.

VAGIRI, M.; CONNER, S.; STEWART, D.; ANDERSSON, S. C.; VERRALL, S.; JOHANSSON, E.; RUMPUNEN, K. Phenolic compounds in blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) leaves relative to leaf position and harvest date. **Food chemistry**, v.172,n.1, p.135-142, 2015.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M. Free radical, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v.160,n.1,p.1-40, 2006.

VELJKOVIC, J.N.; PAVLOVIC, A.N.; MITIC, S. Evaluation of individual phenolic compounds and antioxidant properties of black, green, herbal and fruit tea infusions consumed in Serbia: spectrophotometric and electrochemical approaches. **Journal of Food and Nutrition Research**, v.52,p.12–24,2013.

VENDRAMINI, A. L.; TRUGO, L. C. Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.) at three stages of maturity. **Food Chemistry**, v. 71, p. 195-198, 2000.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. (2006a) Families of phenolic compounds and means of classification. In: Phenolic Compound Biochemistry. W. Vermerris and R. Nicholson. USA, Springer. 1st Ed. pp 1-34.

VERZA, S. G.; KREINECKER, M. T.; REIS, V.; HENRIQUES, A. T.; ORTEGA, G. G. Avaliação das variáveis analíticas do método de Folin Ciocalteu para determinação do teor de taninos totais utilizando como modelo o extrato aquoso de folhas de *Psidium guajava* L. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 815-820, 2007.

VIGNOLI, J. A.; VIEGAS, M. C.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. T. Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees. **Food Research International**, v.61,p. 279–285, 2014.

VISENTAINER, J.V.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N.E.; VIEIRA, O.A. Caracterização físico-química da acerola *Malpighia glabra* L. produzida em Maringá, Paraná, Brasil. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.47,p.70-72,1997.

VVEDENSKAYA, I.O.; ROSEN, R.T.; GUIDO, J.E.; RUSSELL, D.J.; MILLS, K.A.; VORSA, N. Characterization of flavonols in cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) powder. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.188–195, 2004.

WARD, B.; ALEXANDER-WILLIAMS, J.M. Paracetamol revisited: a review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Acute Pain**, v.2, n.3, p.139-149, 1999.

WIOLETTA B.A.; STANISŁAW, W.; EDYTA, K.; MAGDALENA, K.; AGNIESZKA, K.; RYSZARD, A. Phenolic compounds and properties of antioxidants in grapevine roots (*Vitis vinifera L.*) under low-temperature stress followed by recovery , **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**,v.78,n.4,p.279-286,2009.

WROLSTAD, R. E.; CHAOVANALIKIT, A. Anthocyanin and polyphenolic composition of fresh and processed cherries.**Journal of food science**, v. 69, n. 1, p.FCT73-FCT78, 2004.

YAN, X.; MURPHY, B.; HAMMOND, G.B.; VINSON, J.A.; NETO, C.C. Antioxidant activities and antitumor screening of extracts from cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.20, p.5844–5849,2002.

ZOU, H.; KILMARTIN, P.A.; WATERHOUSE, A.L. Correlation of wine phenolic composition versus cyclic voltammetry response. **American Journal of Enology and Viticulture**,v.53,p.294-302,2002.

Anexo 1– Electroanalysis for Quality Control of Acerola (*Malpighia emarginata*) Fruits and their Commercial Products, Stephen Rathinaraj Benjamin, Jerônimo Raimundo de Oliveira Neto, Isaac Yves Lopes de Macedo, Maria Teresa Freitas Bara, Luiz Carlos da Cunha, Luiz Alcir de Faria Carvalho, Eric de Souza Gil; *Food Analytical Methods*, January 2015, Volume 8, Issue 1, pp 86-92. (Publicado)

Anexo 2 – Carbon paste based biosensors for antioxidant capacity, Luane Ferreira Garcia; Flávio Marques Lopes, Mariângela Fontes Santiago; Stephen Rathinaraj Benjamin; Jhébica Cavalcante de Souza Golveia; Eric de Souza Gil. *International Journal of electrochemical science*, 2015, Volume 10, pp 5650-5660. (Publicado)

Anexo 3 – Electrochemical behavior and determination of major phenolic antioxidants in selected coffee samples, Stefani Garcia Rezende; Jerônimo Raimundo Oliveira-Neto; Carolina de Fátima Reis; Stephen Rathinaraj Benjamin, Matheus Lavorenti Rocha; Eric de Souza Gil. *Food Chemistry*, 2016, volume 190 , pp 506–512.(Publicado)

ANEXO 1

Electroanalysis for Quality Control of Acerola (*Malpighia emarginata*) Fruits and their Commercial Products

Stephen Rathinaraj Benjamin · Jerônimo Raimundo de Oliveira Neto ·
Isaac Yves Lopes de Macedo · Maria Teresa Freitas Bara ·
Luiz Carlos da Cunha · Luiz Alcir de Faria Carvalho · Eric de Souza Gil

Received: 28 January 2014 / Accepted: 14 April 2014 / Published online: 4 May 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract The use of natural antioxidants is widespread around the world since they may delay oxidative stress and, consequently, degenerative diseases. Among the prescribed healthy habits for humans is the consumption of fruits containing high levels of phenolic compounds and other radical scavengers. Acerola (*Malpighia emarginata*) is very appreciated for its high content of ascorbic acid (AA) and rutin, two remarkable natural antioxidants (NA). Industrialized as frozen pulp and processed as juice, it is also a good source of carotenoids and anthocyanins. Nevertheless, its commercialization is hindered by its low stability. Considering the great potential of acerola frozen and dried products as rich sources of NA, the development of analytical methods focusing on the determination of active components is imperative for their quality control. Therefore, the aim of this work was to apply differential pulse voltammetry (DPV) for quality control of different products made of acerola fruits. Quality control samples consisted of acerola products spiked with AA, which was the biomarker, compared with its contents in samples

analyzed by high-performance liquid chromatography coupled with photodiode array detection (HPLC-PDA). DPV was employed for quantification of AA in all samples. The achieved limits of detection and quantification were 0.31 and 0.96 mM, respectively, whereas the recovery range was from 97.4 to 102.2 %; the results presented good accuracy and correlation with HPLC-PDA method. In addition to its use in identification, DPV proved to be helpful to check the integrity of natural products and avoid adulteration. Moreover, the electrochemical index proposed is in accordance with traditional methods for estimating antioxidant capacity.

Keywords Acerola · Quality control · Antioxidants · HPLC-PDA · Dried extract · Frozen pulp

Introduction

Oxidative stress plays an important role in the development of several diseases, such as atherosclerosis, cancer, and tissue damage in rheumatoid arthritis (McDonald et al. 2001; Jang et al. 2007). The inverse correlation between the incidence of such degenerative diseases and fruit consumption has been associated to the high content of antioxidants, such as polyphenols and vitamins A, C, and E found in certain fruits (Hanamura et al. 2005). Furthermore, it has been suggested that the presence of different dietary antioxidants leads to a synergistic effect on free radical scavenging and, consequently, improves the protective effect of free radical inhibitors (Sies et al. 2005). Consequently, the search for natural sources of antioxidants and/or free radical scavengers has been increasing (Scalbert et al. 2005; Ozsoy et al. 2008).

Brazil has a variety of underutilized native and exotic tropical fruits, such as acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). Also known as Barbados cherry, acerola is a tropical fruit of great economic and nutritional value because of its high

Research Highlights • Voltammetric profiles can be used as a tool for tentative identification of acerola products.

- The main peak of acerola samples shows great correlation with ascorbic acid.
- Quantitative determination of ascorbic acid in crude samples is achieved using a cheap and fast electroanalytical method.

S. R. Benjamin · J. R. de Oliveira Neto · I. Y. L. de Macedo ·
M. T. F. Bara · L. C. da Cunha · L. A. de Faria Carvalho
Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia,
GO, Brazil

E. de Souza Gil (✉)
Avenida Universitária com 1ª, Avenida, Quadra 62, 2º andar, Sala 36,
74605-220 Goiânia, GO, Brazil
e-mail: ericsgil@gmail.com

E. de Souza Gil
Faculdade de Farmácia, UFG, Rua 240 esquina com 5ª Avenida,
s/n, Setor Leste Universitário, CEP: 74605-170 Goiânia, GO, Brazil

content of vitamin C, which ranges from 1,247.10 to 1,845.79 mg/100 g (Vendramini and Trugo 2000; Freitas and Moretti 2006), as well as carotenes, rutin, thiamin, riboflavin, niacin, proteins, and other trace antioxidants (Kawaguchi et al. 2007; Hanamura et al. 2008). The use of acerola raw products for the production of nutraceuticals and dietary supplements has increased in the last decade. Hence, the identification and quantification of antioxidant species in acerola pulp and dried extract are of utmost importance to evaluate the potential health benefits of these products (Ayala-Zavala et al. 2011).

The intake of vitamin C, together with other ubiquitous antioxidants, may provide a synergistic antioxidant protection (Li et al. 2009). Taking into account the commercial appeal and the low cost of ascorbic acid (AA), the quantification of this major compound is not only relevant to evaluate eventual losses related to processing, but also to avoid adulteration (Lee and Kader 2000).

Chromatographic methods have frequently been proven to be suitable for the analysis of natural products, mainly due to their high separation capability and sensitivity for detecting components of more complex mixtures. However, because of their high cost, scientists have been developing new analytical alternatives. In this context, due to overall low cost, fastness, and great sensibility, the voltammetric techniques emerge as a promising option. Furthermore, akin to traditional spectrophotometric assays, i.e., 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS), employed for the evaluation of antioxidant capacity, the use of voltammetry leads to an accurate understanding of the redox behavior of natural antioxidants, even in crude samples. Therefore, the aim of this work was to assess the electrochemical profile of crude extracts obtained from fresh acerola fruits (AF) and the commercial products acerola dried extract (DE) and acerola frozen pulp (FP) to evaluate their antioxidant potential and also offer new insights for quality control purposes. To achieve these goals, one AF sample, four DE samples, and three FP samples, purchased from local markets, were evaluated using differential pulse voltammetry (DPV), cyclic voltammetry (CV), and square-wave voltammetry (SWV). In order to validate our results, high-performance liquid chromatography coupled with photodiode array detection (HPLC-PDA) and DPPH assay were also performed.

Materials and Methods

Chemicals and Reagents

AA standard, methanol of HPLC grade, and DPPH reagent were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All supporting solutions were prepared using analytical grade reagents and purified water from a Millipore Milli-Q

system (conductivity $\leq 0.1 \mu\text{S/cm}$) (Millipore SAS, Molsheim, France) in accordance with well-established procedures (Lino et al. 2013a, b).

The electrochemical analyses were carried out using 0.1 M phosphate buffer solution (pH 5.0). All electrolyte solutions were of the highest analytical grade and prepared using double-distilled water (Millipore Milli-Q system).

Standard Solutions

A standard stock solution containing 100 mg/100 mL of AA, prepared in purified water (Millipore Milli-Q system), protected from light with aluminum foil and kept in refrigerator, was stable for at least 1 month. The standard working solutions were prepared freshly from the stock solution for each new measurement.

Samples

Fresh AF grown using organic and conventional farming techniques in the region of Goiânia, GO, Brazil, harvested at proper stage of maturity, were purchased in the same municipality. They were selected based on intensive red color, firmness, and pleasant acid flavor, which are indicative of the optimal ripeness stage (Vendramini and Trugo 2004). AF were washed, packed in polyethylene bags, and stored at 4 °C until analyses. The commercial products obtained from acerola, namely four dried extracts (herein identified as DE1, DE2, DE3, and DE4) and two frozen pulps (FP1 and FP2), were purchased from local markets and drugstores in Goiânia.

Preparation of Sample Stock Solutions

A suitable amount of fresh AF was pressed in a mortar, the resulting juice was centrifuged at 1,000 rpm, and 1 mL of the supernatant was diluted with 4 mL of a diluting solution prepared using 2 mL of ethanol and 2 mL of 0.1 M phosphate buffer solution (pH 5.0). FP1 and FP2 were unfrozen and filtered, and 1 mL of each resultant juice was diluted with the aforementioned diluting solution. The preparation of the stock solutions of DE1, DE2, DE3, and DE4 was performed by sonicating 1 g of each sample for 20 min in 4 mL of the diluting solution. The resulting extracts were centrifuged at 1,000 rpm to get a clear supernatant solution. All samples were kept in dark glass vials and analyzed immediately after extraction.

Electroanalytical Measurements

Electroanalytical measurements were carried out in a $\mu\text{Autolab Type III}^{\text{®}}$ potentiostat/galvanostat (Eco-Chemie B.V., Utrecht, The Netherlands) integrated with the GPES 4.9 software. The device was connected to an electrochemical cell of 10 mL with a three-electrode system consisting of a

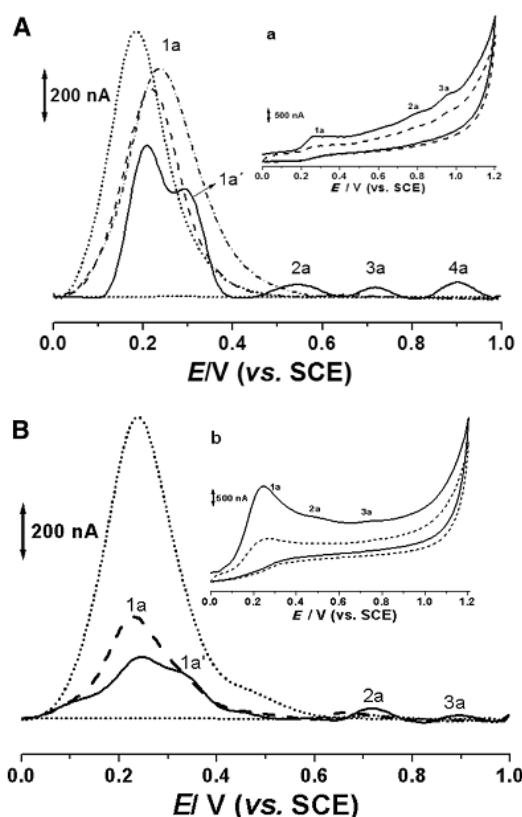


Fig. 1 Differential pulse voltammograms obtained in 5 mL of stock solutions, diluted with 0.1 M phosphate buffer solution (pH 5.0), of **a** 250 μ L of DE4 (straight line), 25 μ L of DE2 (broken line), and 25 μ L DE3 (dotted line); **b** 100 μ L of FP1 (broken line), 100 μ L of FP2 (straight line), and 100 μ L of AF (broken line). Inset Cyclic voltammograms obtained for **a** DE4 and **b** AF in similar conditions

of being diluted tenfold in relation to DE4 and the pulp samples, presented higher peak current levels in the scan range from 0.0 to 0.4 V (Fig. 1a). Also, the current level registered for AF was higher than those obtained for the frozen pulps (Fig. 1b), although the expected concentrations were similar for all samples. Therefore, it can be assumed that the freezing process does not assure the stability of AA. Also, it can be inferred that the huge difference observed between sample DE4 and the other dried extracts may be related to the addition of synthetic AA. Moreover, the excessive amount of this pharmaceutical excipient, commonly used to prevent oxidation, have lead to the mischaracterization of this natural product in samples DE1, DE2, and DE3.

Since no extra amount of synthetic AA was added to DE4, the anodic peaks corresponding to other natural electroactive species of AF were better visualized, even when using low

sensitive and simpler techniques such as CV (Fig. 1a). Thus, a shoulder, 1a' in 0.3 V (vs. SCE), and three well-defined additional anodic peaks, 2a, 3a, and 4a, at E_{pa1} of c.a. 0.55, 0.72, and 0.91 V (vs. SCE), respectively, were observed for sample DE4 (Fig. 1a). The inherent complexity of such natural product is herein expressed by its rich content of electroactive species. Indeed, a similar profile was observed for the pulps (Fig. 1b), and such similarity was higher when the AA level was lower, as observed when comparing FP1 and AF (Fig. 1b). Thus, the natural content of AA present in AF sample was enough to decrease the resolution of anodic peaks 2a and 3a, mainly using CV (Fig. 1b). Therefore, these electroanalytical tools are useful for identification assays, since they constitute a cheap, easy, and fast alternative for the scarce options of analytical methods available for quality control of natural products.

Concerning natural sources of antioxidants, a special application of electroanalytical tools is related to the accurate evaluation of the redox behavior of these compounds. The redox reversibility of each process can be achieved by CV and SWV by comparing the values of peak currents observed for the forward (I_f) and backward (I_b) components (Fig. 2).

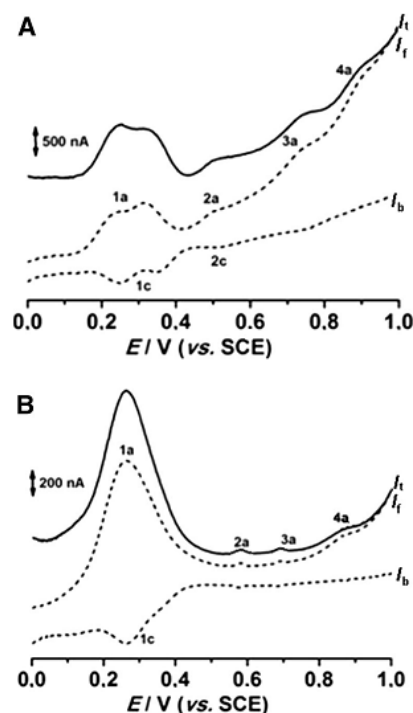


Fig. 2 Square-wave voltammograms obtained in 5 mL of 0.1 M phosphate buffer solution (pH 5.0) for **a** 250 μ L of DE4 and **b** 100 μ L of AF stock solutions

carbon paste electrode (GCE, $\phi=2$ mm, with 75:25 w/w graphite and mineral oil), a platinum wire, and a saturated calomel electrode (SCE), representing the working electrode, the counter electrode, and the reference electrode, respectively. All pH measurements were made using a pH combination glass electrode BlueLine (Schott Instruments GmbH, Mainz, Germany) coupled to a digital pH meter PHS-3B (Nanjing T-Bota Sciotech Instruments & Equipment Co., Ltd., Nanjing, China).

For the analyses, different volumes (25 and 250 μL) of samples (AF, FP1, FP2, DE1, DE2, DE3, and DE4) were completed with a 5 mL aliquot of 0.1 M phosphate buffer solution (pH 5.0) and placed in the voltammetric cell. The cyclic voltammogram was recorded in the range from 0 to 1 V at the scan rate of 100 mV/s. The experimental conditions for DPV were pulse amplitude of 50 mV, pulse width of 0.4 s, and scan rate of 5 mV/s. The parameters of SWV for the determination of AA were frequency, 20 Hz; amplitude, 50 mV; and step potential, 2 mV.

Electrochemical Index Determination

An electrochemical index (EI) was proposed taking into account the main voltammetric parameters, peak potential (E_{pa}), and peak current (I_{pa}). Based on the facts that the lower the E_{pa} (thermodynamic parameter), the higher is the electron donor ability, and the higher the I_{pa} (kinetic parameter), the higher is the amount of electroactive species, EI was calculated using the following equation (Lino et al. 2013a, b):

$$EI = \frac{I_{pa1}}{E_{pa1}} + \frac{I_{pa2}}{E_{pa2}} + \dots + \frac{I_{pan}}{E_{pan}}$$

All experiments were performed at room temperature, using 0.1 M phosphate buffer solution (pH 5.0).

HPLC-PDA Measurements

The determination of AA in all samples was performed in a Shimadzu HPLC system (Shimadzu, Tokyo, Japan) consisting of LC-20AT pump, DGU-20A5 degasser, SPD-M20A photodiode array (PDA) detector, CTO-20A column oven, and SIL-20A autosampler. The temperature of the column oven was set at 30 °C. The separation of the analytes was carried out using stainless steel ACE[®] column packed with C18 (250 \times 4.6 mm, 5 μm). Before use, the mobile phase was filtered through 0.45 μm membrane filters (Millipore, Milford, MA, USA) and degassed under vacuum.

The analytes were separated by isocratic elution, and the mobile phase consisted of 20 mM KH_2PO_4 , prepared in deionized water, at a flow rate of 1 mL/min. Subsequently, the pH was adjusted to 3.0. All solvents were filtered through

0.45 μm membrane filters (Millipore) and degassed for 20 min using ultrasonic cleaner (USC-2800, Unique, Indaiatuba, SP, Brazil). PDA detection was performed at the specific wavelength of 245 nm for AA, chromatographic data were acquired and processed with the computer-based Shimadzu LC Solutions software, and the results were obtained by comparison with external standards. Stock solutions of standard AA (1 mg/mL) were prepared in methanol and stored at -8 °C. Working standard solutions were prepared daily by dilution with the mobile phase. The mixture was centrifuged at 5,000 rpm for 5 min, filtered through polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (13 mm, 0.45 μm ; Millipore), and the obtained clear sample was analyzed.

For the analysis of vitamin C, the sample volume injected into the HPLC was 20 μL . AA peak was identified by comparing its UV-visible spectral characteristics and retention time with the standard solution. The UV spectrum from 200 to 700 nm was also recorded to reinforce AA identification.

Determination of Antioxidant Activity

The antioxidant activity was measured in terms of hydrogen donating or radical scavenging ability using the stable radical DPPH. The reduction of the radical is followed by a decrease in the absorbance at 517 nm. A 2-mL aliquot of the ethanolic stock solution of each sample under study was transferred to test tubes and 2 mL of 1 mM DPPH solution was added. The tubes were covered with Parafilm[®] and kept in the dark for 15 min. Absorbance at 517 nm was measured with a UV-vis spectrophotometer (model V-530, Jasco, Inc., Easton, MD, USA) and compared to the AA calibration curve. The results were expressed as milligram of AA per gram of dried sample. Each assay was carried out in triplicate. Alternatively, the amount of sample necessary to decrease the absorbance of DPPH by 50 % (IC_{50}) was also employed to express the antioxidant activity of all samples.

Results and Discussion

Electroanalytical Measurements

Differential pulse voltammograms obtained for acerola fresh fruits, dried extracts, and frozen pulp are presented in Fig. 1. For all samples, a broad anodic peak was observed at $E_{pa1} \sim 0.2$ V (vs. SCE) (Fig. 1a), which is in agreement with the electrochemical oxidation of AA (McDonald et al. 2001; Jang et al. 2007; Ozsoy et al. 2008) (Fig. 1).

The voltammetric profiles of all samples (AF, FP1, FP2, DE1, DE2, DE3, and DE4) were very distinct. The highest difference was observed between DE4 and the other three dried extracts, DE1, DE2, and DE3, which despite the fact

Sample DE4 showed again four well-defined redox processes, and the ones corresponding to the anodic peaks 1a (E_{pa} vs. SCE) and 2a (E_{pa} vs. SCE) were clearly reversible. In contrast, the electrochemical oxidation related to peak 4a (E_{pa} vs. SCE), which occurred at a more positive potential, was completely irreversible. The loss of resolution and apparent lack of reversibility observed for peak 1a ($I_f/I_b \neq 1$) in AF may be a consequence of the highest content of AA, which in similar experimental conditions, carbon electrode and 0.1 M phosphate buffer solution (pH 5.0) electrolyte, has already been characterized as a quasi-irreversible process (Nemțoi et al. 2012).

The evaluation of the reversibility and also the values observed for E_{pa} at a certain pH suggest the nature of species present in the bulk solution. In experiments performed using carbon electrode and 0.1 M phosphate buffer solution (pH 5.0), the anodic peaks at $E_{pa} < 0.4$ V (vs. SCE) were related to the reversible oxidation of catechol-like compounds (Reis et al. 2009; Gil and Couto 2013). For instance, caffeic acid, rutin, and quercetin, recognized by their powerful antioxidant activity, undergo electrochemical oxidation at such lower potentials that this fact can be attributed to the oxidation of hydroxyl groups bonded to the aromatic ring, leading to the formation of *O*-quinone via semiquinone forms (Sousa et al. 2004; Magarelli et al. 2013).

E_{pa} values between 0.4 and 0.7 V (vs. SCE, pH 5.0) are consistent with the presence of polyphenols such as ferulic acid (Luo et al. 2010), whereas values above 0.8 V are consistent with the presence of resorcinol-like compounds such as the hydroxyl groups bonded to the A ring of flavonols (Gil and Couto 2013).

Since I_{pa} values indicate the amount of electroactive species present in samples, it can be inferred that DE3 and DE4 possess the highest and lowest concentrations of antioxidants, respectively. Higher I_{pa} values indicate the antioxidant content, whereas lower E_{pa} values reflect on the electron donor character and reducing power of the species present in the sample. Hence, the EI obtained from the sum of the rates I_{pa}/E_{pa} of all anodic peaks may express the antioxidant power, even for complex samples (Reis et al. 2009; Lino et al. 2013a, b). EI values and EC_{50} obtained for all the samples are presented in Table 1. AA was used as positive control in this assay.

Table 1 Antioxidant capacity of acerola products using DPPH radical scavenging assay (EC_{50}) and electrochemical index (EI)

Sample	EC_{50} (mg of sample)	EI ($\mu\text{A}/\text{mV}$)
DE1	28.6	0.06
DE2	21.6	4.1
DE3	21.0	7.25
DE4	47.6	0.04
FP1	21.5	4.8
FP2	21.4	5.0
AF	21.1	5.5

As expected, an inverse relationship between EI and EC_{50} was observed. In both antioxidant assays, the most active samples were DE1, DE2, and DE3, which received a huge amount of AA, and DE4 presented the lowest antioxidant capacity, showing that the drying process leads to a decrease in AA content. In fact, the literature has described that the thermal stability of AA is really low.

Analysis of Ascorbic Acid in Commercial Juice Products

Calibration-Curve Technique

Several differential pulse voltammograms were obtained at carbon paste electrode for different AA concentrations (Fig. 3). The peak corresponding to AA oxidation appeared at 0.23 V (vs. SCE). The calibration graph shows a linear range between 0.5 and 4.0 mM for AA ($y=9E-08X+4E-08$), $r^2=0.9914$, where y represents the value of the current intensity from which the background value was subtracted and x is the analyte concentration. AA contents in AF and DE4 were determined by DPV using the standard addition calibration technique. The limit of detection and the limit of quantification were 0.31 and 0.96 mM, respectively. Typical differential pulse voltammograms are shown in Fig. 3. Adding a standard concentration solution of AA to AF solution caused an increase in the oxidation peak height [curves (a) to (i)]. The dependence of peak current on AA concentration shows good linearity.

Recovery Test

AA content in AF samples was determined as the average of triplicate measurements using the standard addition method.

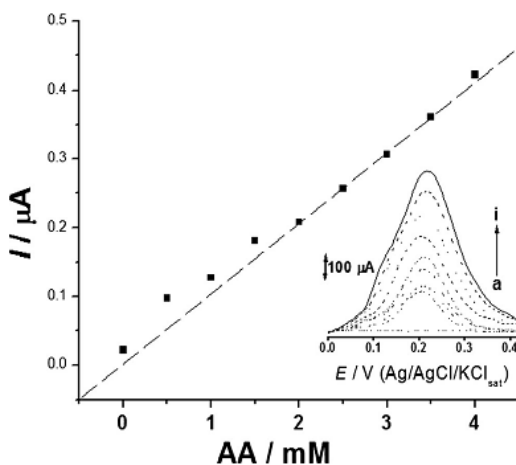


Fig. 3 Differential pulse voltammograms of 0.5 to 4.0 mM of AA in 0.1 M phosphate buffer solution (pH 5.0). Inset Plot of peak current vs. AA concentration

The recovery was calculated by comparing the concentration of AA obtained from the spiked mixtures of DE4 and AF with those of pure AA (Table 2). The excellent recovery values, ranging from 97.3 to 103.6 %, indicate that the electroanalytical method is feasible for quantitative determination of AA in crude samples. Moreover, the electroanalytical method was also compared with the HPLC method using samples DE2, DE4, FP1, and AF (Table 2).

HPLC Measurements

Initially, the chromatographic conditions described by Ke et al. (1994) were followed to analyze AA. Chemical, hydrodynamic, and physical variables were optimized to reduce the analysis time while keeping a good resolution of AA peak in the various samples. Good results were obtained using the most effective amount of 100 % KH_2PO_4 buffer in the mobile phase; these conditions gave optimum resolution, clear baseline separation with reasonable retention time, and no tailing of peaks of the studied compounds at 30 °C. The flow rate significantly influenced the results. The best flow value was 1 mL/min due to the best retention time (2.8 ± 0.06 min) and resolution for AA. The peaks a–c obtained were well developed and symmetrical (Fig. 4a, b).

The chromatogram corresponding to the standard AA and samples DE2 and DE4 shows a single peak at retention time 2.9 min (Fig. 4a). This peak was similar for samples FP1 and AF (Fig. 4b). AA was the most abundant compound identified in the pulp samples analyzed.

AA content ranged from 4.63 (standard) to 3.51 (DE2) and 0.015 (DE4) mg/100 g using the ethanolic extraction method (Fig. 4a). The AA standard was also compared with FP1 and AF, and the contents of AA in FP1 (peak b) and AF (peak c) were 0.22 and 0.15 mg/100 g, respectively (Fig. 4b). In this study, the amount of AA found in the standard used (peak a, Fig. 4a) was higher than that obtained for the other samples. The voltammetric method used in this study is simple, easy to use, and was proven to be effective enough for the identification of AA in AF.

The present results proved that AA can be identified in the samples comparing the retention times obtained in HPLC-

Table 2 Results of the recovery analysis of AA in samples DE4 and AF

Sample	Added (mM)	Found (mM)	Recovery (%)
DE4	0.5	0.49±0.66	98.6
	2.25	2.23±0.49	101.3
	4	4.08±2.50	103.6
AF	0.5	0.49±0.89	97.3
	2.25	2.26±1.18	98.4
	4	4.07±2.53	101.4

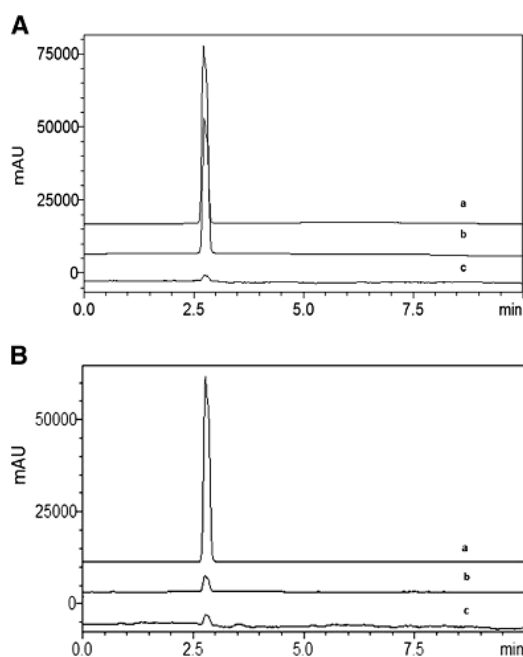


Fig. 4 a HPLC chromatograms obtained for a AA standard, b DE2, and c DE4; b HPLC chromatograms obtained for a AA standard, b FP1, c AF

PDA with those of AA standard analyzed under the same conditions, and comparing the UV absorption spectra of the standard and the peaks of interest in the samples using photodiode array detector. The results herein obtained using HPLC-PDA are in agreement with those reported by Mitić et al. (2011).

Conclusions

The electrochemical characterization of crude extracts obtained from AF as well as acerola commercial products showed to be a new tool to identify the authenticity of natural products. The different patterns observed between the voltammetric profiles varied mainly according to the addition of AA. Thus, besides peak identification, voltammetry is useful to check the integrity of natural products and also to avoid adulterations.

Moreover, the EI herein proposed agreed with traditional methods of antioxidant capacity and DPV was also employed for quantification of AA in all samples. The low limit of quantification and the good recoveries are consistent with the high accuracy level of the electroanalytical method. Therefore, this method offers a green and sensitive possibility for quality control of food and nutraceutical products presenting remarkable antioxidant activity.

Conflict of Interest Stephen Rathinaraj Benjamin has received research grants from CAPES and declares that he has no conflict of interest. Jerônimo Raimundo de Oliveira Neto declares that he has no conflict of interest. Isaac Yves Lopes de Macedo has received research grants from CNPq and declares that he has no conflict of interest. Maria Teresa Freitas Bara declares that she has no conflict of interest. Luiz Carlos da Cunha declares that he has no conflict of interest. Luiz Alcir de Faria Carvalho declares that he has no conflict of interest. Eric de Souza Gil declares that he has no conflict of interest. This article does not contain any studies with human or animal subjects.

References

- Ayala-Zavala JF, Vega-Vega V, Rosas-Domínguez C, Palafox-Carlos H, Villa-Rodríguez JA, Siddiqui MW, Dávila-Aviña JE, González-Aguilar GA (2011) Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Res Int* 44: 1866–1874. doi:10.1016/j.foodres.2011.02.021
- Freitas DGC, Moretti RH (2006) Barra de cereais de elevado teor protéico e vitamínico: estabilidade enzimática e das vitaminas C e E durante armazenamento. *Arch Latinoam Nutr* 56:269–274
- Gil ES, Couto RO (2013) Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications. *Braz J Pharmacogn* 23:542–558. doi: 10.1590/S0102-695X2013005000031
- Hanamura T, Hagiwara T, Kawagishi H (2005) Structural and functional characterization of polyphenols isolated from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. *Biosci Biotechnol Biochem* 69:280–286. doi:10.1271/bbb.69.280
- Hanamura T, Uchida E, Aoki H (2008) Changes of the composition in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit in relation to cultivar, growing region and maturity. *J Sci Food Agric* 88:1813–1820. doi:10.1002/jsfa.3285
- Jang HD, Chang KS, Huang YS, Hsu CL, Lee SH, Su MS (2007) Principal phenolic phytochemicals and antioxidant activities of three Chinese medicinal plants. *Food Chem* 103:749–756. doi:10.1016/j.foodchem.2006.09.026
- Kawaguchi M, Tanabe H, Nagamine K (2007) Isolation and characterization of a novel flavonoid possessing a 4,2"-glycosidic linkage from green mature acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. *Biosci Biotechnol Biochem* 71:1130–1135. doi:10.1271/bbb.60513
- Ke D, El-Wazir F, Cole B, Mateos M, Kader AA (1994) Tolerance of peach and nectarine fruits to insecticidal controlled atmospheres as influenced by cultivar, maturity, and size. *Postharvest Biol Technol* 4:135–146. doi:10.1016/0925-5214(94)90015-9
- Lee SK, Kader AA (2000) Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biol Technol* 20:207–220. doi:10.1016/S0925-5214(00)00133-2
- Li HY, Hao ZB, Wang XL, Huang L, Li JP (2009) Antioxidant activities of extracts and fractions from *Lysimachia foenum-graecum* Hance. *Bioresour Technol* 100:970–974. doi:10.1016/j.biortech.2008.07.021
- Lino FMA, Sá LZ, Torres IMS, Rocha ML, Dinis TCP, Ghedini PC, Somerset VS, Gil ES (2013a) Voltammetric and spectrometric determination of antioxidant capacity of selected wines. *Electrochim Acta*, article in press. doi:10.1016/j.electacta.2013.08.109
- Lino FM, Sá LZ, Torres IMS, Rocha ML, Dinis TCP, Ghedini PC, Somerset VS, Gil ES (2013b) Wines around the world. Their antioxidant capacity estimated by means of DPPH radical scavenging assay and electrochemical index. In: Ozoemena K (Ed.) *Proceedings of the 13 th Topical Meeting of the International Society of Electrochemistry*. Pretória, 208
- Luo L, Wang X, Li Q, Ding Y, Jia J, Deng D (2010) Voltammetric determination of ferulic acid by didodecyltrimethylammonium bromide/naion composite film-modified carbon paste electrode. *Anal Sci* 26:907–911. doi:10.2116/analsci.26.907
- Magarelli G, Silva JS, Sousa Filho IA, Lopes ISD, Souza JR, Hoffmann LV, Castro CSP (2013) Development and validation of a voltammetric method for determination of total phenolic acids in cotton cultivars. *Microchem J* 109:23–28. doi:10.1016/j.microc.2012.05.014
- McDonald S, Prenzler PD, Antolovich M, Robards K (2001) Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chem* 73:73–84. doi:10.1016/S0308-8146(00)00288-0
- Mitić SS, Kostić DA, Nasković-Đokić DC, Mitić MN (2011) Rapid and reliable HPLC method for the determination of vitamin C in pharmaceutical samples. *Trop J Pharm Res* 10:105–111
- Nemţoi G, Ciomaga A, Lupaşcu T (2012) Voltammetric behaviour of enoxil in aqueous medium of NaClO₄ on platinum electrode. *Rev Roum Chim* 57:837–841
- Ozsoy N, Can A, Yanardag R, Akev N (2008) Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. *Food Chem* 110:571–583. doi:10.1016/j.foodchem.2008.02.037
- Reis NS, Serrano SHP, Meneghetti R, Gil ES (2009) Métodos eletroquímicos usados para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. *Lat Am J Pharm* 28:949–953
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45:287–306. doi:10.1080/1040869059096
- Sies H, Stahl W, Sevanian A (2005) Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr* 135:969–972
- Sousa WR, Rocha C, Cardoso CL, Silva DHS, Zanoni MVB (2004) Determination of the relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods. *J Food Compos Anal* 17: 619–633. doi:10.1016/j.jfca.2003.09.013
- Vendramini AL, Trugo LC (2000) Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.) at three stages of maturity. *Food Chem* 71:195–198. doi:10.1016/S0308-8146(00)00152-7
- Vendramini ALA, Trugo LC (2004) Phenolic compounds in acerola fruit (*Malpighia puniceifolia*, L.). *J Braz Chem Soc* 15:664–668. doi:10.1590/S0103-50532004000500009

ANEXO 2

Laccase Carbon Paste Based Biosensors for Antioxidant Capacity. The Effect of Different Modifiers

Luane Ferreira Garcia, Stephen Rathinaraj Benjamin, Ricardo Neves Marreto, Flávio Marques Lopes, Jhêssica Cavalcante de Souza Golveia, Neemias Cintra Fernandes, Mariângela Fontes Santiago, Eric de Souza Gil*

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, 74605–220, Goiânia, Goiás, Brasil

*E-mail: ericsgil@ufg.br

Received: 13 March 2015 / Accepted: 29 April 2015 / Published: 27 May 2015

The natural antioxidants of food products have great influence on human health. Indeed, the protective effects against cardiovascular diseases, cancer and ageing have been attributed to their polyphenol content. In turn, the remarkable antioxidant activity of polyphenols can be easily estimated by polyphenol oxidases based biosensors. The aim of this work was check the effect of modifiers on the improvement of biosensors concerning to performance, in order to express the antioxidant activity and total polyphenol content of complex natural samples such as coffee beverages. The biosensors were constructed by occlusion of crude extract of *Pycnopus sanguineus* containing laccase, in different carbon paste based composites. The electrochemical properties of the resulting composites, namely Carbon Paste-Laccase (CPL), CPL modified with Glutaraldeide (CPL-Glu), Bovine Serum Albumin (CPL-BSA), Chitosan (CPL-Ch), Silica (CPL-SiO), Titanium dioxide (CPL-TiO), DNA (CPL-DNA), Carbon Nanotubes (CPL-CN), non-activated Carbon Nanotubes (CPL-nCN) and activated Carbon Nanotubes plus DNA (CPL-DNA:CN) were evaluated by voltammetry in different experimental conditions. In order, the effect of electrolyte composition, pH, scan rate, pulse amplitude, response time and concentration range were carefully evaluated, whereas rutin and/or catechol were employed as standard solutions. The highest sensitivity level and lowest detection limit were obtained for CPL-DNA:CN. In addition, the biosensor demonstrated suitable stability over 10 days and good repeatability (RSD < 5%). CPL-DNA:CN was used for the determination of total phenol content of coffee samples, expressed as Gallic Acid equivalents (GAEq) and the results were compared with those from the DPPH and Folin–Ciocalteu spectrophotometric methods. Further, the inherent sensitivity of electroanalytical methods, the amperometric biosensor exhibits some interesting advantages such as simplicity due to the minimal sample preparation and leading to rapidity of antioxidant capacity assay.

Keywords: laccase; *Pycnopus sanguineus*; carbon paste electrode; DPV; antioxidant capacity.

1. INTRODUCTION

In analytical chemistry the problem of selectivity, particularly at low analyte concentrations and in the presence of interfering substances is of paramount importance. Among the strategies to overcome these problems emerges the biosensor technology. Biosensors are analytical devices which tightly combine bio recognition elements and physical transducers for detection of the target compounds. Hence, owing to their remarkable practicality and versatility they are already useful analytical tools, applicable in clinical, pharmaceutical, environmental and food analysis, among other fields [1].

In turn, despite the high technological input, there is a wide gap between research and market place [2]. Truly, the great majority of biosensors is only just starting to move from the proof-of-concept stage to field-testing, mass production and commercialization. This "state of art" is mainly due to stability issues and quality assurance [3]. Such sensors can be classified accordingly to the biological recognizing agent and/or the type of transducer employed.

In enzyme-based biosensors, the biological element is the enzyme which reacts selectively with its substrate. The response of an enzymatic biosensor against a selected analyte (substrate) is mainly determined by the concentration of the biochemically generated product at sensor surface. According to the principle of analysis, enzymatic biosensors can be based on: a) catalytic transformation of the analyte; b) specific inhibition of enzyme activity by the analyte and c) modification of enzyme activity by an analyte which acts as a modulator or cofactor [4].

On the other hand, the transducer system might be sensitive to substrate (analyte) or to product. There is a great variety of transducing devices, which combined to the great diversity of materials offer uncountable biosensor design possibilities for an uncountable number of compounds [1].

The efficiency of biosensors is mainly related to the optimal coupling of enzyme to the transducer. Thus, many techniques of immobilization have been proposed, *i.e.* entrapment in polymeric matrices, physico-chemical adsorption or covalent bonding at solid surface and occlusion in nanocomposites [5-8].

Laccase-based enzyme electrodes are commonly designed for the selective determination of phenolic compounds, in which the relevance is figured by organic pollutants and natural antioxidants. Hence, these devices can be applied on the evaluation of total phenol composition, antioxidant capacity, as well as, for tentative determinations of specific "catechol-like" major markers [9, 10]. Their functioning is based on the biochemical oxidation followed by electrochemical reduction, which is easily detected by amperometric transducers [11].

An easy and efficient way to produce an amperometric biosensor is the immobilization of enzyme by occlusion in composites. A mixture of carbon (graphite) powder and an agglutinating liquid is a popular composite material used for the preparation of various modified electrodes [5,12]. Carbon paste allows an intimate contact between biocomponent and sensing sites permitting a fast electron transfer. Aside the versatility in which various modifiers can be incorporated and reasonable stability, the main advantage of carbon paste electrodes is the good reproducibility achieved by the easy renewal of the surface. Carbon paste based biosensors are usually prepared by first mixing the biocomponent

and graphite powder. Then, the resulting powder is mixed with mineral oil (e.g. paraffin or silicone). The final paste is filled into a cylindrical cartridge [5].

Carbon paste electrodes can be modified with a number of inorganic and organic materials, in order to improve the electrical properties [13-17]. Hence, a number of papers about carbon paste laccase-based biosensors have been published [7, 8, 12, 18-21]. Nevertheless, concerned to the effect of modifiers materials on the biosensor performance, an accurate comparison can be only achieved by intra assay experiments. Therefore, the main aim of this work was to evaluate the effect of different materials usually employed in carbon paste laccase-based biosensors.

The electrochemical properties of the resulting composites, namely Carbon Paste-Laccase (CPL) modified with Bovine Serum Albumin (CPL-BSA), Chitosan (CPL-Ch), Silica (CPL-SiO), Titanium dioxide (CPL-TiO), DNA (CPL-DNA), Carbon Nanotubes (CPL-CN), non-activated Carbon Nanotubes (CPL-nCN) and activated Carbon Nanotubes plus DNA (CPL-DCN:CN) were evaluated in different electrolyte conditions by voltammetric techniques. The chosen target was rutin, whereas the biosensor with best performance was applied on the evaluation of antioxidant capacity and total phenol determination in coffee samples.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals and Samples

All chemicals presented analytical grade, all solutions were prepared by using double distilled water (conductivity $\leq 0.1 \mu\text{Scm}^{-1}$).

2.1.1 Samples

Different commercial trademarks of roasted coffee samples herein used as real targets for application studies were purchased from local markets of Goiania-GO/Brazil.

2.1.1.1 Preparation of the coffee samples

The coffee extracts were prepared by infusion submitting two grams (2 g) of each sample in 25 mL of hot water (100 °C) by 10 minutes under stirring. Afterwards the coffee extracts were cooled till room temperature and filtered with 0.45 μm filter paper. The resulting solution was subsequently diluted in suitable analytical grade solvents according to the experiment in order to obtain the assay solutions. For the electrochemical measurements, 250 μL of the resulting solution were diluted in 4 mL of the electrolyte solution, *i.e.* pH 5.0 0.1 M phosphate buffer [10].

2.1.2 Phenolic standards

Cathecol, gallic acid, rutin, caffeic acid, chlorogenic acid, phenol and chlorophenol were purchased from Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.1.3 Modifiers and production of the enzymatic crude extract

Graphite powder, multi wall carbon nanotubes (MWCNT), Bovine Serum Albumin (BSA), Chitosan, and DNA were purchased from Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), Silica, Titanium dioxide and Mineral Oil were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The MWCNT were activated by chemical oxidation in boiling Nitric acid 50%.

The laccase crude extract (2019 U.L⁻¹) was obtained by submerged fermentation using five disks (7 mm in diameter) of the *Pycnoporus sanguineus* (CCT-4518) in growth medium containing 12.8 g.L⁻¹ malt extract (HiMedia, Mumbai, India) and 0.005 g.L⁻¹ CuSO₄.H₂O (Cromoline, São Paulo, Brazil) 50 mg.L⁻¹, 2,5-xylydine (Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was used as inducer of laccase. The fermentation process occurred under agitation of 150 rpm, at 28°C, 72h. The mycelium was separate by filtration and the crude extract used as source of laccase [22-24].

2.2 Biosensor preparation

The immobilization was carried out by occlusion in different carbon powder composites. Briefly, 250 µL of laccase crude extract were added to graphite powder and their mixtures with the different modifiers and left to dry at room temperature (Table 1). Then, mineral oil was added and rigorously mixed in order to obtain the homogeneous paste.

Table 1. Biosensors Composition

Biosensor	Enzymatic extract (µL)	Graphite powder (mg)	Modifier (%)	Mineral Oil (µL)
CPL	50 to 500	70	-	20
CPL-Glu	250	65	5	20
CPL-BSA	250	69	1	20
CPL-Ch	250	69	1	20
CPL-SiO	250	65	5	20
CPL-TiO	250	65	5	20
CPL-DNA	250	69	1	20
CPL-nCN	250	65	5	20
CPL-CN	250	65	5	20
CPL-DNA:CN	250	64	1:5	20

Carbon Paste Laccase based biosensor (CPL); Glutaraldehyde (Glu); Bovine serum albumin (BSA); Chitosane (Ch); Silica (SiO); Titanium dioxide (TiO); Carbon Nanotubes (CN); non-activated CN (nCN).

A suitable portion of the agglutinated paste was taken to fill the cavity 2 mm diameter and 0.5 mm in depth electrode support, originating the CPL like biosensors.

2.4 Electroanalytical assays

Voltammetric experiments were carried out with a potentiostat/galvanostat μ AutolabIII[®] integrated to the GPES 4.9[®] software, Eco-Chemie, Utrecht, The Netherlands. The measurements were performed in a 5.0 mL one-compartment electrochemical cell, with a three-electrode system consisting of a carbon paste laccase-based biosensor and modifiers ($\varnothing = 2$ mm), a Pt wire and the Ag/AgCl/KCl 3M (both purchased from Lab solutions, São Paulo, Brazil), representing the working electrode, the counter electrode and the reference electrode, respectively. The carbon paste was mechanically renewed before each experiment, in order to ensure reproducible results. The experimental conditions for differential pulse voltammetry (DPV) were: pulse amplitude 50 mV, pulse width 0.5 s and scan rate 5 mV.s⁻¹. The experimental conditions for cyclic voltammetry (CV) were: scan rate of 100 mV s⁻¹ and scan range from 0 to 1 V. The DP voltammograms were background-subtracted and baseline-corrected, and then all data were analyzed and treated with the software Origin 8[®]. All experiments were done at room temperature (21 \pm 1 °C) in triplicate (n = 3) and the main electrolyte solution used was the phosphate buffer (PBS).

2.5 Spectrophotometric Antioxidant Assays

The absorbance measurements were recorded with a spectrometer Q798U2VS (Quimis Aparelhos Científicos, São Paulo, Brazil).

2.5.1 Folin-Ciocalteu Total Phenol Assay

For the determination of total polyphenols, the adjusted Folin-Ciocalteu (FC) method was performed. Two milliliters of water and 0.5 mL of Folin Ciocalteu's reagent were mixed with 100 μ L of test samples or standard solutions of gallic acid and the resulting mixture was allowed to react for five minutes. Next, 1.5 mL of 20 % sodium carbonate solution was added and then the volume was completed with distilled water to 10 mL. After 1 h of reaction at room temperature, in a dark environment, the absorbance of the solution was measured by spectrophotometry at 765 nm. All determinations were performed in triplicate. The results were expressed in gallic acid equivalents (GAEq), mg of GA in each mL of coffee brew.

2.5.2 DPPH radical scavenging assay

Radical scavenging activity of diluted coffee beverages was measured based on the redox reaction between 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]), a stable and purple radical, and the intrinsic reducing compounds of coffee, leading to generation of yellow colored DPPH, the reduced form. The ability of samples to scavenge DPPH[•] radicals was determined spectrometrically by the method of Blois (1958) [10,19,20]. Briefly, to 2.5 mL of DPPH[•] ethanolic solution (0.1 mM) an aliquot of 0.5 mL of ethanol (blank) was added to reach a final volume of 3.0 mL that was repeated for all analytical samples. The reaction solution was incubated for 20 min in the dark at room temperature and measured

at 517 nm, against the blank ($A \sim 0.7$), whereas ethanol, the solvent used to prepare all solutions, was used in order to adjust the baseline ($A = 0.000$). Antioxidant activity was expressed as EC_{50} , representing the amount of coffee to produce 50% of decolorization of DPPH• relative to the blank control.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The laccase crude extract of the *Pycnoporus sanguineus* was incorporated to solid composites in the range from 50 to 500 μL and the electrochemical performance of the electrodes was evaluated in a broad pH range (2.0 to 8.0). The best response expressed by higher sensitivity, low capacitive currents and lower response time was achieved for 250 μL in mild acidic pH (5.0 to 6.0). Therefore, these conditions were fixed for all mixed composites, as well as for further studies.

3.1 Electrical Properties

The modifying agents can exert some influence on catalytical and/or electrical properties of modified electrodes. Indeed, the improvement of electrodic properties, such as lower resistivity leads to lower capacitive currents, and has indirect action on the enhancement of sensor sensitivity. Such influence can be monitored by measuring the faradaic electron transfer rate of the reversible ferro/ferricyanide redox system (Figure 1A), and in some extent by observing the profile of blank buffer solution [24]. These statements are well evidenced on Figure 1, where it can be clearly observed how small proportions of different modifiers can change expressively the electrical properties of electrodes.

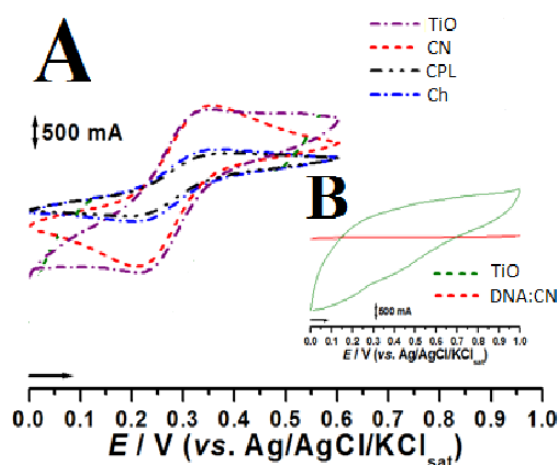


Figure 1. Cyclic voltammograms obtained for different modifiers CPLs in 0.05 M potassium ferrocyanide: 0.1 M PBS, pH 6.0 (A) and 0.1 M PBS, pH 6.0 (B). Scan range from 0 to 1.0 V, scan rate of $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Figure 1A shows voltammograms obtained in the 0.1 mM potassium ferricyanide in 0.1 M PBS, pH 6.0 at CPL biosensors. It was observed, that CN, TiO₂ and also DNA-CN (not shown) increase the electroactive surface area of CP electrodes, leading to high Faradayc peak currents. On the other hand, since inorganic clusters, such as TiO₂, as well as, most of the biopolymers possess lower conductive nature than "sp² like" carbon materials, the reversibility of Ferro/Ferricyanide redox probe may be compromised (Figure 1A) [25, 26].

In fact, the capacitive current observed in blank solution was lower for CPLs modified with activated CN (not shown) and DNA-CN, whereas the ascendant voltammetric profile observed for CPL-TiO reinforces that the metal oxide hampers the electrical conductance of electrode [24]. The same negative effect on the conductance was observed for the biopolymers Ch and BSA. Meanwhile, as expected the decrease of added amount or removal of such modifiers improved the electrical properties. The relative DNA conductivity can be explained by their π - π type electrons and positively charged counter ions [27]. Nevertheless, even for DNA the amount and environmental conditions must be carefully optimized, otherwise it can be obtained opposite effects [27, 28].

3.2 Electrocatalytical Properties and Calibration Curves

The electrical properties of electrodic materials may influence the electrocatalytical properties against target analytes. Therefore, since laccase are polyphenoxidase enzymes, the different CPLs were evaluated against catechol. Thus, the biosensor performance was evaluated by means of cathodic peak current levels obtained for the biochemically generated quinone (Figure 2).

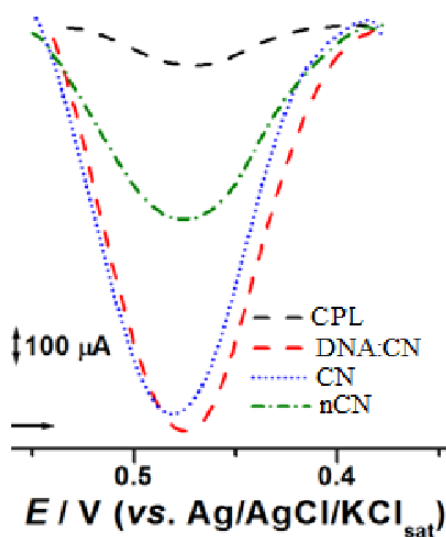


Figure 2. DP voltammograms obtained for different modified CPLs in 0.05 mM Catechol in 0.1 M PBS, pH 6.0. Pulse amplitude of 50 mV, scan rate of 10 mV.s⁻¹.

As expected, it can be observed from Figure 2, that activated CNs have great influence on the biosensor sensitivity. It is explained by the enhancement of electroactive surface area, increasing the electron transfer effectivity. In turn, the slight improvement achieved by DNA incorporation on the electrode, may be consequence of their good electrical conductance and great biocompatibility with enzyme, thus leading to better enzymatic activity at immobilized state. Moreover, Glu, Ch or BSA modifiers (not shown) do not have significant influence on the biosensor performance, whereas the non-activated CN exhibits far lower positive effect.

Table 2 enrolls the detailed merit data for each modified CPL evaluated, obtained from rutin calibration curves, herein represented in Figure 3 for CPL-DNA:CN.

The best biosensor performance expressed by low limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), good coefficient of correlation, higher storage stability and lower peak potentials were obtained for CPL-DNA:CN biosensor (Figure 3).

Table 2. Merit parameters obtained from rutin calibration curves for different modified CPLs in 0.1 M PBS (pH 5.0).

Carbon Paste Biosensors	E_{pc} (V)	R	LOD (μ M)	LOQ (μ M)	3 days (%)	10 days (%)
CPL	0.38	0.9373	30	91	69%	57%
CPL-Glut	0.38	0.9373	40	120	78%	69%
CPL-BSA	0.42	0.8521	29	89	73%	57%
CPL-Ch	0.38	0.9892	28	79	69%	63%
CPL-SiO	0.39	0.987	16	49	94%	83%
CPL-TiO	0.39	0.991	27	83	52%	31%
CPL-DNA	0.40	0.9896	19	69	92%	56%
CPL-nCN	0.39	0.9845	28	88	68%	58%
CPL-CN	0.39	0.9943	16	51	95%	94%
CPL-DNA:CN	0.39	0.9987	12	38	100%	100%

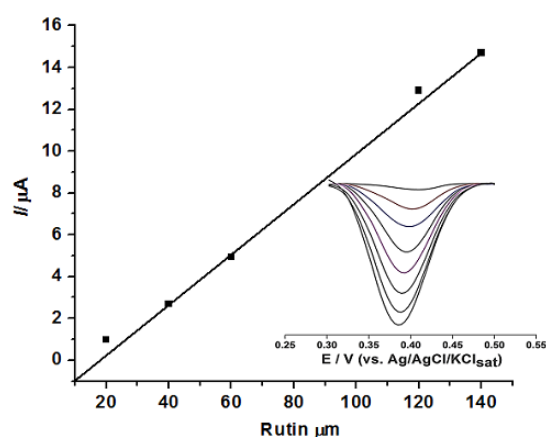


Figure 3. Calibration curve obtained from the DPVs, after successive additions of 1mM rutin standard solution at CPL-DNA:CN in 0.1 M Phosphate buffer (pH 5.0) solution. Scan range from 0.50 to 0.20 V; scan rate of 10 mV.s⁻¹; pulse amplitude of 50 mV.

The higher stability can be also explained by the bioaffinity between DNA and enzyme, whereas the higher surface area, as well as, the cylindrical shape of MWCNTs provides a suitable site for enzyme immobilization.

3.3 Optimization of Experimental Conditions and Affinity Assay

Since CPL-DNA:CN presented better performance, the influence of conditioning time and start potential, as well as the affinity assay were also evaluated.

Nevertheless, the higher the conditioning time, the higher the time for enzymatic oxidation will be, as well as the expected cathodic currents; the fastness of assay is also a desirable feature. In turn, the higher the start potential, the higher will be the chance to provoke electrochemical oxidation will be, hence the selectivity of a biosensor will be higher at lower values.

Therefore, since the conditioning time and starting potential dictate the rapidity and selectivity of analysis, but have opposite effect on the sensitivity, such parameters are very relevant and must be carefully adjusted.

Concerning to the selectivity, the laccase based biosensors have broad range of activity against phenolic compounds, but present higher kinetic rate against catechol like derivatives.

Figures 4A and 4B show the effect of conditioning time and start potential against catechol. In turn, Figure 4C presents the affinity assay against different phenolic compounds, at conditioning time of 30 s and starting potential of 0.5 V.

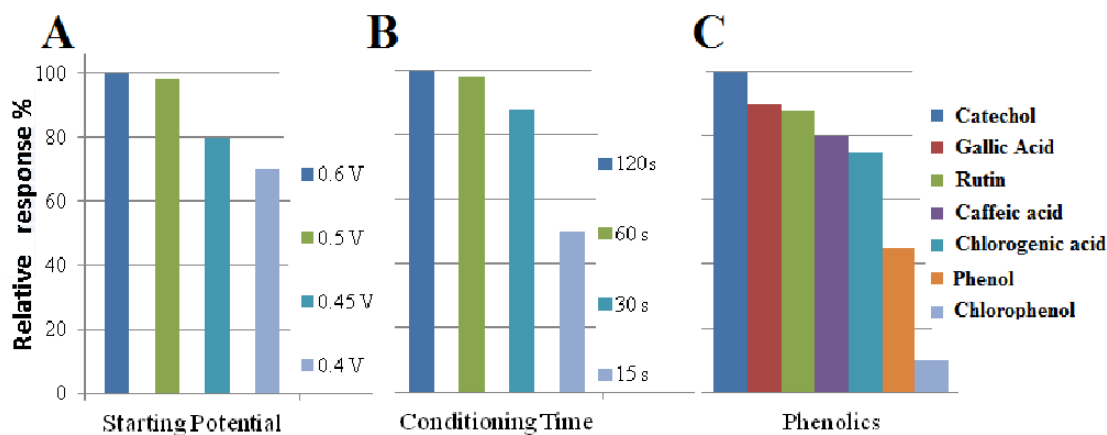


Figure 4. Effect of starting potential (A) and conditioning time (B) on the biosensor performance and the relative response of CPL-DNA:CN against equimolar concentrations of different phenolic compounds (C).

3.4 Application of Biosensor for determination of Antioxidant Capacity

The antioxidant capacity of many natural compounds is very close to the total phenolic (TP) content. Therefore, taking into account the good sensitivity of CPL-DNA:CN for many polyphenolic

antioxidants (Figure 4C), this biosensor was elected for analysis of total phenol (TP) content in coffee crude samples (Table 3).

Table 3. TP content values expressed as Gallic Acid Equivalents (GAEq) (mg/mL) obtained for different roasted coffee beverages by using CPL-DNA:CN biosensor and FC method.

Sample	CPL-DNA:CN GAEq (mg/mL)	FC GAEq (mg/mL)	DPPH (EC ₅₀)
SG (N = 5)	0.48 ± 0.1	0.54 ± 0.2	19.74 ± 1.94
SP (N = 5)	0.43 ± 0.1	0.53 ± 0.2	21.30 ± 0.52
PI (N = 5)	0.41 ± 0.1	0.42 ± 0.2	22.43 ± 1.07
E (N = 5)	0.53 ± 0.1	0.60 ± 0.3	19.72 ± 2.11

SG = soluble granulates; SP = soluble powder; PI = Powder for infusion and E = capsules for espresso.

The biosensor and FC results for TP values presented good agreement. Moreover, the RSD % obtained for the biosensor was lower than the one obtained for FC method. Finally, as expected for coffee samples the TP content agreed with EC₅₀ values obtained for DPPH assay.

Furthermore, the performance of CPL-DNA:CN was similar to other laccase based biosensor, in which despite to the higher complexity concerning their preparations, the limit of detection for phenolic antioxidants have also been in the μM level [29,30].

4. CONCLUSIONS

The biopolymers, specially the DNA confers higher stability to laccase biosensors, whereas MWCNTs increased the electroactive area and improved the electrical properties leading to higher Faradaic peak currents. The optimized CPL-DNA:CN biosensor showed good performance on the determination of natural phenolics, being a useful and easy tool for TP and antioxidant capacity determinations.

References

1. A. Amine, H. Mohammadi, I. Bourais, G. Palleschi. *Biosens. Bioelectron.*, 21 (2006) 1405–1423.
2. C. O'Sullivan, S. J. Alcock. *Water Res.* 36 (1999) 3786–3802.
3. H. H. Weetall. *Biosens. Bioelectron.* 11 (1996) 327-360.
4. K. R. Rogers. *Biosens. Bioelectron.*, 10 (1995) 533-541.
5. L. Gorton, G. Marko-Varga, B. Persson, Z. Huan, H. Lindén, E. Burestedt, S. Ghobadi, M. Smolander, S. Sahni, T. Skotheim. *Adv. Mol. Cell Biol.*, 15 (1996) 421-450.
6. R. Gupta, N. K. Chaudhury. *Biosens. Bioelectron.*, 22 (2007) 2387-2399.
7. R. S. Freire, N. Dúram, L. T. Kubota. *Talanta*, 54 (2001) 681-686.
8. T. M. B. F. Oliveira, M. F. Barroso, S. Morais, M. Araújo, C. Freire, P. Lima-Neto, A. N. Correia, M. B. P. P. Oliveira, C. Delerue-Matos. *Biosens. Bioelectron.* 47 (2013) 292-299.
9. S. Reis, L. M. Magalhaes, M. Santos, M. A. Segundo, and J. L. F. C. Lima, *Talanta*. 77 (2009) 1559.

11. F. M. A. Lino, L. Z. Sá, I. M. S. Torres, M. L. Rocha, T. C. P. Dinis, P. C. Ghedini, S. S. Somerset, E. S. Gil. *Electrochim. Acta*, 128 (2014), 25–31.
12. L. Wang, W. Ma, L. Xu, W. Chen, Y. Zhu, Y. Kotov. *Mat. Sc. Engineer.*, 70 (2010) 265-274.
13. M. C. Rodríguez, G. A. Rivas. *Anal. Chim. Acta*, 459 (2002) 43-51.
14. I. C. Popescu. *Biosens. Bioelectron.*, 10 (1995) 443-461.
15. A. Walcarius. *Anal. Chim. Acta*, 384(1999) 1-16.
16. C. Mousty, *Appl. Clay Sc.* 27 (2004) 159–177.
17. V.K.K.Upadhyayula, V. Gadhamshetty. *Biotechnol. Adv.* 28 (2010) 802–816.
18. T. M. B. F. Oliveira, M. F. Barroso, S. Morais, M. Araújo, C. Freire, P. Lima-Neto, A. N. Correia, M. B. P. P. Oliveira, C. Delerue-Matos. *Talanta*, 106 (2013) 137-143.
19. C. Fernández-Sánchez, T. Tzanov, G. M. Gübitz, A.Cavaco-Paulo. *Bioelectrochem.*, 58 (2002) 149-156.
20. M. Fernández-Fernández, M. A. Sanromán, D. Moldes. *Biotechnol. Adv.*, 31(2013) 1808-1825.
21. F. W. P. Ribeiro, M. F. Barroso, S. Morais, S. Viswanathan, P. Lima-Neto, A. N. Correia, M. B. P. P. Oliveira, C. Delerue-Matos. *Bioelectrochem.*, 95 (2014) 7-14.
22. R. Pang, M. Li, C. Zhang. *Talanta*. 131 (2015) 38-45.
23. V. S. Valeriano, A. M. F. Silva, M. F. Santiago, M. T. F. Bara, T. A. Garcia. *Braz. J. Microbiol.*, 40 (2009) 790-794.
24. E. S. Gil, L. Muller, M. F. Santiago, T. A. Garcia. *Port. Electrochim. Acta.*, 27 (2009) 215-225.
25. G. Perenlei, T. W. Tee , N. A. Yusof , G. J. Kheng, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 6 (2011) 520 - 531.
26. R. L. McCreery, *Chem. Rev.*, 108 (2008) 2646–2687.
27. H. W. Fink, C. Schönenberger, *Nature* (1999) 398, 407-410.
28. E.S. Gil, L.T. Kubota, *Ž. Bioelectrochem.*, 51 (2000) 145–149.
29. M. Di Fusco, C. Tortolini, D. Deriu, F. Mazzei, *Talanta*, 81 (2010) 235-40.
30. E. Casero, M. D. Petit-Domínguez, L. Vázquez, I. Ramírez-Asperilla, A. M. Parra-Alfambra, F. Pariente, E. Lorenzo, *Talanta*, 115 (2013) 401–408

© 2015 The Authors. Published by ESG (www.electrochemsci.org). This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ANEXO 3



Analytical Methods

Electrochemical behavior and determination of major phenolic antioxidants in selected coffee samples



Jerônimo Raimundo Oliveira-Neto, Stefani Garcia Rezende, Carolina de Fátima Reis, Stephen Rathinaraj Benjamin, Matheus Lavorenti Rocha, Eric de Souza Gil*

Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Av. Universitária s/n, 74605-220 Goiânia, GO, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 February 2015
Received in revised form 18 May 2015
Accepted 25 May 2015
Available online 2 June 2015

Keywords:

Coffee brews
Chlorogenic acid
Caffeic acid
Antioxidant activity
Redox behavior
HPLC

ABSTRACT

The redox behavior of commercial roasted coffee products were evaluated by electroanalysis, whereas high performance liquid chromatography (HPLC) was used for determination of cinnamic acid markers, the total phenolic content (TPC) was achieved by Folin-Ciocalteu assay, and the traditional DPPH (1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method for antioxidant power determination. In turn, an optimized electrochemical index was proposed to estimate the antioxidant power of different samples and it was found a great correlation between all methods. The voltammetric profile of all coffee samples was quite similar, presenting the same number of peaks at the same potential values. Minor differences on current levels were in agreement with the total phenolic and major markers content, as well as, to the antioxidant power. Therefore, the electrochemical methods showed to be practical, low cost and very useful to evaluate the antioxidant properties of coffee samples, which is a relevant quality parameter of this widely consumed beverage.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Coffee is one of the most consumed beverages in the world, being very popular in Europe and North America. The nutritional quality of the beverage is due to the high content of antioxidants such as polyphenols, and their content are influenced according to plant species, edapho-climatic aspects, and technological parameters of production, such as roasting conditions (Amare & Admassie, 2012; Kilmartin & Hsu, 2003; Vignoli, Viegas, Bassoli, & Benassi, 2014).

The main polyphenolic compounds include hydroxycinnamic acid and flavonoid derivatives, being that the caffeic acid and chlorogenic acid are two important major markers of coffee samples (Cämmerer & Kroh, 2006). These hydroxycinnamic acids have an important role on the beverage taste and quality of coffee beans and exhibit prominent antioxidant activity (Vignoli et al., 2014).

These polyphenols have called attention due to their ability to scavenge radicals, thus restoring oxidative balance in physiological systems (Parras, Martínez-Tomé, & Jiménez, 2007). This homeostasis is very important to health, whereas it has been well established by a plenty of evidences that free radicals and other

oxidative agents are related to many degenerative diseases, such as cancer, cardiovascular disease, immune system decline, brain dysfunction, as well as to the aging process (Parliament, 2000).

In the face of these statements, the interest in food and beverages presenting remarkable content of antioxidants has upsurged, leading to the developing of many methods to qualify these natural products (Anese & Nicoli, 2003; Blasco, Crevillén, González, & Escarpa, 2007; Blasco, Rogerio, González, & Escarpa, 2005; Borrelli, Visconti, Mennella, Anese, & Fogliano, 2002; Gomez-Ruiz, Ames, & Leake, 2008). Among traditional methods applied to determine the antioxidant activity, DPPH[•] (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay must be highlighted due to this practicality and lower cost (Basnet, Matsushige, Hase, Kadota, & Namba, 1996). This method is based on the conversion of DPPH[•] into non radical species, through electron and hydrogen atom transfer mechanism by addition of antioxidants that leads to the decolourization of solution.

In turn, the antioxidant activity correlates strongly with TPC (Blasco et al., 2007), that is traditionally obtained by Folin-Ciocalteu (FC) method. The FC method is based on the reduction of phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent, by phenolics compounds, to a blue compound in an alkaline medium (Blasco et al., 2007; Everette et al., 2010; Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventos, 1999). The main disadvantage of this assay is the interference of reducing substances that can react with the

* Corresponding author at: Faculty of Pharmacy, UFG, rua 240 esquiuna com 5a avenida, s/n, Setor Universitário, CEP 74605-170 Goiânia, GO, Brazil.
E-mail address: ericsgil@gmail.com (E. de Souza Gil).

FC reagent, thus leading to overestimation of the results for TPC and hampering the accuracy too (Blasco et al., 2007; Escarpa, 2012; Singleton et al., 1999). Moreover, many substances present in such natural products can absorb in the same wave-length range, thus interfering on the accuracy of DPPH and FC methods (Basnet et al., 1996; Escarpa, 2012; Lino et al., 2014).

Therefore, the development of new antioxidant assays is an area of great interest, whereas the electroanalysis emerged as a potential alternative. Indeed, the electrochemical methods present many advantages such as quickness, simplicity, sensitivity, reduced sample and reagent consumption (Blasco et al., 2007; Kilmartin & Hsu, 2003; Lino et al., 2014; Sharma, Gulati, Ravindranath, & Kumar, 2005). Moreover, such assays according to the experimental conditions, can allow the elucidation of the redox behavior and the determination of specific antioxidant classes (Blasco, González, & Escarpa, 2004; Escarpa, 2012; Kilmartin & Hsu, 2003; Gil & Couto, 2013), as well as to categorize according to their electrochemical index or antioxidant power (Blasco et al., 2005; Escarpa, 2012; Lino et al., 2014). Thus, taking into account that the determination of specific antioxidants is usually achieved by hyphenated techniques, which demand expensive apparatus, highly skilled technicians, complicated and time-consuming procedures, electroanalysis becomes a very attractive option (Escarpa, 2012; Jones, Magri, Rios, & Jones, 2011; Khanchi, Mahani, Hajihosseini, & Maragheh, 2007; López-Martinez, López-de-Alba, Garcia-Campos, & LeónRodríguez, 2003; Regan & Shakalisava, 2005). Hence, the electroanalysis may have dual function, on the evaluation of the antioxidant power, and also for the tentative determination of specific classes (Blasco et al., 2007; Escarpa, 2012; Kilmartin & Hsu, 2003; Lino et al., 2014; Rawat, Chandra, & Sarkar, 2010).

So the aim of this work is to investigate the electrochemical behavior of some varied coffee beverages, and its correlation with the phenolics content, consolidating the application of electroanalysis on the determination of antioxidant power of crude samples. In this context, the antioxidant activity of a variety of commercial “soluble” products obtained from roasted coffee was evaluated by traditional DPPH assay and the veracity of the electrochemical index concepts, well stated by Escarpa research group (Blasco et al., 2005; Escarpa, 2012) was herein reinforced and revisited (Lino et al., 2014), whereas the phenolic content was estimated by differential pulse voltammetry and the results compared with Folin Ciocalteu assay and high performance liquid chromatography (HPLC), respectively for total and specific major markers determinations.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Ethanol, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and Folin-Ciocalteu's reagent were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All electrolyte solutions were prepared by using high analytical grade salts, which were diluted in double distilled Milli-Q water (conductivity $\leq 0.1 \mu\text{S cm}^{-1}$) (Millipore S.A., Molsheim, France).

2.2. Coffee samples

Different commercial trademarks of roasted coffee samples herein investigated were purchased from local markets of Goiania-GO/Brazil; Coimbra/Portugal and Auckland/New Zealand. The coffee samples were identified according to the food technology involved in three main types: Soluble granules (SG, $N = 7$); power for infusion (PI, $N = 3$); Capsules for espresso (CE, $N = 21$),

which were sub classified in “lungo or lunghi” (^L), regular (^R) and decaffeinated (^D). In order to discriminate the origin, we have used the ISO codes (http://userpage.chemie.fu-berlin.de/diverse/doc/ISO_3166.html) in BR, PT, NZ, CO and IN, respectively for Brazil, Portugal, New Zealand, Colombia and India.

2.2.1. Sample preparation

The coffee extracts were prepared by infusion submitting 2 g of each sample in 25 mL of hot water by 10 min under stirring. Afterwards the coffee extracts were cooled till room temperature and filtered with 0.45 μm filter paper. The resulting solution was subsequently diluted in suitable analytical grade solvents according to the experiment in order to obtain the assay solutions. For the electrochemical measurements, 250 μL of this resulting solution were diluted in 4 mL of the electrolyte solution, i.e., 0.1 M phosphate buffer pH 5.0. The same procedure was used for the DPPH assay but an analytical grade ethanol solvent was used in place of the buffer electrolyte (Lino et al., 2014). In the case of HPLC analysis, the clear filtrate was diluted in the mobile phase according to the method of Wanyika, Gatebe, Gitu, Ngumba, and Maritim (2010).

2.3. Spectrophotometric assays

2.3.1. Apparatus

The absorbance measurements were recorded with a spectrometer Q798U2VS (Quimis Aparelhos Científicos, São Paulo, Brazil).

2.3.2. DPPH radical scavenging assays

The radical scavenging activity assays were performed using the stable DPPH reagent, in accordance with very well established procedures (Lino et al., 2014). Briefly, the blank control was composed by a mixture of 0.5 mL of ethanol and 2.5 mL of DPPH' ethanolic solution (0.1 mM), in which the final absorbance at $\lambda = 517 \text{ nm}$ was of c.a. $A = 0.7$. The ethanol, solvent used to prepare all solutions, was used in order to adjust the baseline ($A = 0.000$). Antioxidant activity was expressed as EC_{50} , representing the amount (L) of coffee assay solution to produce 50% of decolorization of DPPH' relative to the blank control.

All samples were analyzed in a 1 cm glassy cell length at room temperature.

2.3.3. Folin-Ciocalteu assays

For the determination of total phenolic content the adjusted Folin-Ciocalteu (FC) method was performed. Briefly, 100 L of the sample or gallic acid standard solution were pipetted into 10 mL volumetric flask containing 2 mL of water, 0.5 mL of FC reagent and 1.5 mL of 20% Na_2CO_3 solution and then completed with distilled water to total volume of 10 mL. The flask was then kept in the dark at room temperature, and after 1 h reaction, the solution was measured by the spectrophotometer at 765 nm against a blank sample. All determinations were performed in triplicate and compared to the standard curve, in order to allow to express the results by means of gallic acid equivalents (GAE), mg of GA in each mL of coffee brew (Singleton & Rossi, 1965).

2.4. Electroanalytical assays

Voltammetric experiments were carried out with a potentiostat/galvanostat $\mu\text{Autolab III}^{\circledR}$ integrated to the GPES 4.9 $^{\circledR}$ software, Eco-Chemie, Utrecht, The Netherlands. The measurements were performed in a 5.0 mL one-compartment electrochemical cell, with a three-electrode system consisting of a carbon paste electrode (prepared as a piston-driven holder containing 75% of graphite powder and 25% of Nujol $^{\circledR}$, $\varnothing = 2 \text{ mm}$), a Pt wire and the $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{\text{sat}}$ (both purchased from Lab solutions, São Paulo,

Brazil), representing the working electrode, the counter electrode and the reference electrode, respectively. The carbon paste was mechanically renewed before each experiment, in order to ensure reproducible results. The experimental conditions for differential pulse voltammetry (DPV) were: pulse amplitude 50 mV, pulse width 0.5 s and scan rate 5 mV s⁻¹. The experimental conditions for cyclic voltammetry (CV) were: scan rate of 100 mV s⁻¹ and scan range from 0 to 1 V. The experimental conditions for square wave voltammetry (SWV) were: frequency of 30 Hz, pulse amplitude of 50 mV and effective scan rate of 100 mV s⁻¹. The DP voltammograms were background-subtracted and baseline-corrected, and then all data were analyzed and treated with the software Origin 8[®]. All experiments were done at room temperature (21 ± 1 °C) in triplicate (n = 3) and the main electrolyte used was the phosphate buffer (PBS).

2.4.1. Electrochemical index determination

The electrochemical index (EI) concept was first proposed by Escarpa group (Blasco et al., 2005; Escarpa, 2012) taking into account the voltammetric parameters, anodic peak potential (E_{pa}) and anodic peak current (I_{pa}), independently. Thus, since the lower is the potential (thermodynamic parameter), the higher is the electron donor ability, as well as the higher is the peak current (kinetic and concentration parameter), the higher is electron transfer rate and/or the amount of electroactive species (Escarpa, 2012; Makhotkina & Kilmartin, 2009; Wanyika et al., 2010), the EI was herein calculated by using the Eq. (1) (Lino et al., 2014).

$$EI = \frac{I_{pa1}}{E_{pa1}} + \frac{I_{pa2}}{E_{pa2}} + \dots + \frac{I_{pan}}{E_{pan}} \quad (1)$$

In which I_{pan} and E_{pan} correspond to current and potential value for each anodic peak observed in the DP voltammograms.

2.5. HPLC assays

The determination of the major markers, caffeic acid, chlorogenic acid and caffeine in all coffee samples were performed in a Shimadzu HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) consisting in a LC-20AT pump, DGU-20A₅ degasser, SPD-M20A PDA detector, CTO-20A column oven and SIL-20A auto sampler. The column oven temperature was set to 30 °C. The separation of the analytes was carried out using stainless steel ACE[®] column packed with C₁₈ (250 × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was a mixture, 80:20 v/v, between 50 mM potassium phosphate buffer (pH 3.0) solution and methanol. The mobile phase was previously filtered before the use through 0.45 μm membrane (Millipore, Milford, MA, USA) and degassed in ultrasonic bath (Unique[®] USC-2800) for 20 min. The flow rate was of 1.0 mL/min and 20 L of sample were injected into the HPLC. The detection was performed at a specific wavelength of 280 nm and the data obtained for external standards and samples were processed and compared by LC Solutions software. Stock solutions of chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine (1 mg/mL) were prepared in methanol and stored at 8 °C, from which the working standard solutions were prepared daily by dilution in mobile phase.

2.6. Statistical analysis

Values were expressed as mean ± SEM. Statistical significance was determined using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls Multiple Comparison post hoc test when appropriate. A p value of <0.05 was considered statistically significant. Analyses were performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (San Diego, CA, USA).

3. Results and discussion

3.1. Antioxidant power and total phenol content

The antioxidant power of all coffee beverage samples previously prepared as described in experimental section, were performed by means of spectrophotometric and electroanalytical methods. Electrochemical index (EI), radical scavenging activity (EC₅₀) and total polyphenols (FC-GAE) are shown in Table 1.

The DPPH radical scavenging activity is presented as EC₅₀ (μL), the amount of sample to suppress to the half the initial absorbance value, and the phenol total content was expressed as gallic acid equivalent (mg/mL of coffee beverage), whereas EI (μA/mV), the sum of all I_{pa}/E_{pa} , was calculated as described in experimental section, by using the anodic peak values of DP voltammograms base-line corrected (Escarpa, 2012; Lino et al., 2014). Examples of DP voltammograms obtained for representative samples are presented in Fig. 1.

It can be noticed from Table 1, that the EC₅₀ and EI values present an inverse correlation. Indeed, the lower the amount required to convert DPPH radical into its reduced form, the higher is the antioxidant power. On the other hand, the higher the EI value, the greater will be the content of antioxidants, as well as their inherent reducing power in the related sample. In turn, the EI values were directly proportional to the total phenol content determined by Folin-Ciocalteu method (Fig. 2 and Table 1).

Though the analytical principles and also the units related to spectrophotometric and electroanalytical methods present huge differences, they presented the same tendency and satisfactory correlation, $r = 0.95$ for DPPH/EC₅₀ vs EI and $r = 0.98$ for FC/GAE vs EI.

Table 1

Results for EI (electrochemical index), EC₅₀ (amount of coffee assay solution to produce 50% of decolorization of DPPH) and FC-GAE (Folin-Ciocalteu-gallic acid equivalents) values obtained for different roasted coffee samples.

Samples	EI (μA/mV) ±RSD (n = 3)	EC ₅₀ (μL)	FC-GAE (mg/mL)
SG-1BR	6.2 ± 0.3	16.9 ± 0.8	0.55 ± 0.1
SG-2BR	6.8 ± 0.5	17.8 ± 0.6	0.53 ± 0.1
SG-3BR	5.8 ± 0.3	20.0 ± 0.6	0.55 ± 0.1
SG-4BR	5.8 ± 0.3	22.9 ± 0.4	0.54 ± 0.2
SG ^d -1BR	5.5 ± 0.2	20.3 ± 0.5	0.53 ± 0.1
SG ^d -2BR	5.5 ± 0.3	20.4 ± 0.6	0.54 ± 0.2
SG ^d -3BR	5.4 ± 0.4	19.9 ± 0.7	0.53 ± 0.2
SGaverage	5.85 ± 0.49	19.74 ± 1.94	0.54 ± 0.01
SP-1BR	5.9 ± 0.3	21.9 ± 0.5	0.53 ± 0.2
SP-2BR	5.8 ± 0.3	21.1 ± 0.4	0.53 ± 0.2
SP-3BR	5.9 ± 0.3	20.9 ± 0.5	0.55 ± 0.1
SPaverage	5.86 ± 0.05	21.30 ± 0.52	0.53 ± 0.01
PI _{sz}	4.7 ± 0.4	21.2 ± 0.4	0.42 ± 0.1
PI _{BR}	4.6 ± 0.4	22.9 ± 0.3	0.42 ± 0.2
PI _{BR}	4.5 ± 0.2	23.2 ± 0.7	0.41 ± 0.2
PIaverage	4.6 ± 0.1	22.43 ± 1.07	0.42 ± 0.01
CE ^{II}	7.0 ± 0.5	18.2 ± 0.4	0.59 ± 0.2
CE ^I -1PT	7.1 ± 0.3	17.9 ± 0.4	0.61 ± 0.3
CE ^I -2PT	7.2 ± 0.3	17.7 ± 0.4	0.60 ± 0.2
CE ^I -3PT	7.3 ± 0.3	17.5 ± 0.4	0.62 ± 0.2
CE^Iaverage	7.1 ± 0.1	17.83 ± 0.20	0.60 ± 0.01
CE ^{III} -1PT	3.5 ± 0.3	24.4 ± 0.4	0.22 ± 0.2
CE ^{III} -2PT	3.7 ± 0.3	23.8 ± 0.4	0.24 ± 0.2
CE ^R -1PT	4.4 ± 0.5	22.5 ± 0.5	0.40 ± 0.2
CE ^R -2PT	4.3 ± 0.6	23.1 ± 0.5	0.40 ± 0.2
CE ^R -3PT	4.5 ± 0.5	21.4 ± 0.5	0.43 ± 0.2
CE ^R -4PT	4.3 ± 0.6	23.3 ± 0.5	0.40 ± 0.2
CE ^R -5PT	4.5 ± 0.5	21.1 ± 0.5	0.40 ± 0.2
CE ^R -6PT	4.4 ± 0.6	22.3 ± 0.5	0.44 ± 0.2
CE ^R _{sz}	5.0 ± 0.2	19.5 ± 0.6	0.49 ± 0.1
CE ^{EO}	4.2 ± 0.2	23.6 ± 0.4	0.39 ± 0.2
CE ^{IN}	4.1 ± 0.4	24.9 ± 0.5	0.38 ± 0.1
CE^Raverage	4.26 ± 0.52	22.72 ± 2.11	0.38 ± 0.09

The bold represents the average of each group of different type of coffee samples.

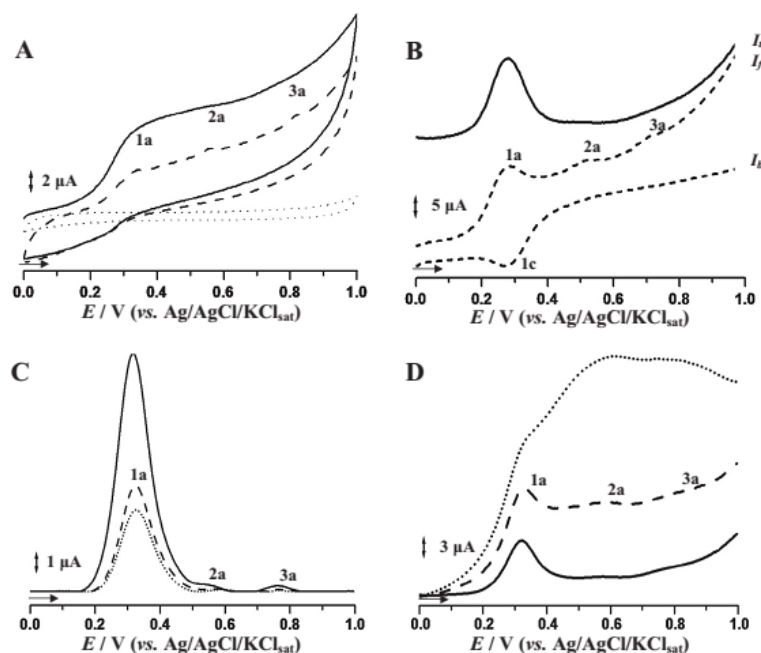


Fig. 1. (A) Cyclic voltammograms of blank (---), first (—) and second (---) scans obtained for 1% CE_{PI} sample; (B) SW voltammogram obtained for 0.5% SP_{BR} sample; (C) successive scans of DP voltammograms base-line corrected obtained for 0.5% w/v CE_{PI} sample; (D) DP voltammograms obtained for different concentrations of PI_{k22} sample: 0.1% (—); 0.5% (---) and 1.5% (---). All in 0.1 M PBS pH 5.0 at CPE. Other parameters included scan rate of 100 mV s⁻¹ for cyclic voltammetry; pulse width of 5 mV, pulse amplitude of 50 mV, scan rate of 10 mV s⁻¹. For DPV: $f = 50$ Hz, $\Delta E_s = 2$ mV, $\nu_{eff} = 100$ mV s⁻¹; I_t – total, I_f – forward and I_b – backward currents in SWV.

In the present study, the highest antioxidant activity (EI and DPPH assays) was observed for the “espresso lungo” samples. Meanwhile, the lowest values were observed for “espresso regular” samples followed by the PI samples. As expected, the same tendency was observed for TPC, as can be seen in the FC–GAE results (Table 1).

In the case of “regular” CE samples, the lower TPC and antioxidant power might be associated to the speed of the extraction process. Yet, regarding to the “lungo” samples, such CE are produced for larger amount of water (c.a. 250 mL) in comparison to regular ones (c.a. 50 mL). Therefore, since the same amount of water was used to prepare all samples, the content of phenolic antioxidants per cup of coffee, may be higher in the lungo samples (Gloess et al., 2013). This fact explains our best findings for “espresso lungo” group as compared to espresso regular. In turn, the filtration required for preparation of PI group, suggests that this procedure may retain part of the intrinsic antioxidants, thus explaining the inferior results. In fact, this assumption was previously stated by Niseteo, Komes, Belscak-Cvitanovic, Horzic, and Budec (2012) who also achieved that filter use impaired coffee total phenol content, as well as, antioxidant activity.

In turn, the SG and SP samples presented intermediate values for antioxidant power and TPC. Also, it was noticed a slight fall of antioxidant activity and TPC for decaffeinated coffee brews. Which, spite the absence of statistical significance, agrees with the lower content of phenolic acids, already described in literature for decaffeinated coffee (Vicente, Queiro, Gottlieb, & Torres, 2014). Finally, regarding the country origin, the values were quite similar for the samples herein evaluated (Table 1).

Besides the fact that EI method is simpler and less expensive than FC and DPPH assays, the results agreement were very strong

for both, antioxidant power and TPC approaches. Moreover, the ease of handling and simple surface renewing of carbon paste electrodes allow the possibility to carry out other voltammetric techniques, thus leading to a better understanding of the redox behavior of the major coffee antioxidants, even in when applied for complex matrices such as coffee beverages. Moreover, carbon paste electrodes are cheap and accessible for any quality control lab even in underdevelopment countries, whereas the reproducibility (RSD < 5%) is easily achieved by established standard operational procedures.

3.2. Electrochemical characterization

The redox behavior of coffee samples and their main markers was evaluated by different voltammetric techniques and at different conditions (Figs. 1 and 2). Fig. 1A shows a typical cyclic voltammogram obtained for 1% coffee sample in 0.1 M phosphate buffer pH 5.0, in which can be observed a well defined anodic peak 1a, at $E_{p1a} = 0.33$ V. On the reverse scan, the corresponding cathodic peak at $E_{p1c} = 0.28$ V, is almost imperceptible indicating strong adsorptive behavior (Fig. 1A).

Yet, the reversibility of redox pair 1a and 1c was confirmed by plotting the simultaneous forward and backward components of the total peak current of SWV. It can be perfectly observed that the I_{pa}/I_{pc} ratio is close to the unit, and that E_{pa} and E_{pc} occurs almost at the same potential (Fig. 1B). In turn, two further irreversible anodic process, 2a and 3a can be hardly observed by both techniques (Fig. 1A and B). The same voltammetric profile was obtained for other coffee samples, herein evaluated.

In fact, the anodic peaks, 2a and 3a, were better identified by DPV, in which the capacitive currents are minimized, allowing

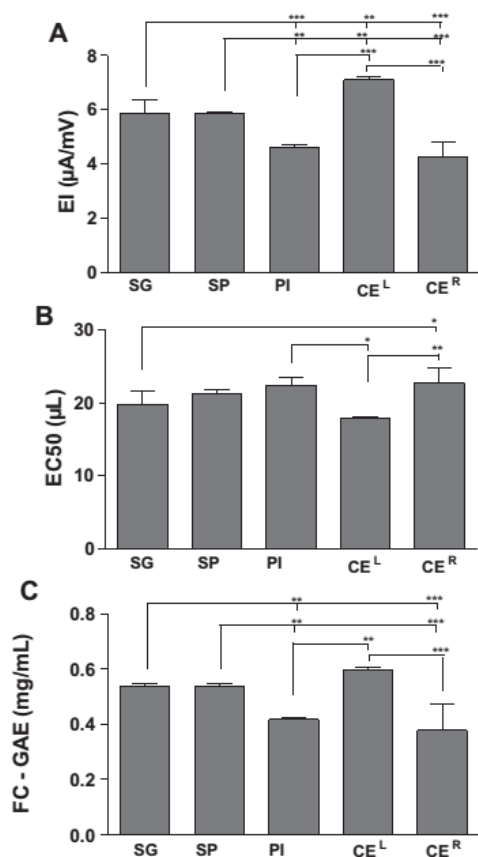


Fig. 2. Determinations of antioxidant capacity and total phenols in coffee samples. Vertical bars represent the average \pm SD values. The antioxidant activity was obtained by (A) EI (electrochemical index) and (B) DPPH method (EC_{50} = amount of coffee assay solution to produce 50% of decolorization of DPPH). The total phenolic content was estimated using the Folin-Ciocalteu reaction (C) FC-GAE (Folin-Ciocalteu-gallic acid equivalents). Significant difference * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (ANOVA plus Newman-Keuls Multiple Comparison post hoc test).

higher sensitivity and detection of irreversible redox processes related to minor electroactive markers. The DP voltammograms (Fig. 1C and D) obtained for the first scan in 0.5% coffee sample and in the same electrolyte solution allow the observation of two further anodic process, peaks 2a and 3a, at $E_{p2a} = 0.55$ V and $E_{p3a} = 0.78$ V, respectively.

Moreover, the electrochemical oxidation of phenolic compounds is generally associated to adsorption of unstable intermediates that undergoes to formation of insulating film. Accordingly, the better resolutions depend on the adsorptive behavior of oxidation products and also of the optimum adjust of concentration. The adsorptive behavior and the influence of added sample on the peak resolution are presented on Fig. 1C and D. Though at high concentration, higher peak currents would be the expected, the passivation process also increases, thus decreasing the DPV resolution (Fig. 1D). Furthermore, successive DP voltammograms obtained without surface renewing led to the complete suppression of peak currents (Fig. 1C), which is typical for the electrooxidation of phenolic species, that exhibit adsorptive and passivation behavior.

In order to investigate the influence of the coffee major markers on the DPV profile of crude samples, caffeic acid, chlorogenic acid,

caffeine and a pool of these three compounds were also studied in 0.1 M PBS pH 5.0 (Fig. 3A). The Fig. 3A shows an anodic peak 1a, for all samples, the caffeic acid occurring at $E_{p1a} = 0.18$ V and the chlorogenic acid, as well as the pool of markers at $E_{p1a} = 0.22$ V, which is very close to the value observed for all samples of 0.23 V.

The peak potential, 1a at E_{p1a} lower than 0.25 V is consistent with high electron donor character and is commonly attributed to catechol like polyphenols, the greatest antioxidants (Couto & Gil, 2013).

It was observed, that even at more than 10-fold the concentration of the phenolic compounds the influence of the electrooxidation of caffeine on the voltammetric profile of coffee samples was irrelevant (Fig. 3A1).

The effect of pH was also evaluated in a broad pH range (3.0–9.0) and the results obtained are shown in Fig. 3B, which is a 3D plot of DP voltammograms as a function of pH. It was observed, at the same way that occurs for the many phenolic compounds, an inverse linear plot, E_{pa} vs pH unit, until the pK_a value, in which the slope of c.a. 59.2 mV is in agreement with the Nernstian theoretical value for quid pro quo electron:proton transfer processes. The electroactive species in coffee samples presented higher peak currents at middle acid pH (5.0–6.0), whereas the slope broken and fall of peak currents were observed at pH \sim 8.0. The same behavior is observed for the hydroxycinnamic derivatives (not shown). From such similarities it could be inferred the redox behavior of coffee beverage samples are governed by “catechol like” major markers, which are recognized by their great antioxidant properties (Couto & Gil, 2013; Manaia, Diculescu, Gil, & Oliveira-Brett, 2012).

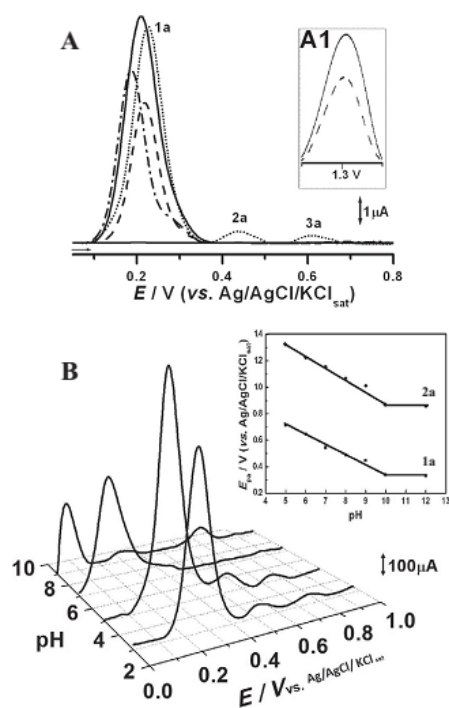


Fig. 3. (A) DP voltammograms obtained for 1 mM caffeic acid (----); 1 mM chlorogenic acid (---); the pool of coffee markers (—) and 0.1% w/v SG3, a representative coffee sample (---); A1) DP voltammograms for 5 mM (----) and 10 mM (—) caffeine solution. (B) 3 D plots of DP voltammograms base-line corrected for 0.5% w/v coffee sample (CE5) in different pH solutions. Inset: E_{pa} vs pH plot.

Table 2
Quantification of hydroxycinnamic acid derivatives and caffeine in coffee samples (mg/g).

Coffee sample	Chlorogenic acid (mg/g)	Caffeine (mg/g)	Caffeic acid (mg/g)
CE RD	3.19 ± 0.13	ND	0.08 ± 0.02
CE ^R	21.10 ± 0.07	0.89 ± 0.09	0.12 ± 0.03
CE ^L	89.03 ± 0.85	5.72 ± 0.14	0.18 ± 0.05
PI	13.19 ± 0.13	0.89 ± 0.09	0.08 ± 0.03
SG ^d	21.10 ± 0.07	ND	0.12 ± 0.03
SG	32.01 ± 0.30	1.22 ± 0.09	0.11 ± 0.03
SP	78.08 ± 0.72	1.66 ± 0.08	0.25 ± 0.06

ND, not detected.

Furthermore, it was also noticed that the peaks, 2a and 3a, observed only in the coffee crude samples, are not related to oxidation products of the main major markers (Fig. 3A). Thus, it can be inferred that these anodic processes should be related to other distinct phenolic species that occur in minor proportions. Furthermore, akin to the observed for crude samples, the reversibility of peak 1a was also confirmed by SWV (not shown). Since the redox reversibility is linked to the capacity of regeneration, such feature is very well desired.

Concerning peaks 2a, at $E_{p2a} \sim 0.4$ V and 3a, at $E_{p3a} \sim 0.7$ V, the electroactive species related to these oxidation processes possess intermediary and complementary electron donor abilities that may contribute slightly to antioxidant power of coffee beverages (Blasco et al., 2005; Couto & Gil, 2013; Escarpa, 2012; Lino et al., 2014).

Since the hydroxycinnamic derivatives, chlorogenic acid and caffeic acid, as well as caffeine are the main markers of coffee samples. Their content in some selected samples were evaluated through HPLC method, in order to confirm their presence and influence on the redox behavior of such beverages, thus allowing to establish comparisons with DPV method.

The identification was achieved by comparing the retention times and spectral data with those of standards and the results are presented on Table 2.

The highest content of both hydroxycinnamic acids were found in the pool samples corresponding to the "lungo" CE and soluble products, SG and SP, while the lowest was found in the sample PI and "regular" CE. Therefore, these results agree with the average results observed for each category of sample (Table 1).

4. Conclusions

The use of EI showed to be a rapid and appropriate tool to express the antioxidant activity of coffee samples and presented a good correlation with radical scavenging method. It was also possible to correlate it with the contents of hydroxycinnamic acids, from HPLC, present in these samples, thus proving the effectiveness of the use of electroanalytical techniques in determining the antioxidant power and TPC for coffee beverages.

When compared with other techniques, which demand large amounts of reagents, expensive apparatus, highly skilled technicians, complicated and time-consuming procedures, the electrochemical methods become attractive due to their practicality, low cost and very useful to evaluate the antioxidant properties of coffee samples, which is a relevant quality parameter of this widely consumed beverage.

Acknowledgment

The authors wish to thank Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) – Brazil for scholarship and financial support to this work.

References

- Amare, M., & Admassie, S. (2012). Polymer modified glassy carbon electrode for the electrochemical determination of caffeine in coffee. *Talanta*, 93, 122–128.
- Anese, M., & Nicoli, M. C. (2003). Antioxidants properties of ready-to-drink coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 942–946.
- Basnet, P., Matsushige, K., Hase, K., Kadota, S., & Namba, T. (1996). Four di-O-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 19, 1479–1484.
- Blasco, A. J., González, M. C., & Escarpa, A. (2004). Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: Towards an electrochemical index of natural antioxidants. *Analytica Chimica Acta*, 511, 71.
- Blasco, A. J., Rogerio, M. C., González, M. C., & Escarpa, A. (2005). "Electrochemical Index" as a screening method to determine "total polyphenolics" in foods: A proposal. *Analytica Chimica Acta*, 539, 237.
- Blasco, A. J., Crevillén, A. G., González, M. C., & Escarpa, A. (2007). Direct electrochemical sensing and detection of natural antioxidants and antioxidant capacity in vitro systems. *Electroanalysis*, 19, 2275.
- Borrelli, R. C., Visconti, A., Mennella, C., Anese, M., & Fogliano, V. (2002). Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6527–6533.
- Couto, R. O., & Gil, E. S. (2013). Flavonoid electrochemistry: A review on the electroanalytical applications. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23, 542–558.
- Cämmerer, B., & Kroh, L. W. (2006). Antioxidant activity of coffee brews. *European Food Research and Technology*, 223, 469–474.
- Escarpa, A. (2012). Food Electroanalysis: Sense and simplicity. *The Chemical Records*, 12, 72–91.
- Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., & Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8139–8144.
- Gil, E. S., & Couto, R. O. (2013). Flavonoid electrochemistry: A review on the electroanalytical applications. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 23, 542–558.
- Gloess, A. N., Schonbachler, B., Klopffrogge, B., D'Ambrosio, L., Chatelain, K., Bongartz, A., Strittmatter, A., Rast, M., & Yeretizian, C. (2013). Comparison of nine common coffee extraction methods: Instrumental and sensory analysis. *European Food Research and Technology*, 236, 607–627.
- Gomez-Ruiz, J. A., Ames, J. M., & Leake, D. S. (2008). Antioxidant activity and protective effects of green and dark coffee components against human low density lipoprotein oxidation. *European Food Research and Technology*, 4, 1017–1024.
- Jones, J., Magri, R., Rios, R., & Jones, M. (2011). The detection of caffeine and cotinine in umbilical cord tissue using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, 3, 1310–1315.
- Khanchi, A. R., Mahani, M. K., Hajihosseini, M., & Maragheh, M. H. (2007). Simultaneous spectrophotometric determination of caffeine and theobromine in Iranian tea by artificial neural networks and its comparison with PLS Original Research. *Food Chemistry*, 103, 1062–1068.
- Kilmartin, P. A., & Hsu, C. F. (2003). Characterization of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry. *Food Chemistry*, 82, 501.
- Lino, F. M. A., Sá, L. Z., Torres, I. M. S., Rocha, M. L., Ghedini, P. C., Somerset, V. S., & Gil, E. S. (2014). Voltammetric and spectrometric determination of antioxidant capacity of selected wines. *Electrochimica Acta*, 128, 25–31.
- López-Martínez, L., López-de-Alba, P. L., García-Campos, R., & LeónRodríguez, L. M. (2003). Simultaneous determination of methylxanthines in coffees and teas by UV-Vis spectrophotometry and partial least squares. *Analytica Chimica Acta*, 493, 83–94.
- Makhotkina, O., & Kilmartin, P. A. (2009). Uncovering the influence of antioxidants on polyphenol oxidation in wines using an electrochemical method: Cyclic voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 633, 165–174.
- Manaia, M. A. N., Diculescu, V. C., Gil, E. S., & Oliveira-Brett, A. M. (2012). Guaiacolic spices curcumin and capsaicin electrochemical oxidation behaviour at a glassy carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 682, 83–89.
- Niseteo, T., Komes, D., Belscak-Cvitanovic, A., Horzic, D., & Budec, M. (2012). Bioactive composition and antioxidant potential of different commonly consumed coffee brews affected by their preparation technique and milk addition. *Food Chemistry*, 134, 1870–1877.
- Parliament, T. H. (2000). An overview of coffee roasting. In T. H. Parliament, C. T. Ho, & P. Schieberle (Eds.), *Caffeinated beverages: Health benefits, physiological effects and chemistry* (pp. 188–201). Washington, DC: ACS Symposium Series 754, American Chemical Society.
- Parras, P., Martínez-Tomé, A. M., & Jiménez, M. A. M. (2007). Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. *Food Chemistry*, 102, 582–592.
- Rawat, A., Chandra, S., & Sarkar, A. (2010). Easy way of sample monitoring: Chemical sensors and biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2, 212–216.
- Regan, F., & Shakalisava, Y. (2005). Rapid simultaneous determination of alkylxanthines by CZE and its applications in analysis of pharmaceuticals and food samples. *Analytica Chimica Acta*, 540, 103–110.

- Sharma, V., Gulati, A., Ravindranath, S. D., & Kumar, V. (2005). A simple and convenient method for analysis of tea biochemicals by reverse phase HPLC. *Journal Food Composition Analysis*, 18, 583–594.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.
- Vicente, S. J. V., Queiro, Y. S., Gottlieb, S. L. D., & Torres, E. A. F. S. (2014). Stability of phenolic compounds and antioxidant capacity of regular and decaffeinated coffees. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57, 110–118.
- Vignoli, J. A., Viegas, M. C., Bassoli, D. G., & Benassi, M. T. (2014). Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees. *Food Research International*, 61, 279–285.
- Wanyika, H. N., Gatebe, E. G., Gitu, L. M., Ngumba, E. K., & Maritim, C. W. (2010). Determination of caffeine content of tea and instant coffee brands found in the Kenyan market. *African Journal of Food Science*, 4, 353–358.