

FLÁVIA DE ABREU PINHEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO EXPERIMENTAL  
BASEADO EM VOLTAMETRIA PARA DETERMINAÇÃO DA  
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE POLPA DE  
PEQUI (*Caryocar brasiliense* Camb.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Pinheiro, Flávia de Abreu, 1982-  
P654d            Desenvolvimento de protocolo experimental baseado em  
2018            voltametria para determinação da capacidade antioxidante de  
                 polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) / Flávia de Abreu  
                 Pinheiro. – Viçosa, MG, 2018.  
                 xvii, 116 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Edimar Aparecida Filomeno Fontes.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Pequi. 2. Antioxidantes. 3. Voltametria. 4. Eletroquímica.  
5. Compostos bioativos. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de  
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.  
II. Título.

CDD 22. ed. 664.804575

FLÁVIA DE ABREU PINHEIRO

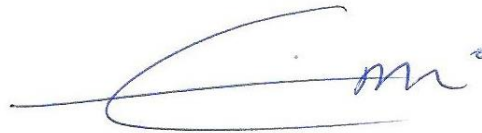
**DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO EXPERIMENTAL  
BASEADO EM VOLTAMETRIA PARA DETERMINAÇÃO DA  
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE POLPA DE  
PEQUI (*Caryocar brasiliense* Camb.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

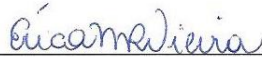
APROVADA: 04 de julho de 2018.



Leonardo Luiz Okumura  
(Coorientador)



Eduardo Basílio de Oliveira



Érica Nascif Rufino Vieira



Ulisses Alves Pereira



Edimar Aparecida Filomeno Fontes  
(Orientadora)

*A minha filha Sofia e ao meu esposo Wilton,  
que foram fundamentais para esta conquista*

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e oportunidade de viver cada dia de aprendizado.

A minha filha Sofia, pelo amor e pela superação da minha ausência.

Ao meu esposo Wilton, pelo incentivo, compreensão, apoio e orientação em todos os momentos.

Aos meus pais, Alzira e José Cleves, que sempre me incentivaram a estudar e apoiaram minhas decisões, e ao meu irmão Leonardo.

Ao Instituto Federal do Espírito Santo, *campus* Venda Nova do Imigrante, pela concessão do afastamento para capacitação.

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do Doutorado.

À Prof<sup>a</sup>. Edimar, pelo desafio proposto, pela orientação, confiança e ensinamentos.

Ao Prof. Leonardo, pela oportunidade de integrar ao GEAP, pela orientação, ensinamentos e confiança para desenvolver o projeto.

À Prof<sup>a</sup>. Astréa, pelas importantes sugestões.

Aos Professores Eduardo, Érica, Frederico Barros e Ulisses pelas importantes considerações para enriquecimento desse trabalho.

Aos Professores Deusélio (IFES-VNI) e Edilton (DEQ-UFV) pela contribuição com as análises estatísticas.

Ao Prof. Juraci (BIO 600), pelo exemplo e ensinamentos.

Aos amigos conquistados nos laboratórios 104 e GEAP: Alessandra, Dandara, Herbert, Juliana, Júnio, Letícia, Marcela, Maurício, Patrícia, Priscila e Roberta, pelo apoio e acolhimento. Em especial ao Júnio, pelo companheirismo, auxílio nos experimentos, paciência e orientações tão valiosas; à Letícia, pela amizade e paciência com as lamentações, por todo auxílio para obtenção e análises do pequi; ao Herbert, pela prontidão e gentileza para ajudar em diversas dúvidas; à Juliana e Patrícia pela presença e carinho.

Às graduandas em CTA do IFES-VNI, Luzia e Silvana, pelo auxílio nas análises.

Aos servidores do DTA, em especial à Juliana, Lorena, Pollyana, Talita e à equipe da Fábrica de Conservas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro do projeto.

A todos que me auxiliaram com seus ensinamentos, orações, conselhos, boas energias, que direta ou indiretamente, colaboraram para meu aprendizado pessoal e profissional, e concretização deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE QUADROS .....	xiv
LISTA DE TABELAS .....	xv
RESUMO .....	xvi
ABSTRACT .....	xvii
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1. Objetivo geral.....	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
CAPÍTULO 1 .....	5
Antioxidantes: conceito e importância.....	6
Determinação da capacidade antioxidante de alimentos.....	7
Técnicas voltamétricas .....	10
Pequi ( <i>Caryocar brasiliense</i> Camb.).....	16
Referências Bibliográficas.....	23
CAPÍTULO 2 .....	30
Metodologia.....	31
Reagentes e soluções .....	31
Gases.....	32
Instrumentação voltamétrica.....	32
Eletrodo de trabalho .....	32
Procedimento experimental .....	34
Estudo do oxigênio como agente oxidante.....	34
Estudo do permanganato como agente oxidante.....	43
Referências Bibliográficas.....	46
CAPÍTULO 3 .....	47
Abstract.....	48
Introduction .....	49
Experimental.....	50
Reagents and solutions.....	50
Preparation of the pequi pulp extract.....	50
Instrumentation of the voltammetric electrochemical assay.....	51
Voltammetric characterization of pequi pulp and antioxidant standards .....	51
Assessment of the total antioxidant capacity through the electroreduction of oxygen ..	51
Spectrophotometric assay of the radical cation ABTS <sup>•+</sup> .....	53
Spectrophotometric assay of the DPPH <sup>•</sup> radical .....	53
Statistical analysis.....	54
Results and Discussion .....	54

Characterization of the voltammetric profile of the compounds with antioxidant capacity .....	54
In vitro total antioxidant capacity assessment expressed by the antioxidant capacity coefficient (K).....	57
In vitro evaluation of the total antioxidant capacity expressed in $DPV_{TEAC}$ , $ABTS_{TEAC}$ and $DPPH_{TEAC}$ .....	62
Conclusions .....	64
Supplementary Information.....	65
Acknowledgments .....	65
References .....	65
CAPÍTULO 4 .....	69
Resumo .....	70
Introdução.....	70
Material e Métodos.....	71
Reagentes e soluções .....	71
Preparo dos extratos da polpa de pequi .....	72
Avaliação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> .....	73
Ensaio eletroquímico.....	73
Ensaio do cátion radical $ABTS^{*+}$ .....	74
Ensaio do radical $DPPH^*$ .....	74
Determinação de compostos fenólicos totais.....	75
Determinação de carotenoides totais .....	75
Análise estatística .....	76
Resultados e Discussão.....	77
Capacidade antioxidante expressa pelo coeficiente de capacidade antioxidante (K): ensaio eletroquímico .....	77
Capacidade antioxidante expressa em equivalente ao trolox: comparação entre os ensaios DPV, ABTS e DPPH .....	83
Avaliação de compostos bioativos nos extratos de pequi: fenólicos e carotenoides totais .....	85
Conclusão .....	87
Referências Bibliográficas.....	87
Informação Suplementar.....	91
CAPÍTULO 5 .....	92
Resumo .....	93
Introdução.....	93
Material e Métodos.....	95
Reagentes e soluções .....	95
Preparo dos extratos.....	96
Avaliação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> : ensaios eletroquímicos.....	98
Índice eletroquímico (EI) .....	98
Coeficiente de capacidade antioxidante (K) .....	99

Determinação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> : ensaios espectrofotométricos.....	100
Ensaio do cátion radical ABTS <sup>•+</sup> .....	100
Ensaio do radical DPPH <sup>•</sup> .....	100
Determinação de compostos fenólicos totais.....	101
Análise estatística .....	101
Resultados e Discussão.....	101
Estudo eletroquímico dos extratos vegetais.....	101
Avaliação da capacidade antioxidante pelos ensaios espectrofotométricos .....	106
Conteúdo de fenólicos totais.....	106
Correlação entre ensaios de capacidade antioxidante e compostos fenólicos totais.....	107
Conclusão .....	110
Referências Bibliográficas.....	110
3. CONCLUSÃO GERAL .....	116

## LISTA DE ABREVIATURAS

A: absorbância do extrato de carotenoides a 450 nm

$A_{1cm}^{1\%}$ : coeficiente de absorvidade molar do  $\beta$ -caroteno em éter de petróleo

ABTS: 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico); 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

ABTS<sup>•+</sup>: cátion radical ABTS

ABTS<sub>TEAC</sub>: ABTS assay expressed in trolox standard

ALC: extrato alcoólico da polpa de pequi

AM: extrato acetometílico da polpa de pequi

ANOVA: análise de variância; analysis of variance

AQ: extrato aquoso da polpa de pequi

ASC: ácido L-ascórbico; L-ascorbic acid

ATT: acidez total titulável

Au: eletrodo de trabalho de ouro

BHA: butyl hydroxyanisole; 2(3)-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole; 2(3)-*tert*-butil-4-hidroxianisol

CV: Voltametria Cíclica; Cyclic Voltammetry

BHT: butyl hydroxytoluene; 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol; 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol

CAR:  $\beta$ -caroteno

CIT: citric acid

CUM: *p*-coumaric acid

CT: conteúdo de carotenoides totais

DNA: ácido desoxirribonucleico

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

DPPH<sup>•</sup>: radical DPPH

DPPH<sub>TEAC</sub>: DPPH assay expressed in trolox standard

DPV: Voltametria de Pulso Diferencial; Differential Pulse Voltammetry

DPV<sub>TEAC</sub>: DPV assay expressed in trolox standard

E: potencial; real potential (V) under nonstandard conditions

E°: tabulated standard potential (V)

E<sub>1/2</sub>: potencial de meia onda

EC<sub>50</sub>: concentração de extrato necessária para reduzir a concentração inicial do radical DPPH<sup>•</sup> em 50%

EI: índice eletroquímico

E<sub>pa</sub>: potencial de pico anódico

E<sub>pc</sub>: potencial de pico catódico

EXT: pequi pulp extract

F: Faraday constant

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power

GAE: equivalentes de ácido gálico

GAL: ácido gálico; gallic acid

GC: eletrodo de trabalho de carbono vítreo

GPES: General Purpose Electrochemical System

HAT: doação de hidrogênio; hydrogen atom transfer

HPLC-DAD-MS: high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to mass spectrometry

i: corrente elétrica

I<sub>pa</sub>: corrente de pico anódico

I<sub>pc</sub>: corrente de pico catódico

I<sub>res</sub>: corrente de pico catódica do eletrólito de suporte desoxigenado

I<sub>p0</sub>: corrente de pico catódica inicial de O<sub>2</sub>

K: coeficiente de capacidade antioxidante

LSV: Voltametria Linear; Linear Sweep Voltammetry

m: massa (g) de polpa de pequi, nêspera ou *physalis* ou de flor de capuchinha

n: (Capítulo 2) - number of electrons involved on the reaction stoichiometry

n: (Capítulo 4) - número de picos anódicos

OH: grupo hidroxila

ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity

PA: grau analítico de pureza; analytical grade of purity

PCA: Análises de Componentes Principais; Principal Component Analysis

pH: potencial hidrogeniônico

pK<sub>a</sub>: logaritmo negativo da constante de acidez

R: universal gas constant

SET: doação de elétron; single electron transfer

SST: sólidos solúveis totais

SWV: Voltametria de Onda Quadrada; Square Wave Voltammetry

T: absolute temperature (K)

TE: trolox equivalente

TEAC: Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox; Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

TOC:  $\alpha$ -tocopherol

TRO: trolox; 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid; ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

v: volume de extrato de pequi (mL)

V: volume final da solução extrato de carotenoides (mL)

## LISTA DE FIGURAS

### 1. INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Relatório de artigos publicados referentes aos termos de busca “antioxidant and capacity and voltammetry”, no período de 2008 a julho de 2018.....2

### CAPÍTULO 1

Figura 1. Estruturas químicas de compostos com propriedades antioxidantes.....7

Figura 2. Mecanismo de reação do antioxidante com o radical livre. SET: transferência de elétron. HAT: transferência de hidrogênio.....8

Figura 3. Mecanismo de reação para formação do radical ABTS<sup>•+</sup> pelo persulfato de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) e sua estabilização pelo antioxidante.....9

Figure 4. Mecanismo de reação do DPPH<sup>•</sup> com o composto antioxidante.....9

Figura 5. Classificação das técnicas voltamétricas de acordo com a forma de aplicação do potencial.....12

Figura 6. Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.).....18

### CAPÍTULO 2

Figura 1. Instrumentação utilizada para realização das análises voltamétricas: (a) potenciostato interligado ao computador e célula; (b) célula eletroquímica com arranjo de três eletrodos.....32

Figura 2. Eletrodos de trabalho de carbono vítreo e de ouro.....33

Figura 3. Voltamograma de ciclos sucessivos com eletrodo de trabalho de ouro em solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Varredura de 0 a +1,4 V, com velocidade de potencial de 100 mV s<sup>-1</sup>.....34

Figura 4. Comportamento da corrente catódica de O<sub>2</sub> em eletrólito de suporte KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, com injeção do gás variando entre 5 a 30 min, utilizando-se os eletrodos de trabalho de carbono vítreo (a) e ouro (b). Tempo 0: controle (sem injeção de O<sub>2</sub>).....35

Figura 5. Comportamento da corrente catódica de O<sub>2</sub> em eletrólito de suporte KOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, com injeção do gás variando entre 5 a 30 min, utilizando-se os eletrodos de trabalho de carbono vítreo (a) e ouro (b). Tempo 0: controle (sem injeção de O<sub>2</sub>).....36

Figura 6. Comportamento da corrente catódica de O<sub>2</sub> em KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, utilizando-se eletrodo de trabalho de ouro. Leituras: 1: corrente de O<sub>2</sub> obtida com saturação da solução

por 05 min; 2: após 2:30 min da leitura 1; 3: após 5 min da leitura 1; 13: após 30 min da leitura 1.....	38
Figura 7. Intensidade da corrente catódica de O <sub>2</sub> em eletrólito de suporte tampão Britton-Robinson 0,1 mol L <sup>-1</sup> , pH 2,20 (a); pH 7,15 (b) e pH 10,05 (c), utilizando-se os eletrodos de trabalho de ouro (Au) e carbono vítreo (GC).....	39
Figura 8. Comportamento da corrente catódica de O <sub>2</sub> em eletrólito de suporte tampão Britton-Robinson 0,1 mol L <sup>-1</sup> , pH 2,20 (a); pH 7,15 (b) e pH 10,05 (c), com injeção do gás variando entre 5 a 30 min, utilizando-se o eletrodo de trabalho de ouro. Tempo 0: controle (sem injeção de O <sub>2</sub> ).....	40
Figura 9. Fluxograma do protocolo voltamétrico para avaliação da eletrorredução de O <sub>2</sub> com adição de padrões antioxidantes.....	42
Figura 10. Comportamento voltamétrico da corrente catódica de MnO <sub>4</sub> <sup>-</sup> em diferentes condições. ES: eletrólito de suporte tampão Britton-Robinson (tampão BR). AO: agente oxidante, MnO <sub>4</sub> <sup>-</sup> . AA: antioxidante, ácido L-ascórbico.....	44

### CAPÍTULO 3

Figure 1. Cyclic voltammograms of pequi pulp extract and antioxidant standards L-ascorbic acid, BHA and trolox in 0.1 mol L <sup>-1</sup> Britton-Robinson buffer, pH 2.20, 7.15 and 10.05. Scan of -0.6 to +1.4 V, at 100 mV s <sup>-1</sup> . Concentration of antioxidants standards: 1.0 mmol L <sup>-1</sup> .....	56
Figure 2. Differential pulse voltammograms of the oxygen electroreduction in 0.1 mol L <sup>-1</sup> Britton-Robinson buffer, pH 7.15; in the absence of extract of the pequi pulp (a) and with the addition of the extract (b to g), being (b): 50 µL; (c): 100 µL; (d): 150 µL; (e): 200 µL, (f): 250 µL and (g): 300 µL. I <sub>res</sub> : residual current of the support electrolyte without addition of oxygen and of pequi pulp extract.....	58
Figure 3. Variation curves of cathodic oxygen current rate as a function of the volume of pequi pulp extract and 0.02 mol L <sup>-1</sup> solution of compounds with antioxidant capacity (gallic acid, L-ascorbic acid and trolox) in 0.1 mol L <sup>-1</sup> Britton-Robinson buffer, pH 2.20, 7.15 e 10.05.....	59
Figure 4. Principal components analysis: pequi extract and antioxidant compounds as a function of pH and antioxidant capacity coefficient (a), and pH as a function of extract and compounds analyzed (b). Legend: EXT: pequi pulp extract; ASC: L-ascorbic acid; CIT: citric acid; CUM: <i>p</i> -coumaric acid; GAL: gallic acid; TOC: α-tocopherol; BHA: butyl hydroxyanisole, BHT: butyl hydroxytoluene and TRO: trolox.....	61
Figure 5. Antioxidant capacity of pequi pulp expressed in trolox equivalent (wet basis), according to electrochemical differential pulse voltammetry (DPV) and spectrophotometric assays of the radical cation ABTS <sup>•+</sup> and the radical DPPH. Mean ± standard deviation (n = 3).....	63
Figure S1. Cyclic voltammograms of antioxidant standards BHT, citric acid, α-tocopherol, gallic acid and <i>p</i> -coumaric acid, in 0.1 mol L <sup>-1</sup> Britton-Robinson buffer, pH 2.20, pH 7.15	

and pH 10.05. Scan of -0.6 to +1.4 V, at 100 mV s<sup>-1</sup>. Concentration of antioxidants standards: 1.0 mmol L<sup>-1</sup>.....68

## CAPÍTULO 4

Figura 1. Extratos da polpa de pequi aquoso (AQ), alcoólico (ALC) e acetometílico (AM).....72

Figura 2. Dispersão entre volume de extratos de pequi e de padrões antioxidantes e taxa de corrente catódica de oxigênio. Extratos da polpa de pequi: AQ: extrato aquoso, ALC: extrato alcoólico e AM: extrato acetometílico. ASC: ácido L-ascórbico, GAL: ácido gálico, CAR: β-caroteno e TRO: trolox.....78

Figura 3. Resultados das Análises de Componentes Principais (a) e de Cluster (b) para extratos da polpa de pequi e padrões antioxidantes, em função dos valores do coeficiente de capacidade antioxidante (K), independente do pH. AQ: extrato de pequi aquoso; ALC: extrato alcoólico; AM: extrato acetometílico; ASC: ácido L-ascórbico; GAL: ácido gálico, CAR: β-caroteno e TRO: trolox.....81

Figura 4. Dendrograma com os resultados da análise de Cluster para diferentes valores de pH em função dos coeficientes de capacidade antioxidante (K) obtidos para os extratos de pequi e padrões antioxidantes.....83

Figura 5. Capacidade antioxidante de extratos da polpa de pequi expressa em equivalente trolox, segundo o ensaio eletroquímico DPV (pH 7,15) e os ensaios espectrofotométricos ABTS e DPPH. Média ± desvio padrão (n=3). AQ: extrato de pequi aquoso, ALC: extrato alcoólico e AM: extrato acetometílico. DPV: médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis (p > 0,05). ABTS e DPPH: médias seguidas de letras diferentes, no mesmo ensaio, diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (p < 0,05).....84

Figura S1. Voltamogramas de pulso diferencial e curvas de variação da taxa de corrente catódica de oxigênio em função da adição de extrato de pequi, em tampão Britton-Robinson 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 4,05. (a): sem adição de extrato de pequi - (g): 300 μL de extrato. *i*<sub>res</sub>: corrente residual do eletrólito de suporte.....91

## CAPÍTULO 5

Figura 1. Vegetais exóticos comestíveis (pequi, capuchinha, nêspera e *physalis*) utilizados para preparo dos extratos.....97

Figura 2. Extratos de capuchinha (a); nêspera (b); *physalis* (c) e pequi (d).....98

Figura 3. Voltamogramas de pulso diferencial dos extratos vegetais: (a): pequi; (b): nêspera; (c): capuchinha e (d): *physalis*. (s): solução do solvente extrator (branco). Varredura de -0,6 a +0,6 V, com velocidade de potencial de 20 mV s<sup>-1</sup>.....102

Figura 4. Curvas de variação da corrente catódica de oxigênio em função do volume de extrato vegetal (pequi, nêspera, capuchinha e *physalis*), em solução tampão Britton-Robinson  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,15.....105

## LISTA DE QUADROS

### CAPÍTULO 1

- Quadro 1. Composição química da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) em relação aos principais micro e macronutrientes.....19
- Quadro 2. Composição química da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) em relação a carotenoides e principais compostos fenólicos .....20
- Quadro 3. Capacidade antioxidante da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) determinada em diferentes estudos.....22

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 3

Table 1. Antioxidant capacity coefficient (K) for the pequi pulp extract and several antioxidant patterns (found in pequi and antioxidants recognized as reference standards), at different pH values.....58

### CAPÍTULO 4

Tabela 1. Coeficiente de capacidade antioxidante (K) de extratos da polpa de pequi e padrões antioxidantes, em diferentes valores de pH.....79

Tabela 2. Resultados da correlação de Pearson entre os compostos para as médias dos valores de K, independente do pH.....82

Tabela 3. Compostos fenólicos e carotenoides totais em extratos da polpa de pequi.....86

### CAPÍTULO 5

Tabela 1. Capacidade antioxidante pelos ensaios eletroquímicos (EI e K) e espectrofotométricos (ABTS e DPPH) e conteúdo de fenólicos totais de extratos de pequi, capuchinha, nêspera e *physalis*.....104

Tabela 2. Resultados da correlação de Pearson entre ensaios de capacidade antioxidante e compostos fenólicos totais dos extratos vegetais.....108

## RESUMO

PINHEIRO, Flávia de Abreu, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Desenvolvimento de protocolo experimental baseado em voltametria para determinação da capacidade antioxidante de polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. Orientadora: Edimar Aparecida Filomeno Fontes. Coorientadores: Astréa Filomena de Souza Silva e Leonardo Luiz Okumura.

O objetivo deste estudo foi desenvolver um protocolo experimental, baseado em voltametria para determinar a capacidade antioxidante de polpa de pequi. O protocolo desenvolvido teve como princípio a eletrorredução do oxigênio, avaliada pela técnica voltamétrica de pulso diferencial (DPV). A partir da polpa de pequi foram preparados três extratos, aquoso (AQ), alcoólico (ALC) e acetometílico (AM), obtidos respectivamente, pelos solventes água, etanol e metanol seguido de reextração com acetona. O ensaio eletroquímico foi aplicado para avaliação destes extratos, sendo a capacidade antioxidante expressa como coeficiente de capacidade antioxidante (K), em diferentes valores de pH e em equivalente ao padrão trolox (TEAC), o qual foi comparado aos ensaios espectrofotométricos ABTS e DPPH. Na avaliação do extrato AM observou-se pela análise de componentes principais (PCA), que o extrato da polpa de pequi apresentou maior K tendendo a pH 7,15, sendo a ação antioxidante, relacionada à presença do ácido gálico em sua composição. No estudo do efeito do procedimento de extração na ação antioxidante dos extratos AQ, ALC e AM, observou-se pelas análises de PCA e Cluster, maior similaridade entre AM, trolox e ácido gálico; AQ e ácido L-ascórbico, e ALC e  $\beta$ -caroteno. Não houve diferença na ação antioxidante dos extratos pelo ensaio DPV, já AM destacou-se pelos ensaios ABTS e DPPH. Quanto ao valor TEAC, o melhor resultado foi obtido pelo ensaio DPV. AQ apresentou maior teor de fenólicos e ALC maior teor de carotenoides. Comparando-se o extrato de pequi com extratos de capuchinha, *nêspera* e *physalis*, observou-se maior capacidade antioxidante para *physalis*, expressa pelo índice eletroquímico (EI) e K, e para pequi e capuchinha pelos ensaios ABTS e DPPH. A polpa de pequi apresentou capacidade antioxidante comparada aos compostos padrões antioxidantes avaliados. Concluiu-se que o protocolo voltamétrico mostrou ser uma metodologia alternativa apropriada para expressar a capacidade antioxidante da polpa de pequi, sobretudo por fornecer informações importantes do processo redox, podendo também ser aplicado a outras matrizes alimentares.

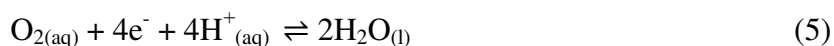
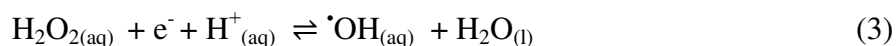
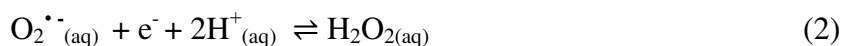
## ABSTRACT

PINHEIRO, Flávia de Abreu, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **Development of experimental protocol based on voltammetry to determine the antioxidant capacity of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp.** Adviser: Edimar Aparecida Filomeno Fontes. Co-advisers: Astréa Filomena de Souza Silva and Leonardo Luiz Okumura.

This study aimed to develop an experimental protocol based on voltammetry to determine the antioxidant capacity of pequi pulp. The protocol developed was based on the electroreduction of oxygen, evaluated by differential pulse voltammetric (DPV) technique. From the pequi pulp were prepared three extracts, aqueous (AQ), alcoholic (ALC) and acetomethylic (AM), obtained respectively by the solvents water, ethanol, and methanol followed by reextraction with acetone. The electrochemical assay was applied to evaluate these extracts, and the antioxidant capacity was expressed as a coefficient of antioxidant capacity (K), at different pH values and in trolox equivalent (TEAC), which was compared to the ABTS and DPPH spectrophotometric assays. In the evaluation of the AM extract, it was observed by the principal component analysis (PCA) that the pequi pulp extract presented higher K and pH tending to 7.15, the antioxidant action was related to the presence of gallic acid in its composition. In the study of the effect of the extraction procedure on the antioxidant action of the extracts AQ, ALC and AM, it was observed by the PCA and Cluster analyzes, greater similarity between AM, trolox and gallic acid; AQ and L-ascorbic acid, and ALC and  $\beta$ -carotene. There was no difference in the antioxidant action of the extracts by the DPV assay, since AM was highlighted by the ABTS and DPPH assays. Regarding the TEAC value, the best result was obtained by the DPV assay. AQ presented higher phenolic content and ALC presented higher carotenoid content. Comparing the pequi extract with extracts of nasturtium, loquat and physalis, it was observed a higher antioxidant capacity for physalis, expressed by the electrochemical index (EI) and K, and for pequi and capuchinha by the ABTS and DPPH assays. The pequi pulp showed antioxidant capacity compared to the standard antioxidant compounds evaluated. It was concluded that the voltammetric protocol proved to be an appropriate alternative methodology to express the antioxidant capacity of pequi pulp, mainly because it provides important information of the redox process, and it can also be applied to other food matrices.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O processo de oxidação no organismo humano é fundamental para produção de energia via mecanismo aeróbico de respiração. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o oxigênio molecular ( $O_2$ ) sofre redução tetravalente, com ganho de quatro elétrons, resultando na formação de  $H_2O$ , como descrito nas equações 1 a 5. Durante este processo, há formação de espécies reativas, sendo estas radicais livres, como o radical hidroxil ( $\cdot OH$ ) e o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), ou não radicais, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Babior, 1997; Pisoschi; Pop, 2015).



Quando em excesso, as espécies reativas podem ser associadas a inúmeros processos fisiopatológicos, desencadeados pelo estresse oxidativo. A fim de evitar este desequilíbrio, o organismo utiliza-se do sistema de defesa antioxidante (Egea *et al.*, 2017).

Os antioxidantes são definidos quimicamente como um grupo de compostos que promovem estabilização e, ou inibição de espécies reativas, geralmente, por processos redox (Apak *et al.*, 2016a). Sendo assim, os antioxidantes atuam como agentes redutores prevenindo danos causados pela oxidação de importantes biomoléculas, como lipídios, proteínas, ácidos nucleicos, dentre outras.

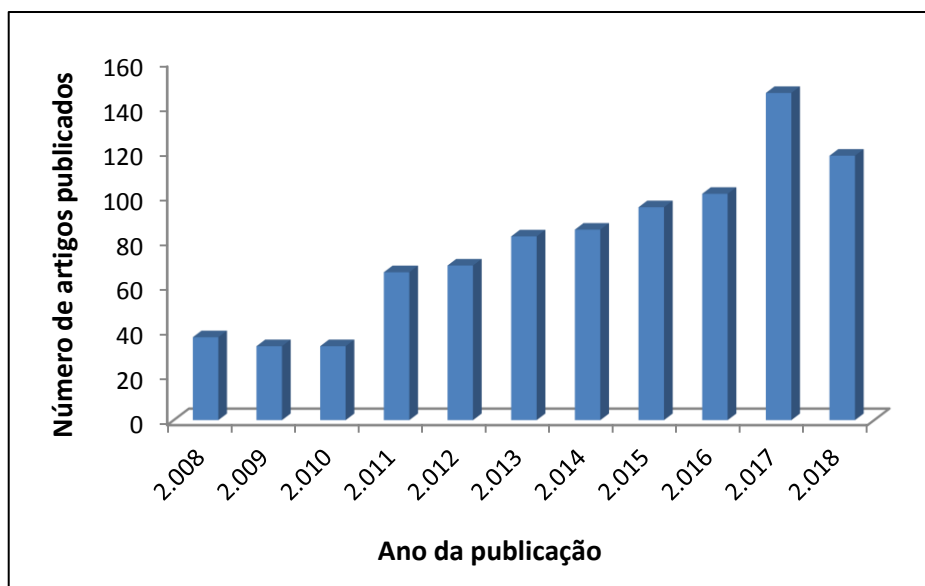
Diante dos benefícios atribuídos aos antioxidantes, a realização de pesquisas para melhor elucidar suas propriedades tem despertado interesse entre os cientistas de alimentos. Em um levantamento de publicações dos últimos dez anos, na base de dados Science Direct (2018), foram descritos 66.003 e 125.850 artigos (de pesquisa e revisão), respectivamente, para os termos de busca “antioxidant and activity” e “antioxidant and capacity”.

Diversas metodologias são empregadas para avaliar a potencialidade antioxidante dos alimentos, sendo as técnicas espectrofotométricas as mais utilizadas. No entanto, essa determinação apresenta limitações (Apak *et al.*, 2016a,b), sobretudo para correlação dos dados obtidos entre diferentes técnicas. De fato, cada método possui suas próprias

características, como por exemplo, mecanismo de reação; tipos de substratos de oxidação; meio reacional (básico, ácido ou neutro); agente oxidante (composto prova da reação); expressão dos resultados, dentre outras (Ferreira, 2009; Shahidi; Zhong, 2015).

Assim, novos protocolos têm sido desenvolvidos e adaptados, visando a padronização de uma metodologia simples, rápida e eficaz, que apresente resultados representativos e reprodutíveis para diversas amostras, com destaque para as técnicas eletroquímicas voltamétricas.

A utilização dessas técnicas é uma alternativa para determinação da capacidade antioxidante total, pois se baseiam em processos redox, geralmente envolvidos nos mecanismos de ação antioxidante; possibilitam análise direta em meios complexos; permitem maior padronização da metodologia, e informações qualitativas e quantitativas sobre o composto de interesse, como exemplos, valor do potencial de pico e intensidade da corrente de pico, respectivamente. Nota-se uma tendência crescente nos últimos anos, pela utilização de métodos voltamétricos para determinação da capacidade antioxidante, como pode ser observado na Figura 1.



**Figura 1.** Relatório de artigos publicados referentes aos termos de busca “antioxidant and capacity and voltammetry”, no período de 2008 a julho de 2018.

Base de dados: Science Direct, 2018.

Diversas pesquisas têm utilizado métodos voltamétricos para avaliação da capacidade antioxidante de alimentos (Cruz *et al.*, 2016; Macêdo *et al.*; 2017; Jara-Palacios

*et al.*, 2017; Peixoto *et al.*, 2017; Lugonja *et al.*, 2018). No entanto, não foi encontrado até o momento, nenhum estudo desenvolvido com esta finalidade para polpa de pequi.

O pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) é um fruto nativo do Cerrado brasileiro, com grande importância socioeconômica para a população local (Leão *et al.*, 2017), sendo um dos principais frutos do bioma Cerrado, tanto por suas características sensoriais, pelo sabor e aroma característicos acentuados, quanto por seu valor nutricional.

O fruto é explorado economicamente pela agricultura regional, sendo destinado ao consumo *in natura*, para extração de óleo, preparo de conserva, licor, suco, sorvete, geleia, pratos típicos tradicionais, dentre outros (Machado; Mello; Hubinger, 2013). Além de contribuir para a renda familiar, constitui uma importante fonte de nutrientes na alimentação das populações regionais, sobretudo, por conter polpa com alto teor de lipídios, vitaminas, compostos fenólicos e carotenoides (Azevedo-Meleiro; Rodriguez-Amaya, 2004; Magalhães; Cardoso; Reis, 2018; Nascimento *et al.*, 2017).

Assim, diante da importância de se estudar as técnicas voltamétricas para análises da ação antioxidante, esta pesquisa objetivou o desenvolvimento de um protocolo experimental, baseado em voltametria, para determinar a capacidade antioxidante de polpa de pequi. Este fruto foi escolhido como matriz de interesse, por apresentar grande potencial antioxidante, ainda não avaliado por ensaios voltamétricos.

Neste sentido, a tese foi estruturada nos seguintes tópicos: 1. Introdução geral; 2. Objetivos; Capítulo 1 (Revisão de literatura); Capítulo 2 (Desenvolvimento do protocolo voltamétrico); Capítulos 3, 4 e 5 (estruturados em formato de artigos) e 3. Conclusão geral. Os Capítulos 3, 4 e 5 abordaram a aplicação do protocolo voltamétrico desenvolvido, respectivamente, para: determinar a capacidade antioxidante da polpa de pequi; avaliar a influência de processos de extração na ação antioxidante de extratos de pequi, e comparar a capacidade antioxidante de pequi com outros vegetais exóticos (capuchinha, nêspera e *physalis*).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Desenvolver e aplicar um protocolo experimental, baseado em voltametria para determinar a capacidade antioxidante de polpa de pequi.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Desenvolver um protocolo voltamétrico, baseado na eletrorredução do oxigênio, para avaliação da capacidade antioxidante total;
- Aplicar o ensaio voltamétrico desenvolvido para avaliar a capacidade antioxidante de polpa de pequi;
- Avaliar a influência do processo de extração na capacidade antioxidante de extratos da polpa de pequi,
- Realizar um estudo comparativo da capacidade antioxidante da polpa de pequi com outros vegetais exóticos: capuchinha, nêspera e *physalis*.

# **CAPÍTULO 1**

---

## **Revisão de Literatura**

---

## **Antioxidantes: conceito e importância**

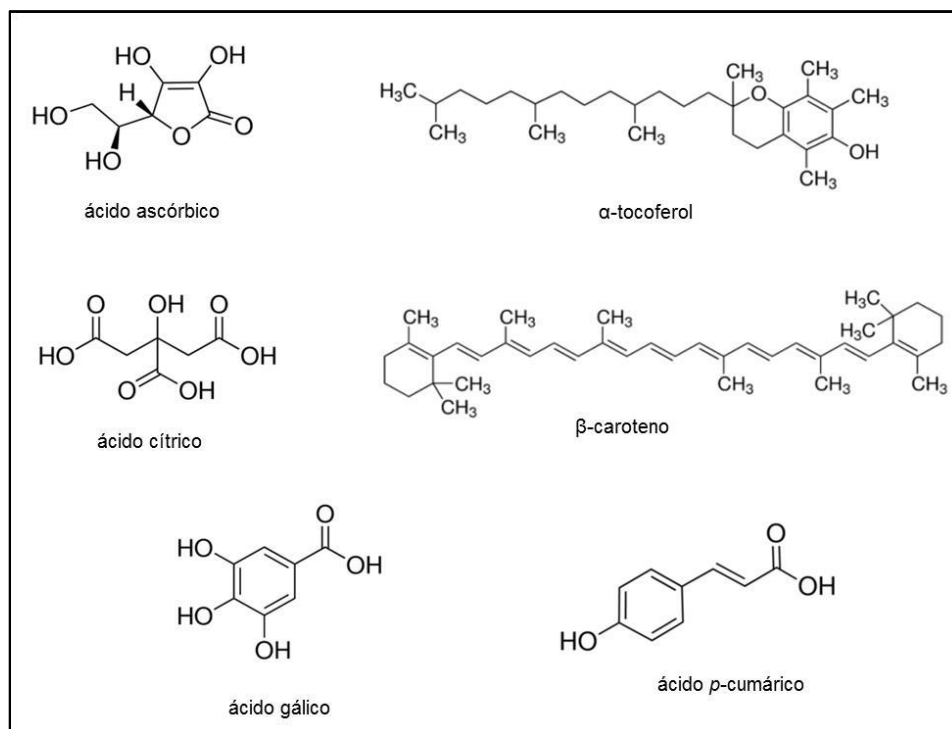
Antioxidantes são compostos, presentes naturalmente em plantas, animais e microrganismos, ou podem ser sintetizados por reações químicas (Shahidi; Zhong, 2015), que previnem a oxidação de outros compostos (Embuscado; 2015), pela estabilização e, ou inibição de espécies reativas, como radicais livres. Geralmente isso ocorre por meio de mecanismos que envolvem transferência de elétron (SET: single electron transfer) e, ou hidrogênio (HAT: hydrogen atom transfer); pela formação de quelatos com íons metálicos e pela associação com outros antioxidantes (Apak *et al.*, 2016a). Assim, exercem um papel fundamental no organismo, promovendo a manutenção do processo oxidativo dentro dos limites fisiológicos e passíveis de regulação, evitando o estresse oxidativo (Barbosa *et al.*, 2010).

O estresse oxidativo ocorre pelo desequilíbrio entre as espécies oxidantes e o sistema de defesa antioxidante, podendo desencadear danos celulares responsáveis por cânceres, diabetes, doenças cardiovasculares e renais, dentre outras (Pisoschi; Pop, 2015).

Nos alimentos, os antioxidantes são indispensáveis, pois previnem a deterioração causada por processos oxidativos, prolongando a vida-de-prateleira dos produtos, sem efeito adverso sobre suas qualidades sensoriais ou nutricionais (Araújo, 2011; Shahidi; Ambigaipalan, 2015).

O efeito protetor dos antioxidantes é influenciado por diversos fatores: estrutura química, concentração, solubilidade, localização no sistema (por exemplo, distribuição em interface), temperatura, pH e estado físico do meio, assim como a presença de pró-oxidantes e agentes sinérgicos (Shahidi; Zhong, 2015).

A estrutura química de um antioxidante determina sua reatividade com outras espécies químicas e, conseqüentemente, sua ação antioxidante. Entre compostos com a mesma estrutura-base, o número de grupos hidroxila (OH) é o fator determinante para a capacidade antioxidante, no entanto, ao se comparar compostos pertencentes a diferentes subclasses, outros fatores também devem ser avaliados (Firuzi *et al.*, 2005). Na Figura 1, estão exemplificadas diferentes estruturas moleculares de compostos com propriedades antioxidantes.



**Figura 1.** Estruturas químicas de compostos com propriedades antioxidantes.

A defesa antioxidante no organismo ocorre por meio da ação de vias enzimáticas (como exemplo, glutatona peroxidase, superóxido dismutase e catalase), vias não enzimáticas (como exemplo, glutatona e ácido úrico) e de compostos adquiridos pela alimentação (como exemplo, carotenoides, selênio, compostos fenólicos e vitaminas C e E) (Swapna *et al.*, 2014).

Os antioxidantes obtidos na dieta alimentar exercem um importante papel na manutenção da saúde, pois atuam prevenindo a oxidação de importantes biomoléculas, como proteínas, ácido desoxirribonucleico (DNA), lipídios e outros componentes celulares, que podem não ser totalmente protegidos pelo sistema antioxidante endógeno (Araújo, 2011; Carocho *et al.*, 2018; Pompella, 1997). Neste sentido, é crescente o estudo de compostos com propriedades antioxidantes, sobretudo, provenientes de frutas e hortaliças.

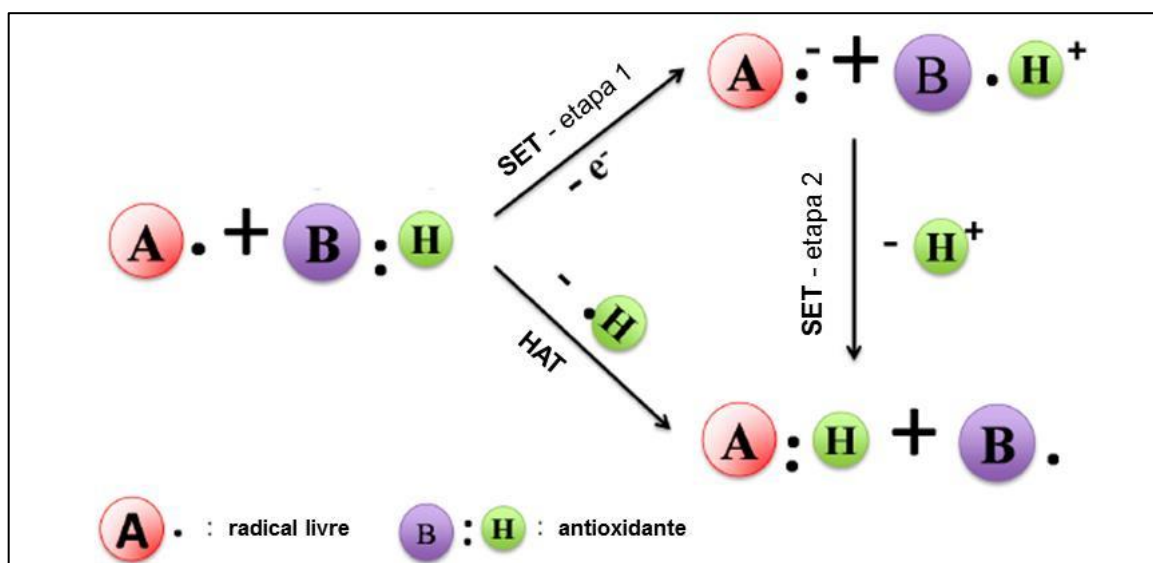
### **Determinação da capacidade antioxidante de alimentos**

Os termos “atividade” e “capacidade antioxidante” são frequentemente utilizados nos artigos científicos como sinônimos. Embora não seja feita distinção entre estes termos para indicar a ação antioxidante de um alimento, muitos pesquisadores consideram que “capacidade antioxidante total” seja a nomenclatura mais adequada, já que, a capacidade é indicativa da ação conjunta de todos os compostos antioxidantes presentes na matriz

alimentar e não de constituintes antioxidantes individuais (Apak *et al.*, 2016a; Ferreira, 2009).

Este parâmetro não é obrigatório nas rotulagens dos alimentos; no entanto, consiste num índice de grande importância para avaliação da qualidade, pois indica o potencial de uma matriz alimentar em promover a estabilização de espécies reativas e assim, prevenir a oxidação de importantes biomoléculas. A não obrigatoriedade de tal índice nutricional, pode estar associada à falta de métodos de quantificação padronizados para sua determinação (Apak *et al.*, 2016a).

Várias metodologias espectrofotométricas são empregadas para avaliar a capacidade antioxidante dos alimentos, como por exemplo, os ensaios DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) e FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) (Oroian; Escriche, 2015). Geralmente o mecanismo de reação envolvido entre o radical e o antioxidante, baseia-se na transferência de elétron (SET) e, ou de hidrogênio (HAT), conforme Figura 2.

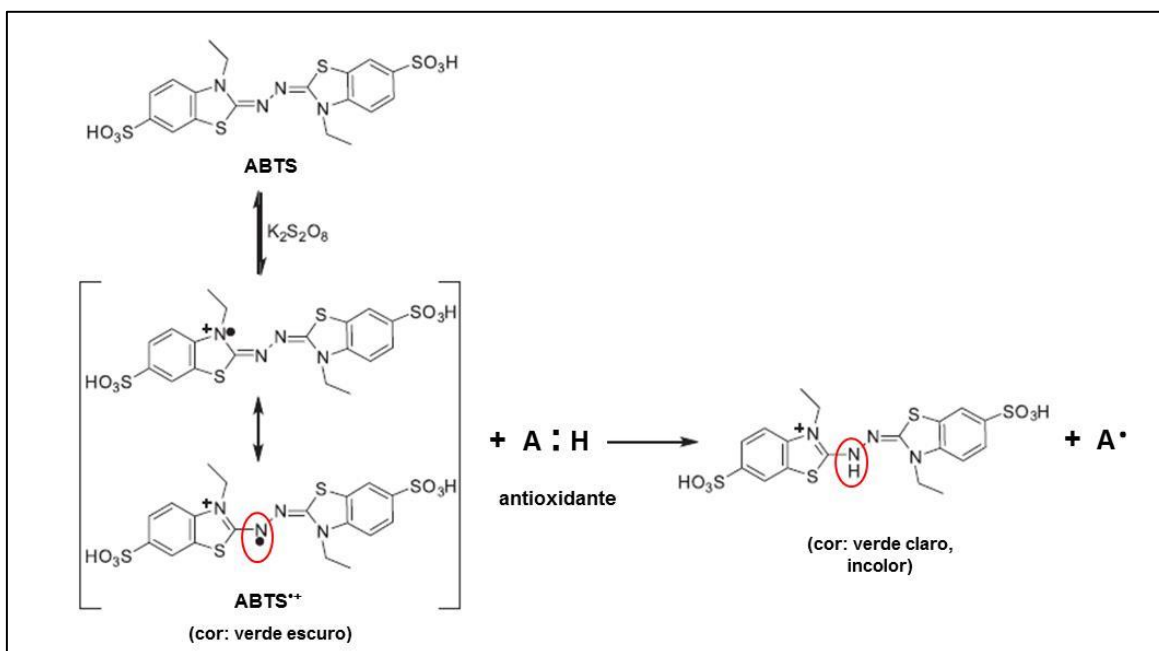


**Figura 2.** Mecanismo de reação do antioxidante com o radical livre. SET: transferência de elétron. HAT: transferência de hidrogênio.

Fonte: Adaptado de Liang; Kitts (2014).

Dentre os métodos espectrofotométricos, os ensaios ABTS e DPPH são os mais utilizados (Olszowy; Dawidowicz, 2018). O ensaio ABTS, também conhecido como TEAC (Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox), baseia-se no monitoramento do decréscimo da absorvância a 734-744 nm, devido à descoloração do cátion radical  $ABTS^{+·}$

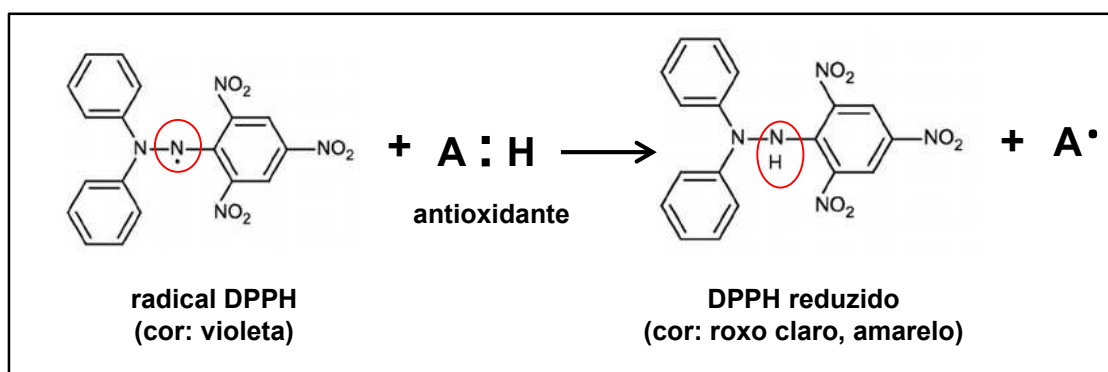
ao ser reduzido (estabilizado) por compostos antioxidantes (Cömert; Gökmen, 2018; Re *et al.*, 1999), conforme pode ser mostrado na Figura 3. Quanto maior a capacidade antioxidante do composto testado, maior será o decréscimo da absorbância.



**Figura 3.** Mecanismo de reação para formação do radical ABTS<sup>•+</sup> pelo persulfato de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) e sua estabilização pelo antioxidante.

Fonte: Adaptado de Oliveira *et al.* (2014).

O ensaio DPPH baseia-se na captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil por antioxidantes (Figura 4), produzindo um decréscimo da absorbância a 515-519 nm.



**Figure 4.** Mecanismo de reação do DPPH<sup>•</sup> com o composto antioxidante.

Fonte: Adaptado de Liang; Kitts (2014).

Este método tem por princípio a redução do radical DPPH<sup>•</sup> pela remoção de H<sup>•</sup> do antioxidante em estudo, promovendo diminuição da absorbância, proporcional à concentração e à ação antioxidante da amostra (Brand-Williams; Cuvelier; Berset, 1995).

Uma vantagem deste método em relação ao ABTS, é que o radical livre DPPH<sup>•</sup> é estável e encontra-se disponível comercialmente, não sendo necessária sua geração como ocorre com o radical ABTS<sup>•+</sup>, facilitando seu uso (Lima, 2008).

Os métodos colorimétricos apresentam algumas limitações (Apak *et al.*, 2016a,b), sobretudo para correlação dos dados obtidos entre diferentes técnicas. De fato, cada método possui suas próprias características, como exemplo, mecanismo de reação (SET e, ou HAT); tipos de substratos de oxidação; meio reacional (básico, ácido ou neutro); agente oxidante (composto prova da reação) e expressão dos resultados (Ferreira, 2009; Shahidi; Zhong, 2015).

É frequente encontrar resultados divergentes para uma mesma matriz alimentar avaliada. Portanto, a fim de minimizar as limitações existentes para correlação dos dados e evitar comparações inadequadas entre resultados obtidos por diferentes estudos, é crescente o interesse dos pesquisadores pelo desenvolvimento e adaptação de protocolos mais rápidos e eficientes, que possam ser aplicados diretamente no alimento e forneçam dados representativos e reprodutíveis (Alves *et al.*, 2010).

As diferenças existentes entre as espécies reativas e suas formas de atuação, tornam difícil o desenvolvimento de um método simples e universal para determinação da capacidade antioxidante total, de maneira precisa e quantitativa (Alves *et al.*, 2010). Assim, a utilização de técnicas eletroquímicas, surge como uma alternativa para esta análise.

Pelo fato dos processos que envolvem a formação e, ou estabilização de radicais livres estarem relacionados a reações redox (Halliwell, 2000), sugere-se que a aplicação das técnicas voltamétricas sejam apropriadas para a determinação da capacidade antioxidante em meios complexos, pois abrangem os processos químicos que envolvem transferência de elétrons entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície.

### **Técnicas voltamétricas**

A voltametria é uma técnica eletroanalítica e consiste basicamente na aplicação de um potencial a uma célula eletroquímica. Os métodos eletroanalíticos relacionam medidas de propriedades elétricas, como corrente, potencial e carga, com parâmetros químicos.

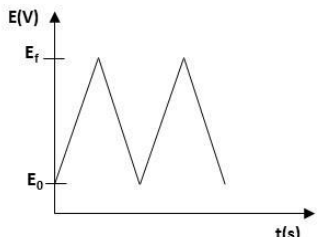
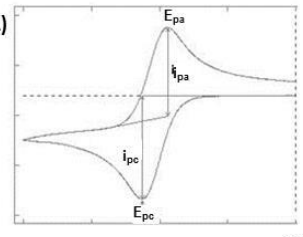
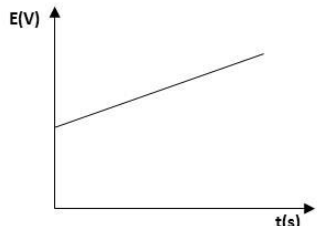
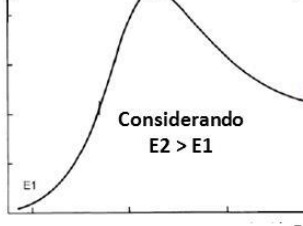
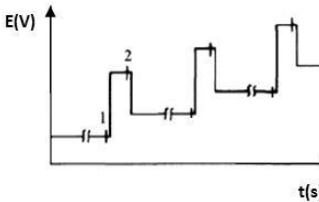
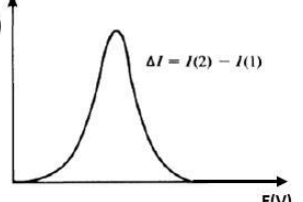
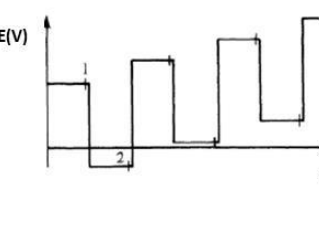
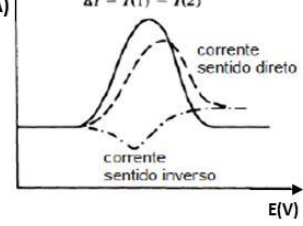
Baseiam-se nas características elétricas do analito presente em uma determinada amostra, para fornecer informações fundamentais, qualitativas ou quantitativas, sobre o composto de interesse (Galli *et al.*, 2006). Dentre estas informações, tem-se por exemplo, o potencial de pico, relacionado à tendência do analito em se oxidar ou reduzir em diferentes meios, e a intensidade da corrente de pico, relacionada à concentração do composto na solução.

As técnicas voltamétricas, em sistemas de três eletrodos, baseiam-se na medição da corrente elétrica ( $i$ ) que surge entre os eletrodos de trabalho e o auxiliar, mediante a aplicação de um potencial controlado ( $E$ ) entre os eletrodos de referência e de trabalho, de modo que apenas este último se polarize. A corrente elétrica resultante desta aplicação de potencial deve-se à transferência de elétrons durante o processo redox (reações de oxidação, no sentido crescente de aplicação do potencial, ou redução, sentido decrescente de aplicação do potencial) que ocorrem na superfície do eletrodo de trabalho devido à presença de espécies eletroativas em solução (Pacheco *et al.*, 2013).

De um modo geral, são utilizados eletrodos de trabalho, no qual se varia o potencial elétrico em relação ao eletrodo de referência, de potencial constante. Para que seja possível determinar um analito por voltametria, é desejável que o mesmo seja eletroativo, ou seja, que oxide ou reduza em uma faixa de potencial aplicado, na qual a transferência de elétrons seja favorável termodinamicamente ou cineticamente, criando-se um fluxo de elétrons (Bard; Faulkner, 2001; Pacheco *et al.*, 2013).

As informações qualitativas e quantitativas de um analito são obtidas por meio do voltamograma, gerado pelo registro da corrente em função do potencial controlado. A magnitude da corrente obtida pode ser relacionada com a quantidade de analito presente na interface do eletrodo e, conseqüentemente, na célula eletroquímica (Bard; Faulkner, 2001).

As técnicas voltamétricas são classificadas em: voltametria cíclica (Cyclic Voltammetry - CV), voltametria linear (Linear Sweep Voltammetry - LSV), voltametria de onda quadrada (Square Wave Voltammetry - SWV) e voltametria de pulso diferencial (Differential Pulse Voltammetry - DPV). Estas se diferem, basicamente, pela forma como o potencial é aplicado ao eletrodo de trabalho e pela forma como o sinal analítico (corrente) é obtido (Figura 5), o que gera diferentes características às técnicas, tais como, limite de detecção e velocidade da análise (Garrido *et al.*, 2004).

Tipo de técnica	Forma de aplicação do E (V)	Corrente resultante
<b>Voltametria cíclica (CV)</b>		
<b>Voltametria de varredura linear (LSV)</b>		
<b>Voltametria de pulso diferencial (DPV)</b>		
<b>Voltametria de onda quadrada (SWV)</b>		

**Figura 5.** Classificação das técnicas voltamétricas de acordo com a forma de aplicação do potencial.

Fonte: Adaptado de Pacheco *et al.* (2013).

A voltametria cíclica é a técnica voltamétrica mais utilizada para se obter informações qualitativas, sendo geralmente a primeira análise realizada em um estudo eletroquímico. Com estas análises, obtêm-se a corrente de pico anódico ( $I_{pa}$ ), corrente de pico catódico ( $I_{pc}$ ), potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ) (relativo ao processo de oxidação) e potencial de pico catódico ( $E_{pc}$ ) (relativo ao processo de redução).

Em geral, essa técnica possibilita rápida determinação do potencial redox da espécie eletroativa em estudo, permitindo a obtenção de informações termodinâmicas e cinéticas de transferência de elétrons do processo redox e informações sobre processos de adsorção do analito na superfície do eletrodo de trabalho (Bard; Faulkner, 2001; Skoog *et al.*, 2006).

As informações termodinâmicas e cinéticas obtidas pela técnica voltamétrica, podem ser entendidas e demonstradas (por meio de literatura relacionada a conhecimentos de físico-química e eletroquímica: Atkins; De Paula, 2008; Bard; Faulkner, 2001; Castellan, 1996) a partir da junção da Primeira Lei da Termodinâmica (equação 1), referente à conservação de energia em um sistema, com a Segunda Lei da Termodinâmica, relativa à entropia (equação 2), sendo possível obter a equação 3:

$$\partial U = \partial Q - \partial W \quad (1)$$

$$\partial S \geq \frac{\partial Q}{T} \quad (2)$$

$$T\partial S \geq \partial U + \partial W \quad (3)$$

onde  $\partial U$ ,  $\partial Q$ ,  $\partial W$ ,  $\partial S$  e  $T$  referem-se à energia, calor, trabalho, entropia e temperatura, respectivamente.

Considerando que o trabalho total ( $\partial W$ ), pode ser descrito como tendo uma componente elétrica ( $\partial W_{ele}$ ) e uma componente mecânica ( $P\partial V$ ), equação 4, é possível obter pela substituição da equação 4 na equação 3, a equação 5:

$$\partial W = P\partial V + \partial W_{ele} \quad (4)$$

$$T\partial S - \partial U - P\partial V - \partial W_{ele} \geq 0 \quad (5)$$

Assumindo temperatura e pressão constantes, pode-se descrever a equação 5 na forma representada pela equação 6. Desta equação, é possível descrever a equação 7, pois o termo entre parênteses na equação 6 corresponde à definição matemática da energia livre de Gibbs ( $G$ ):

$$\partial(U + PV - TS) \leq -\partial W_{ele} \quad (6)$$

$$\partial G \leq -\partial W_{ele} \quad (7)$$

Uma vez que  $W_{ele}$  pode ser descrito como o produto da constante de Faraday ( $F$ ), pelo número de partículas carregadas ( $n$ ) e pelo potencial elétrico envolvido ( $E$ ), obtém-se em equilíbrio, a equação 8, que pode ser expandida considerando o fato de  $\Delta G$  variar com a composição do meio ( $Q$ ), sendo essa dependência representada na equação 9:

$$\Delta G = -nFE \quad (8)$$

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln Q \quad (9)$$

Pela substituição da equação 8 na equação 9, seguido da divisão de todos os termos por  $(-nF)$ , é possível obter a equação de Nernst (equação 10):

$$E = E^\circ - \frac{RT}{nF} \ln Q \quad (10)$$

onde,  $E$  e  $E^\circ$ , referem-se ao potencial real em condições não padrão e ao potencial padrão tabelado, respectivamente,  $R$  à constante universal dos gases e  $T$  à temperatura absoluta. Assim, pela equação 10, é possível calcular valores de constantes de equilíbrio ( $Q$ ). Em termos práticos, a voltametria, por meio da medida do potencial elétrico de um sistema redox, permite calcular valores de constantes de equilíbrio da ordem de  $10^{-17}$ , ou seja, constantes que não são possíveis serem estimadas por métodos convencionais.

Por meio da relação entre  $\Delta G$  e  $\Delta H$  (equação 11) e da relação da variação de  $\Delta G$  com o tempo e variação da entropia do sistema (equação 12), é possível, por meio de medidas voltamétricas, obter parâmetros termodinâmicos, como variação de entropia e entalpia do sistema em estudo:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (11)$$

$$\left(\frac{\partial \Delta G}{\partial T}\right)_p = -\Delta S \quad (12)$$

Além dos parâmetros termodinâmicos, pode-se estimar experimentalmente, parâmetros cinéticos, por meio da teoria de Butler-Volmer, sendo possível calcular a cinética do eletrodo (equação 13 para processos de redução e equação 14 para processos de oxidação) a partir das medidas voltamétricas (diferença de potencial dada pela expressão  $(\phi_M - \phi_S)$ ):

$$k_c \propto \exp \left[ \frac{-\alpha F (\phi_M - \phi_S)}{RT} \right] \quad (13)$$

$$k_c \propto \exp \left[ \frac{-\beta F(\Phi_M - \Phi_S)}{RT} \right] \quad (14)$$

A determinação dos coeficientes de transferência de carga  $\alpha$  (para processos de redução) e  $\beta$  (para processos de oxidação) pode ser dada pela teoria de Tafel. Para um processo eletródico  $A_{(aq)} + e^- \rightleftharpoons B_{(aq)}$ , pode-se afirmar as equações 15 e 16:

$$\ln|I_{red}| = -\frac{\alpha FE}{RT} + constante \quad (15)$$

$$\ln|I_{oxi}| = \frac{\beta FE}{RT} + constante \quad (16)$$

onde:  $I_{red}$  e  $I_{oxi}$ , correspondem à intensidade de corrente de redução e oxidação, respectivamente.

Na voltametria de varredura linear, também conhecida como varredura de potencial linear, o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho varia linearmente com o tempo. Assim como a voltametria cíclica, não é muito aplicada quantitativamente devido a sua baixa sensibilidade, uma vez que não se tem boa discriminação entre corrente capacitiva (indesejável) e faradáica (desejável), já que o potencial aplicado gera uma corrente de forma direta (Skoog *et al.*, 2006).

Na voltametria de pulso são realizadas duas leituras da corrente e a partir da diferença entre elas, é possível fazer a correção da corrente capacitiva, o que permite reduzir os limites de detecção das medidas voltamétricas (Lourenção, 2009).

Na técnica de onda quadrada, a corrente é amostrada ao final do pulso direto, quando a direção do pulso é igual à direção da varredura, e outra ao final do pulso reverso, onde a direção do pulso é contrária à direção da varredura. Assim como na voltametria de pulso diferencial, esta dupla amostragem da corrente garante uma minimização da contribuição da corrente capacitiva sobre a corrente total medida (Pacheco *et al.*, 2013).

Estas técnicas, quando comparadas a técnicas tradicionais, apresentam como principal vantagem a possibilidade de análise direta na amostra, sem necessidade de etapa de separação ou pré-tratamento, além da determinação em materiais coloridos ou com partículas sólidas dispersas (Galli *et al.*, 2006).

Como vantagens, também se pode mencionar: baixo custo operacional e instrumental; rapidez na obtenção de dados; sensibilidade; portabilidade; utilização de menor quantidade de solventes orgânicos, conseqüentemente, geração de menor volume de resíduos, além de possibilitarem maior padronização da metodologia (Arteaga *et al.*, 2012; Reis *et al.*, 2009).

As técnicas voltamétricas podem ser aplicadas para avaliação da ação antioxidante, baseando-se no princípio de que os compostos antioxidantes atuam como agentes redutores e, em soluções, tendem a oxidar-se facilmente em eletrodos inertes (Dar *et al.*, 2017). A determinação da capacidade antioxidante pode ser realizada de forma direta ou indireta.

O método direto consiste na avaliação qualitativa do agente antioxidante, e baseia-se no princípio de que um bom antioxidante é aquele que se oxida facilmente. Baseando-se nisso, o potencial de meia onda ( $E_{1/2}$ ) ou o potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ) pode ser utilizado como um parâmetro para medir a ação antioxidante. A maior parte das espécies reativas é estabilizada pelo processo de oxidação-redução, em que o agente antioxidante é oxidado e, o agente oxidante (espécies reativas) é reduzido. Portanto, a maioria dos ensaios para determinação da capacidade antioxidante total *in vitro* baseia-se na avaliação do poder redutor (Halliwell, 2000).

Quanto maior o valor de  $E_{pa}$ , menor é o poder doador de elétron da espécie em estudo e, portanto, teoricamente, menor seu poder antioxidante (Alves *et al.*, 2010; Arteaga *et al.*, 2012).

No método indireto a ação antioxidante é determinada por meio da avaliação do decréscimo de corrente catódica ( $I_{pc}$ ) do agente oxidante, em função da adição de um antioxidante, ou seja, o método avalia o quanto o agente antioxidante é capaz de reduzir o agente oxidante.

Pesquisas têm utilizado estes métodos para determinação da capacidade antioxidante de alimentos e bebidas (Ferreira *et al.*, 2015; Jara-Palacios *et al.*, 2017; Lugonja *et al.*, 2018; Macêdo *et al.*, 2017). De fato, diante das vantagens apresentadas pelas técnicas voltamétricas, estas se mostram como uma alternativa para avaliação da capacidade antioxidante total de matrizes alimentares de interesse.

### **Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)**

O pequi é uma planta perene, arbórea, que pode ser classificada como frutífera ou oleaginosa, em razão das suas características e formas de utilização. É nativa do

Cerrado brasileiro, pertencente à família *Caryocaraceae* e ao gênero *Caryocar*, sendo a espécie *Caryocar brasiliense* Camb. a de maior incidência no Brasil (Oliveira *et al.*, 2008).

O fruto de pequi é cultivado principalmente nas regiões sudeste, nordeste e central do Brasil (Leão *et al.*, 2017), sobretudo nos estados de Minas Gerais, Goiás, Ceará, Pará, Mato Grosso, São Paulo, Paraná, Piauí, Maranhão e no Distrito Federal. O pequi é também conhecido popularmente como piqui, pequiá, amêndoa de espinho, grão de cavalo ou amêndoa do Brasil, de acordo com a região de ocorrência (Lima *et al.*, 2007). É um dos frutos mais comercializados do bioma Cerrado, tendo produção em 2016, estimada em 17.305 toneladas (IBGE, 2016).

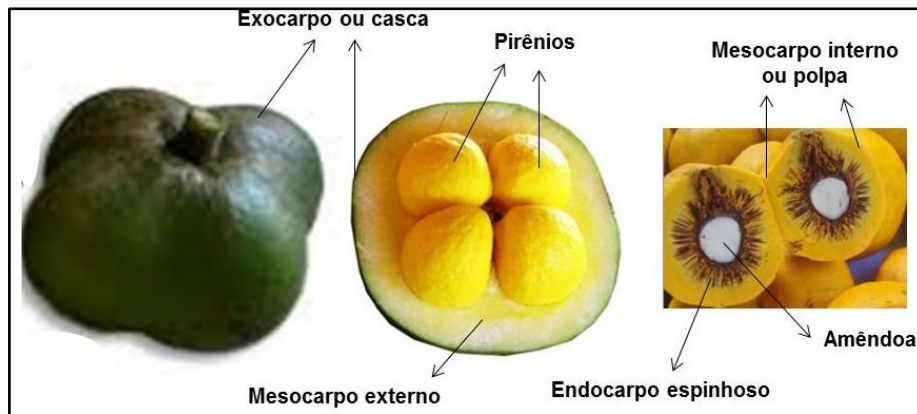
O pequi é explorado tipicamente através do extrativismo, sendo considerada uma prática ambientalmente sustentável, de grande importância socioeconômica para a população local (Cândido; Malafaia; Rezende, 2012), contribuindo com a renda familiar e permanência dos agricultores nas regiões produtoras.

O pequizeiro atinge de 7 a 12 m de altura. A época de floração e frutificação varia entre as regiões, principalmente devido a diferenças de temperatura, umidade e período de chuvas. Em geral, os frutos amadurecem de outubro a fevereiro, sendo o pico da safra entre os meses de dezembro e janeiro (Oliveira; Scariot, 2010).

No norte de Minas Gerais, uma das principais regiões produtoras do país, a colheita do pequi começa em novembro ou dezembro e dura até fevereiro ou março, dependendo da região, com efetivamente três meses de colheita. Os frutos são coletados geralmente no solo, assim que amadurecem e caem da planta, quando atingiram seu pleno desenvolvimento (Oliveira *et al.*, 2017).

O fruto pesa entre 30 a 400 g, com comprimento variando de 6 a 14 cm e diâmetro de 6 a 10 cm (Oliveira; Scariot, 2010). É importante destacar que estes dados podem variar de acordo com a origem, variedade, condições climáticas, dentre outros fatores. Em estudo realizado por Alves *et al.* (2014), foram encontrados frutos de pequi com massa variando entre 59,2 g (provenientes de Goiás) e 437,0 g (provenientes de Minas Gerais).

O fruto é constituído por exocarpo (de coloração marrom esverdeada), mesocarpo externo (formado por uma polpa branca) e pirênios ou caroços (formados por mesocarpo interno ou polpa comestível, endocarpo espinhoso e amêndoa ou semente) (Figura 6).



**Figura 6.** Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.).

O pequi apresenta elevado potencial para a alimentação humana, tanto por sua elevada ocorrência, como por suas características sensoriais e nutricionais (Gonçalves *et al.*, 2011). É utilizado predominantemente pela população local, para consumo *in natura*, em pratos típicos, e também comercializado em conservas, para extração da amêndoa, óleo, sorvetes, geleias, farinha, dentre outros, além da sua aplicação na indústria de cosméticos e farmacêutica. É pouco difundido, por ser altamente perecível e conter muitos espinhos próximos à polpa, que dificultam sua manipulação e limitam seu uso (Machado; Mello; Hubinger, 2013).

Dentre as partes do fruto, a polpa é a mais utilizada na alimentação humana, apresentando cor intensa que varia de amarelo claro a laranja escuro. Diante da sazonalidade do suprimento dos frutos, o pequi é comumente congelado para armazenamento, de modo que pode ser comercializado no período de entressafra (Oliveira *et al.*, 2017).

A polpa de pequi constitui uma importante fonte de nutrientes, com destaque para o conteúdo de lipídios e compostos bioativos, como vitaminas C e E, compostos fenólicos e carotenoides (Quadros 1 e 2). Dentre os carotenoides predominantes, têm-se violaxantina, luteína e zeaxantina (Azevedo-Meleiro; Rodriguez-Amaya, 2004).

**Quadro 1.** Composição química da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) em relação aos principais micro e macronutrientes

Nutriente		Valor obtido	Parte do fruto analisada	Origem	Referência
Minerais (mg 100 g <sup>-1</sup> )	P	30	pirênio cozido	Bocaiúva-MG	Gonçalves <i>et al.</i> , 2011
	S	60			
	Mn	0,40			
	Mg	40			
	Ca	90			
	K	469,57 ± 8,59	polpa	Campo Azul, Japonvar e Monte Alegre-MG	Alves <i>et al.</i> , 2014
	Na	4,02 ± 0,71			
	Fe	1,40 ± 0,59			
	Zn	2,81 ± 0,70			
	P	136,62 ± 2,13			
	Mg	84,29 ± 2,94			
	Ca	58,83 ± 2,06			
Vitamina A (U.I. · 1000)		112 - 161*	polpa congelada	Norte de Minas Gerais	Oliveira <i>et al.</i> , 2006
Vitamina C (mg 100 g <sup>-1</sup> )		54,73 ± 0,51 (base seca)	polpa (lascas frescas)	Norte de Minas Gerais	Mendonça <i>et al.</i> , 2017
		6,63 ± 1,02	polpa congelada	Montes Claros-MG	Machado <i>et al.</i> , 2013
		14,33 ± 0,32	polpa cozida	Curvelo-MG	Cardoso <i>et al.</i> , 2013
Vitamina E (α-tocoferol) (μg 100 g <sup>-1</sup> )		58,77 ± 12,70			
Proteínas (g 100g <sup>-1</sup> )		3,73 ± 0,01	polpa	Campo Azul, Japonvar e Monte Alegre-MG	Alves <i>et al.</i> , 2014
		1,35 ± 0,01	polpa	Minas Gerais	Magalhães <i>et al.</i> , 2018
Fibras (g 100g <sup>-1</sup> )		7,42 ± 0,03	polpa cozida	Curvelo-MG	Cardoso <i>et al.</i> , 2013
		9,9 ± 0,2			
Carboidratos (g 100g <sup>-1</sup> )		2,7 ± 0,4	polpa	Minas Gerais	Magalhães <i>et al.</i> , 2018
		2,78 ± 0,02			
Lipídios (g 100g <sup>-1</sup> )		16,67 ± 0,82	polpa cozida	Curvelo-MG	Cardoso <i>et al.</i> , 2013
		33,1 ± 0,3			

\*Faixa dos valores obtidos na análise de frutos provenientes de diferentes modos de coleta.

**Quadro 2.** Composição química da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) em relação a carotenoides e principais compostos fenólicos

Nutriente		Valor obtido	Parte do fruto analisada	Origem	Referência	
Carotenoides (mg 100 g <sup>-1</sup> )	β-caroteno	3,08	polpa crua	Bocaiúva-MG	Gonçalves <i>et al.</i> , 2011	
		4,24 ± 1,26	polpa cozida	Curvelo-MG	Cardoso <i>et al.</i> , 2013	
	β-criptoxantina	3,86 ± 0,97				
	Licopeno	1,32 - 1,74*	polpa congelada	Norte de Minas Gerais	Oliveira <i>et al.</i> , 2006	
Carotenoides totais (mg 100 g <sup>-1</sup> )		13,06	polpa crua	Bocaiúva-MG	Gonçalves <i>et al.</i> , 2011	
		10,64 ± 0,29	polpa congelada	Montes Claros-MG	Machado <i>et al.</i> , 2013	
		8,10 ± 2,23	polpa cozida	Curvelo-MG	Cardoso <i>et al.</i> , 2013	
Compostos fenólicos	(μg mL <sup>-1</sup> )	ácido gálico	342,38 ± 1,50	extrato aquoso da polpa	Minas Gerais	Magalhães <i>et al.</i> , 2018
		ácido <i>p</i> -cumárico	8,43 ± 0,31			
		ácido elágico	175,55 ± 0,65			
	(μg g <sup>-1</sup> )	ácido gálico	9,56 ± 0,1		Tanque do Piauí-PI	Lima, 2008
		ácido <i>p</i> -cumárico	27,43 ± 0,87			
		ácido elágico	32,2 ± 0,91			

\*Faixa dos valores obtidos na análise de frutos provenientes de diferentes modos de coleta.

É importante observar nos Quadros 1 e 2, que os dados para composição química da polpa de pequi, obtidos pelos diversos estudos citados, foram descritos em relação à polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) em diferentes condições de preparo da amostra (polpa cozida, congelada, lascas frescas, extrato aquoso) e origem. Vale ressaltar a importância desta descrição em tabelas e quadros com a finalidade de comparação entre diferentes pesquisas, já que a procedência da matéria-prima, etapas de processamento e conservação do fruto podem influenciar na sua composição química, sobretudo em relação aos compostos bioativos. Esses fatores, dentre outros, poderiam justificar as variações encontradas para a composição química da polpa de pequi, descrita nos Quadros anteriores.

Devido sua composição química (Quadros 1 e 2), sobretudo pelo conteúdo de carotenoides, ácido ascórbico e compostos fenólicos, observa-se que o pequi é um fruto com relevante potencial antioxidante (Machado; Mello; Hubinger, 2013; 2015; Magalhães; Cardoso; Reis, 2018; Mendonça *et al.* 2017; Nascimento *et al.*, 2017), despertando interesse para diversas pesquisas.

No Quadro 3, estão descritos dados referentes à avaliação da capacidade antioxidante de extratos da polpa de pequi, obtidos por frutos de diferentes localidades.

Além da ação antioxidante da polpa de pequi expressa no Quadro 3, observa-se uma falta de padronização na expressão dos resultados, o que inviabiliza a comparação de dados provenientes de diferentes estudos, confirmando o que já foi descrito nos itens anteriores, em relação à limitação das técnicas tradicionais para determinação da capacidade antioxidante. Isso reforça a importância de pesquisas que objetivam o desenvolvimento de uma metodologia alternativa, que possibilite maior padronização da análise e expressão dos resultados, conforme proposto no presente estudo.

**Quadro 3.** Capacidade antioxidante da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) determinada em diferentes estudos

Parte do fruto analisada	Origem	Valor obtido	Método/Expressão do resultado	Referência
Polpa liofilizada (extrato obtido da mistura de diferentes solventes)	São Miguel do Araguaia-GO	12,0 ± 0,0	DPPH (μmol TE g <sup>-1</sup> )*	Nascimento <i>et al.</i> , 2017
Polpa (extrato alcoólico)	Ibiaí-MG	202,00 ± 5,15	DPPH (EC <sub>50</sub> em μg mL <sup>-1</sup> extrato)**	Ribeiro, 2011
	Japonvar-MG	194,30 ± 2,68		
	Tanque do Piauí-PI	820,7 ± 8,7		ABTS (mM de trolox g <sup>-1</sup> polpa)***
		0,85 ± 0,11		
	Montes Claros-MG	21,90 ± 0,54	DPPH (% inibição)	Machado <i>et al.</i> , 2013
Polpa (extrato aquoso)	Ibiaí-MG	193,79 ± 0,55	DPPH (EC <sub>50</sub> em μg mL <sup>-1</sup> extrato) **	Ribeiro, 2011
	Japonvar-MG	187,17 ± 4,86		
	Tanque do Piauí-PI	260,37 ± 4,3		ABTS (mM de trolox g <sup>-1</sup> polpa)***
		1,75 ± 0,11		
	Montes Claros-MG	23,03 ± 0,36	DPPH (% inibição)	Machado <i>et al.</i> , 2013

\*μmol TE g<sup>-1</sup> = μmol de trolox equivalente por g de polpa. \*\*EC<sub>50</sub>: concentração de extrato necessária para reduzir a concentração inicial do radical DPPH<sup>•</sup> em 50%.  
 \*\*\*ABTS: tempo de reação entre o radical e o extrato igual a 6 min.

## Referências Bibliográficas

- ATKINS, P.W.; DE PAULA, J. **Físico-química**. 8. ed., v. 1. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 612p.
- ALVES, A. M.; FERNADES, D. C.; SOUSA, A. G. O.; NAVES, R. V.; NAVES, M. M. V. Características físicas e nutricionais de pequis oriundos dos estados de Tocantins, Goiás e Minas Gerais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 3, p. 198–203, 2014.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Méodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.
- APAK, R.; ÖZYÜREK, M.; GÜÇLÜ, K.; ÇAPANOĞLU, E. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 5, p. 1028–1045, 2016a.
- APAK, R.; ÖZYÜREK, M.; GÜÇLÜ, K.; ÇAPANOĞLU, E. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 2. Hydrogen Atom Transfer (HAT)-Based, Mixed-Mode (Electron Transfer (ET)/HAT), and Lipid Peroxidation Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 5, p. 997–1027, 2016b.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 5 ed., Viçosa, MG: UFV, 2011, 601p.
- 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. 17, n. 5, p. 5126–5138, 2012.
- AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, n. 3–4, p. 385–396, 2004.
- BABIOR, B. M. Superoxide: a two-edged sword. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 141–155, 1997.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios.

**Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.

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

CÂNDIDO, P. A.; MALAFAIA, G. C.; REZENDE, M. L. A exploração do pequi na região norte de Minas Gerais: abordagem por meio do Sistema Agroalimentar Localizado. **Revista IDeAS**, v. 5, n. 2, p. 118–138, 2012.

CARDOSO, L. M.; REIS, B. D. L.; HAMACEK, F. R.; SANT’ANA, H. M. P. Chemical characteristics and bioactive compounds of cooked pequi fruits (*Caryocar brasiliense* Camb.) from the Brazilian Savannah. **Fruits**, v. 68, n. 1, p. 3–14, 2013.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 71, p. 107–120, 2018.

CASTELLAN G.W. **Fundamentos de Físico-Química**. Rio de Janeiro: LTC, 1996. 527p.

CÖMERT, E. D.; GÖKMEN, V. Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. **Food Research International**, v. 105, p. 76–93, 2018.

CRUZ, D.; BARROSO, M. F.; RAMALHOSA, M. J.; COELHO, A.; SILVA, H.; DUARTE, A.J.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M.B.; CARVALHO, A.P.; DELERUE-MATOS, C. DNA-based sensor against nitrite oxide radical: Evaluation of total antioxidant capacity in beverages. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 763, p. 110–115, 2016.

DAR, R. A.; BRAHMAN, P. K.; KHURANA, N.; WAGAY, J. A.; LONE, Z. A.; GANAIE, M. A.; KRISHNA, S. P. Evaluation of antioxidant activity of crocin , podophyllotoxin and kaempferol by chemical , biochemical and electrochemical assays. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S1119–S1128, 2017.

EGEA, J.; FABREGAT, I.; FRAPART, Y. M.; et al. European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS). **Redox Biology**, v. 14, p. 694–696, 2017.

EMBUSCADO, M. E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants - A mini review.

**Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 811–819, 2015.

FERREIRA, R. Q. **Desenvolvimento e aplicação de um novo ensaio para a determinação eletroquímica da capacidade antioxidante de compostos modelo e de matrizes complexas** (Tese de doutorado). Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos-SP, 2009. 155f.

FERREIRA, R. Q.; GRECO, S. J.; DELARMELINA, M.; WEBER, K. C. Electrochemical quantification of the structure/antioxidant activity relationship of flavonoids. **Electrochimica Acta**, v. 163, p. 161–166, 2015.

FIRUZI, O.; LACANNA, A.; PETRUCCI, R.; MARROSU, G.; SASO, L. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1721, n. 1–3, p. 174–184, 2005.

GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105–112, 2006.

GARRIDO, E. M.; DELERUE-MATOS, C.; LIMA, J. L.; BRETT, A. M. Electrochemical Methods in Pesticides Control. **Analytical Letters**, v. 37, n. 9, p. 1755–1791, 2004.

GONÇALVES, G. A. S.; VILAS BOAS, E. V. B.; RESENDE, J. V.; MACHADO, A. L. L.; VILAS BOAS, B. M. Qualidade dos frutos do pequi submetidos a diferentes tempos de cozimento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 2, p. 377–385, 2011.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **The Lancet**, v. 355, p. 1179–1180, 2000.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura. Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA. PEVS - 2016. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pevs/quadros/brasil/2016>. Acesso em: 10 jul. 2018.

JARA-PALACIOS, M. J.; ESCUDERO-GILETE, M. L.; HERNÁNDEZ-HIERRO, J. M.; HEREDIA, F. J.; HERNANZ, D. Cyclic voltammetry to evaluate the antioxidant potential in winemaking by-products. **Talanta**, v. 165, p. 211–215, 2017.

LEÃO, D. P.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; BASTOS, R.; COIMBRA, M.A. Physicochemical characterization, antioxidant capacity, total phenolic and proanthocyanidin content of flours prepared from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit

by-products. **Food Chemistry**, v. 225, p. 146–153, 2017.

LIANG, N.; KITTS, D. D. Antioxidant property of coffee components: Assessment of methods that define mechanism of action. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 19180–19208, 2014.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)** (Tese de doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. 182f.

LIMA, A.; SILVA, A. M. O.; TRINDADE, R. A.; TORRES, R. P.; MANCINI-FILHO, J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 695–698, 2007.

LOURENÇÃO, B. C. **Determinação Voltamétrica simultânea de paracetamol e cafeína e de ácido ascórbico e cafeína em formulações farmacêuticas empregando um eletrodo de diamante dopado como boro** (Dissertação de Mestrado). Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, 2009. 139f.

LUGONJA, N. M.; STANKOVIĆ, D. M.; MILIČIĆ, B.; SPASIĆ, S. D.; MARINKOVIĆ, V.; VRVIĆ, M. M. Electrochemical monitoring of the breast milk quality. **Food Chemistry**, v. 240, p. 567–572, 2018.

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

MACHADO, M. T. C.; MELLO, B. C. B. S.; HUBINGER, M. D. Study of alcoholic and aqueous extraction of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) natural antioxidants and extracts concentration by nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 450–457, 2013.

MACHADO, M. T. C.; MELLO, B. C. B. S.; HUBINGER, M. D. Evaluation of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) aqueous extract quality processed by membranes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 95, p. 304–312, 2015.

MAGALHÃES, F. S.; CARDOSO, V. L.; REIS, M. H. M. Sequential process with bioadsorbents and microfiltration for clarification of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit extract. **Food and Bioproducts Processing**, v. 108, p. 105–116, 2018.

MENDONÇA, K. S.; CORRÊA, J. L. G.; JUNQUEIRA, J. R. J.; CIRILLO, M. A.; FIGUEIRA, F. V.; CARVALHO, E. E. N. Influences of convective and vacuum drying on the quality attributes of osmo-dried pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) slices. **Food Chemistry**, v. 224, p. 212–218, 2017.

NASCIMENTO, N. R. R. DO; ALVES, A. M.; SILVA, M. R.; NAVES, M. M. V. Antioxidant capacity of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp is preserved by freeze-drying and light-resistant packaging. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n. 1, p. 1–7, 2017.

OLIVEIRA, M. E. B.; GUERRA, N. B.; BARROS, L. M.; ALVES, R. E. Aspectos agronômicos e de qualidade do pequi. **Documentos 113 - EMBRAPA**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2008. 32 p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/426706/1/Dc113.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2018.

OLIVEIRA, M. N. S.; GUSMÃO, E.; LOPES, P. S. N.; SIMÕES, M. O. M.; RIBEIRO, L. M.; DIAS, B. A. S. Estádio de maturação dos frutos e fatores relacionados aos aspectos nutritivos e de textura da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 3, p. 380–386, 2006.

OLIVEIRA, M. N. S.; LOPES, P. S. N.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; PEREIRA, E. G.; RIBEIRO, L. M. Post-harvest quality of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) collected from the plant or after naturally falling off and subjected to slow and quick freezing. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n. 1: (e-768), 2017.

OLIVEIRA, S.; SOUZA, G. A.; ECKERT, C. R.; SILVA, T. A.; SOBRAL, E. S.; FÁVERO, O. A.; FERREIRA, M. J. P.; ROMOFF, P.; BAADER, W. J. Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 497–503, 2014.

OLIVEIRA, W. L.; SCARIOT, A. **Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável do pequi**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 84 p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/156376/1/Pequi.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2018.

OLSZOWY, M.; DAWIDOWICZ, A. L. Is it possible to use the DPPH and ABTS methods for reliable estimation of antioxidant power of colored compounds? **Chemical Papers**, v. 72, n. 2, p. 393–400, 2018.

- OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, v. 74, p. 10–36, 2015.
- PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.
- PEIXOTO, C. R. M.; FRAGA, S.; JUSTIM, J. R.; GOMES, M. S.; CARVALHO, D. G.; JARENKOW, J. A.; MOURA, N. F. Voltammetric determination of total antioxidant capacity of *Bunchosia glandulifera* tree extracts. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 799, p. 519–524, 2017.
- PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.
- POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v. 67, n. 5, p. 289–297, 1997.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant Activity Applying an Improved Abts Radical Cation Decolorization Assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231–1237, 1999.
- 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. 949–953, 2009.
- RIBEIRO, D. M. **Propriedades físicas, químicas e bioquímicas de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) de diferentes regiões do cerrado** (Dissertação de Mestrado). Departamento de Nutrição. Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2011. 64f.
- SCIENCE DIRECT, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/>. Acesso em: 14 mar. 2018.
- SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820–897, 2015.
- SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 757–781, 2015.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8 ed. São Paulo: Thomson, 2006.

SWAPNA, L. A.; PRADEEP, K.; REDDY, P.; DEEPAK, K.; GOYAL, S. Antioxidants and their implication in oral health and general health. **International Journal of Case Reports and Images**, v. 5, n. 4, p. 258–263, 2014.

## **CAPÍTULO 2**

---

### **Desenvolvimento do protocolo voltamétrico para determinação da capacidade antioxidante total**

---

## Metodologia

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Eletroanalítica Aplicada (GEAP), Departamento de Química, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), *Campus* Viçosa, Minas Gerais.

O protocolo voltamétrico foi desenvolvido aplicando-se a técnica voltamétrica de pulso diferencial (DPV), com base em pesquisa realizada por Korotkova; Karbainov; Shevchuk (2002).

Para otimização das condições experimentais, foram realizados testes para determinação do eletrólito de suporte; eletrodo de trabalho; faixa de potencial aplicada; tempo necessário para injeção de O<sub>2</sub>, que promovesse saturação do eletrólito de suporte, e faixa de concentração de padrões antioxidantes que exibissem melhor linearidade.

## Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico de pureza (P.A.): ácido acético, ácido bórico, ácido clorídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, cloreto de sódio, etanol, hidróxido de sódio, metanol e permanganato de potássio, adquiridos da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil), cloreto de potássio e hidróxido de potássio, adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil) e tampão fosfato pH 7,0 ± 0,05, adquirido da Labsynth (Diadema, SP, Brasil).

A solução tampão Britton-Robinson (tampão BR) 0,1 mol L<sup>-1</sup> foi preparada a partir de soluções 0,1 mol L<sup>-1</sup> de ácido acético, ácido bórico e ácido fosfórico. O pH das soluções foi ajustado para pH 2,20; 7,15 e 10,05, utilizando-se solução de hidróxido de sódio 8,0 mol L<sup>-1</sup> em pHmetro 827 pH lab (Metrohm, Herisau, Switzerland).

Foram utilizados os seguintes padrões antioxidantes: ácido L-ascórbico, ácido cítrico, ácido *p*-cumárico, ácido gálico,  $\alpha$ -tocoferol, 2(3)-*tert*-butil-4-hidroxianisol (BHA), 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT) e ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (trolox), adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA).

Para preparo das soluções aquosas, utilizou-se água ultrapura (resistividade de 18,2 M $\Omega$  cm a 25 °C), obtida pelo sistema de deionização Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

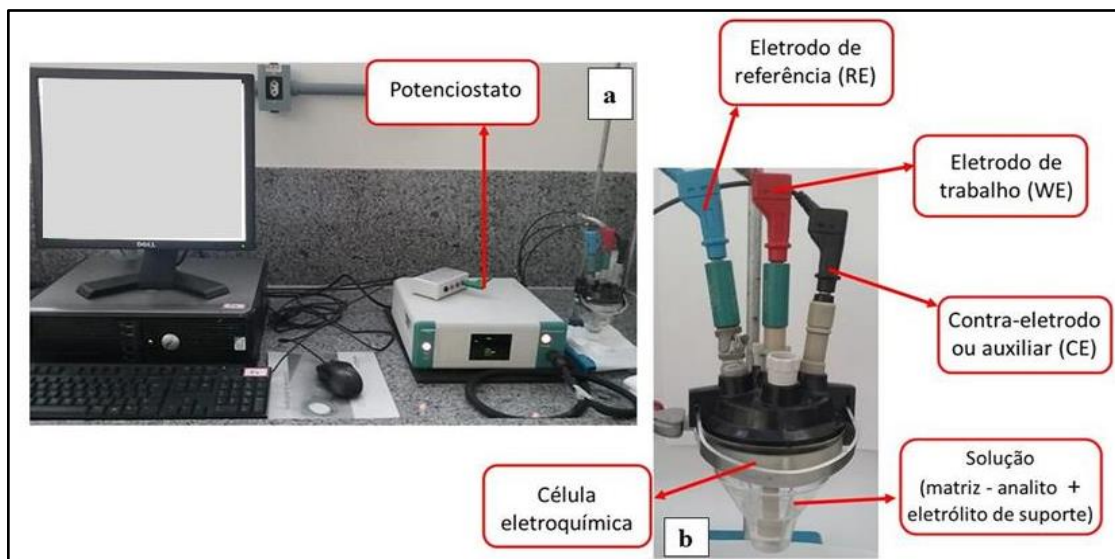
As soluções de uso dos padrões antioxidantes foram preparadas em etanol 95%, no dia da análise. A escolha do etanol foi feita de modo a padronizar o mesmo solvente para todos os padrões, já que alguns eram insolúveis em água.

## Gases

Os gases, nitrogênio ( $N_2$ ), teor de pureza de 99,9%, utilizado para desoxigenar a solução na célula eletroquímica, e oxigênio industrial ( $O_2$ ), pureza > 90%, utilizado como agente oxidante, foram obtidos da White Martins Gases Industriais Ltda (Juiz de Fora, MG, Brasil).

## Instrumentação voltamétrica

As medidas voltamétricas foram realizadas com um potenciostato/galvanostato, Autolab (Metrohm Penslab, Utrecht, The Netherlands), interfaciado a um computador pelo software General Purpose Electrochemical System (GPES), versão 4.9, utilizando-se uma célula eletroquímica de 50 mL com arranjo de três eletrodos (Figura 1), sendo um eletrodo de trabalho, um eletrodo auxiliar de platina e um eletrodo de referência de  $Ag|AgCl, KCl_{sat.} 3,0 \text{ mol L}^{-1}$  (Metrohm, Herisau, Switzerland).



**Figura 1.** Instrumentação utilizada para realização das análises voltamétricas: (a) potenciostato interligado ao computador e célula; (b) célula eletroquímica com arranjo de três eletrodos.

## Eletrodo de trabalho

O sucesso no emprego de técnicas voltamétricas depende da escolha do eletrodo de trabalho, isto porque as respostas de corrente obtidas relacionam-se às reações de redução e

oxidação que ocorrem na sua superfície ou na interface eletrodo-solução, dependentes do material do eletrodo. Portanto, sua escolha é feita em função do comportamento redox do analito de interesse, janela de potencial, condutividade elétrica, reprodutibilidade da superfície, propriedades mecânicas, custo, disponibilidade e toxicidade (Oliveira, 2013).

Foram utilizados eletrodos de trabalho de ouro e de carbono vítreo (Figura 2), com áreas geométricas de 0,196 cm<sup>2</sup> e 0,071 cm<sup>2</sup>, respectivamente, fabricados pela Metrohm (Herisau, Switzerland).

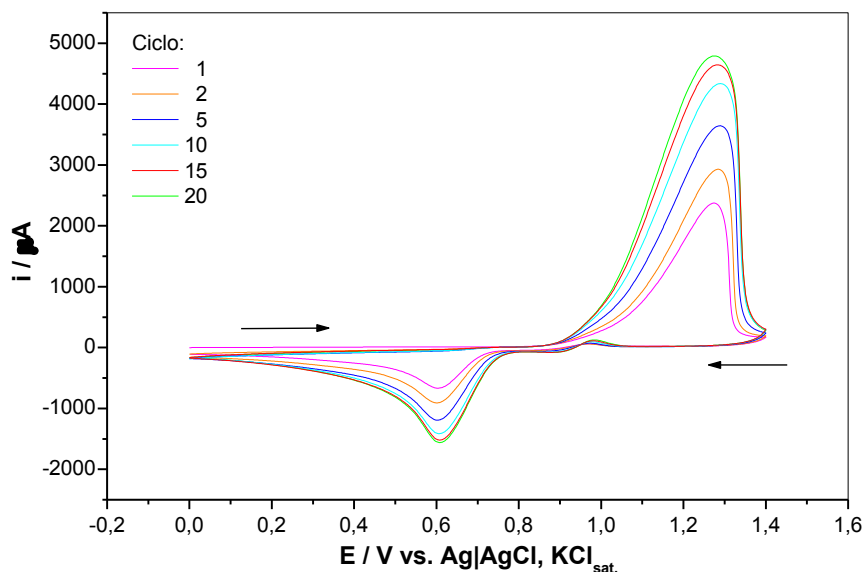
Os eletrodos de carbono vítreo são os mais comumente utilizados em voltametria, por apresentarem excelentes propriedades mecânicas e elétricas, ampla janela de potencial, inércia química (resistência ao solvente) e desempenho reprodutível (Dekanski *et al.*, 2001). Os eletrodos de ouro apresentam como vantagem elevada pureza, ampla faixa de potencial de trabalho, bem como a possibilidade de controle e modificação da superfície eletródica (Silva *et al.*, 2013).



**Figura 2.** Eletrodos de trabalho de carbono vítreo e de ouro.

O eletrodo de ouro foi acondicionado diariamente em solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, realizando-se 20 ciclos sucessivos em voltametria cíclica (CV), com varredura no sentido anódico, variando de 0 V a +1,4 V, em velocidade de varredura de potencial de 100 mV s<sup>-1</sup> e incremento de varredura de 2 mV. O comportamento voltamétrico pode ser observado na Figura 3.

Antes de cada leitura voltamétrica, fez-se limpeza da superfície dos eletrodos de trabalho, com polimento mecânico, por aproximadamente, 1 minuto, utilizando-se um feltro metalográfico, contendo suspensão de alumina 0,3 e 0,05 μm (Buehler, Lake Bluff, IL, USA), seguido de enxágue com água ultrapura.



**Figura 3.** Voltamograma de ciclos sucessivos com eletrodo de trabalho de ouro em solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Varredura de 0 a +1,4 V, com velocidade de potencial de 100 mV s<sup>-1</sup>.

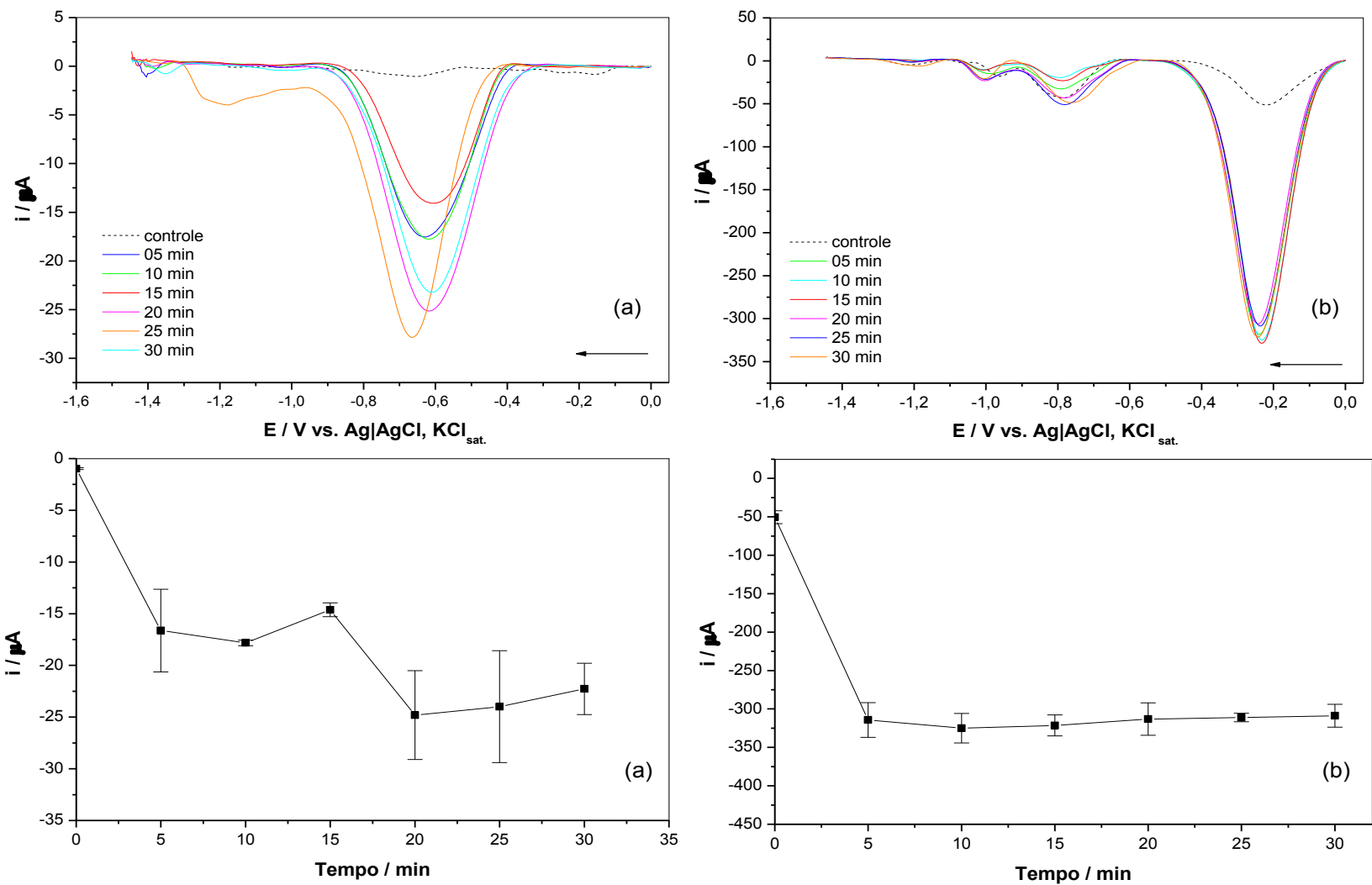
## Procedimento experimental

### Estudo do oxigênio como agente oxidante

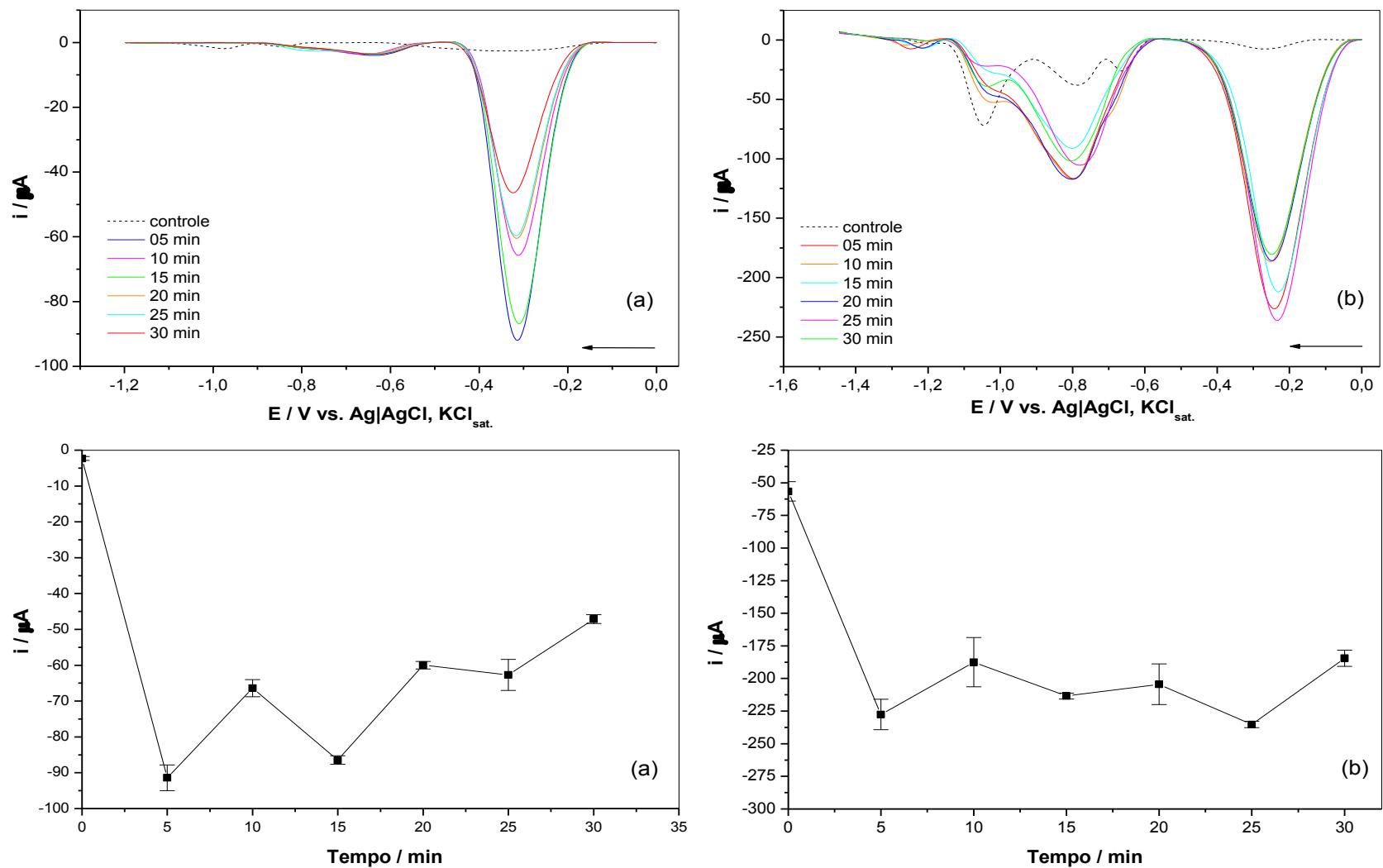
Inicialmente foram realizados testes para determinação do tempo de saturação do eletrólito de suporte com O<sub>2</sub>. Utilizou-se como eletrólitos de suporte: KCl, NaCl, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KOH, HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e misturas de KCl com etanol e metanol, todos na concentração 0,1 mol L<sup>-1</sup>. A injeção do gás foi feita diretamente na solução, em diferentes tempos: 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. Imediatamente após a injeção do gás, realizou-se as leituras em DPV, no sentido catódico (redução), em diferentes faixas de potencial, com amplitude de pulso de 100 mV, velocidade de varredura de potencial de 20 mV s<sup>-1</sup> e tempo de pulso de 2 ms, utilizando-se os eletrodos de trabalho de carbono vítreo e ouro.

Para leitura do controle (tempo 0, sem injeção de O<sub>2</sub>), utilizou-se fluxo de N<sub>2</sub>, por 10 minutos, diretamente no eletrólito de suporte. Essa etapa teve como objetivo remover o oxigênio naturalmente dissolvido na solução, para não interferir nas respostas voltamétricas e assim, avaliar o efeito do eletrólito de suporte sem o analito. Foram realizadas no mínimo três leituras voltamétricas para cada tempo de injeção com O<sub>2</sub>.

Nas Figuras 4 e 5 estão apresentados os voltamogramas e gráficos para avaliação da corrente de O<sub>2</sub> em diferentes tempos de injeção do gás, com eletrodos de trabalho de carbono vítreo e ouro, em eletrólitos de suporte KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e KOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>.



**Figura 4.** Comportamento da corrente catódica de  $O_2$  em eletrólito de suporte  $KCl\ 0,1\ mol\ L^{-1}$ , com injeção do gás variando entre 5 a 30 min, utilizando-se os eletrodos de trabalho de carbono vítreo (a) e ouro (b). Tempo 0: controle (sem injeção de  $O_2$ ).



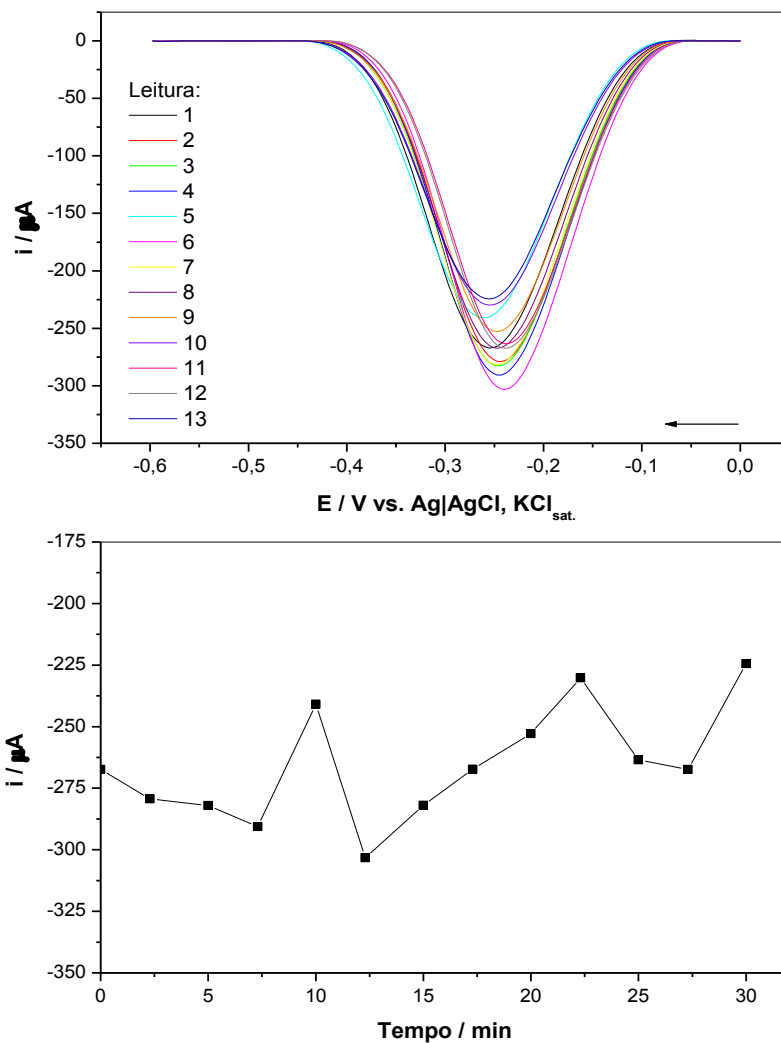
**Figura 5.** Comportamento da corrente catódica de  $O_2$  em eletrólito de suporte  $KOH$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , com injeção do gás variando entre 5 a 30 min, utilizando-se os eletrodos de trabalho de carbono vítreo (a) e ouro (b). Tempo 0: controle (sem injeção de  $O_2$ ).

A partir dos testes realizados, definiu-se o tempo de 05 minutos para saturação do eletrólito de suporte com O<sub>2</sub>. Este valor foi definido com base no menor tempo necessário para saturação da solução que proporcionasse maior intensidade de corrente (dada em módulo) do primeiro pico catódico em relação ao controle. Definiu-se também o eletrodo de trabalho de ouro para ser utilizado nas análises posteriores, por exibir maior intensidade de corrente (dada em módulo) e melhor repetibilidade das leituras voltamétricas em relação ao eletrodo de carbono vítreo. Nas Figuras 4 e 5, pode-se observar a diferença de intensidade de corrente entre os eletrodos avaliados.

De acordo com o potencial do primeiro pico catódico de O<sub>2</sub>, exibido pelo eletrodo de ouro (E<sub>pc</sub> próximo a -0,2 V), conforme Figuras 4 e 5, definiu-se a faixa de potencial de 0 V a -0,6 V para aplicação do pulso.

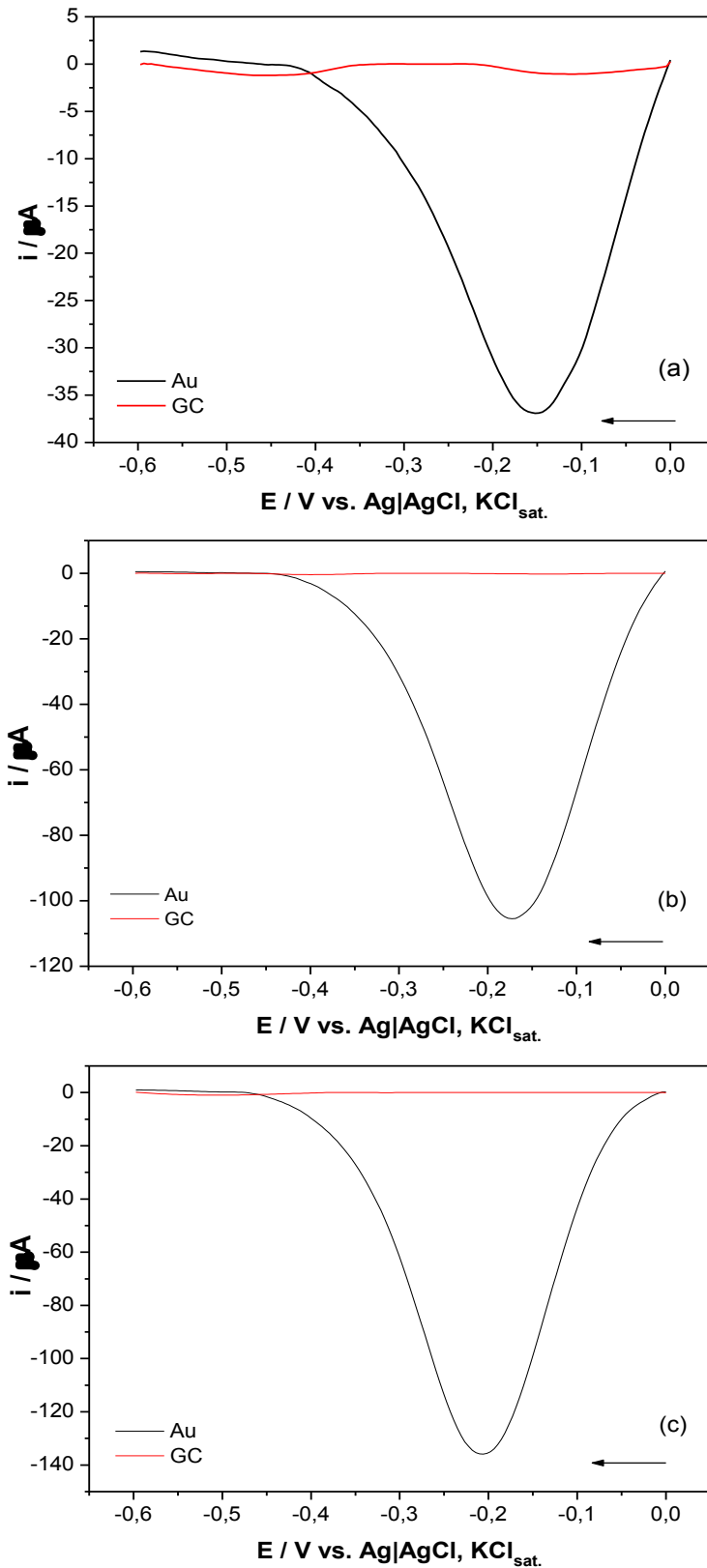
Após definição do tempo de injeção de O<sub>2</sub>, avaliou-se a estabilidade da intensidade de corrente durante 30 minutos (Figura 6), tempo estimado para realização das análises posteriores de capacidade antioxidante.

Para escolha do eletrólito de suporte, além das soluções anteriormente citadas, avaliou-se o tampão fosfato pH 7,0 e tampão BR 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 2,20; 7,15 e 10,05. O tampão BR foi escolhido como eletrólito de suporte com base na solubilidade dos padrões antioxidantes e por permitir controle do pH em diferentes condições. O valor do pH do meio interfere na espécie eletroativa disponível, não podendo ser negligenciado em análises para determinação da capacidade antioxidante.

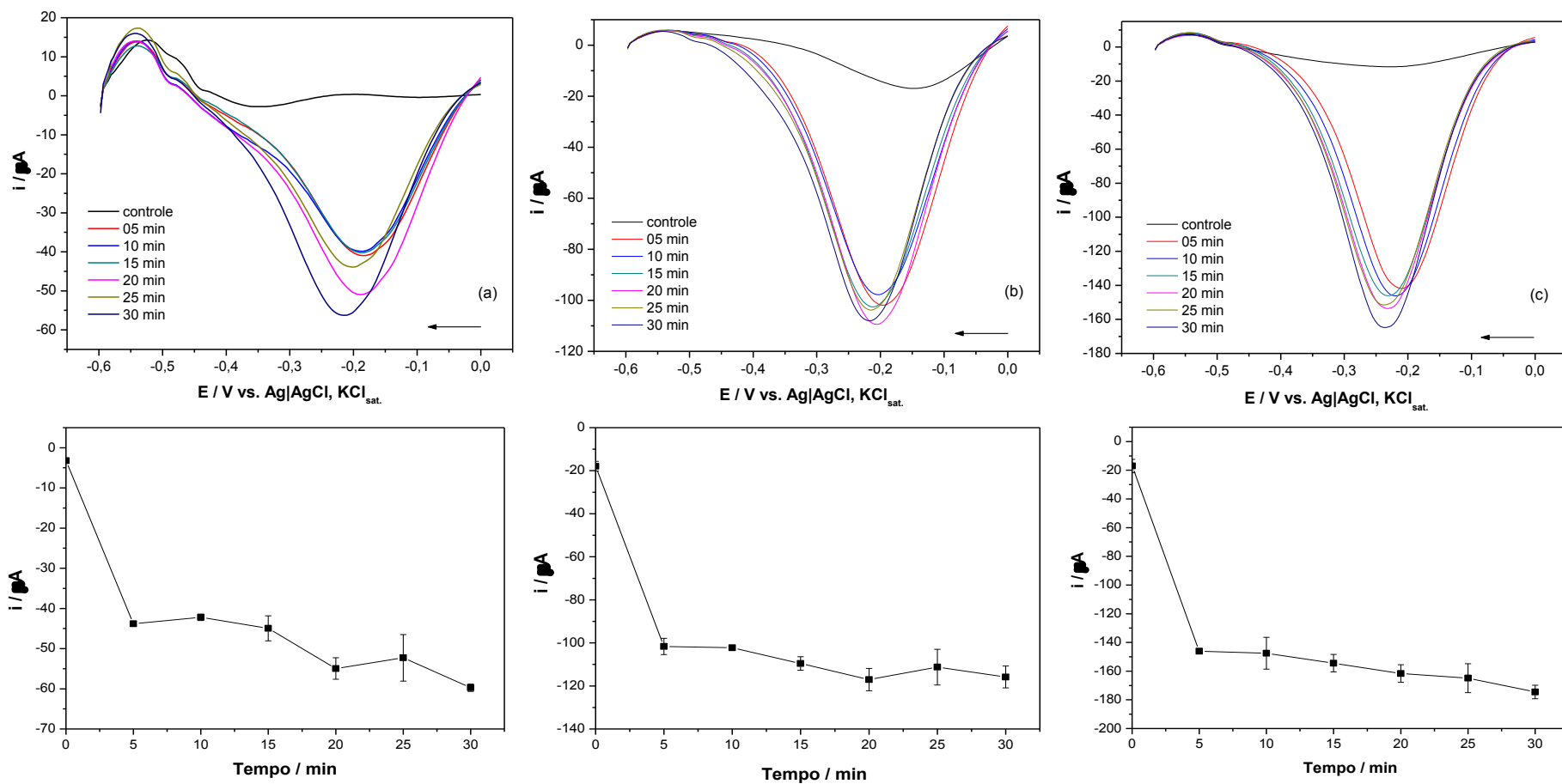


**Figura 6.** Comportamento da corrente catódica de  $O_2$  em  $KCl$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , utilizando-se eletrodo de trabalho de ouro. Leituras: 1: corrente de  $O_2$  obtida com saturação da solução por 05 min; 2: após 2:30 min da leitura 1; 3: após 5 min da leitura 1; 13: após 30 min da leitura 1.

Nas Figuras 7 e 8 pode-se observar o comportamento da corrente de oxigênio no tampão BR  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 2,20; 7,15 e 10,05.



**Figura 7.** Intensidade da corrente catódica de  $O_2$  em eletrólito de suporte tampão Britton-Robinson  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 2,20 (a); pH 7,15 (b) e pH 10,05 (c), utilizando-se os eletrodos de trabalho de ouro (Au) e carbono vítreo (GC).

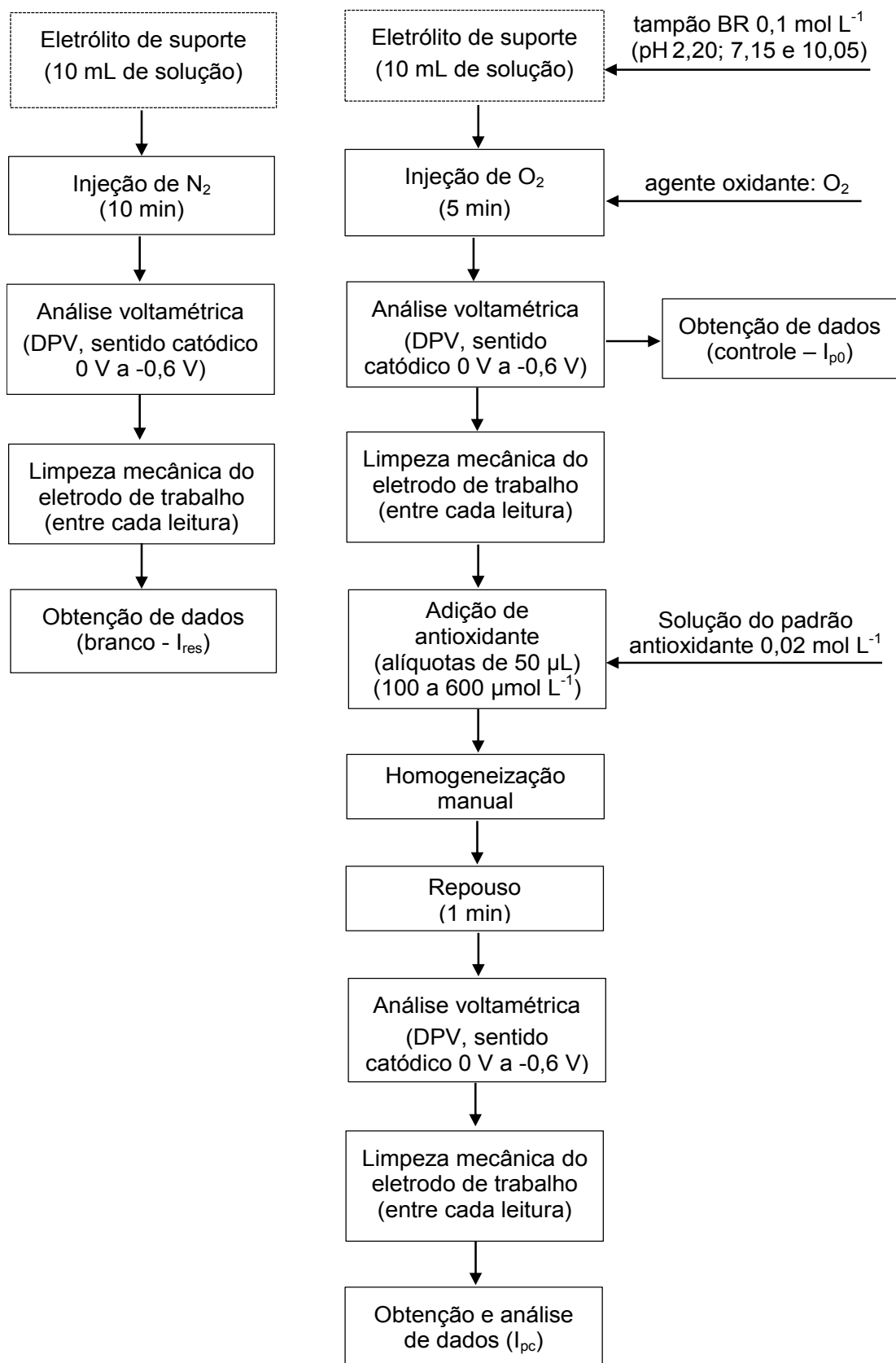


**Figura 8.** Comportamento da corrente catódica de  $\text{O}_2$  em eletrólito de suporte tampão Britton-Robinson  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 2,20 (a); pH 7,15 (b) e pH 10,05 (c), com injeção do gás variando entre 5 a 30 min, utilizando-se o eletrodo de trabalho de ouro. Tempo 0: controle (sem injeção de  $\text{O}_2$ ).

A partir dos parâmetros definidos foram realizados testes para determinação da faixa de concentração dos padrões antioxidantes utilizada na avaliação da eletrorredução do oxigênio. Definiu-se a faixa de 100 a 600  $\mu\text{mol L}^{-1}$  por ter apresentado melhor linearidade do decaimento da corrente catódica de oxigênio. Este decaimento foi observado pelos voltamogramas e por gráficos de  $[(I_{pc} - I_{res})/(I_{p0} - I_{res}) = f(v)]$ , construídos a partir das médias de corrente catódica do oxigênio, obtidas para cada concentração do padrão antioxidante. Onde:  $I_{pc}$  é a corrente de pico catódica de  $\text{O}_2$ , na presença de composto com capacidade antioxidante;  $I_{res}$  é a corrente de pico catódica do eletrólito de suporte desoxigenado,  $I_{p0}$  é a corrente de pico catódica inicial de  $\text{O}_2$ , sem adição de composto antioxidante e  $v$  é o volume do padrão antioxidante..

Após ajustes dos parâmetros, aplicou-se o protocolo voltamétrico para avaliação do comportamento de eletrorredução do  $\text{O}_2$  com adição dos padrões antioxidantes ácido L-ascórbico, ácido cítrico, ácido *p*-cumárico, ácido gálico,  $\alpha$ -tocoferol, BHA, BHT e trolox, conforme descrito na Figura 9.

A partir dos gráficos descritos anteriormente, obtém-se o coeficiente de capacidade antioxidante (K), dado em módulo, pelo coeficiente angular da curva, sendo este índice utilizado para expressar a capacidade antioxidante das substâncias avaliadas. A aplicação do protocolo voltamétrico para avaliação da capacidade antioxidante da polpa de pequi e comparação com os padrões antioxidantes será descrita no Capítulo 3.



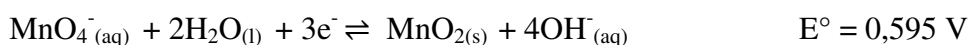
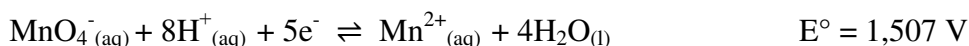
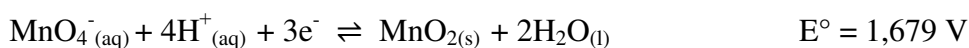
**Figura 9.** Fluxograma do protocolo voltamétrico para avaliação da eletrorredução de  $O_2$  com adição de padrões antioxidantes.

## Estudo do permanganato como agente oxidante

O protocolo voltamétrico desenvolvido foi aplicado para avaliação do permanganato ( $\text{MnO}_4^-$ ), a fim de comparar os resultados obtidos pela avaliação da eletrorredução de oxigênio com outro agente oxidante. A escolha do  $\text{KMnO}_4$  foi feita por ser um agente oxidante forte, de baixo custo, muito empregado em química analítica em reações de oxirredução. Nessas reações, o íon  $\text{MnO}_4^-$  atua também como indicador, ao ser reduzido, por permitir fácil visualização da mudança de cor da solução, possibilitando o acompanhamento colorimétrico do decaimento da corrente catódica ao reagir com o composto antioxidante estudado.

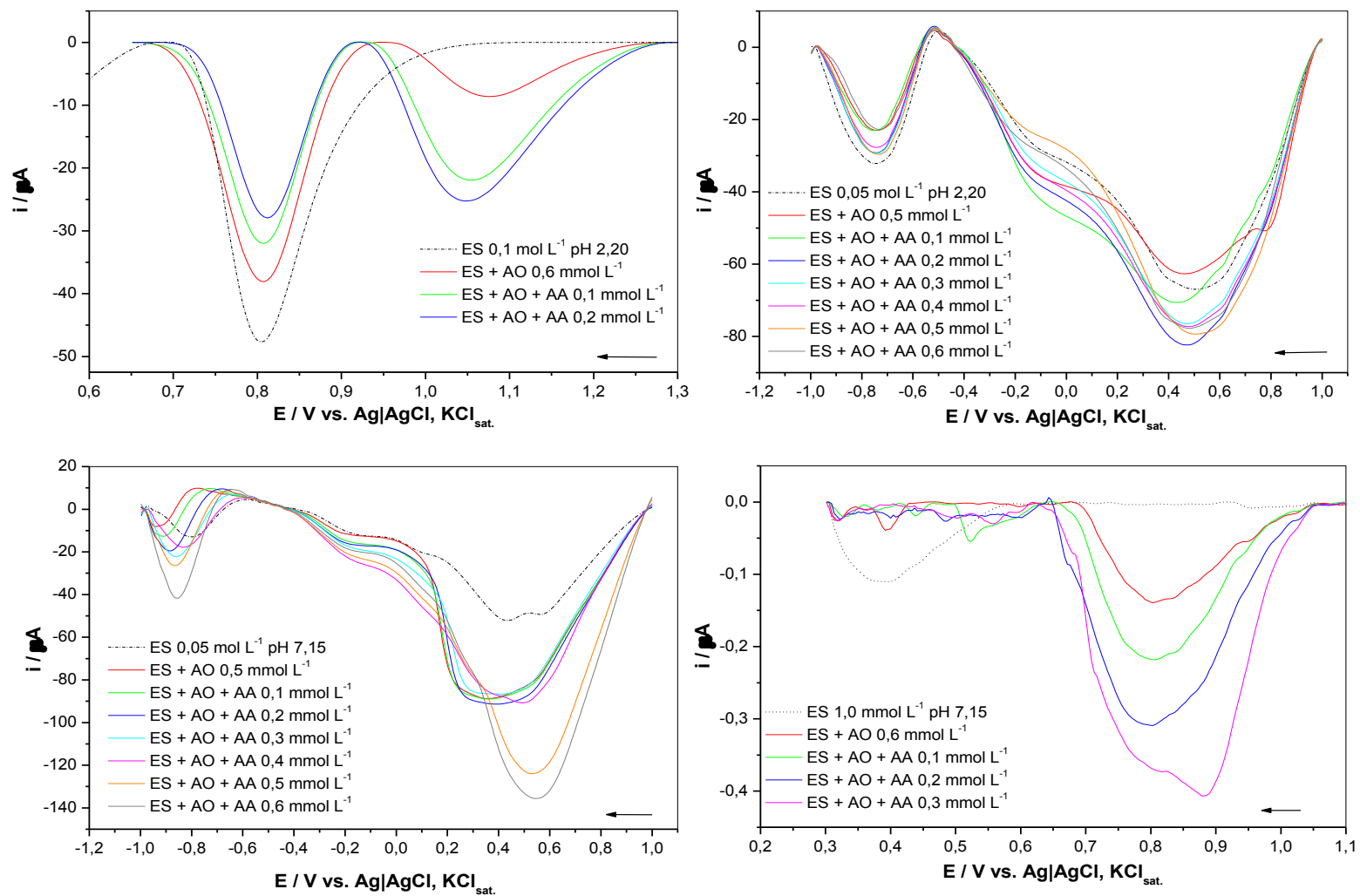
A avaliação da capacidade antioxidante pelo método indireto baseou-se no monitoramento da corrente do  $\text{MnO}_4^-$  em função da adição da solução antioxidante. O procedimento para avaliação deste oxidante foi semelhante ao descrito na Figura 9, com substituição da etapa de injeção de oxigênio pela adição de solução de permanganato de potássio, com concentração previamente definida. Fez-se injeção de  $\text{N}_2$  por 5 minutos na célula eletroquímica, a fim de homogeneizar a mistura e remover o oxigênio dissolvido, evitando interferência na corrente produzida pela espécie eletroativa.

Abaixo estão descritas as principais reações de oxirredução do  $\text{MnO}_4^-$ :



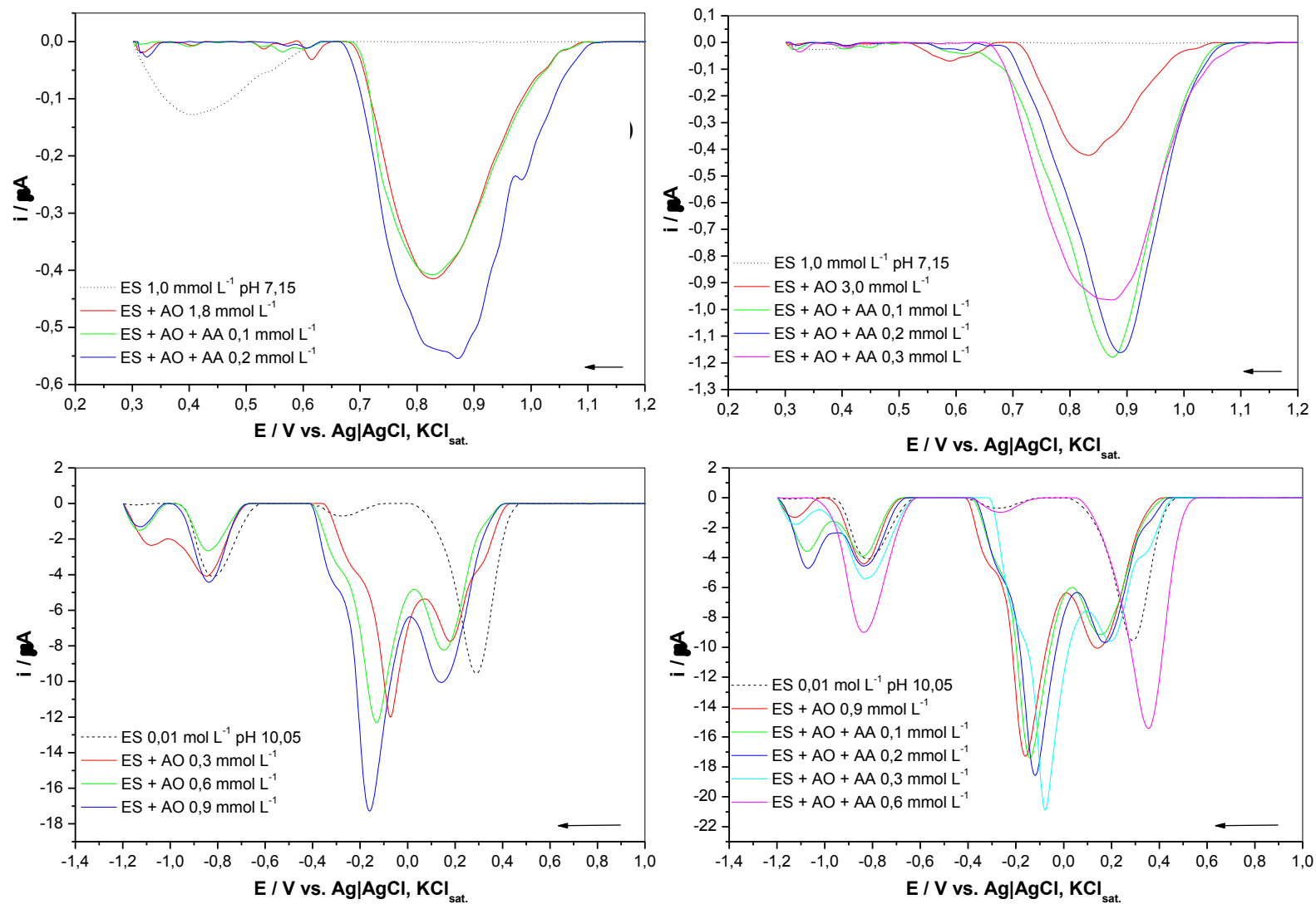
Foram realizados testes para determinação da concentração do agente oxidante, faixa de potencial e concentração do eletrólito de suporte, de modo que as condições de estudo fossem mais próximas às definidas para o oxigênio. Na Figura 10 pode-se observar o comportamento voltamétrico do  $\text{MnO}_4^-$  em tampão BR em diferentes concentrações e pH do meio. A partir da análise dos resultados (Figura 10), observou-se que não foi obtido comportamento linear do decaimento da  $I_{\text{pc}}$  do  $\text{MnO}_4^-$ , com adição de padrão antioxidante, em nenhuma das condições testadas.

Assim, não foi possível aplicar o protocolo desenvolvido, utilizando-se o permanganato como agente oxidante, para avaliar a ação antioxidante dos padrões e polpa de pequi pelo coeficiente de capacidade antioxidante (K), nas condições padronizadas para comparação com os resultados do estudo de eletrorredução do oxigênio.



**Figura 10.** Comportamento voltamétrico da corrente catódica de  $\text{MnO}_4^-$  em diferentes condições. ES: eletrólito de suporte tampão Britton-Robinson. AO: agente oxidante,  $\text{MnO}_4^-$ . AA: antioxidante, ácido L-ascórbico.

Continuação Figura 10...



## Referências Bibliográficas

DEKANSKI, A.; STEVANOVIC, J.; STEVANOVIC, R.; NIKOLIC, B. Z.; JOVANOVIC, V.M. Glassy carbon electrodes: I. Characterization and electrochemical activation. **Carbon**, v. 39, p. 1195-1205, 2001.

KOROTKOVA, E. I.; KARBAINOV, Y. A.; SHEVCHUK, A. V. Study of antioxidant properties by voltammetry. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 518, p. 56–60, 2002.

OLIVEIRA, S. D. S. **Aplicação das técnicas eletroanalíticas (voltametria cíclica e de pulso diferencial) usando o eletrodo de diamante dopado com boro para o estudo da isoniazida, etambutol, rifampicina e pirazinamida** (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, 2013. 128f.

SILVA, R. S. N.; SANTOS, T. L. L.; NUNES, G. S.; MARQUES, P. R. B. O. **Construção e caracterização inicial de eletrodo de ouro construído a partir de CD gravável para utilização na construção de biossensores**. 65<sup>a</sup> SBPC Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. UFPE. Recife-PE, 2013. Disponível em: <http://www.sbpcnet.org.br/livro/65ra/resumos/resumos/2366.htm>. Acesso em: 08 ago. 2016.

## CAPÍTULO 3

---

**Applicability of a voltammetric assay based on the electroreduction of oxygen to evaluate the antioxidant capacity of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp**

*J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 29, No. 8, 1653-1662, 2018

<http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20180038>

---

## **Applicability of a Voltammetric Assay Based on the Electroreduction of Oxygen to Evaluate the Antioxidant Capacity of Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) Pulp**

Flávia A. Pinheiro,<sup>a,b</sup> Leonardo L. Okumura,<sup>c</sup> Astréa F. S. Silva,<sup>c</sup> Júnio G. Silva,<sup>c</sup> Letícia R. Ferreira,<sup>b</sup> Edilton S. Barcellos<sup>c</sup> and Edimar A. F. Fontes<sup>\*,b</sup>

*<sup>a</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo,  
Campus Venda Nova do Imigrante, 29375-000 Venda Nova do  
Imigrante-ES, Brazil*

*<sup>b</sup>Departamento de Tecnologia de Alimentos and <sup>c</sup>Departamento de Química, Universidade  
Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa-MG, Brazil*

\*e-mail: eaffontes@ufv.br

### **Abstract**

This study aimed to use a differential pulse voltammetric (DPV) assay, based on the electroreduction of oxygen, to evaluate the antioxidant capacity of pequi pulp. The results were expressed in coefficient of antioxidant capacity (K), at different pH values and in trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), and were compared to the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) spectrophotometric assays. The principal component analysis showed higher K for pequi pulp extract and pH tending to 7.15. The antioxidant capacity was related to the presence of gallic acid in its composition. Regarding the TEAC value, the best result was obtained by the DPV test ( $53.43 \pm 5.14 \mu\text{mol trolox g}^{-1}$  pulp). The pequi pulp showed antioxidant capacity, compared to the standard antioxidant compounds evaluated. It was concluded that the voltammetric protocol was efficient to assess the total antioxidant capacity of pequi pulp and can be an alternative to conventional spectrophotometric assays, for the analysis of food matrices.

**Keywords:** electrochemical techniques, food analysis, antioxidant capacity, bioactive compounds, pequi.

## Introduction

The assessment of the antioxidant potential of foods is carried out by the determination of their antioxidant capacity. Various methodologies are employed for this purpose, especially the spectrophotometric assays, including the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).<sup>1</sup> However, these colorimetric methods have some limitations.<sup>2,3</sup> For example, the samples must undergo a pretreatment to eliminate interfering agents, such as reducing sugars and organic acids.<sup>4</sup> In fact, each method has its own characteristics, such as the reaction mechanism, types of oxidation substrates, reaction medium (basic, acid or neutral), compound proof of reaction and expression of results.<sup>1</sup> This hinders the comparison of results obtained by different authors that used different methodologies.

The differences between the reactive species and their forms of activity hinder the development of a simple and universal method to accurately and quantitatively determine the total antioxidant capacity.<sup>5</sup> Therefore, the use of electrochemical techniques becomes an alternative for this analysis.<sup>6</sup> The processes of formation and/or stabilization of free radicals are related to oxidation-reduction reactions.<sup>7</sup> Therefore, several studies have used voltammetric electrochemical techniques to assess the antioxidant capacity of foods and isolated compounds, since they improve methodology standardization and increase the amount of information about the compound of interest.<sup>6,8-12</sup>

Voltammetry presents the following advantages over traditional spectrophotometric techniques: low operation and instrumental cost; use of less organic solvents, consequently decreasing waste generation; the analysis can be performed in the sample without pretreatment for separation/cleaning of the compounds that affect other methods, colored materials or other dispersed solid particles; fast data acquisition, sensitivity and portability.<sup>13-17</sup>

As already described, several studies have applied voltammetric techniques to determine the antioxidant capacity of food matrices. However, no study using pequi pulp for this purpose has been found so far.

Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) is a typical fruit of the Brazilian cerrado that has not been the subject of scientific investigation. It is an important source of nutrients, whose pulp has about  $3.73 \pm 0.01$  g *per* 100 g of proteins;  $26.15 \pm 0.85$  g *per* 100 g of lipids;  $58.83 \pm 2.06$  mg *per* 100 g of calcium;  $1.40 \pm 0.59$  mg *per* 100 g of iron and  $2.81 \pm 0.70$  mg *per* 100 g of zinc.<sup>18</sup> It also contains bioactive compounds with antioxidant

properties, such as vitamin C ( $6.63 \pm 1.02$  mg *per* 100 g),<sup>19</sup> phenolic compounds ( $1.80 \pm 0.04$  to  $3.34 \pm 0.07$  mg GAE g<sup>-1</sup>) and total carotenoids ( $37.08 \pm 1.84$  to  $187.00 \pm 12.43$  μg g<sup>-1</sup>).<sup>20</sup> Violaxanthin, lutein and zeaxanthin are among the predominant carotenoids observed.<sup>21</sup>

Therefore, this study aimed to verify the applicability of an experimental protocol, based on voltammetry, to evaluate the antioxidant capacity of pequi pulp.

## Experimental

### Reagents and solutions

All reagents used were of analytical grade of purity (P.A.). Acetone, acetic acid, boric acid, phosphoric acid, ethanol, sodium hydroxide and methanol were purchased from Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brazil); ABTS, DPPH, potassium persulfate, L-ascorbic acid, citric acid, *p*-coumaric acid, gallic acid,  $\alpha$ -tocopherol, 2(3)-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA), 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT) and 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (trolox) were acquired from Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA).

The 0.1 mol L<sup>-1</sup> Britton-Robinson buffer was used as support electrolyte in the voltammetric analyses, at pH 2.20, 7.15 and 10.05. It was prepared from 0.1 mol L<sup>-1</sup> solutions of acetic acid, boric acid and phosphoric acid. The pH was adjusted with sodium hydroxide solution, 8.0 mol L<sup>-1</sup>, in a pH Meter, model 827 pH lab (Metrohm, Herisau, Switzerland). The solutions of the antioxidant standards used in the electrochemical test were prepared in ethanol, 95%, on the day of the analysis.

### Preparation of the pequi pulp extract

The pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp was obtained through the processing of fresh fruits from the December 2015 harvest of the municipality of Santana de Pirapama, MG, Brazil, located at 19°00'21''S (latitude), 44°02'35''W (longitude). The pulp was obtained with the aid of a depulping machine (Itametal/NPC Equipamentos, model Bonina 0.25 df, Itabuna, Brazil) and used in the production of the extract, as recommended by Rufino *et al.*<sup>22</sup> The extract was stored in an amber flask and maintained under freezing (-18 °C) for later defrosting and use.

### **Instrumentation of the voltammetric electrochemical assay**

The voltammetric measurements were performed using a potentiostat/galvanostat, Autolab (Metrohm Pensalab, Utrecht, The Netherlands), in interface with a computer through the General Purpose Electrochemical System (GPES), version 4.9, with a 50 mL electrochemical cell provided with three electrodes, one gold working electrode having a geometric area of 0.196 cm<sup>2</sup>; one platinum wire auxiliary electrode and one Ag|AgCl, 3.0 mol L<sup>-1</sup> KCl reference electrode (Metrohm, Herisau, Switzerland). Following each voltammetric reading, the surface of the working electrode was polished for approximately 1 min, with alumina 0.3 and 0.05 μm (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) on an alumina polishing pad, rinsed with ultrapure water (resistivity of 18.2 MΩ·cm at 25 °C) from a Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

### **Voltammetric characterization of pequi pulp and antioxidant standards**

The voltammetric profile of the compounds with antioxidant capacity was characterized by cyclic voltammetry (CV), with scanning of anodic direction, ranging from -0.6 to +1.4 V, at scan rate of 100 mV s<sup>-1</sup> and step potential of 2 mV. For such, 10.0 mL of the 0.1 mol L<sup>-1</sup> Britton-Robinson buffer, pH 2.20, were transferred to the electrochemical cell. Five minutes after the nitrogen gas injection (N<sub>2</sub>, 99.9% purity) (White Martins Gases Industriais Ltda, Juiz de Fora, MG, Brazil), it was added an aliquot of 300 μL of the antioxidant standard solution 33.3 mmol L<sup>-1</sup> (L-ascorbic acid, citric acid, *p*-coumaric acid, gallic acid, α-tocopherol, BHA, BHT and trolox) for the deoxygenation of the solution. Its final concentration in the cell was around 1.0 mmol L<sup>-1</sup>. Then, N<sub>2</sub> was injected for 1 min to homogenize the mixture.

The pequi pulp was assessed with the addition of 300 μL of the extract in replacement of the antioxidant standard solution. It was also performed analysis of the supporting electrolyte solution to verify the presence of some peak.

In addition to the evaluation of the voltammetric profile of the antioxidant compounds at pH 2.20, the 0.1 mol L<sup>-1</sup> Britton-Robinson buffer was used, at pH 7.15 and 10.05, in the previous procedure, to assess the effect of pH on the antioxidant capacity. All analyses were performed in triplicate.

### **Assessment of the total antioxidant capacity through the electroreduction of oxygen**

The methodology used in this study was developed through the application of the differential pulse voltammetric (DPV) technique, based on a research carried out by

Korotkova *et al.*<sup>23</sup> In order to develop the experimental protocol, preliminary tests were carried out to determine the time corresponding to O<sub>2</sub> injection demands to promote the saturation of the supporting electrolyte and its selection. It was also determined the concentration range of some antioxidant standards with improved linearity (not shown in this article). The experimental conditions adopted for the DPV readings were: cathodic direction measurements, ranging from 0 to -0.6 V, pulse amplitude of 100 mV, scan rate of 20 mV s<sup>-1</sup> and modulation time of 2 ms.

Molecular oxygen (O<sub>2</sub>) was used as oxidant for being a strong oxidizing agent (E° = 1.229 V)<sup>24</sup> and one of the most important radicals found in our biological system. At ground state, O<sub>2</sub> is a diradical with one unpaired electron in each oxygen. As a radical, it can abstract hydrogen atoms, similarly to the combustion and autoxidation reactions, or work as an electron receptor in biological systems.<sup>25</sup>

10.0 mL of 0.1 mol L<sup>-1</sup> Britton-Robinson buffer (pH 2.20, 7.15 and 10.05) were transferred to the electrochemical cell. Following saturation with O<sub>2</sub> for 5 min (industrial oxygen, purity > 90%) (White Martins Gases Industriais Ltda, Juiz de Fora, MG, Brazil), the cathodic peak current of the oxygen (oxidizing agent) was read, without antioxidant addition (control). Then, this solution received the addition of aliquots of 50 µL of 0.02 mol L<sup>-1</sup> antioxidant standard solution (solution for the use of L-ascorbic acid, citric acid, *p*-coumaric acid, gallic acid, α-tocopherol, BHA, BHT and trolox), so that its concentration in the cell ranged between 0.1 and 0.6 mmol L<sup>-1</sup>. A manual homogenization was conducted and after the solution remained at rest for 1 min, the voltammetric measurement was performed. A similar procedure was adopted in the analysis of the pequi pulp extract, with the addition of successive 50 µL aliquots of the undiluted extract, which replaced the standard antioxidant solution.

The residual current, inherent to the supporting electrolyte, was determined through voltammetric reading of the 0.1 mol L<sup>-1</sup> Britton-Robinson buffer (pH 2.20, 7.15 and 10.05), after an injection of N<sub>2</sub> for 10 min. The voltammetric measurements were carried out in duplicate, and the experiment was conducted with three replications. The baseline of the voltammograms was corrected through the moving average, using the tool available in the GPES software system, version 4.9. The voltammograms were plotted with the aid of the OriginPro 8<sup>®</sup> software.<sup>26</sup>

A graphic of  $(I_{pc} - I_{res}) / (I_{p0} - I_{res}) = f$  (volume of the antioxidant standard or volume of pequi extract) was developed based on the averages of the cathodic oxygen current obtained for each concentration of the antioxidant standard or pequi extract, where:  $I_{pc}$  is

the peak cathodic current of  $O_2$ , in the presence of compound with antioxidant capacity;  $I_{res}$  is the peak cathodic current of the deoxygenated supporting electrolyte, and  $I_{p0}$  is the initial peak cathodic current of  $O_2$ , without the addition of antioxidant compound. The current decay curve was also observed. The antioxidant capacity of the pequi pulp extract and the antioxidant standards were expressed as antioxidant capacity coefficient (K), which is the angular coefficient of the curve.

In addition to the K value, the antioxidant capacity of the pequi pulp was expressed as trolox equivalent antioxidant capacity, given by the TEAC value ( $\mu\text{mol trolox g}^{-1}$  pequi pulp). For such, we used the results of cathodic current of oxygen, pH 7.15, obtained by the voltammetric protocol previously described, with pequi pulp concentration ranging from 5 to 30  $\text{mL L}^{-1}$  and trolox (antioxidant standard) ranging from 100 to 600  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

### **Spectrophotometric assay of the radical cation ABTS<sup>•+</sup>**

The determination of the antioxidant capacity by the ABTS test was performed according to the methodology described by Re *et al.*,<sup>27</sup> with modifications. In an amber container, 5 mL of 7.0  $\text{mmol L}^{-1}$  ABTS solution were added to 5 mL of 2.45  $\text{mmol L}^{-1}$  potassium persulfate solution, which remained protected from light for 12 to 16 h for the generation of ABTS<sup>•+</sup> cation chromophore. Then, the radical solution was diluted in 80% ethanol until reaching an absorbance of  $0.700 \pm 0.005$ , at wavelength of 734 nm, in a spectrophotometer (BEL Photonics UV-M51, Piracicaba, Brazil) previously calibrated with 80% ethanol. 0.5 mL of different dilutions of the pequi pulp extracts and 3.5 mL of the ABTS<sup>•+</sup> radical solution were placed in test tubes and homogenized in a tube shaker. After 6 min of reaction, the absorbance of the samples was read at 734 nm. 80% ethanol was used as control, in replacement of the pequi extracts. The analysis was completely performed in low light environment. The antioxidant capacity was expressed by the TEAC value ( $\mu\text{mol trolox g}^{-1}$  pequi pulp), according to Rufino *et al.*,<sup>22</sup> calculated from the trolox analytical curve, prepared with standard solutions, with concentrations ranging between 10 and 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

### **Spectrophotometric assay of the DPPH<sup>•</sup> radical**

The antioxidant capacity was determined by the DPPH test, according to the methodology described by Brand-Williams *et al.*,<sup>28</sup> with modifications.

In a low light environment, aliquots of 0.1 mL of different dilutions of pequi extracts were transferred to test tubes, which were added to 2.9 mL of 60  $\mu\text{mol L}^{-1}$

methanolic solution of the DPPH<sup>•</sup> radical previously prepared. The mixture was then homogenized in a tube shaker. The tubes were placed to rest, in the dark, for 25 min. Next, absorbance was read at 515 nm in a spectrophotometer (BEL Photonics UV-M51, Piracicaba, Brazil) previously calibrated with methanol. Methanol was used as the control, in replacement of the pequi extracts.

Similarly to the ABTS test, the results were expressed based on the TEAC value ( $\mu\text{mol trolox g}^{-1}$  pequi pulp), according to Rufino *et al.*<sup>22</sup> Therefore, a trolox analytical curve was developed with standard solutions, with concentrations ranging from 30 to 600  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

### Statistical analysis

The results for antioxidant capacity, expressed in TEAC and antioxidant capacity coefficient (K) were presented as the mean ( $\pm$  standard deviation) of the values obtained from three replicates. The statistical analyses were performed using analysis of variance (ANOVA), linear regression with no adjustment and Tukey test at 5% probability, using the Statistical Analysis System (SAS), version 9.3,<sup>29</sup> licensed for the Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG, Brazil). A principal component analysis (PCA) was applied to produce graphics for better explaining the results found for the antioxidant compounds, according to K and pH, using the Matlab platform.<sup>30</sup>

## Results and Discussion

### Characterization of the voltammetric profile of the compounds with antioxidant capacity

The voltammetric profile of the pequi pulp extract and antioxidant standards was assessed using the cyclic voltammetry technique, prior to the application of the experimental protocol, to evaluate the behavior of the oxygen electroreduction. Figure 1 shows the cyclic voltammograms for the pequi extract, L-ascorbic acid, BHA and trolox (the other figures are presented in the Figure S1, Supplementary Information).

Cathodic peaks with greater current intensity were observed, close to the potential of 0.810, 0.440 and 0.250 V, at pH 2.20, 7.15 and 10.05, respectively, in all compounds analyzed. These peaks are from the 0.1 mol L<sup>-1</sup> Britton-Robinson buffer, as their intensity was similar to that of peaks obtained after the addition of the antioxidant standards and pequi pulp extract. Only BHA and trolox presented cathodic peaks that are not from the

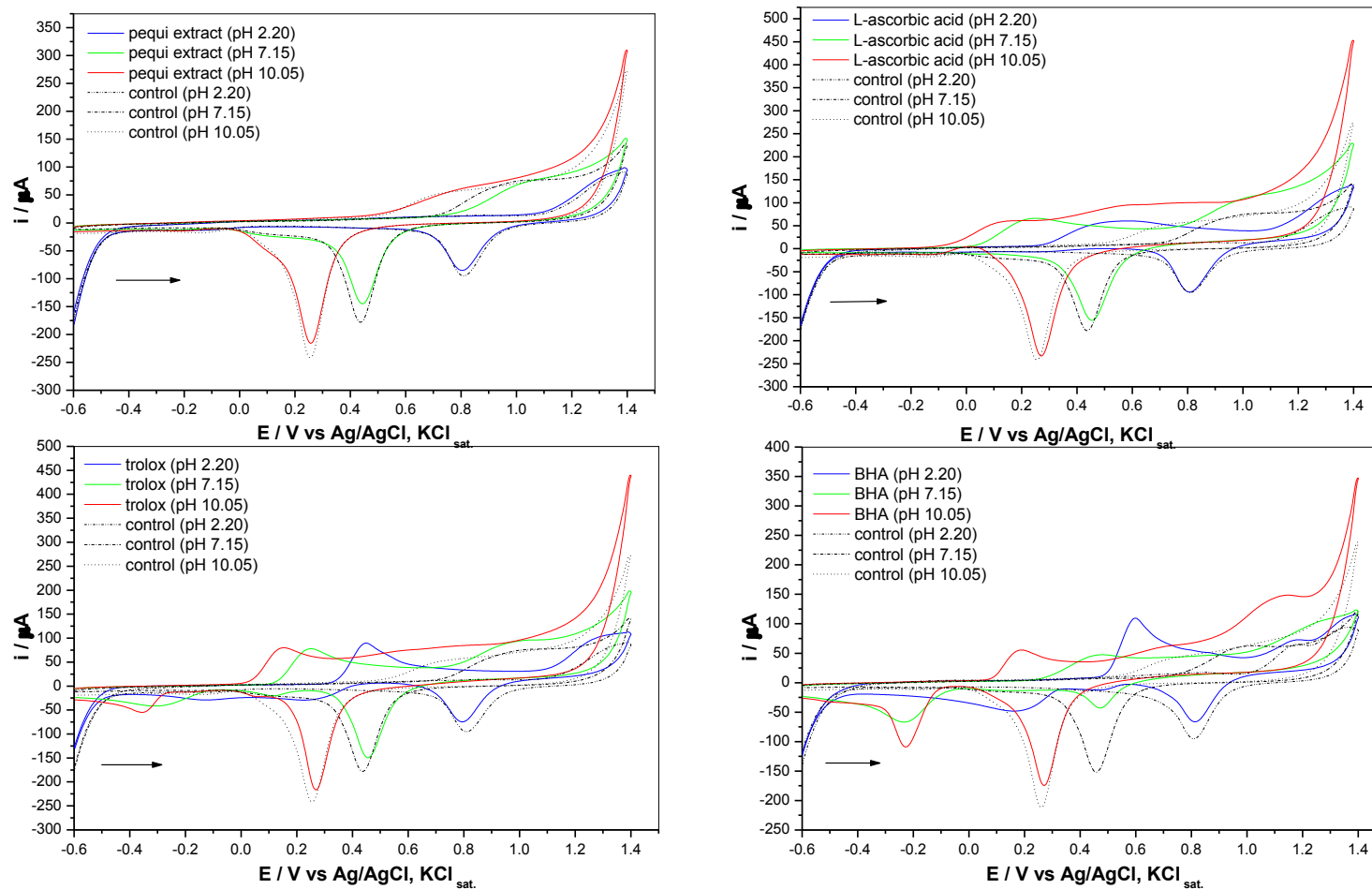
supporting electrolyte. The BHA showed better defined peaks, close to the potential  $-0.200$  V at pH 7.15 and 10.05.

Regarding the reading in the oxidation direction, all the analyzed compounds presented some anodic peak. Trolox (at pH 2.20, 7.15 and 10.05) and BHA (at pH 2.20 and 10.05) presented more defined peaks, with increased current intensity, which indicates increased sensitivity of the technique used for these compounds, since all antioxidant standards were analyzed in the same concentration ( $1.0 \text{ mmol L}^{-1}$ ). It was also observed for these peaks that the pH affected the displacement of the potential for values closer to 0 V, which improves the tendency of the antioxidant standard to oxidize, in the following order: pH  $10.05 > 7.15 > 2.20$ .

The potential variation can also be understood according to the Nernst equation (equation 1):

$$E = E^{\circ} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{products}]}{[\text{reagents}]} \quad (1)$$

where, E is the real potential (V) under nonstandard conditions;  $E^{\circ}$  is the tabulated standard potential (V); R is the universal gas constant ( $8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ); T is the absolute temperature (K); n is the number of electrons involved on the reaction stoichiometry; and F is the Faraday constant ( $96,485 \text{ C mol}^{-1}$ ). It demonstrated that the potential depends on the concentration of the species in the solution and that it can be changed in case of variation in the concentration of the products formed, depending on the medium pH. The same initial concentration has been used for all the antioxidant standards, but the structural change of the molecules varies differently for each compound (according to the  $pK_a$ , for instance), depending on the medium pH. It can also make the redox reaction more thermodynamically favorable for certain substances.



**Figure 1.** Cyclic voltammograms of pequi pulp extract and antioxidant standards L-ascorbic acid, BHA and trolox in  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  Britton-Robinson buffer, pH 2.20, 7.15 and 10.05. Scan of -0.6 to +1.4 V, at  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . Concentration of antioxidants standards:  $1.0 \text{ mmol L}^{-1}$ .

In a study for the assessment of the antioxidant capacity of natural compounds, Arteaga *et al.*<sup>17</sup> also verified that, as pH increased, the oxidation potentials changed to less positive values. It implies that oxidation becomes easier and may be related to the deprotonation of compounds. Alberto *et al.*<sup>31</sup> also reported that the thermochemical viability of the electron transfer process (SET mechanism) of trolox increased with the degree of deprotonation of the antioxidant standard, for different free radicals.

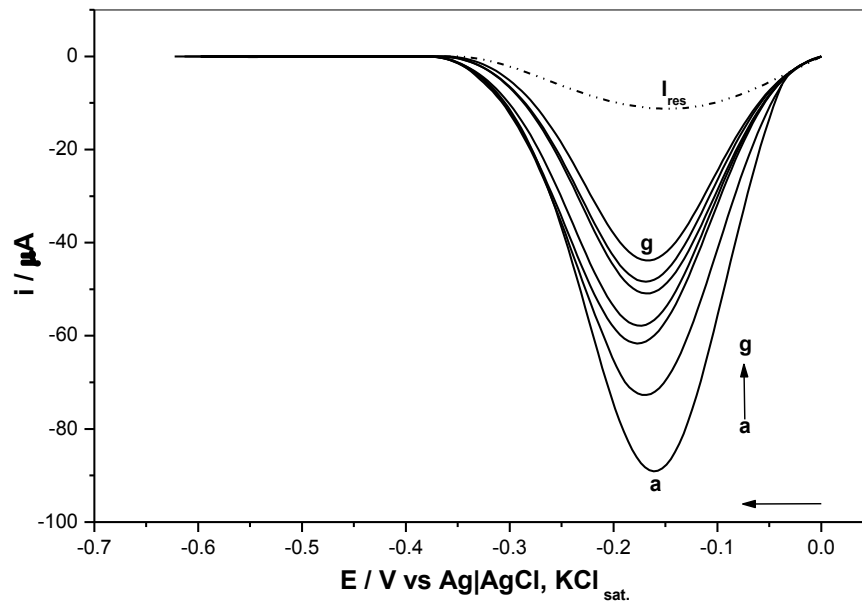
The CV technique showed that all the evaluated compounds, except for BHA and trolox, were not electroactive at the range of 0 to  $-0.6$  V, a potential window used for subsequent monitoring of the cathodic current of  $O_2$ .

### **In vitro total antioxidant capacity assessment expressed by the antioxidant capacity coefficient (K)**

Figure 2 shows the voltammograms of oxygen electroreduction in  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  Britton-Robinson buffer, pH 7.15, with the addition of the pequi pulp extract. This Figure shows that the  $O_2$  current decreased as the pequi extract concentration (a  $\rightarrow$  g) increased. This behavior was also verified for the antioxidant standards for all pH values analyzed. The proportion of oxygen species in the solution decreases when it reacts with the antioxidant, according to the voltammetric readings, since less  $O_2$  molecules are available to receive electrons from the working electrode. Therefore, the intensity of the cathodic current of the oxidant decreases.

The effect of the increased antioxidant concentration was assessed (depending on the added volume) and the medium pH on the  $O_2$  current decay rate  $[(I_{pc} - I_{res})/(I_{p0} - I_{res})]$ . No effect of the pH *versus* volume interaction ( $p \geq 0.05$ ) was observed. Therefore, the factors pH and volume worked independently and were studied separately for each sample with antioxidant capacity. Based on the averages of the current values obtained by voltammetric readings, a regression analysis was applied to the volume factor  $[(I_{pc} - I_{res})/(I_{p0} - I_{res}) \times \text{compound volume added}]$ . The K was determined for the evaluated compounds (Table 1) through the angular coefficient of each curve obtained in this analysis. Figure 3 presents the linear regression curves for the pequi extract, gallic acid, L-ascorbic acid and trolox.

Table 1 shows that the mean values of K ranged between  $0.768 \pm 0.112 \text{ mL}^{-1}$  and  $2.222 \pm 0.172 \text{ mL}^{-1}$ , respectively for  $\alpha$ -tocopherol (pH 2.20) and L-ascorbic acid (pH 10.05).

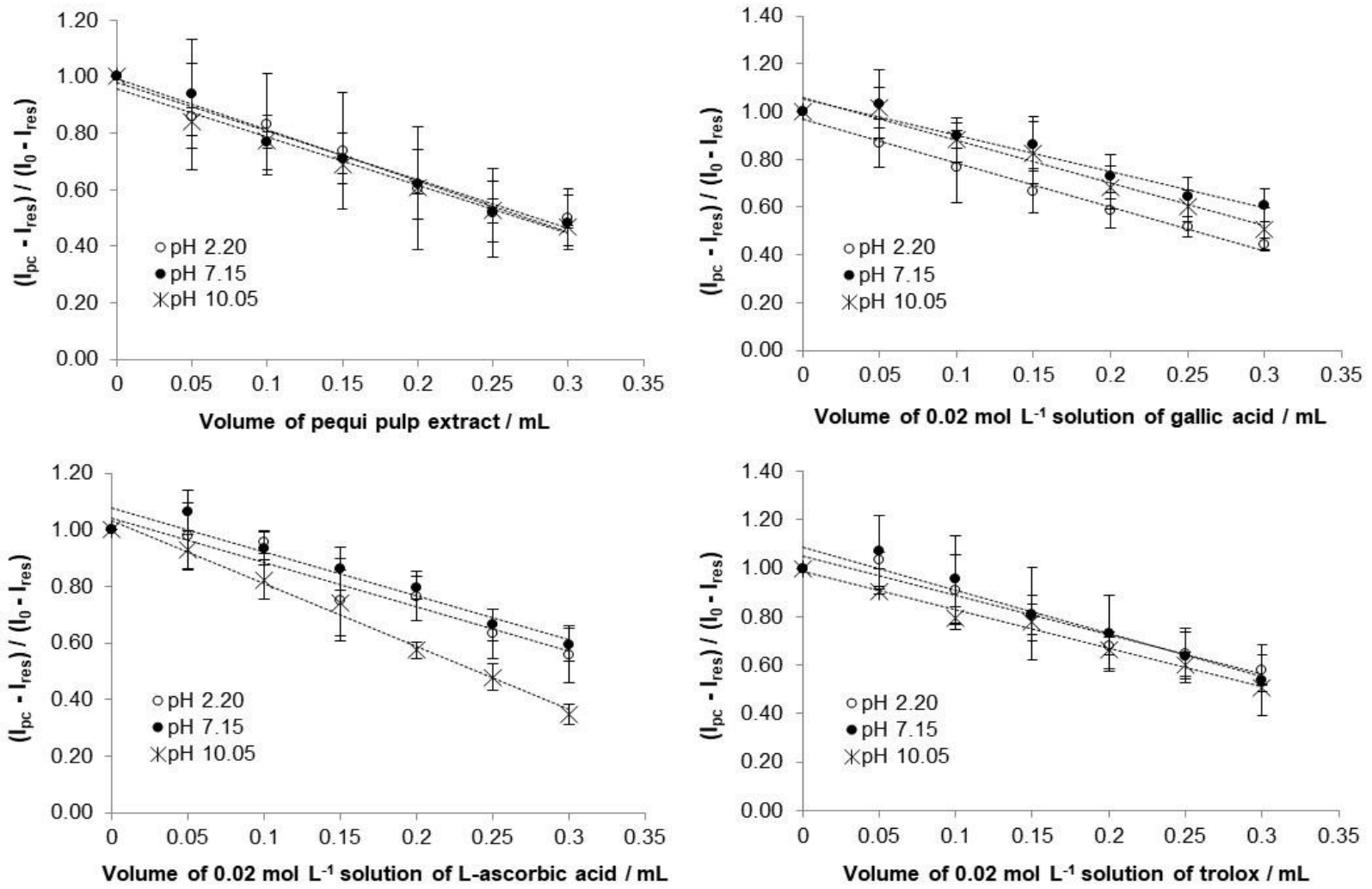


**Figure 2.** Differential pulse voltammograms of the oxygen electroreduction in 0.1 mol L<sup>-1</sup> Britton-Robinson buffer, pH 7.15; in the absence of extract of the pequi pulp (a) and with the addition of the extract (b to g), being (b): 50 μL; (c): 100 μL; (d): 150 μL; (e): 200 μL, (f): 250 μL and (g): 300 μL. I<sub>res</sub>: residual current of the support electrolyte without addition of oxygen and of pequi pulp extract.

**Table 1.** Antioxidant capacity coefficient (K) for the pequi pulp extract and several antioxidant patterns (found in pequi and antioxidants recognized as reference standards), at different pH values

Compound	Coefficient of antioxidant capacity / mL <sup>-1</sup>		
	pH 2.20	pH 7.15	pH 10.05
Extract of pequi pulp	1.719 ± 0.202	1.805 ± 0.234	1.704 ± 0.139
L-Ascorbic acid	1.577 ± 0.266	1.542 ± 0.121	2.222 ± 0.172
Citric acid	1.676 ± 0.476	2.120 ± 0.239	2.006 ± 0.297
<i>p</i> -Coumaric acid	2.149 ± 0.084	1.756 ± 0.344	1.587 ± 0.241
Gallic acid	1.826 ± 0.249	1.523 ± 0.315	1.784 ± 0.251
α-Tocopherol	0.768 ± 0.112	1.355 ± 0.399	1.527 ± 0.448
BHA	2.214 ± 0.271	1.486 ± 0.109	1.534 ± 0.224
BHT	1.910 ± 0.379	1.620 ± 0.210	1.355 ± 0.396
Trolox	1.616 ± 0.292	1.773 ± 0.378	1.587 ± 0.122

Mean values ± standard deviation (n = 3). BHA: 2(3)-*t*-butyl-4-hydroxyanisole; BHT: 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol.



**Figure 3.** Variation curves of cathodic oxygen current rate as a function of the volume of pequi pulp extract and 0.02 mol L<sup>-1</sup> solution of compounds with antioxidant capacity (gallic acid, L-ascorbic acid and trolox) in 0.1 mol L<sup>-1</sup> Britton-Robinson buffer, pH 2.20, 7.15 e 10.05.

A principal component analysis of the antioxidant compounds depending on K and pH was applied (Figure 4) for better understanding of the results described in Table 1. The two first components explained 88.14%.

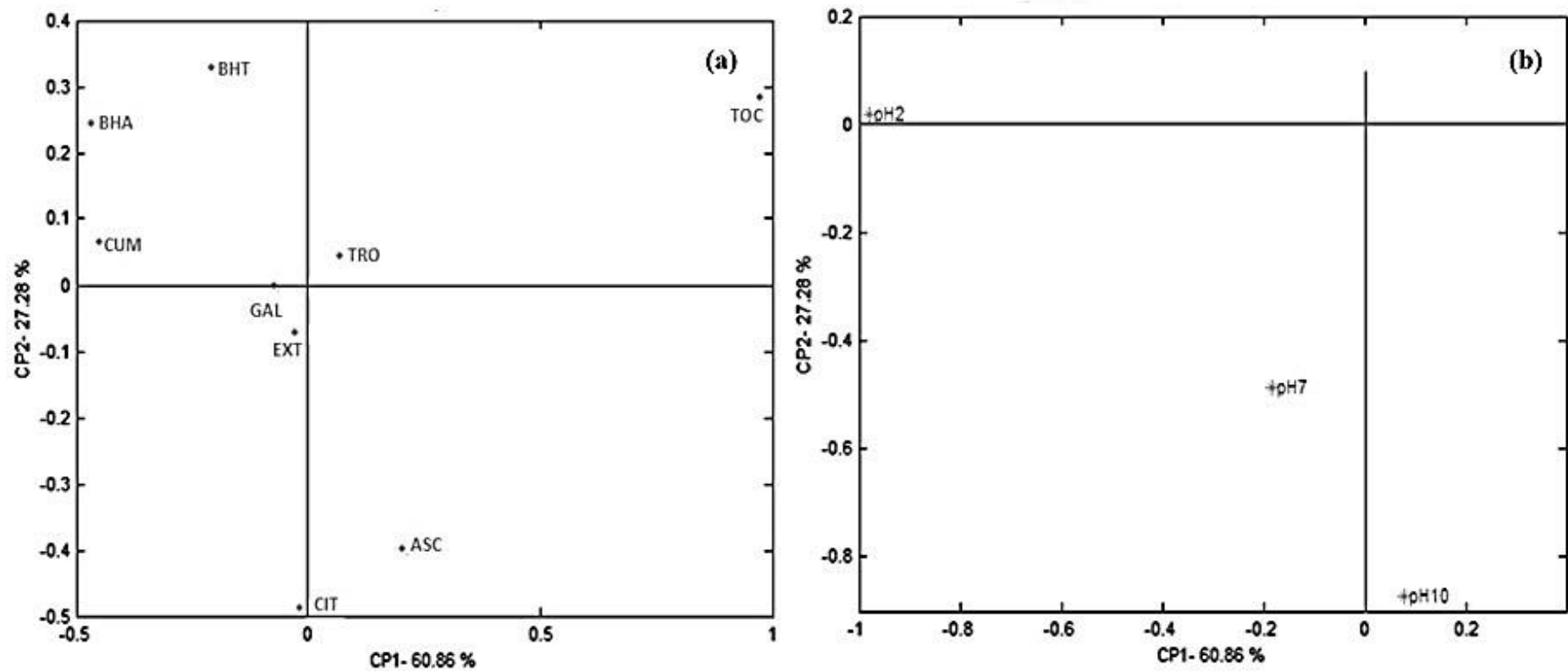
Figure 4 shows the distribution of the antioxidants in relation to the principal components (a) and a projection of the groups in relation to pH (b). The simultaneous assessment of Figures 4a and 4b reveals a distribution of the antioxidant compounds, according to the K and pH values. Therefore, it is possible to infer that the compounds *p*-coumaric acid, BHA and BHT presented better antioxidant behavior at pH 2.20; L-ascorbic acid, at pH 10.05; and pequi extract and citric acid, at pH 7.15. The other pH values seem to affect the pequi extract, which was also verified for citric acid, in relation to pH 10.05. The antioxidant capacity of gallic acid was affected by pH 2.20 and 7.15.

The increased antioxidant capacity observed at more alkaline pH values is directly related to the deprotonation of certain compounds, and may involve different mechanisms of antioxidant capacity, such as the donation of hydrogen atom or electrons, or the coexistence of both mechanisms.<sup>32</sup> In this work, this justification can be attributed to the ascorbic and citric acids, since the greater antioxidant tendency of these compounds was verified at pH values in which both were deprotonated.

Figure 4 shows that the compound  $\alpha$ -tocopherol presented the greatest difference among those analyzed, which may be explained by its lower solubility in the supporting electrolyte, compared to the other compounds under study.

The antioxidant capacity of trolox and  $\alpha$ -tocopherol standards was not affected by pH under the experimental conditions of the present study. It can be explained by the fact that the K value is directly related to the reaction stoichiometry (how much oxygen reacts with an antioxidant molecule), which is not necessarily altered by the medium pH variation (differently from that described for the potential), since K also depends on the reaction kinetics.

It must be highlighted that the distribution of the antioxidant standards may be related to the similarity of the chemical structure of the compounds. Among the compounds assessed, greater structural similarity was found between trolox and  $\alpha$ -tocopherol, and between BHA and BHT.



**Figure 4.** Principal components analysis: pequi extract and antioxidant compounds as a function of pH and antioxidant capacity coefficient (a), and pH as a function of extract and compounds analyzed (b). Legend: EXT: pequi pulp extract; ASC: L-ascorbic acid; CIT: citric acid; CUM: *p*-coumaric acid; GAL: gallic acid; TOC:  $\alpha$ -tocopherol; BHA: butyl hydroxyanisole, BHT: butyl hydroxytoluene and TRO: trolox.

Figure 4 shows that BHA, BHT and *p*-coumaric acid seem to present similar characteristics for the antioxidant capacity, which may be related to the presence of a phenol group in the chemical structure of these compounds.

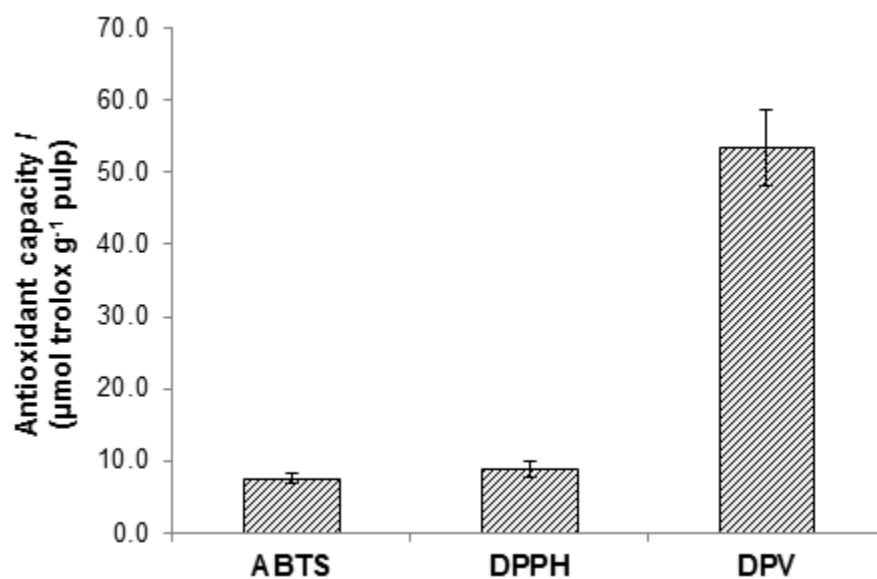
Ahmed and Shakeel<sup>33</sup> state that the behavior and the intensity of the reduction of the oxidizing agent vary according to the structure of the antioxidant compounds. These authors attributed the variation in the mode and magnitude of elimination of the superoxide radical to the structure-activity relationship of different flavonoids: the presence of phenol groups in the chemical structure of the molecule, which increases its antioxidant capacity; as well as the presence of a planar structure and unsaturations, since they enhance the stability of the phenoxyl radical formed.

Figure 4 shows that the pequi pulp extract and the gallic acid presented similar distribution. Therefore, based on the values of the antioxidant capacity coefficient obtained in this study, the antioxidant capacity of the pequi extract can be strongly attributed to the presence of gallic acid in its composition, compared to the other antioxidant standards assessed. Gallic acid was described as the predominant compound among the phenolic compounds evaluated by Machado *et al.*<sup>34</sup> in the aqueous extract of pequi pulp (from the region of Montes Claros, MG, Brazil). Almeida *et al.*<sup>35</sup> identified gallic acid, by using HPLC-DAD-MS (high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to mass spectrometry), as the major phenolic compound observed in the lyophilized pequi pulp, corresponding to 31% of the total phenolics.

The antioxidant potential of gallic acid was also observed in a study carried out by Arteaga *et al.*,<sup>17</sup> which highlighted the presence of adjacent phenolic groups, prone to oxidation, and a carboxyl group that favors the stabilization of the species resulting from the oxidative process.

### **In vitro evaluation of the total antioxidant capacity expressed in DPV<sub>TEAC</sub>, ABTS<sub>TEAC</sub> and DPPH<sub>TEAC</sub>**

Figure 5 presents the results of the antioxidant capacity of pequi pulp, evaluated by the DPV, ABTS and DPPH tests, expressed in trolox standard, TEAC value ( $\mu\text{mol}$  of trolox  $\text{g}^{-1}$  pequi pulp). This Figure shows that the greatest antioxidant capacity was obtained by the DPV electrochemical test ( $53.43 \pm 5.14 \mu\text{mol trolox g}^{-1}$  pulp), in comparison with the ABTS spectrophotometric tests ( $7.62 \pm 0.66 \mu\text{mol trolox g}^{-1}$  pulp) and DPPH ( $8.88 \pm 1.08 \mu\text{mol trolox g}^{-1}$  pulp).



**Figure 5.** Antioxidant capacity of pequi pulp expressed in trolox equivalent (wet basis), according to electrochemical differential pulse voltammetry (DPV) and spectrophotometric assays of the radical cation ABTS<sup>•+</sup> and the radical DPPH. Mean ± standard deviation (n = 3).

Nascimento *et al.*<sup>36</sup> assessed pequi from São Miguel do Araguaia, GO, Brazil, by the DPPH test and found 12.0 µmol trolox g<sup>-1</sup> of lyophilized pequi pulp. Rufino *et al.*<sup>37</sup> conducted a study to evaluate the antioxidant capacity of tropical nontraditional Brazilian fruits and found values ranging from 6.3 ± 0.2 to 153.0 ± 2.6 µmol trolox g<sup>-1</sup> of fruit, respectively, for umbu and camu-camu, using the ABTS test.

It is known that the total antioxidant capacity of a food matrix is affected by the synergistic activity of its bioactive components.<sup>32</sup> Therefore, the best result was found by the DPV test, possibly because this technique allows the joint evaluation of the reducing power of pequi bioactive components (phenolic compounds, ascorbic acid and carotenoids). On the other hand, the ABTS and DPPH tests are more specific for polyphenols, and may underestimate the value obtained. The higher sensitivity of the voltammetric electrochemical test applied in this study can also be attributed to the thermodynamic enhancement of the reaction mechanism involved between the antioxidant compounds of pequi and oxygen (oxidizing agent).

Sawai *et al.*<sup>38</sup> state that the DPPH<sup>•</sup> radical test is not the most appropriate to evaluate the antioxidant potential of lipophilic compounds, including carotenoids. Therefore, this trial is more efficient to evaluate the antioxidant capacity of phenolic compounds, and it underestimates the antioxidant capacity of pequi pulp.

Schaich *et al.*<sup>39</sup> mentioned several factors that limit the use of the ABTS and DPPH tests, such as disregard for chemical aspects, including the effects of solvents, concentration, medium pH, radical solubility and, particularly, reaction kinetics; use of stable radicals with stereochemical hindrance instead of easy access and short duration small radicals (example: OH<sup>•</sup> and O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), for better simulation of *in vivo* occurrence; and lack of standardization of the experimental procedures, especially the expression of the results, which prevents comparing the results from different researchers.

Besides, the spectrophotometric assays ABTS and DPPH are affected by the activity of interfering agents present in the food matrix. Oliveira *et al.*<sup>4</sup> described the ascorbic acid as an interfering agent in the evaluation of the antioxidant capacity of anthocyanins in foods. Schaich *et al.*<sup>39</sup> cited the interference caused by the oxygen dissolved in the medium and the use of organic solvents (for instance, methanol in the DPPH test).

The antioxidant capacity of a matrix is affected by several factors, such as solubility and the chemical structure of the bioactive compounds, chemical quality of the oxidizing agent, reaction mechanism, specific experimental conditions, among others. Therefore, it is difficult to compare the TEAC values obtained by different tests, since the different results can be attributed to the characteristics of each technique.<sup>40</sup>

Arteaga *et al.*<sup>17</sup> report that the electrochemical tests are more advantageous than the DPPH test, since they present greater precision and speed of analysis; the tests can be carried out at different pH values, and on different reaction media, which allows the comparison between the antioxidant capacities of molecules under different experimental conditions; they are less expensive, mainly due to the use of less organic solvents, which also reduces the waste generated.

Therefore, the voltammetric test is a viable alternative for the evaluation of the antioxidant capacity of food matrices.

## **Conclusions**

The results obtained in this study lead to the inference that the pequi pulp has potential to work as a reducing agent when compared to the antioxidant standards evaluated. Its antioxidant capacity was strongly attributed to the presence of gallic acid in its composition. Besides, it was observed that the pH of solution affects the activity of most antioxidant compounds and cannot be neglected in such analyses.

Among the three *in vitro* assays applied, ABTS, DPPH and DPV, the best result for antioxidant capacity of the pequi pulp was obtained by the voltammetric test and expressed in trolox standard equivalent. Therefore, this protocol was efficient to evaluate the antioxidant capacity. It is also an alternative methodology to carry out this analysis, mainly for providing relevant information for the redox process that cannot be obtained from the traditional spectrophotometric assays.

### Supplementary Information

Supplementary information is available free of charge at <http://jbcs.org.br> as a PDF file.

### Acknowledgments

The authors are grateful to financial support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil) and Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (IFES, Brazil).

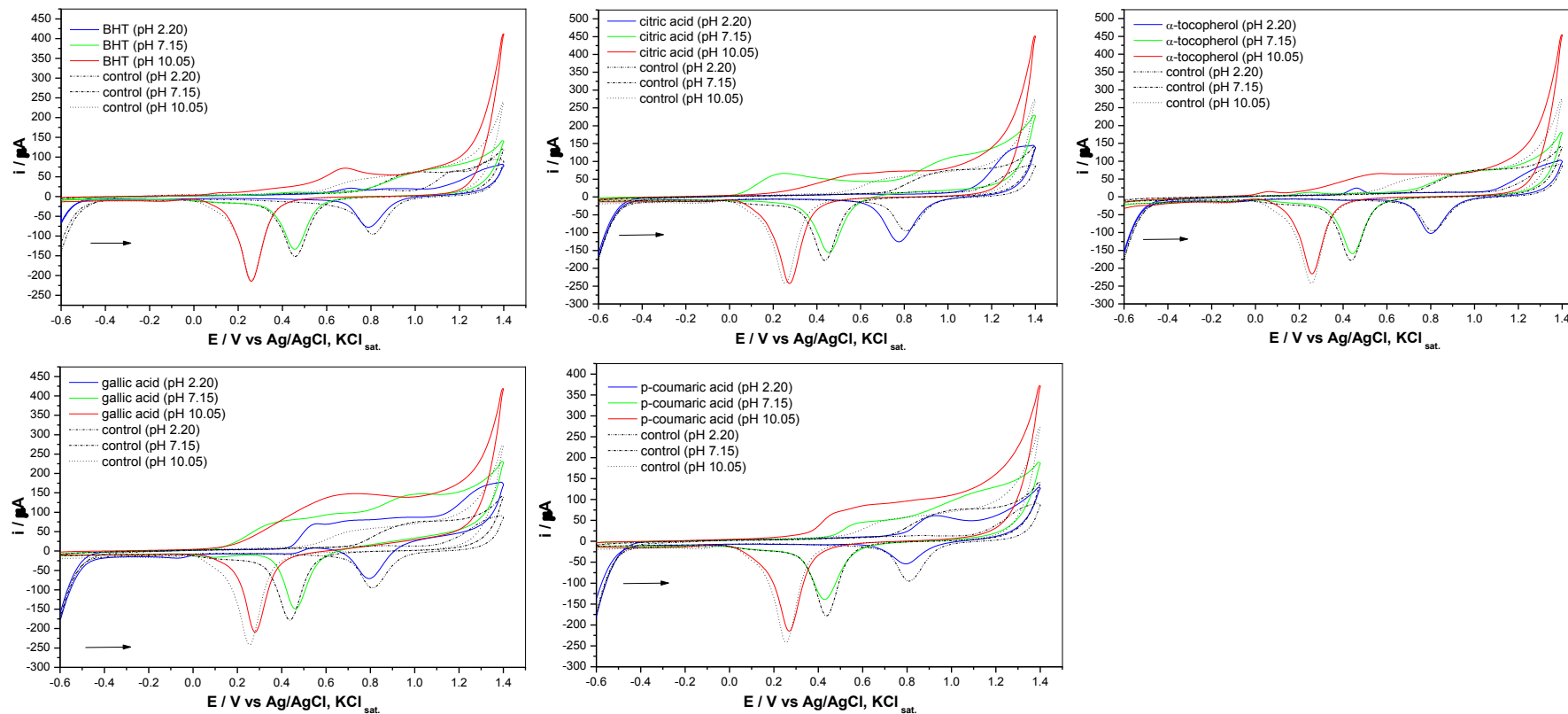
### References

1. Shahidi, F.; Zhong, Y.; *J. Funct. Foods* **2015**, *18*, 757.
2. Apak, R.; Özyürek, M.; Güçlü, K.; Çapanoğlu, E.; *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 997.
3. Apak, R.; Özyürek, M.; Güçlü, K.; Çapanoğlu, E.; *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 1028.
4. Oliveira, I. R. N.; Teófilo, R. F.; de Oliveira, E. B.; Ramos, A. M.; Barros, F. A. R.; Maia, M. P.; Stringheta, P. C.; *Int. J. Food Sci. Technol.* **2017**, *52*, 511.
5. Alves, C. Q.; David, J. M.; David, J. P.; Bahia, M. V.; Aguiar, R. M.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 2202.
6. Dar, R. A.; Brahman, P. K.; Khurana, N.; Wagay, J. A.; Lone, Z. A.; Ganaie, M. A.; Pitre, K. S.; *Arab. J. Chem.* **2017**, *10*, S1119.
7. Halliwell, B.; *Lancet* **2000**, *355*, 1179.
8. de Macêdo, I. Y. L.; Garcia, L. F.; Oliveira-Neto, J. R.; Leite, K. C. S.; Ferreira, V. S.; Ghedini, P. C.; Gil, E. S.; *Food Chem.* **2017**, *217*, 326.

9. Peixoto, C. R. M.; Fraga, S.; Justim, J. R.; Gomes, M. S.; Carvalho, D. G.; Jarenkow, J. A.; Moura, N. F.; *J. Electroanal. Chem.* **2017**, *799*, 519.
10. Cruz, D.; Barroso, M. F.; Ramalhosa, M. J.; Coelho, A.; da Silva, H.; Duarte, A. J.; González-García, M. B.; Carvalho, A. P.; Delerue-Matos, C.; *J. Electroanal. Chem.* **2016**, *763*, 110.
11. Falcão, S. I.; Tomás, A.; Freire, C.; Vilas-Boas, M.; *Eur. Food Res. Technol.* **2016**, *242*, 1393.
12. Ferreira, R. D. Q.; Greco, S. J.; Delarmelina, M.; Weber, K. C.; *Electrochim. Acta* **2015**, *163*, 161.
13. Lugonja, N. M.; Stanković, D. M.; Miličić, B.; Spasić, S. D.; Marinković, V.; Vrvic, M. M.; *Food Chem.* **2018**, *240*, 567.
14. Hoyos-Arbeláez, J.; Vázquez, M.; Contreras-Calderón, J.; *Food Chem.* **2017**, *221*, 1371.
15. Oliveira-Neto, J. R.; Rezende, S. G.; Reis, C. F.; Benjamin, S. R.; Rocha, M. L.; Gil, E. S.; *Food Chem.* **2016**, *190*, 506.
16. David, I. G.; Bizgan, A. M. C.; Popa, D. E.; Buleandra, M.; Moldovan, Z.; Badea, I. A.; Tekiner, T. A.; Basaga, H.; Ciucu, A. A.; *Food Chem.* **2015**, *173*, 1059.
17. Arteaga, J. F.; Ruiz-Montoya, M.; Palma, A.; Alonso-Garrido, G.; Pintado, S.; Rodríguez-Mellado, J. M.; *Molecules* **2012**, *17*, 5126.
18. Alves, A. M.; Fernandes, D. C.; Sousa, A. G. O.; Naves, R. V.; Naves, M. M. V.; *Brazilian J. Food Technol.* **2014**, *17*, 198.
19. Machado, M. T. C.; Mello, B. C. B. S.; Hubinger, M. D.; *J. Food Eng.* **2013**, *117*, 450.
20. Ribeiro, D. M.; Fernandes, D. C.; Alves, A. M.; Naves, M. M. V.; *Food Sci. Technol.* **2014**, *34*, 507.
21. Azevedo-Meleiro, C. H.; Rodriguez-Amaya, D. B.; *J. Food Compos. Anal.* **2004**, *17*, 385.
22. Rufino, M. S. M.; Alves, R. E.; de Brito, E. S.; Morais, S. M.; Sampaio, C. G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F. D.; *Comun. Tec. - EMBRAPA, Cent. Pesqui. Agropec. Trop. Umido* **2007**, *128*, 1. Available at <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/426954/1/Cot128.pdf>, accessed in February 2018.
23. Korotkova, E. I.; Karbainov, Y. A.; Shevchuk, A. V.; *J. Electroanal. Chem.* **2002**, *518*, 56.

24. Zoski, C. G.; *Handbook of Electrochemistry*, 4<sup>th</sup> ed.; Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 2007.
25. Solomons, T. W. G.; Fryhle, C. B.; *Química orgânica*; vol. 1, 10<sup>a</sup> ed.; LTC: Rio de Janeiro, Brasil, 2016.
26. *OriginLab*; version 8.0, OriginLab Corp., Northampton, MA, USA, 2007.
27. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C.; *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231.
28. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C.; *LWT - Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25.
29. *Statistical Analysis System*, SAS Procedures Guide, version 9.3; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2011.
30. *Matlab R2016a*; version 9.0; The MathWorks Inc., Natick, MA, USA, 2016.
31. Alberto, M. E.; Russo, N.; Grand, A.; Galano, A.; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 4642.
32. Altunkaya, A.; Gökmen, V.; Skibsted, L. H.; *Food Chem.* **2016**, *190*, 25.
33. Ahmed, S.; Shakeel, F.; *Czech J. Food Sci.* **2012**, *30*, 153.
34. Machado, M. T. C.; Mello, B. C. B. S.; Hubinger, M. D.; *Food Bioprod. Process.* **2015**, *95*, 304.
35. Almeida, M. R.; Darin, J. D. C.; Hernandez, L. C.; Aissa, A. F.; Chisté, R. C.; Mercadante, A. Z.; Antunes, L. M. G.; Bianchi, M. L. P.; *Plant Foods Hum. Nutr.* **2012**, *67*, 171.
36. do Nascimento, N. R. R.; Alves, A. M.; Silva, M. R.; Naves, M. M. V.; *Rev. Bras. Frutic.* **2017**, *39*, 1.
37. Rufino, M. S. M.; Alves, R. E.; de Brito, E. S.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F.; Mancini-Filho, J.; *Food Chem.* **2010**, *121*, 996.
38. Sawai, Y.; Moon, J. H.; Sakata, K.; Watanabe, N.; *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3598.
39. Schaich, K. M.; Tian, X.; Xie, J.; *J. Funct. Foods* **2015**, *14*, 111.
40. Cárdenas, A.; Gómez, M.; Frontana, C.; *J. Electroanal. Chem.* **2014**, *729*, 116.

## Supplementary Information



**Figure S1.** Cyclic voltammograms of antioxidant standards BHT, citric acid,  $\alpha$ -tocopherol, gallic acid and *p*-coumaric acid, in 0.1 mol L<sup>-1</sup> Britton-Robinson buffer, pH 2.20, pH 7.15 and pH 10.05. Scan of -0.6 to +1.4 V, at 100 mV s<sup>-1</sup>. Concentration of antioxidants standards: 1.0 mmol L<sup>-1</sup>.

## **CAPÍTULO 4**

---

### **Influência do processo de extração na capacidade antioxidante de extratos da polpa de pequi**

---

## Resumo

Este estudo objetivou avaliar o efeito do procedimento de extração na capacidade antioxidante de extratos da polpa de pequi: aquoso (AQ), alcoólico (ALC) e acetometílico (AM), obtidos respectivamente, pelos solventes água, etanol, e metanol seguido de acetona. A ação antioxidante foi expressa pelo coeficiente de capacidade antioxidante (K) obtido pelo teste eletroquímico (DPV) em diferentes valores de pH, e em equivalente ao trolox, por DPV (pH 7,15) e ensaios espectrofotométricos ABTS e DPPH. Determinou-se também os teores de carotenoides e fenólicos totais. Pelas análises de Componentes Principais e Cluster, observou-se maior similaridade de K entre AM, trolox e ácido gálico; AQ e ácido L-ascórbico, e ALC e  $\beta$ -caroteno, independente do pH. Segundo a análise de Cluster, maior diferenciação de K foi em pH 2,20. Em geral, melhor ação antioxidante (equivalente ao trolox) foi obtida para AM. AQ apresentou maior teor de fenólicos e ALC maior teor de carotenoides. Os métodos de extração influenciaram no conteúdo de compostos bioativos dos extratos de pequi e, portanto, na capacidade antioxidante.

**Palavras-chave:** solvente extrator, compostos bioativos, pequi, análise voltamétrica.

## Introdução

O consumo de frutas e hortaliças tem um importante papel na manutenção da saúde, pois fornecem quantidades apreciáveis de vitaminas, minerais, fibras, carotenoides e compostos fenólicos, que auxiliam na prevenção de doenças (Chang *et al.*, 2016). Os efeitos protetores à saúde são decorrentes, na maioria das vezes, da ação antioxidante dos compostos bioativos (Almeida *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013).

O Brasil, por apresentar características geográficas e climáticas favoráveis, possui uma diversidade de espécies frutíferas nativas e exóticas, ainda pouco exploradas na dieta alimentar (Schiassi *et al.*, 2018). Dentre estes frutos, tem-se o pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), nativo do cerrado brasileiro, tipicamente cultivado nas regiões sudeste, nordeste e central do país, com relevância econômica para a população local (Leão *et al.*, 2017). Embora não seja difundido em todo o país, o fruto apresenta potencial para a alimentação humana, tanto por sua elevada ocorrência, como por suas características sensoriais e nutricionais (Gonçalves *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, pesquisas têm relatado a importância do pequi quanto à capacidade antioxidante, atribuída, sobretudo à polpa, por sua composição rica em

compostos com propriedades antioxidantes (Nascimento *et al.*, 2017; Pinheiro *et al.*, 2018; Ribeiro *et al.*, 2014).

A avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* é realizada por diferentes metodologias, incluindo técnicas espectrofotométricas e eletroquímicas (Apak *et al.*, 2016). Os resultados da ação antioxidante são frequentemente correlacionados ao conteúdo de compostos bioativos predominantes nas matrizes alimentares analisadas, como teor de compostos fenólicos e carotenoides.

A obtenção dos compostos bioativos das matrizes vegetais é tradicionalmente realizada por processos de extração e concentração (Magalhães; Cardoso; Reis, 2018) sendo o uso de solventes orgânicos, o mais utilizado.

A elaboração dos extratos é um ponto crítico nas análises, pois os índices de capacidade antioxidante são diretamente influenciados pela eficiência do processo de extração.

Neste sentido, pesquisas têm buscado determinar condições ótimas para extração de compostos bioativos. Dentre os fatores avaliados, tem-se: método de extração, tipo de solvente extrator, tempo e temperatura de extração (Das; Eun, 2018; Machado; Mello; Hubinger, 2013; Mankanjuola, 2017). Em relação ao pequi, não foi encontrado até o momento, nenhum estudo que avaliasse o efeito do processo de extração no potencial antioxidante de extratos, determinado por técnicas voltamétricas.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo, avaliar a influência de três métodos de extração, à base de solventes, na capacidade antioxidante de extratos da polpa de pequi, estimada por ensaios voltamétrico e espectrofotométricos. Foram também avaliados os teores de compostos fenólicos e de carotenoides totais dos extratos.

## **Material e Métodos**

### **Reagentes e soluções**

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico de pureza (P.A.): acetona, ácido acético, ácido bórico, ácido fosfórico, etanol, hidróxido de sódio e metanol, adquiridos da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil); carbonato de sódio, sulfato de sódio e éter de petróleo, adquiridos da Dinâmica Química (Diadema, SP, Brasil), reativo de Follin Ciocalteau, adquirido da Êxodo Científica (Hortolândia, SP, Brasil); 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), persulfato de potássio, ácido L-ascórbico, ácido gálico,  $\beta$ -caroteno e ácido 6-hidroxi-

2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (trolox), adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA).

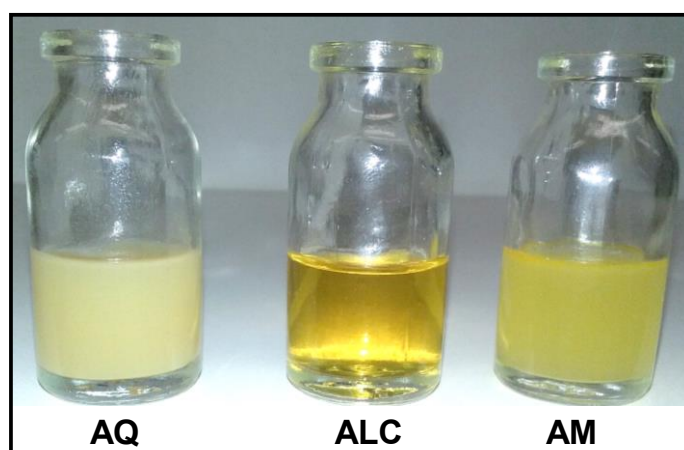
Nas análises voltamétricas, utilizou-se como eletrólito de suporte, tampão Britton-Robinson  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , em pH 2,20; 4,05; 7,15 e 10,05, preparado a partir de soluções  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de ácido acético, ácido bórico e ácido fosfórico. O pH foi ajustado com solução de hidróxido de sódio  $8,0 \text{ mol L}^{-1}$ , em pHmetro 827 pH lab (Metrohm, Herisau, Switzerland).

As soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura (resistividade de  $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), obtida pelo sistema de deionização Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). As soluções de uso dos padrões antioxidantes, utilizadas no ensaio eletroquímico, foram preparadas em etanol 95%, no dia da análise.

### Preparo dos extratos da polpa de pequi

A polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) foi obtida a partir do processamento dos frutos *in natura*, da safra de dezembro de 2015, provenientes do município de Santana de Pirapama, MG, Brasil. Foram utilizados frutos maduros, com acidez total titulável (ATT) igual a  $0,17 \pm 0,01\%$  (expressa em ácido cítrico, m/m); teor de sólidos solúveis totais (SST) igual a  $6,0 \pm 0,0 \text{ }^\circ\text{Brix}$  (Ferreira, 2017) e *ratio* (relação SST/ATT) igual a 35,29. Para obtenção da polpa, utilizou-se uma despulpadeira modelo bonina 0.25 df (Itametal/NPC Equipamentos, Itabuna, BA, Brasil).

A partir da polpa foram preparados três extratos, identificados como: extrato aquoso (AQ), extrato alcoólico (ALC) e extrato acetometílico (AM), de acordo com o solvente extrator (Figura 1).



**Figura 1.** Extratos da polpa de pequi aquoso (AQ), alcoólico (ALC) e acetometílico (AM).

O extrato acetometílico foi preparado conforme Rufino *et al.* (2007), utilizando-se primeiramente o solvente metanol 50% (v/v), seguido de reextração com acetona 70% (v/v).

Os extratos aquoso e alcoólico foram preparados conforme Machado; Mello; Hubinger (2013), com modificações. Portanto, pesou-se 20 g de polpa de pequi, previamente descongelada sob refrigeração e adicionou-se água destilada (AQ) ou etanol 95% (ALC), na proporção 1:3 (m/m, polpa:solvente). A mistura foi homogeneizada em frasco âmbar, utilizando-se um agitador magnético DiagTech DT3110H (São Paulo, SP, Brasil), a 750 rpm por 2 horas, em temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado a 15.000 rpm por 15 minutos a 25 °C, em centrífuga Beckman J2-MC (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, EUA) e o sobrenadante filtrado a vácuo, em papel filtro. O extrato foi acondicionado em frasco âmbar e armazenado a -18 °C.

## **Avaliação da capacidade antioxidante in vitro**

### **Ensaio eletroquímico**

As leituras voltamétricas foram realizadas utilizando-se um potenciostato/galvanostato, Autolab (Metrohm Penslab, Utrecht, The Netherlands), interfaciado a um computador pelo software General Purpose Electrochemical System (GPES), versão 4.9, utilizando-se uma célula eletroquímica de 50 mL com arranjo de três eletrodos: eletrodo de trabalho de ouro com área geométrica de 0,196 cm<sup>2</sup>, eletrodo auxiliar de platina e eletrodo de referência de Ag|AgCl, KCl 3,0 mol L<sup>-1</sup> (Metrohm, Herisau, Switzerland). Após cada leitura voltamétrica, realizou-se limpeza da superfície do eletrodo de trabalho, com polimento mecânico, por aproximadamente, 1 minuto, em feltro metalográfico, contendo suspensão de alumina com granulometria de 0,3 e 0,05 µm (Buehler, Lake Bluff, IL, USA). Em seguida, fez-se enxágue com água ultrapura (resistividade de 18,2 MΩ·cm a 25 °C), obtida pelo sistema de deionização Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

A avaliação da capacidade antioxidante total dos extratos da polpa de pequi foi realizada com base na eletrorredução do oxigênio, aplicando-se a técnica voltamétrica de pulso diferencial (DPV), conforme Pinheiro *et al.* (2018). A capacidade antioxidante foi expressa pelo coeficiente de capacidade antioxidante (K) em pH 2,20; 4,05; 7,15 e 10,05, e por equivalente ao trolox (µmol trolox mL<sup>-1</sup> extrato de pequi), a partir dos valores de intensidade da corrente catódica de oxigênio obtidos em pH 7,15, com concentração de

extrato variando entre 5 e 30 mL L<sup>-1</sup> e de trolox (padrão antioxidante) variando entre 100 e 600 µmol L<sup>-1</sup>.

Os valores médios de K dos três extratos de pequi foram comparados com os padrões antioxidantes ácido L-ascórbico, ácido gálico, β-caroteno e trolox.

### **Ensaio do cátion radical ABTS<sup>•+</sup>**

A avaliação da capacidade antioxidante pelo ensaio ABTS foi realizada segundo metodologia descrita por Re *et al.* (1999), com modificações. Foram misturados 5 mL de solução de ABTS 7,0 mmol L<sup>-1</sup> e 5 mL de solução de persulfato de potássio 2,45 mmol L<sup>-1</sup>, em frasco âmbar. A mistura ficou em repouso, ao abrigo da luz, durante 12 a 16 horas para geração do cátion cromóforo ABTS<sup>•+</sup>. Posteriormente, a solução do radical foi diluída com etanol 80% até que atingisse absorvância de 0,700 ± 0,005, a 734 nm, em espectrofotômetro BEL Photonics UV-M51 (Piracicaba, SP, Brasil), previamente calibrado com etanol 80%.

Em tubos de ensaio, adicionou-se 0,5 mL de diferentes diluições dos extratos da polpa de pequi e 3,5 mL de solução do radical ABTS<sup>•+</sup>, seguido de homogeneização em agitador de tubos. Após 6 minutos de reação, fez-se leitura da absorvância dos extratos, a 734 nm. Como controle, utilizou-se etanol 80% em substituição à adição dos extratos de pequi. Toda a análise foi realizada em ambiente com baixa luminosidade.

A capacidade antioxidante foi expressa em equivalente ao trolox (µmol trolox mL<sup>-1</sup> extrato de pequi), calculado com base na curva analítica de trolox, preparada com soluções do padrão, de concentrações variando entre 10 e 100 µmol L<sup>-1</sup>, conforme procedimento descrito para o preparo da curva dos extratos. A realização dos cálculos foi feita com base em Rufino *et al.* (2007).

### **Ensaio do radical DPPH<sup>•</sup>**

A determinação da capacidade antioxidante pelo ensaio DPPH foi realizada segundo metodologia descrita por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995), com modificações.

Em tubos de ensaio, foram adicionadas alíquotas de 0,1 mL de diferentes diluições dos extratos da polpa de pequi e 2,9 mL de solução metanólica 60 µmol L<sup>-1</sup> do radical DPPH<sup>•</sup>, previamente preparada. A mistura foi homogeneizada em agitador de tubos e deixada em repouso por 25 minutos no escuro. Após este período, fez-se leitura da absorvância a 515 nm, em espectrofotômetro BEL Photonics UV-M51 (Piracicaba, SP,

Brasil), previamente calibrado com metanol. O controle foi feito utilizando-se metanol em substituição à adição dos extratos de pequi.

Os resultados foram expressos em equivalente ao trolox ( $\mu\text{mol trolox mL}^{-1}$  extrato de pequi). Portanto, fez-se uma curva analítica de trolox, com soluções do padrão de concentrações variando entre 30 a 600  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , conforme procedimento descrito para o preparo da curva dos extratos. A realização dos cálculos foi feita com base em Rufino *et al.* (2007).

### **Determinação de compostos fenólicos totais**

O conteúdo de fenólicos totais foi estimado com base no ensaio de Folin-Ciocalteu (Swain; Hills, 1959), com modificações. Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,25 mL de extrato de pequi diluído e 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu 10%. A mistura foi agitada e deixada em repouso por 4 minutos. Adicionou-se 2 mL de solução de carbonato de sódio 7,5%, seguido de repouso por 90 minutos, em ambiente escuro, à temperatura ambiente. Os valores de absorbância foram medidos a 760 nm, em espectrofotômetro Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis (Santa Clara, CA, USA), previamente calibrado com água destilada. O teor de fenólicos totais foi obtido com base em uma curva padrão de ácido gálico, com concentrações entre 10 e 120  $\text{mg L}^{-1}$ , sendo os resultados expressos como equivalentes de ácido gálico ( $\mu\text{g GAE mL}^{-1}$  extrato de pequi).

### **Determinação de carotenoides totais**

O teor de carotenoides totais dos extratos de pequi foi estimado conforme metodologia descrita por Rodriguez-Amaya (2001), com modificações. 5 mL de extrato e 10 mL de éter de petróleo foram misturados em um funil de separação, seguido de agitação manual e descarte da fase aquosa. Fez-se lavagem da fase etérea (extrato de carotenoides em éter de petróleo) com água destilada por quatro vezes, descartando-se a fase aquosa. O extrato de carotenoides em éter de petróleo foi filtrado em papel filtro contendo sulfato de sódio anidro, para um balão de 25 mL. O volume foi completado com éter de petróleo e em seguida, fez-se leitura da absorbância a 450 nm, em espectrofotômetro Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis (Santa Clara, CA, USA), previamente calibrado com éter de petróleo. Toda a análise foi realizada em ambiente com baixa luminosidade. O teor de carotenoides totais foi obtido utilizando-se a equação 1:

$$CT \left( \frac{\mu g}{mL} \right) = \frac{A \times V \times 10^6}{A_{1cm}^{1\%} \times v \times 100} \quad (1)$$

onde, *CT* é o conteúdo de carotenoides totais, expresso em equivalente β-caroteno (μg carotenoides mL<sup>-1</sup> extrato de pequi); *A* é a absorbância da solução a 450 nm; *V* é o volume final da solução (mL); *A*<sub>1cm</sub><sup>1%</sup> é o coeficiente de absorvidade molar do β-caroteno em éter de petróleo (2.592) e *v* é o volume de extrato de pequi (mL).

### **Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média ± desvio-padrão (n = 3). Os valores de *K* foram determinados por meio de análise de regressão linear. Para identificação de fatores, componentes ou agrupamentos de compostos, utilizou-se Análise Fatorial por Componentes Principais. A adequação global da extração dos fatores foi verificada pelo teste de Esfericidade de Bartlett, a 5% de significância. Como auxílio à Análise de Componentes Principais (PCA), aplicou-se o método de Agrupamento Hierárquico utilizando-se das Distâncias Euclidianas para a formação de grupos, apresentado em forma de Dendrograma.

Para as comparações entre os extratos e compostos padrões antioxidantes, realizou-se previamente o teste de aderência à distribuição normal, Kolmogorov-Smirnov, e homogeneidade de variâncias, teste de Levene, ambos a 5% de significância. A comparação múltipla dos extratos e padrões antioxidantes foi realizada pela análise de variância (ANOVA) e pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, a 5% de significância. Os testes de Tukey (paramétrico) e de Mann-Whitney (não paramétrico), a 5% de significância, foram utilizados para comparação de médias. Correlação de Pearson também foi aplicada para estabelecer relação entre extratos e padrões antioxidantes, em função de *K*.

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) para Windows versão 20.0.

## Resultados e Discussão

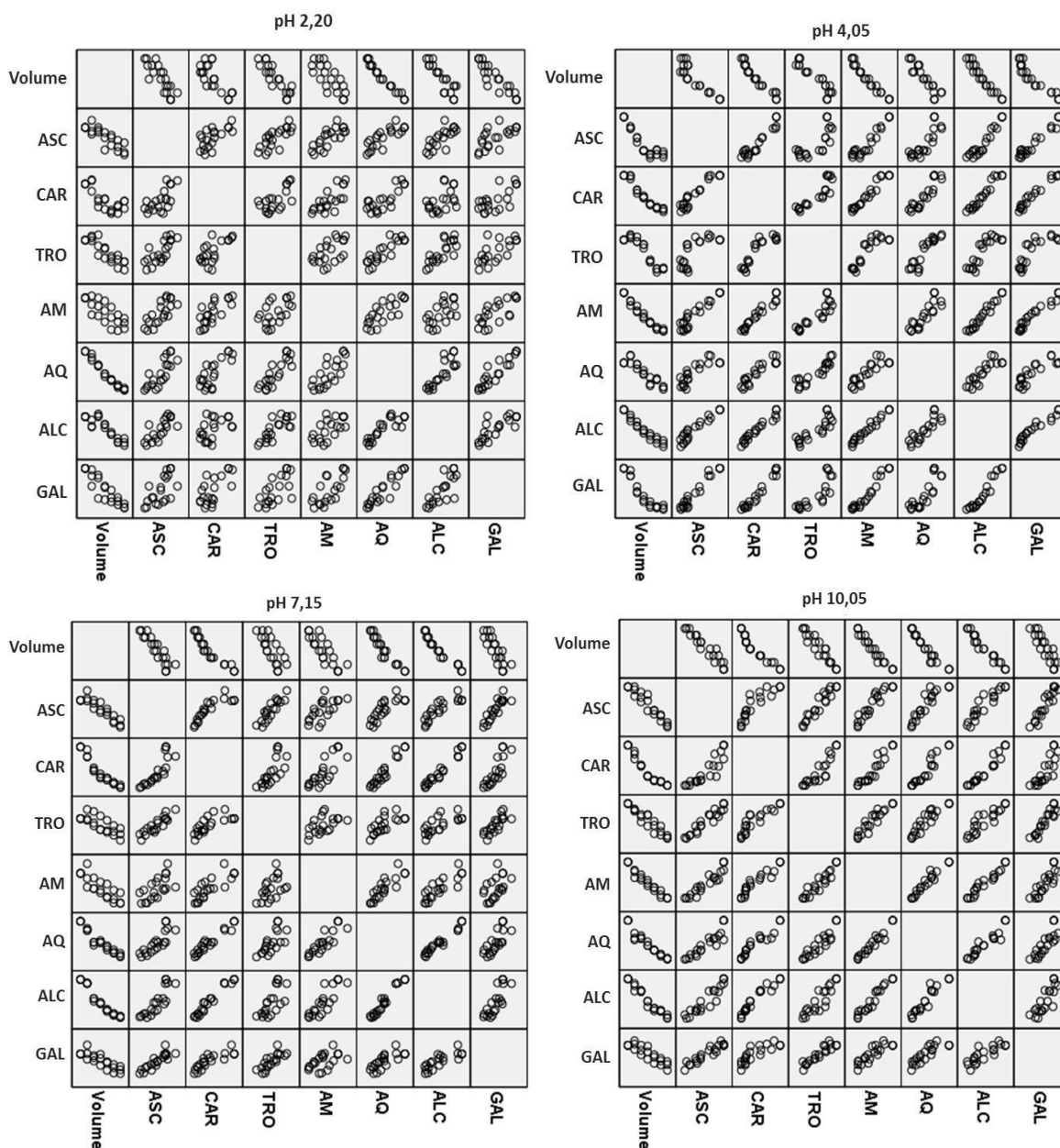
### Capacidade antioxidante expressa pelo coeficiente de capacidade antioxidante (K): ensaio eletroquímico

A partir da eletrorredução do oxigênio pelo ensaio voltamétrico foi possível observar uma diminuição da corrente de O<sub>2</sub> com adição dos extratos da polpa de pequi (aquoso, alcoólico e acetometílico) e dos padrões antioxidantes (ácido L-ascórbico, ácido gálico, β-caroteno e trolox), possibilitando avaliar a capacidade antioxidante destes extratos. O comportamento de diminuição da corrente de O<sub>2</sub> foi observado em todos os valores de pH estudados (pH 2,20; 4,05; 7,15 e 10,05). Os voltamogramas de eletrorredução do oxigênio em tampão Britton-Robinson 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 4,05, com adição dos extratos da polpa de pequi aquoso, alcoólico e acetometílico, bem como as curvas de variação da taxa de corrente em função do volume de extrato de pequi  $[(I_{pc} - I_{res})/(I_{p0} - I_{res}) = f(v)]$ , estão apresentados no Material Suplementar. Onde:  $I_{pc}$  é a corrente de pico catódica de O<sub>2</sub>, na presença de extrato de pequi;  $I_{res}$  é a corrente de pico catódica do eletrólito de suporte desoxigenado,  $I_{p0}$  é a corrente de pico catódica inicial de O<sub>2</sub>, sem adição de extrato e  $v$  é o volume de extrato de pequi.

Na Figura 2 estão apresentadas as dispersões entre o volume de extrato de pequi e de padrões antioxidantes e a taxa de corrente catódica de oxigênio, separadamente por pH. Nota-se uma relação inversa entre o aumento do volume e a taxa de corrente para todos os extratos e compostos estudados, comprovando o que foi descrito anteriormente.

Na Figura 2, é também possível observar a correlação da taxa de corrente entre cada extrato e padrão antioxidante, por pH do meio. Neste caso, correlação refere-se à dispersão dos pontos tendendo a uma curva linear crescente (correlação positiva) ou decrescente (correlação negativa). A dispersão dos pontos sem formação de um modelo linear representa uma correlação que não pode ser explicada linearmente, ou não correlação.

Comparando os extratos de pequi com o padrão trolox, observou-se que em pH 2,20, apenas as taxas de corrente dos extratos AQ e ALC apresentaram correlação positiva com a do trolox. Em pH 4,05 e 10,05, observou-se tendência de correlação positiva para todos os extratos. Já em pH 7,15, pode-se inferir que não houve correlação, já que os pontos não apresentaram uma tendência linear.



**Figura 2.** Dispersão entre volume de extratos de pequi e de padrões antioxidantes e taxa de corrente catódica de oxigênio. Extratos da polpa de pequi: AQ: extrato aquoso, ALC: extrato alcoólico e AM: extrato acetometílico. ASC: ácido L-ascórbico, GAL: ácido gálico, CAR:  $\beta$ -caroteno e TRO: trolox.

O coeficiente de capacidade antioxidante foi obtido a partir do coeficiente angular (em módulo) das curvas descritas pela análise de regressão  $[(I_{pc} - I_{res}) / (I_{p0} - I_{res}) = f(v)]$ , para cada extrato de pequi e padrões antioxidantes, em determinado pH do meio. Os valores médios de K ( $\pm$  desvio padrão) estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Coeficiente de capacidade antioxidante (K) de extratos da polpa de pequi e padrões antioxidantes, em diferentes valores de pH

Extratos/Compostos	Coeficiente de capacidade antioxidante / mL <sup>-1</sup>			
	pH 2,20*	pH 4,05*	pH 7,15**	pH 10,05*
AQ	1,949 ± 0,023 <sup>a</sup>	1,619 ± 0,067 <sup>c</sup>	1,852 ± 0,089 <sup>a</sup>	2,289 ± 0,105 <sup>a</sup>
ALC	1,333 ± 0,132 <sup>bc</sup>	1,927 ± 0,137 <sup>bcd</sup>	1,940 ± 0,034 <sup>a</sup>	1,897 ± 0,143 <sup>ab</sup>
AM	1,719 ± 0,202 <sup>ab</sup>	2,173 ± 0,044 <sup>a</sup>	1,805 ± 0,234 <sup>a</sup>	1,704 ± 0,139 <sup>b</sup>
CAR	1,027 ± 0,031 <sup>c</sup>	1,872 ± 0,020 <sup>cd</sup>	1,954 ± 0,096 <sup>a</sup>	1,985 ± 0,100 <sup>ab</sup>
ASC	1,577 ± 0,266 <sup>abc</sup>	1,846 ± 0,136 <sup>d</sup>	1,542 ± 0,121 <sup>a</sup>	2,222 ± 0,172 <sup>a</sup>
GAL	1,826 ± 0,249 <sup>ab</sup>	2,074 ± 0,023 <sup>abc</sup>	1,523 ± 0,315 <sup>a</sup>	1,784 ± 0,251 <sup>b</sup>
TRO	1,616 ± 0,292 <sup>ab</sup>	2,130 ± 0,034 <sup>ab</sup>	1,773 ± 0,378 <sup>a</sup>	1,587 ± 0,122 <sup>b</sup>

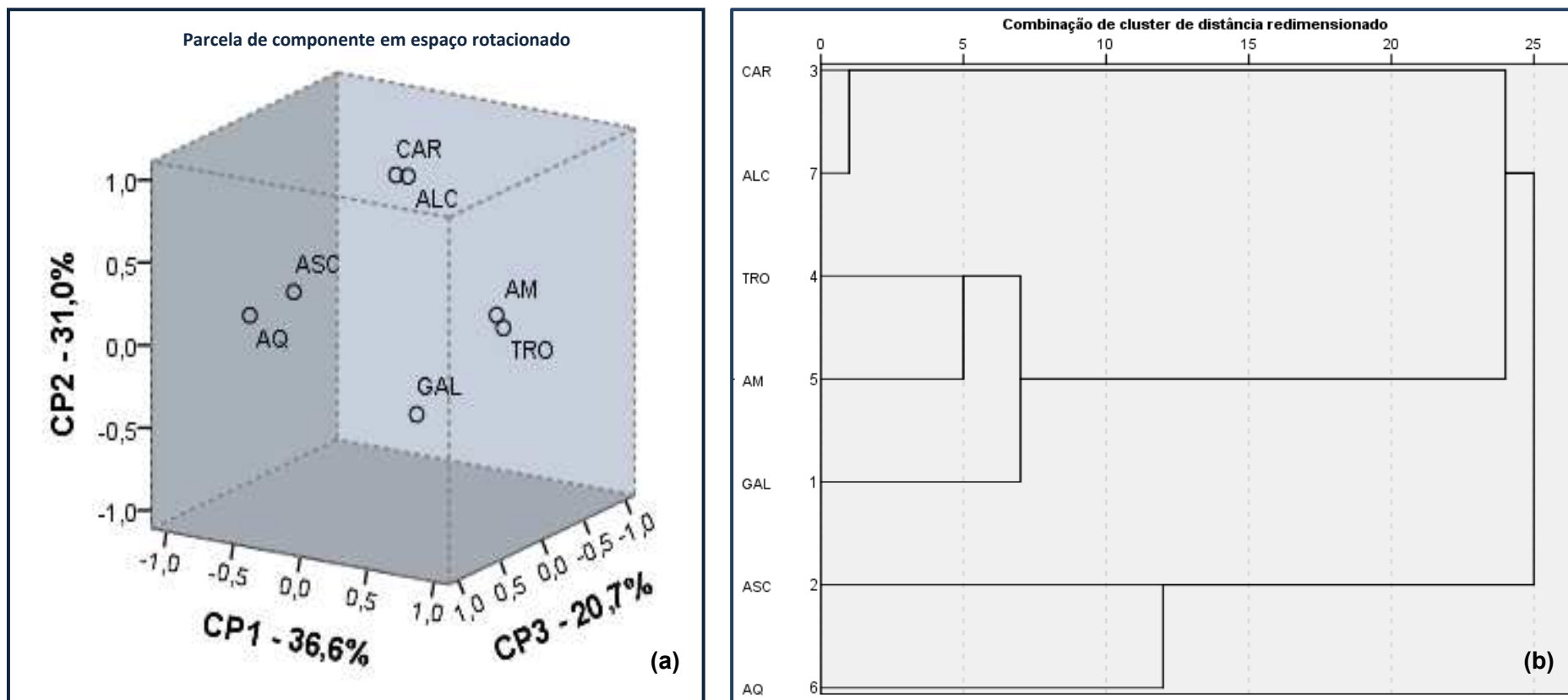
Média ± desvio-padrão (n=3). AQ: extrato de pequi aquoso; ALC: extrato alcoólico; AM: extrato acetometílico; ASC: ácido L-ascórbico; GAL: ácido gálico, CAR: β-caroteno e TRO: trolox. \*pH 2,20; 4,05 e 10,05: médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (p < 0,05). \*\*pH 7,15: médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis (p > 0,05).

Conforme Tabela 1 foram obtidos valores médios de K entre  $1,027 \pm 0,031 \text{ mL}^{-1}$  e  $2,289 \pm 0,105 \text{ mL}^{-1}$ , respectivamente para  $\beta$ -caroteno (pH 2,20) e extrato de pequi aquoso (pH 10,05). Pode-se observar uma variação do coeficiente de capacidade antioxidante ( $p < 0,05$ ) para os extratos e padrões estudados, em pH 2,20; 4,05 e 10,05. Em relação ao pH 7,15, não houve diferença ( $p > 0,05$ ) para a ação antioxidante entre os extratos e compostos.

Visando obter melhor agrupamento dos compostos avaliados em relação aos valores de K, foram realizadas Análises de Componentes Principais (PCA) e de Cluster (Figura 3).

A partir da PCA (Figura 3a) foram definidos três componentes, sendo que 36,6% da variância total são compartilhadas para a formação do primeiro componente, 31,0% para o segundo e 20,7% para o terceiro. Portanto, os três componentes permitiram uma explicação de 88,3%. O extrato de pequi acetometílico e o trolox foram os compostos que mais contribuíram para a formação do componente 1, o extrato alcoólico e o padrão  $\beta$ -caroteno para a formação do componente 2 e os padrões antioxidantes ácido L-ascórbico e ácido gálico para o componente 3.

Os grupamentos formados pela PCA podem ser melhor distinguidos pela análise de Cluster. Esta análise possibilitou a formação de dois grandes grupos para os extratos de pequi e padrões antioxidantes em relação aos valores de K (Figura 3b). O primeiro grupo apresentou mais elementos, sendo formado pelos extratos de pequi alcoólico e acetometílico e pelos padrões ácido gálico,  $\beta$ -caroteno e trolox. O segundo grupo foi formado apenas pelo extrato de pequi aquoso e ácido L-ascórbico. Pode-se ressaltar que dois subgrupos foram formados dentro do primeiro grande grupo, separando-se os extratos de pequi alcoólico e acetometílico. A classificação dos extratos em três subgrupos se deu em função dos diferentes procedimentos de extração/solventes extratores para obtenção de compostos bioativos da polpa de pequi, ou seja, composição química dos extratos finais, o que reflete diretamente na capacidade antioxidante dos extratos avaliados. Portanto, os resultados confirmam que o método utilizado para extração influencia na ação antioxidante estimada pelo protocolo voltamétrico aplicado.



**Figura 3.** Resultados das Análises de Componentes Principais (a) e de Cluster (b) para extratos da polpa de pequi e padrões antioxidantes, em função dos valores do coeficiente de capacidade antioxidante (K), independente do pH. AQ: extrato de pequi aquoso; ALC: extrato alcoólico; AM: extrato acetometílico; ASC: ácido L-ascórbico; GAL: ácido gálico, CAR:  $\beta$ -caroteno e TRO: trolox.

A correlação da capacidade antioxidante, expressa pelos valores médios de K, entre os extratos e os padrões antioxidantes, também foi avaliada. Os resultados estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Resultados da correlação de Pearson entre os compostos para as médias dos valores de K, independente do pH

Extratos de pequi	Correlação						
	AM	AQ	ALC	CAR	ASC	GAL	TRO
AM	1,000	-0,552	0,327	0,288	-0,015	0,480	0,615*
AQ	-0,552	1,000	-0,061	0,045	0,466	-0,229	-0,582*
ALC	0,327	-0,061	1,000	0,934**	0,412	-0,068	0,277

\*Correlação significativa ao nível de 5%. \*\*Correlação significativa ao nível de 1%. AQ: extrato de pequi aquoso; ALC: extrato alcoólico; AM: extrato acetometílico; ASC: ácido L-ascórbico; GAL: ácido gálico, CAR:  $\beta$ -caroteno e TRO: trolox.

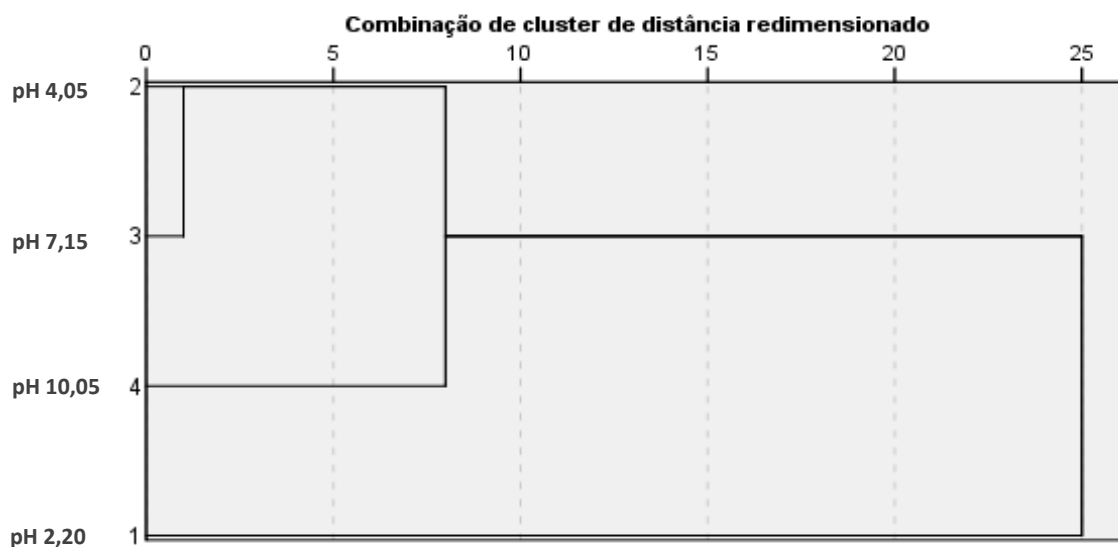
Avaliando as correlações significativas descritas na Tabela 2, pode-se observar significância positiva entre o extrato acetometílico e o trolox, e entre o extrato alcoólico e o padrão  $\beta$ -caroteno. Tais resultados podem ser relacionados com a formação dos grupos nas análises de Componentes Principais e de Cluster. Já para o extrato aquoso, verificou-se uma correlação negativa significativa entre o trolox.

Para melhor compreensão dos resultados obtidos pelo estudo dos valores de K em função do pH, foi realizada uma análise de Cluster (Figura 4).

A partir desta avaliação foi possível obter dois grandes grupos, sendo o primeiro formado pelos valores de pH 4,05; 7,15 e 10,05 e o segundo pelo pH 2,20. Houve a formação de dois subgrupos dentro do primeiro grupo, sendo o pH 4,05 e pH 7,15 classificados no mesmo subgrupo, conforme maior similaridade para os valores de K, em relação aos demais.

Estes resultados reforçam a importância do estudo do pH para avaliação da capacidade antioxidante de matrizes alimentares.

Pela Figura 4, observa-se que a ação antioxidante (expressa pelos valores de K) dos extratos e padrões obtida em pH 2,20 foi a que mais se diferenciou em relação aos demais pH estudados.

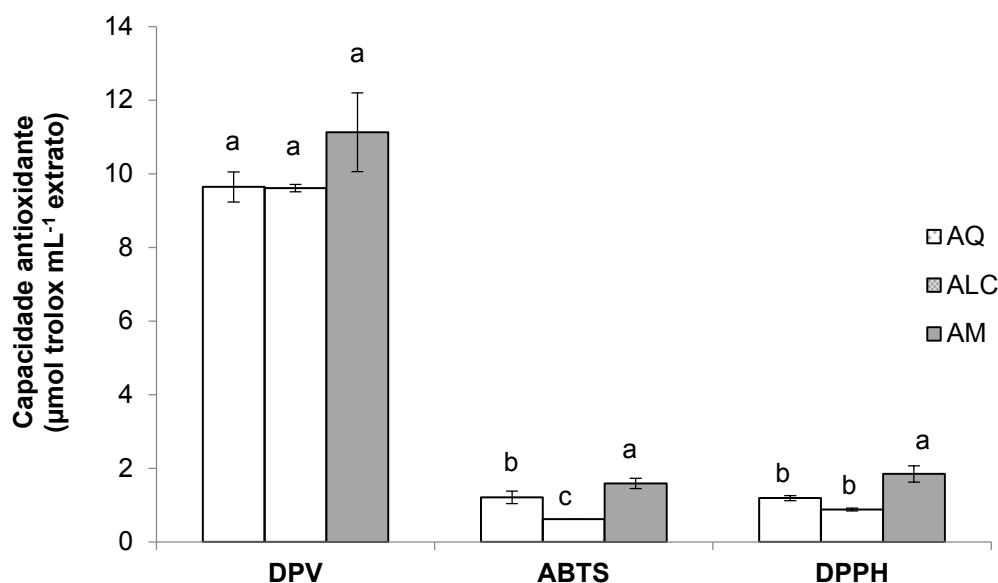


**Figura 4.** Dendrograma com os resultados da análise de Cluster para diferentes valores de pH em função dos coeficientes de capacidade antioxidante (K) obtidos para os extratos de pequi e padrões antioxidantes.

A influência do pH do meio na capacidade antioxidante pode ocorrer pela desprotonação de compostos antioxidantes, em função dos seus valores de  $pK_a$ , e assim formação de espécies reativas com eletroatividade diferenciada, devido aos diferentes mecanismos de reação com o agente oxidante. Diversos estudos observaram que a desprotonação de substâncias antioxidantes, com o aumento do pH do meio, favoreceu sua ação antioxidante (Alberto *et al.*, 2013; Altunkaya; Gökmen; Skibsted, 2016).

#### **Capacidade antioxidante expressa em equivalente ao trolox: comparação entre os ensaios DPV, ABTS e DPPH**

De acordo com Barros *et al.* (2017), para maior precisão e confiabilidade na apresentação de resultados sobre a ação antioxidante de matrizes complexas, aconselha-se a aplicação de diferentes ensaios antioxidantes, já que estes diferem em relação ao princípio e condições experimentais. Neste sentido, além da avaliação da influência dos métodos de extração na ação antioxidante dos extratos de pequi, expressa pelo K, descrita anteriormente, este estudo buscou comparar os dados obtidos pelo ensaio eletroquímico DPV, em pH 7,15, com os ensaios espectrofotométricos ABTS e DPPH. Os resultados foram expressos pela equivalência ao padrão trolox ( $\mu\text{mol}$  de trolox  $\text{mL}^{-1}$  extrato de pequi) e estão descritos na Figura 5.



**Figura 5.** Capacidade antioxidante de extratos da polpa de pequi expressa em equivalente trolox, segundo o ensaio eletroquímico DPV (pH 7,15) e os ensaios espectrofotométricos ABTS e DPPH. Média  $\pm$  desvio padrão (n=3). AQ: extrato de pequi aquoso, ALC: extrato alcoólico e AM: extrato acetometílico. DPV: médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ ). ABTS e DPPH: médias seguidas de letras diferentes, no mesmo ensaio, diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A partir da Figura 5, os extratos da polpa de pequi foram classificados, conforme a capacidade antioxidante, na seguinte ordem: DPV: AM = AQ = ALC; ABTS: AM > AQ > ALC, e DPPH: AM > AQ = ALC. Em geral, observa-se maior ação antioxidante para o extrato acetometílico.

Variação nos resultados de capacidade antioxidante de extratos vegetais, avaliada por diferentes métodos, também foi relatada em estudo descrito por Melo *et al.* (2011).

Comparando-se as médias da capacidade antioxidante entre os ensaios (Figura 5), pode-se observar que maior ação antioxidante foi obtida pelo ensaio DPV para todos os extratos (AM:  $11,13 \pm 1,07 \mu\text{mol trolox mL}^{-1}$  extrato; ALC:  $9,61 \pm 0,10 \mu\text{mol trolox mL}^{-1}$  extrato e AQ:  $9,64 \pm 0,41 \mu\text{mol trolox mL}^{-1}$  extrato). Isto se deve, possivelmente, à propriedade da técnica eletroquímica em permitir a avaliação conjunta do poder redutor dos compostos bioativos presentes nos extratos de pequi (efeito sinérgico dos compostos), enquanto os ensaios ABTS e DPPH são mais específicos para determinadas classes de compostos, como fenólicos, podendo subestimar a capacidade antioxidante total dos extratos analisados (Pinheiro *et al.*, 2018).

O método de extração/solvente extrator não influenciou ( $p > 0,05$ ) na ação antioxidante avaliada pelo ensaio eletroquímico DPV, em pH 7,15, como pode ser observado na Figura 5 (resultados de capacidade antioxidante expressos em equivalente ao trolox) e na Tabela 1 (dados expressos pelo coeficiente de capacidade antioxidante, K).

Em estudo realizado por Machado; Mello; Hubinger (2013) o extrato de pequi aquoso apresentou maior ação antioxidante pelos ensaios DPPH ( $23,03 \pm 0,36$  % inibição) e FRAP ( $2,62 \pm 0,007$  mM  $\text{FeSO}_4$   $\text{mL}^{-1}$  extrato) que o extrato alcoólico ( $21,90 \pm 0,54$  % inibição;  $2,47 \pm 0,050$  mM  $\text{FeSO}_4$   $\text{mL}^{-1}$  extrato). Segundo as pesquisadoras, estes resultados podem ter sido influenciados pela variação dos compostos bioativos presentes em cada extrato e pela interação de cada composto com o mecanismo de reação envolvido nos métodos aplicados.

A polaridade do meio reacional inerente do método utilizado para determinação da capacidade antioxidante também pode influenciar no mecanismo de reação dos compostos antioxidantes presentes nos extratos dos alimentos avaliados. Assim, variações obtidas na ação antioxidante ao comparar resultados de diferentes métodos, podem ser devido a estes fatores (Melo *et al.*, 2011).

### **Avaliação de compostos bioativos nos extratos de pequi: fenólicos e carotenoides totais**

O efeito dos diferentes procedimentos de extração para obtenção dos extratos de pequi, no teor de fenólicos e carotenoides totais foi avaliado. Os resultados destas análises estão descritos na Tabela 3.

De acordo com a Tabela 3, pode-se observar que o extrato aquoso apresentou maior teor de compostos fenólicos ( $286,33 \pm 0,74$   $\mu\text{g GAE mL}^{-1}$  extrato), seguido dos extratos acetometílico ( $249,09 \pm 4,26$   $\mu\text{g GAE mL}^{-1}$  extrato) e alcoólico ( $185,17 \pm 10,67$   $\mu\text{g GAE mL}^{-1}$  extrato).

Quanto ao teor de carotenoides totais, as médias variaram entre  $0,14 \pm 0,01$  e  $3,10 \pm 0,39$   $\mu\text{g carotenoides mL}^{-1}$  extrato, sendo os extratos classificados na seguinte ordem: ALC > AM > AQ.

Portanto, observa-se que neste estudo o processo de extração/solvente extrator promoveu diferença ( $p < 0,05$ ) no conteúdo de carotenoides e compostos fenólicos dos extratos avaliados.

**Tabela 3.** Compostos fenólicos e carotenoides totais em extratos da polpa de pequi

Extratos	Fenólicos totais / $\mu\text{g GAE mL}^{-1}$ extrato	Carotenoides totais / $\mu\text{g carotenoides mL}^{-1}$ extrato
AQ	$286,33 \pm 0,74^a$	$0,14 \pm 0,01^c$
ALC	$185,17 \pm 10,67^c$	$3,10 \pm 0,39^a$
AM	$249,09 \pm 4,26^b$	$1,37 \pm 0,30^b$

Média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Mann-Whitney (p < 0,05). AQ: extrato de pequi aquoso, ALC: extrato alcoólico e AM: extrato acetometílico. GAE: equivalentes de ácido gálico.

Machado; Mello; Hubinger (2013) também encontraram maior teor de compostos fenólicos no extrato aquoso de pequi ( $213,70 \pm 1,44 \mu\text{g GAE mL}^{-1}$  extrato) que no alcoólico ( $138,99 \pm 10,05 \mu\text{g GAE mL}^{-1}$  extrato), e maior conteúdo de carotenoides no extrato alcoólico ( $4,42 \pm 0,15 \mu\text{g } \beta\text{-caroteno mL}^{-1}$  extrato) que no aquoso ( $2,55 \pm 0,07 \mu\text{g } \beta\text{-caroteno mL}^{-1}$  extrato).

Barros *et al.* (2017) descreveram que o sistema de extração aquoso foi mais eficiente que o metanólico para ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido gálico, ácido *p*-cumárico, etc) avaliados em extratos de resíduos dos frutos achachairu, araçá-boi e bacaba.

Monteiro *et al.* (2015) verificaram efeito do tipo de solvente e do método de extração no teor de fenólicos e capacidade antioxidante em extratos de casca de pequi, sendo o extrato hidroetanólico 80% obtido por agitação, o que apresentou maior teor de polifenóis comparado aos extratos hidroetanólico 80% obtido por micro-ondas e aquosos obtidos por ambos os métodos.

Melo *et al.* (2011) obtiveram melhor eficiência de extração de compostos fenólicos em extratos etanólicos de resíduos agroindustriais de uva e goiaba que em extratos aquosos.

Diante das observações descritas, pode-se inferir que não há um solvente específico ou um procedimento de extração ideal para obtenção de compostos fenólicos e carotenoides, simultaneamente, em um meio complexo de origem vegetal. Geralmente, compostos fenólicos tendem a ser polares, portanto, melhor extraídos em solventes mais polares. Já carotenoides, especificamente carotenos, apresentam caráter lipofílico, sendo solúveis em solventes apolares.

Neste sentido, misturas de solventes podem promover melhoria do processo de extração a partir da utilização de suas propriedades conjuntamente (Wijngaard *et al.*, 2012).

Metanol e etanol podem ser usados como co-solventes para aumentar a solubilidade de compostos fenólicos específicos e a seletividade da extração (Cassano *et al.*, 2017).

Em geral, acetona e hexano são utilizados para extração de xantofila (carotenoide polar) e caroteno (carotenoide não polar), respectivamente. Por outro lado, uma mistura de acetona, etanol e hexano pode ser usada para extração simultânea de carotenoides polares e não polares. Além disso, as propriedades miscíveis de acetona e etanol em água ajudam na extração eficiente de carotenoides em matrizes alimentares úmidas (Saini; Keum, 2018).

## **Conclusão**

Os resultados deste trabalho demonstraram que os procedimentos de extração/solvente extrator influenciaram na ação antioxidante dos extratos da polpa de pequi, expressa pelo coeficiente de capacidade antioxidante (K), possibilitando a classificação destes extratos em diferentes grupos, de acordo com a similaridade aos padrões antioxidantes estudados.

Em geral, maior ação antioxidante (expressa em equivalente ao trolox) foi obtida pelo extrato acetometílico. Os resultados obtidos pelo ensaio eletroquímico DPV apresentaram maior capacidade antioxidante que os ensaios ABTS e DPPH, para todos os extratos.

Com base nestes resultados, ressalta-se a importância da avaliação de métodos de extração/solventes extratores de compostos bioativos em estudos para determinação da capacidade antioxidante de matrizes alimentares.

## **Referências Bibliográficas**

ALBERTO, M. E.; RUSSO, N.; GRAND, A.; GALANO, A. A physicochemical examination of the free radical scavenging activity of Trolox: mechanism, kinetics and influence of the environment. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 15, p. 4642–50, 2013.

ALMEIDA, M. M. B.; SOUSA, P. H. M.; ARRIAGA, Â. M. C.; PRADO, G. M.;

MAGALHÃES, C. E. C.; MAIA, G. A.; LEMOS, T. L. G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2155–2159, 2011.

ALTUNKAYA, A.; GÖKMEN, V.; SKIBSTED, L. H. pH dependent antioxidant activity of lettuce (*L. sativa*) and synergism with added phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 190, p. 25–32, 2016.

APAK, R.; ÖZYÜREK, M.; GÜÇLÜ, K.; ÇAPANOĞLU, E. Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 5, p. 997–1027, 2016.

BARROS, R. G. C.; ANDRADE, J. K. S.; DENADAI, M.; NUNES, M. L.; NARAIN, N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity in some Brazilian exotic fruit residues. **Food Research International**, v. 102, p. 84–92, 2017.

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

CASSANO, A.; De LUCA, G.; CONIDI, C.; DRIOLI, E. Effect of polyphenols-membrane interactions on the performance of membrane-based processes . A review. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 351, p. 45–75, 2017.

CHANG, S. K.; ALASALVAR, C.; SHAHIDI, F. Review of dried fruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health benefits. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 113–132, 2016.

DAS, P. R.; EUN, J. B. A comparative study of ultra-sonication and agitation extraction techniques on bioactive metabolites of green tea extract. **Food Chemistry**, v. 253, p. 22–29, 2018.

FERREIRA, L. R. **Bebida isotônica formulada a base de permeado obtido da ultrafiltração do soro de leite adicionado de carotenoides em pó de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)** (Dissertação de Mestrado). Departamento de Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2017. 86f.

GONÇALVES, G. A. S.; VILAS BOAS, E. V. B.; RESENDE, J. V.; MACHADO, A. L. L.; VILAS BOAS, B. M. Qualidade dos frutos do pequi submetidos a diferentes

- tempos de cozimento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 2, p. 377–385, 2011.
- LEÃO, D. P.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; BASTOS, R.; COIMBRA, M.A. Physicochemical characterization, antioxidant capacity, total phenolic and proanthocyanidin content of flours prepared from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit by-products. **Food Chemistry**, v. 225, p. 146–153, 2017.
- MACHADO, M. T. C.; MELLO, B. C. B. S.; HUBINGER, M. D. Study of alcoholic and aqueous extraction of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) natural antioxidants and extracts concentration by nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 450–457, 2013.
- MAGALHÃES, F. S.; CARDOSO, V. L.; REIS, M. H. M. Sequential process with bioadsorbents and microfiltration for clarification of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit extract. **Food and Bioproducts Processing**, v. 108, p. 105–116, 2018.
- MAKANJUOLA, S. A. Influence of particle size and extraction solvent on antioxidant properties of extracts of tea, ginger, and tea–ginger blend. **Food Science and Nutrition**, v. 5, n. 6, p. 1179–1185, 2017.
- MELO, P. S.; BERGAMASCHI, K. B.; TIVERON, A. P.; MASSARIOLI, A. P.; OLDONI, T. L. C.; ZANUS, M. C.; PEREIRA, G. E.; ALENCAR, S. M. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais Phenolic composition and antioxidant activity of agroindustrial residues. **Ciência Rural**, v. 41, n. 6, p. 1088–1093, 2011.
- MONTEIRO, S. S.; SILVA, R. R.; MARTINS, S. C.; BARIN, J. S.; ROSA, C. S. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts of pequi peel (*Caryocar brasiliense* Camb.). **International Food Research Journal**, v. 22, n. 5, p. 1985–1992, 2015.
- NASCIMENTO, N. R. R.; ALVES, A. M.; SILVA, M. R.; NAVES, M. M. V. Antioxidant capacity of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp is preserved by freeze-drying and light-resistant packaging. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n. 1, p. 1–7, 2017.
- PINHEIRO, F. A.; OKUMURA, L. L.; SILVA, A. F. S.; SILVA, J. G.; FERREIRA, L. R.; BARCELLOS, E. S.; FONTE, E. A. F. Applicability of a voltammetric assay based on the electroreduction of oxygen to evaluate the antioxidant capacity of pequi. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 8, p. 1653–1662, 2018.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-

EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231–1237, 1999.

RIBEIRO, D. M.; FERNANDES, D. C.; ALVES, A. M.; NAVES, M. M. V. Carotenoids are related to the colour and lipid content of the pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp from the Brazilian Savanna. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 3, p. 507–512, 2014.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**. International Life Sciences Institute: Washington, DC, EUA, 2001. Disponível em <http://beauty-review.nl/wp-content/uploads/2014/11/A-guide-to-carotenoid-analysis-in-foods.pdf>.

Acesso em: 08 jan. 2018.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS<sup>•+</sup>. **Comunicado Técnico - Embrapa**, v. 128, 2007. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/426954/1/Cot128.pdf>.

Acesso em: 19 fev. 2018.

SAINI, R. K.; KEUM, Y. S. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. **Food Chemistry**, v. 240, p. 90–103, 2018.

SCHIASSI, M. C. E. V.; SOUZA, V. R.; LAGO, A. M. T.; CAMPOS, L. G.; QUEIROZ, F. Fruits from the Brazilian Cerrado region: Physico-chemical characterization, bioactive compounds, antioxidant activities, and sensory evaluation. **Food Chemistry**, v. 245, p. 305–311, 2018.

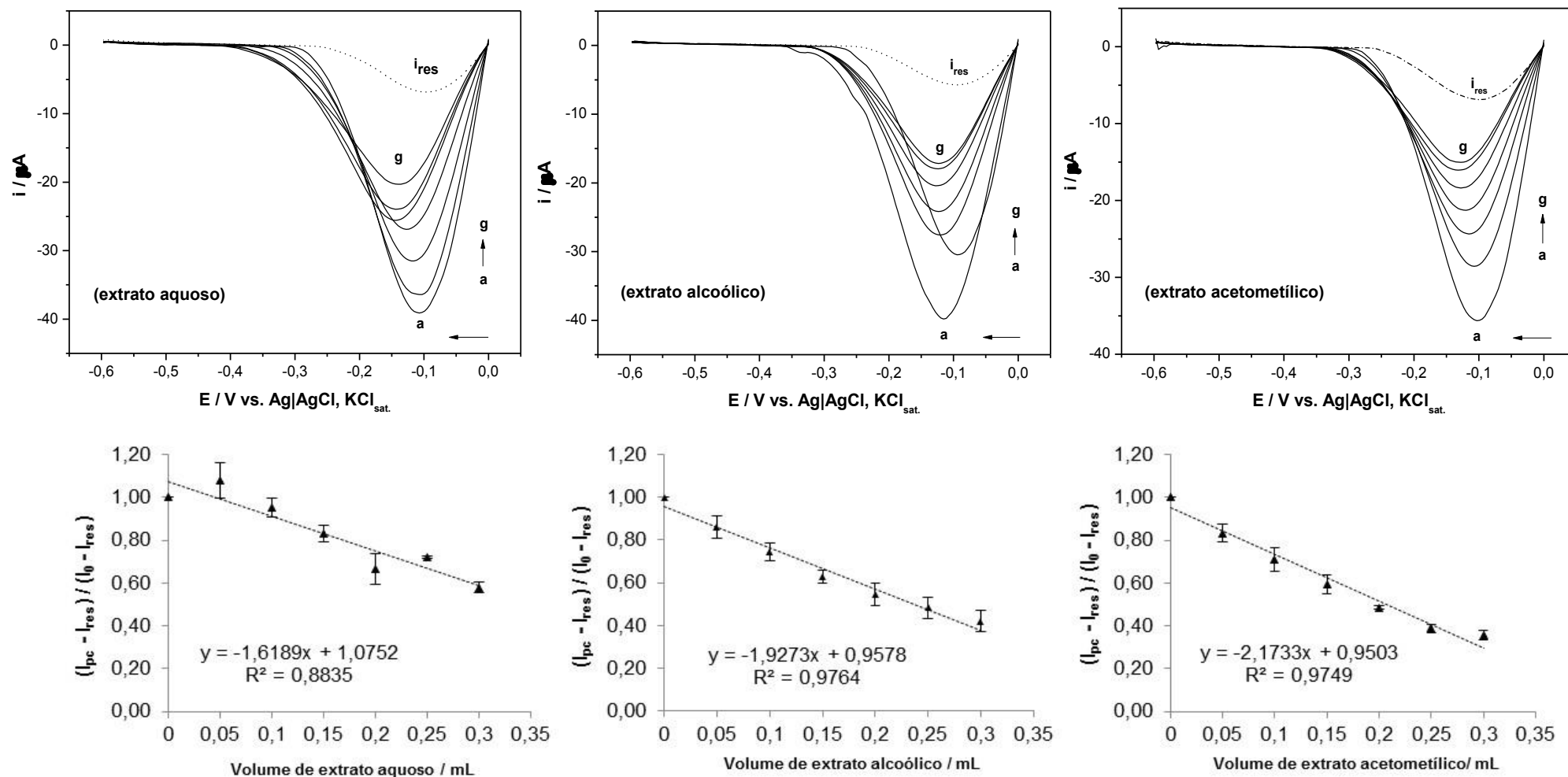
Statistical Package for the Social Sciences, versão 20.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA.

SWAIN, T.; HILLS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 19, p. 63–68, 1959.

WIJNGAARD, H.; HOSSAIN, M. B.; RAI, D. K.; BRUNTON, N. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 505–513, 2012.

YANG, Y.; ZHOU, J.; ZHANG, H.; GAI, P.; Zhang, X.; Chen, J. Electrochemical evaluation of total antioxidant capacities in fruit juice based on the guanine/graphene nanoribbon/glassy carbon electrode. **Talanta**, v. 106, p. 206–211, 2013.

### Informação Suplementar



**Figura S1.** Voltamogramas de pulso diferencial e curvas de variação da taxa de corrente catódica de oxigênio em função da adição de extrato de pequi, em tampão Britton-Robinson 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 4,05. (a): sem adição de extrato de pequi - (g): 300  $\mu\text{L}$  de extrato.  $i_{\text{res}}$ : corrente residual do eletrólito de suporte.

## **CAPÍTULO 5**

---

**Estudo comparativo da capacidade antioxidante de extratos vegetais por  
métodos eletroquímicos e espectrofotométricos**

---

## Resumo

Este estudo objetivou comparar a capacidade antioxidante de extrato da polpa de pequi, com extratos de capuchinha, nêspera e *physalis*, aplicando-se ensaios eletroquímicos e espectrofotométricos. Utilizou-se a técnica voltamétrica de pulso diferencial (DPV) para avaliação da ação antioxidante expressa pelo índice eletroquímico (EI) e pelo coeficiente de capacidade antioxidante (K). Os ensaios espectrofotométricos ABTS e DPPH foram aplicados para expressar a capacidade antioxidante em equivalente ao trolox e o ensaio de Folin-Ciocalteu para determinar o teor de fenólicos totais. Alta correlação de Pearson foi obtida entre os ensaios EI e K (0,965) e entre os ensaios ABTS e DPPH (0,997). Maior capacidade antioxidante foi obtida para *physalis* pelos testes EI e K, e para pequi e capuchinha pelos ensaios ABTS e DPPH. Capuchinha apresentou maior conteúdo de fenólicos. Embora não se tenha obtido correlação entre os ensaios eletroquímicos e espectrofotométricos, os extratos vegetais analisados apresentaram ação antioxidante, sendo fontes alternativas de compostos com propriedades benéficas à saúde.

**Palavras-chave:** vegetais exóticos; eletroquímica; propriedades funcionais; antioxidantes.

## Introdução

Os antioxidantes adquiridos na dieta alimentar exercem um importante papel na manutenção da saúde, pois atuam prevenindo a oxidação de importantes biomoléculas, como proteínas, ácido desoxirribonucleico (DNA), lipídios e componentes celulares, que não são totalmente protegidos pelo sistema antioxidante endógeno (Araújo, 2011; Carocho; Morales; Ferreira, 2018).

Os vegetais destacam-se como uma importante fonte natural de compostos antioxidantes, sendo encontrados em diversas combinações. A ação sinérgica entre eles parece exercer grande influência sobre o efeito antioxidante (Altunkaya; Gökmen; Skibsted, 2016).

Diante dos benefícios associados à saúde, os consumidores estão cada vez mais interessados em alimentos com propriedades nutricionais e funcionais (Olivares-Tenorio *et al.*, 2016), o que justifica o aumento da demanda por frutas e hortaliças.

O mercado de vegetais exóticos encontra-se em expansão devido à tendência pelo consumo de “novos alimentos” que sejam saborosos e saudáveis, como exemplo, frutos e flores comestíveis. Neste sentido, pesquisas têm sido desenvolvidas para melhor

compreensão da composição nutricional destes alimentos e de suas propriedades promotoras à saúde (Chen *et al.*, 2018; Eitzbach *et al.*, 2018; Koike *et al.*, 2015; Leão *et al.*, 2017; Sytar *et al.*, 2018).

Embora existam diversos estudos na literatura sobre avaliação da capacidade antioxidante de vegetais exóticos, raros trabalhos aplicam técnicas eletroquímicas para esta análise. Neste sentido, o presente estudo teve como finalidade aplicar a técnica voltamétrica de pulso diferencial (DPV) para avaliar a capacidade antioxidante de extratos de pequi, capuchinha, nêpera e *physalis*.

A técnica DPV baseia-se em processos redox, geralmente envolvidos nos mecanismos de ação antioxidante; é simples; sensível; fornece informações relevantes sobre o composto em análise com base em aspectos cinéticos e termodinâmicos; pode ser usada para amostras coloridas e turvas. Isto justifica sua aplicação em matrizes alimentares, tornando-se uma alternativa aos métodos espectrofotométricos tradicionais (Arribas; Martínez-Fernández; Chicharro, 2012; Gomes *et al.*, 2016).

O pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) é um fruto exótico, nativo do cerrado brasileiro, utilizado predominantemente pela população local, para consumo *in natura*, em pratos típicos, conservas, extração de óleo, dentre outros. É pouco difundido, por ser altamente perecível e conter muitos espinhos próximos à polpa, que dificultam sua manipulação e limitam seu uso (Machado; Mello; Hubinger, 2013).

A capuchinha (*Tropaeolum majus* L.) é uma flor nativa das regiões montanhosas da América do Sul e Central, também conhecida como chaguinha, nastúrcio ou *nasturtium*. As flores são comumente amarelas, vermelhas ou laranjas, sendo estas as mais comuns (Garzón; Wrolstad, 2009). São usadas para enfeitar pratos, sendo normalmente consumidas em saladas (Fernandes *et al.*, 2017).

A nêpera (*Eriobotrya japonica* L.) é uma fruta subtropical exótica que se desenvolve bem em regiões com temperatura média anual superior a 15 °C (Barbi *et al.*, 2018). Provavelmente teve origem no sudeste da China. Além do seu cultivo, desde a antiguidade na China e Japão, atualmente é encontrada em outras regiões. No continente americano, o Brasil é um grande produtor de nêpera, com destaque para o estado de São Paulo. Os frutos apresentam sabor suave e agradável, sendo consumidos frequentemente frescos ou processados como geleias (Ferrerres *et al.*, 2009).

*Physalis peruviana* L., espécie mais conhecida e estudada do gênero *physalis*, é originária da região dos Andes da América do Sul, sendo a Colômbia o maior produtor mundial do fruto, tendo como grandes competidores Brasil e Chile (Luchese; Gurak;

Marczak, 2015). O fruto apresenta coloração amarela/laranja, é succulento (4-10 g), contém numerosas pequenas sementes e é protegido por um cálice (Mokhtar; Swailam; Embaby, 2018). Apresenta diferentes denominações de acordo com a localidade, sendo *physalis* no Brasil e *goldenberry* em países de língua inglesa. Este fruto é consumido *in natura*, e usado na indústria alimentícia em diferentes produtos, como bebidas, iogurtes e geleias (Ramadan, 2011).

A escolha destes vegetais como matrizes alimentares para avaliação no presente estudo, deu-se em função de seu caráter exótico e de sua composição, sendo relatados na literatura como fontes de substâncias bioativas e propriedades antioxidantes (Azevedo-Meleiro; Rodriguez-Amaya, 2004; Bazylo *et al.*, 2013; Goulas *et al.*, 2014; Magalhães; Cardoso; Reis, 2018; Olivares-Tenorio *et al.*, 2016). Além da avaliação da capacidade antioxidante dos extratos de pequi, capuchinha, nêspera e *physalis*, foi estimado o conteúdo de compostos fenólicos totais.

## **Material e Métodos**

### **Reagentes e soluções**

Acetona, ácido acético, ácido bórico, ácido fosfórico, etanol, hidróxido de sódio e metanol, foram obtidos da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil); carbonato de sódio, sulfato de sódio e éter de petróleo, adquiridos da Dinâmica Química (Diadema, SP, Brasil), reativo de Folin-Ciocalteu, adquirido da Êxodo Científica (Hortolândia, SP, Brasil); 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), persulfato de potássio, ácido gálico e ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (trolox), obtidos da Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico de pureza.

Nas análises voltamétricas, utilizou-se como eletrólito de suporte, tampão Britton-Robinson 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,15, preparado a partir de soluções 0,1 mol L<sup>-1</sup> de ácido acético, ácido bórico e ácido fosfórico. O pH foi ajustado com solução de hidróxido de sódio 8,0 mol L<sup>-1</sup>, em pHmetro 827 pH lab (Metrohm, Herisau, Switzerland). As soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura (resistividade de 18,2 MΩ·cm a 25 °C), obtida pelo sistema de deionização Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

### **Preparo dos extratos**

Para elaboração dos extratos, utilizou-se polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), obtida a partir de frutos *in natura*, maduros, da safra de dezembro de 2015, provenientes do município de Santana de Pirapama, MG, Brasil. A polpa foi obtida com auxílio de uma despoldadeira modelo bonina 0.25 df (Itametal/NPC Equipamentos, Itabuna, BA, Brasil).

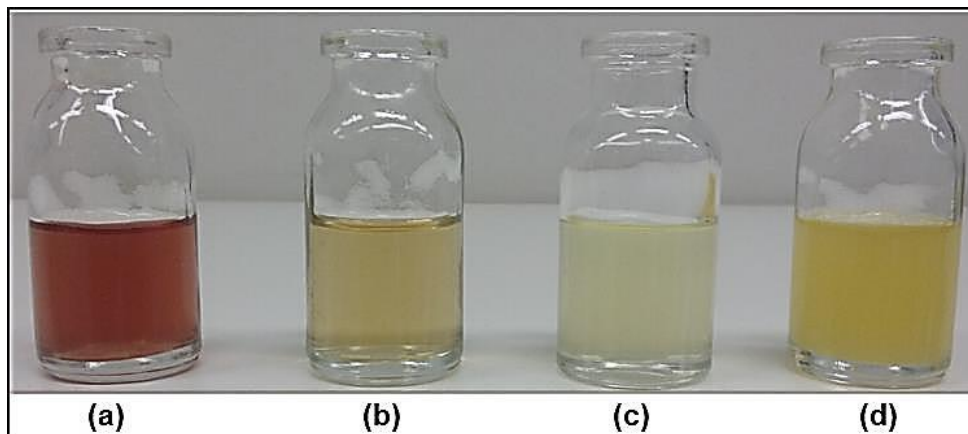
Capuchinha (*Tropaeolum majus* L.), nêspira (*Eriobothrya japônica* L.) e *physalis* (*Physalis peruviana* L.) foram obtidos em setembro de 2017, provenientes do município de Venda Nova do Imigrante, ES, Brasil. Para elaboração do extrato de *physalis*, utilizou-se frutos maduros, sem cálices. O extrato de nêspira foi obtido a partir da polpa sem casca (ou pele), de frutos maduros. O preparo das polpas de *physalis* e nêspira foi realizado com auxílio de um moedor modelo 80374BZ, Hamilton Beach® (Shenzhen, Guangdong, China). Para o extrato de capuchinha, foram utilizadas flores abertas, de cor laranja, sem processamento.

As polpas e flores frescas foram armazenadas sob congelamento (-18 °C) até utilização posterior para elaboração dos extratos. Na Figura 1 estão apresentados os vegetais com suas respectivas partes utilizadas para preparo dos extratos.



**Figura 1.** Vegetais exóticos comestíveis (pequi, capuchinha, nêspera e *physalis*) utilizados para preparo dos extratos.

Os extratos (Figura 2) foram preparados de acordo com Rufino *et al.* (2007), utilizando-se primeiramente o solvente metanol 50% (v/v), seguido de reextração com acetona 70% (v/v). Após o preparo, foram acondicionados em frascos envoltos por papel alumínio e armazenados sob congelamento (-18 °C).



**Figura 2.** Extratos de capuchinha (a); nêspera (b); *physalis* (c) e pequi (d).

### **Avaliação da capacidade antioxidante in vitro: ensaios eletroquímicos**

#### **Índice eletroquímico (EI)**

A análise voltamétrica foi conduzida utilizando-se um potenciostato/galvanostato, Autolab (Metrohm Pensalab, Utrecht, The Netherlands), interfaciado a um computador pelo software General Purpose Electrochemical System (GPES), versão 4.9, utilizando-se uma célula eletroquímica de 50 mL com arranjo de três eletrodos: eletrodo de trabalho de ouro com área geométrica de 0,196 cm<sup>2</sup>, eletrodo auxiliar de platina e eletrodo de referência de Ag|AgCl, KCl, 3,0 mol L<sup>-1</sup> (Metrohm, Herisau, Switzerland).

Após cada leitura voltamétrica, realizou-se limpeza da superfície do eletrodo de trabalho, com polimento mecânico, por aproximadamente, 1 minuto, em feltro metalográfico, contendo suspensão de alumina com granulometria de 0,3 e 0,05 µm (Buehler, Lake Bluff, IL, USA). Em seguida, fez-se enxágue com água ultrapura (resistividade de 18,2 MΩ·cm a 25 °C), obtida pelo sistema de deionização Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

O perfil voltamétrico dos extratos foi avaliado aplicando-se a técnica voltamétrica de pulso diferencial (DPV), no sentido anódico (-0,6 V a 0,6 V), em amplitude de pulso de 100 mV, velocidade de varredura de potencial de 20 mV s<sup>-1</sup> e tempo de pulso de 2 ms.

A linha de base dos voltamogramas foi corrigida por meio da média móvel (*moving average*), utilizando-se a ferramenta disponível no software General Purpose Electrochemical System (GPES), versão 4.9. Os voltamogramas foram plotados com o auxílio do software OriginPro 8<sup>®</sup> (OriginLab Corporation, 2007).

A partir dos dados de intensidade de corrente de pico anódica ( $I_{pa}$ ) e potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ), obtidos nos voltamogramas, calculou-se o índice eletroquímico (EI), conforme equação 1 (Lino *et al.*, 2014):

$$EI \left( \frac{\mu A}{V} \right) = \frac{I_{pa1}}{E_{pa1}} + \frac{I_{pa2}}{E_{pa2}} + \dots + \frac{I_{pan}}{E_{pan}} \quad (1)$$

onde,  $EI$  corresponde ao somatório da razão entre a intensidade de corrente e potencial dos principais picos anódicos e  $n$  ao número de picos.

O índice eletroquímico baseia-se no princípio de que quanto menor o  $E_{pa}$  (parâmetro termodinâmico), maior é a habilidade do composto prova em doar elétrons, e quanto maior a  $I_{pa}$  (parâmetro cinético), maior é a quantidade de espécies eletroativas no meio (Lino *et al.*, 2014; Oliveira Neto *et al.*, 2017).

### **Coefficiente de capacidade antioxidante (K)**

A capacidade antioxidante total dos extratos vegetais foi avaliada com base na eletrorredução do oxigênio, conforme protocolo descrito por Pinheiro *et al.* (2018). As leituras foram realizadas aplicando-se a técnica DPV, no sentido catódico (0 V a -0,6 V), utilizando-se como eletrólito de suporte tampão Britton-Robinson 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,15. As condições experimentais foram semelhantes às citadas no item anterior.

Os resultados foram expressos pelo coeficiente de capacidade antioxidante (K), calculado a partir do coeficiente angular das curvas de variação da taxa de corrente  $[(I_{pc} - I_{res}) / (I_{p0} - I_{res}) = f(v)]$ , onde  $I_{pc}$  é a corrente de pico catódica de O<sub>2</sub>, na presença de extrato vegetal;  $I_{res}$  é a corrente de pico catódica do eletrólito de suporte desoxigenado,  $I_{p0}$  é a corrente de pico catódica inicial de O<sub>2</sub>, sem adição de extrato e  $v$  é o volume de extrato vegetal.

## Determinação da capacidade antioxidante in vitro: ensaios espectrofotométricos

### Ensaio do cátion radical ABTS<sup>•+</sup>

A avaliação da capacidade antioxidante pelo ensaio ABTS foi realizada segundo metodologia descrita por Re *et al.* (1999), com modificações. Foram misturados 5 mL de solução de ABTS 7,0 mmol L<sup>-1</sup> e 5 mL de solução de persulfato de potássio 2,45 mmol L<sup>-1</sup>, em frasco âmbar. A mistura ficou em repouso, ao abrigo da luz, durante 12 a 16 horas para geração do cátion cromóforo ABTS<sup>•+</sup>. Posteriormente, a solução do radical foi diluída com etanol 80% até que atingisse absorvância de  $0,700 \pm 0,005$ , a 734 nm, em espectrofotômetro Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis (Santa Clara, CA, USA), previamente calibrado com etanol 80%.

Em tubos de ensaio, adicionou-se 0,5 mL de diferentes diluições do extrato vegetal e 3,5 mL de solução do radical ABTS<sup>•+</sup>, seguido de homogeneização em agitador de tubos. Após 6 minutos de reação, fez-se leitura da absorvância dos extratos, a 734 nm. Como controle, utilizou-se etanol 80% em substituição à adição dos extratos vegetais. Toda a análise foi realizada em ambiente com baixa luminosidade.

A capacidade antioxidante foi expressa em equivalente ao trolox ( $\mu\text{mol trolox g}^{-1}$  polpa ou flor), calculado com base na curva analítica de trolox, preparada com soluções do padrão, de concentrações variando entre 10 e 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , conforme procedimento descrito para o preparo da curva dos extratos. A realização dos cálculos foi feita com base em Rufino *et al.*, (2007).

### Ensaio do radical DPPH<sup>•</sup>

A determinação da capacidade antioxidante pelo ensaio DPPH foi realizada segundo metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com modificações.

Em tubos de ensaio, foram adicionadas alíquotas de 0,1 mL de diferentes diluições do extrato vegetal e 2,9 mL de solução metanólica 60  $\mu\text{mol L}^{-1}$  do radical DPPH<sup>•</sup>, previamente preparada. A mistura foi homogeneizada em agitador de tubos e deixada em repouso por 25 minutos no escuro. Após este período, fez-se leitura da absorvância a 515 nm, em espectrofotômetro Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis (Santa Clara, CA, USA), previamente calibrado com metanol. O controle foi feito utilizando-se metanol em substituição à adição dos extratos vegetais.

Os resultados foram expressos em equivalente ao trolox ( $\mu\text{mol trolox g}^{-1}$  polpa ou flor). Portanto, fez-se uma curva analítica de trolox, com soluções do padrão de concentrações variando entre 30 a 600  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , conforme procedimento descrito para o preparo da curva dos extratos. A realização dos cálculos foi feita com base em Rufino *et al.* (2007).

### **Determinação de compostos fenólicos totais**

O conteúdo de fenólicos totais foi estimado com base no ensaio de Folin-Ciocalteu (Swain; Hills, 1959), com modificações. Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,25 mL de extrato vegetal diluído e 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu 10%. A mistura foi agitada e deixada em repouso por 4 minutos. Adicionou-se 2 mL de solução de carbonato de sódio 7,5%, seguido de repouso por 90 minutos, em ambiente escuro, à temperatura ambiente. Os valores de absorbância foram medidos a 760 nm, em espectrofotômetro Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis (Santa Clara, CA, USA), previamente calibrado com água destilada. O teor de fenólicos totais foi obtido com base em uma curva padrão de ácido gálico, com concentrações entre 10 e 120  $\text{mg L}^{-1}$ , sendo os resultados expressos como equivalentes de ácido gálico ( $\mu\text{g GAE g}^{-1}$  polpa ou flor).

### **Análise estatística**

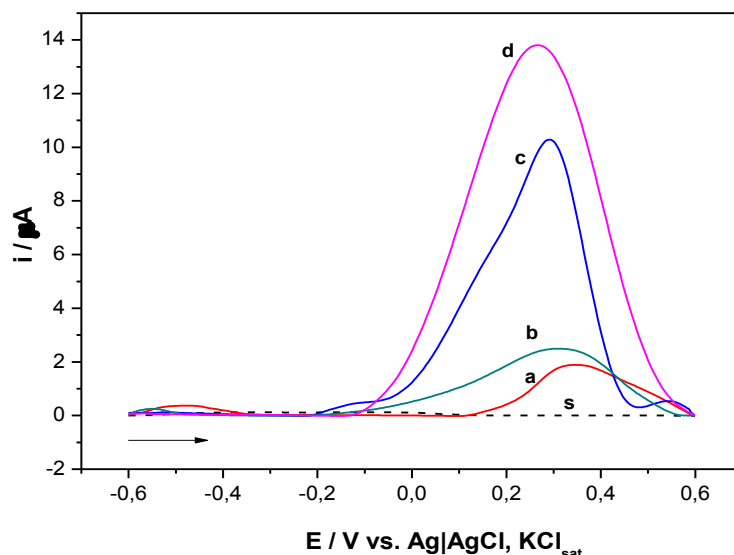
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio-padrão ( $n = 3$ ). Para avaliação dos resultados utilizou-se análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Correlação de Pearson também foi aplicada para estabelecer relação entre os ensaios aplicados para avaliação dos extratos vegetais.

As análises foram realizadas com auxílio do software estatístico Minitab® (Minitab 17, versão Demo, 2014).

## **Resultados e Discussão**

### **Estudo eletroquímico dos extratos vegetais**

O comportamento eletroquímico dos extratos de pequi, capuchinha, nêspera e *physalis*, avaliado pela técnica DPV, pode ser observado nos voltamogramas da Figura 3.



**Figura 3.** Voltamogramas de pulso diferencial dos extratos vegetais: (a): pequi; (b): nêspera; (c): capuchinha e (d): *physalis*. (s): solução do solvente extrator (branco). Varredura de -0,6 a +0,6 V, com velocidade de potencial de 20 mV s<sup>-1</sup>.

Observando-se o principal pico anódico exibido nos voltamogramas para cada extrato vegetal (Figura 3), verifica-se maior intensidade de corrente ( $13,53 \pm 0,16 \mu\text{A}$ ) para o extrato de *physalis*, em +0,265 V. Os demais extratos apresentaram o principal pico anódico em: +0,290 V (capuchinha), +0,308 V (nêspera) e +0,343 V (pequi). Embora com baixa intensidade de corrente, outros picos foram exibidos para os extratos, como pode ser observado para o pequi (-0,479V), indicando presença de espécies eletroativas com poder doador de elétrons.

A partir dos valores médios de potencial de pico ( $E_{\text{pa}}$ ) e corrente de pico ( $I_{\text{pa}}$ ), determinou-se o índice eletroquímico (EI). O conceito de EI baseia-se nos potenciais de pico ( $E_{\text{pa}}$ ) e nas correntes de pico ( $I_{\text{pa}}$ ), a fim de expressar o poder redutor termodinâmico e a cinética/concentração de espécies antioxidantes presentes nas amostras. Nas inferências sobre a ação antioxidante,  $E_{\text{pa}}$  tem sentido qualitativo, sendo que quanto menor seu valor, maior o poder antioxidante. Já  $I_{\text{pa}}$  tem um significado quantitativo de acordo com a lei de Faraday e a cinética dos processos de transferência de elétrons (Oliveira Neto *et al.*, 2017).

Os valores de EI (Tabela 1) variaram entre  $4,88 \pm 0,37 \mu\text{A V}^{-1}$  (pequi) e  $51,04 \pm 0,60 \mu\text{A V}^{-1}$  (*physalis*); sendo os extratos classificados, quanto ao potencial redutor, na seguinte ordem: *physalis* > capuchinha > nêspera > pequi.

Gomes *et al.* (2016) em estudo eletroquímico para avaliação da capacidade antioxidante total de diferentes frutos, observaram maior ação antioxidante para amora (EI = 0,738 nA mV<sup>-1</sup>) e menor para *physalis* (EI = 0,003 nA mV<sup>-1</sup>).

Vale ressaltar que variações obtidas para resultados de diferentes estudos eletroquímicos podem ser devido à metodologia aplicada, faixa de varredura de potencial, pH do meio e características da matriz (espécie, cultivar, tempo de maturação, forma de cultivo, solvente extrator, concentração do extrato, dentre outras).

Macêdo *et al.* (2017) avaliando a ação antioxidante de extratos de frutas vermelhas desidratadas, pelo EI, obtiveram os seguintes resultados: camu-camu ( $16 \pm 0,3 \mu\text{A V}^{-1}$ ) = cramberry ( $14 \pm 0,3 \mu\text{A V}^{-1}$ ) > açaí ( $6,9 \pm 0,5 \mu\text{A V}^{-1}$ ) = acerola ( $5,8 \pm 1,7 \mu\text{A V}^{-1}$ ). Estes pesquisadores associaram o primeiro pico anódico ( $E_{pa} = +0,27 \text{ V}$ ) de acerola e camu-camu ao comportamento redox do ácido ascórbico, principal composto destas frutas. Tal associação pode ser atribuída aos extratos de *physalis* e capuchinha no presente estudo, por terem apresentado principal pico anódico em  $E_{pa} \cong +0,28 \text{ V}$ .

Olivares-Tenorio *et al.* (2017) encontraram valores entre 33,4 e 39,4 mg ácido ascórbico 100 g<sup>-1</sup> para *physalis*. Para capuchinha, foram descritos valores em torno de 60,9 mg ácido ascórbico 100 g<sup>-1</sup> (Costa; Ribeiro; Barbosa, 2014) e  $71,5 \pm 5,30 \text{ mg ácido ascórbico } 100 \text{ g}^{-1}$  (Garzón; Wrolstad, 2009); para pequi  $6,63 \pm 1,02 \text{ mg ácido ascórbico } 100 \text{ g}^{-1}$  (Machado; Mello; Hubinger, 2013) e para nêspira entre 4,17 e 8,33 mg ácido ascórbico 100 g<sup>-1</sup> (Ercisli *et al.*, 2012). De acordo com os dados apresentados por estes pesquisadores, observa-se maior teor de vitamina C (ácido ascórbico) nos frutos *physalis* e capuchinha, que para os frutos pequi e nêspira, o que pode ser relacionado com os dados obtidos na Figura 3.

**Tabela 1.** Capacidade antioxidante pelos ensaios eletroquímicos (EI e K) e espectrofotométricos (ABTS e DPPH) e conteúdo de fenólicos totais de extratos de pequi, capuchinha, nêspera e *physalis*

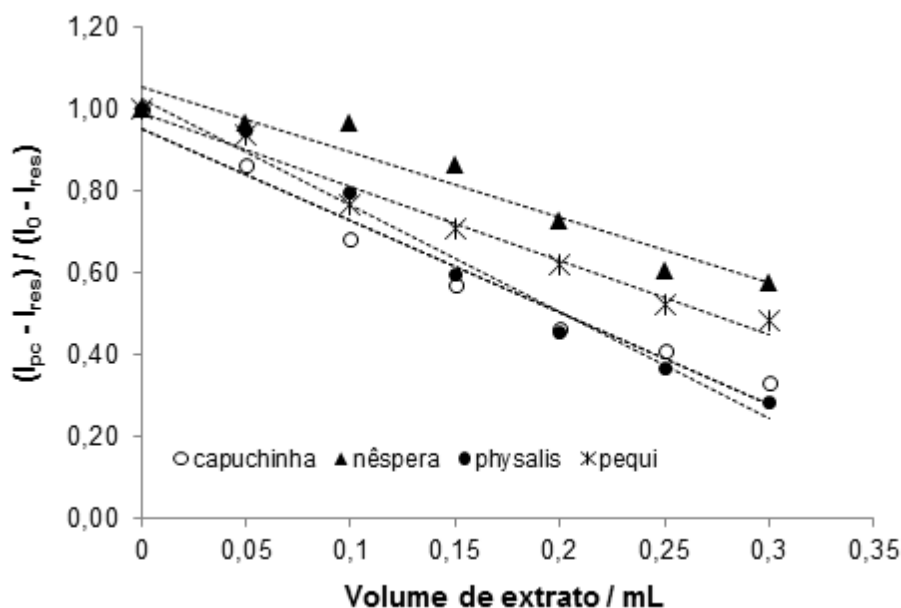
Extrato	EI / $\mu\text{A V}^{-1}$	K / $\text{mL}^{-1}$	ABTS / $\mu\text{mol trolox g}^{-1}$ polpa ou flor*	DPPH / $\mu\text{mol trolox g}^{-1}$ polpa ou flor*	Fenólicos totais / $\mu\text{g GAE g}^{-1}$ polpa ou flor*
Pequi	4,881 $\pm$ 0,367 <sup>d</sup>	1,805 $\pm$ 0,234 <sup>c</sup>	7,62 $\pm$ 0,66 <sup>a</sup>	8,88 $\pm$ 1,08 <sup>a</sup>	1195,61 $\pm$ 20,43 <sup>b</sup>
Capuchinha	34,234 $\pm$ 0,623 <sup>b</sup>	2,240 $\pm$ 0,045 <sup>b</sup>	6,87 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	8,19 $\pm$ 1,19 <sup>a</sup>	2340,55 $\pm$ 14,40 <sup>a</sup>
Nêspera	8,268 $\pm$ 0,239 <sup>c</sup>	1,582 $\pm$ 0,053 <sup>c</sup>	1,39 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	1,47 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	473,06 $\pm$ 39,05 <sup>c</sup>
<i>Physalis</i>	51,044 $\pm$ 0,597 <sup>a</sup>	2,604 $\pm$ 0,117 <sup>a</sup>	1,85 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	2,35 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	484,34 $\pm$ 22,07 <sup>c</sup>

Média  $\pm$  desvio-padrão (n=3). Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (p < 0,05). GAE (equivalente de ácido gálico). \*Resultados expressos em base úmida. EI: índice eletroquímico. K: coeficiente de capacidade antioxidante, pelo ensaio de eletrorredução de oxigênio.

A capacidade antioxidante dos extratos vegetais foi também avaliada com base na eletrorredução de oxigênio. Para todos os extratos avaliados, observou-se diminuição da corrente de O<sub>2</sub> com aumento da concentração de extrato no eletrólito de suporte.

Este ensaio tem como princípio a diminuição da proporção do agente oxidante em solução, ao reagir com as espécies antioxidantes dos extratos vegetais. Assim, menos moléculas de O<sub>2</sub> estarão disponíveis para receberem elétrons do eletrodo de trabalho, resultando em menor intensidade da corrente catódica obtida nas leituras voltamétricas (Pinheiro *et al.*, 2018).

A partir dos valores médios de corrente obtidos no ensaio voltamétrico, foram construídas curvas de variação da taxa de corrente  $[(I_{pc} - I_{res}) / (I_{p0} - I_{res}) = f(v)]$ , descritas na Figura 4. A capacidade antioxidante total foi expressa pelo coeficiente angular (em módulo) da curva correspondente a cada extrato vegetal, sendo denominado de coeficiente de capacidade antioxidante (K).



**Figura 4.** Curvas de variação da corrente catódica de oxigênio em função do volume de extrato vegetal (pequi, nêspira, capuchinha e *physalis*), em solução tampão Britton-Robinson 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,15.

Os valores médios de K estão descritos na Tabela 1. Pode-se observar uma variação destes coeficientes entre os extratos, sendo os mesmos classificados na seguinte ordem: *physalis* (2,604 ± 0,117 mL<sup>-1</sup>) > capuchinha (2,240 ± 0,045 mL<sup>-1</sup>) > pequi (1,805 ± 0,234 mL<sup>-1</sup>) = nêspira (1,582 ± 0,053 mL<sup>-1</sup>).

## **Avaliação da capacidade antioxidante pelos ensaios espectrofotométricos**

Os resultados da ação antioxidante dos extratos vegetais, obtidos pelos ensaios ABTS e DPPH, estão descritos na Tabela 1. A partir destes resultados, os extratos foram ordenados, conforme a capacidade antioxidante, da seguinte forma: pequi = capuchinha > *physalis* = nêspera.

Pelo ensaio ABTS, os resultados variaram entre  $1,39 \pm 0,05$  a  $7,62 \pm 0,66$   $\mu\text{mol trolox g}^{-1}$  polpa, e pelo ensaio DPPH, entre  $1,47 \pm 0,13$  a  $8,88 \pm 1,08$   $\mu\text{mol trolox g}^{-1}$  polpa, respectivamente para nêspera e pequi, em ambos os ensaios.

Para polpa de pequi liofilizada, Nascimento *et al.* (2017) obtiveram  $12,0 \pm 0,0$   $\mu\text{mol trolox equivalente g}^{-1}$  polpa, pelo ensaio DPPH. As diferenças encontradas para expressão dos resultados de capacidade antioxidante, obtidos pelos ensaios espectrofotométricos para polpa de pequi, dificultam a comparação com dados de outros estudos referentes a este fruto (base úmida). Comparada a diferentes frutos exóticos do Cerrado brasileiro, estudados por Schiassi *et al.* (2018), a polpa de pequi do presente estudo apresentou maior capacidade antioxidante pelo ensaio ABTS ( $7,62 \pm 0,66$   $\mu\text{mol trolox g}^{-1}$  polpa), que mangaba ( $2,49 \pm 0,01$   $\mu\text{mol trolox equivalente g}^{-1}$ ), cajá ( $5,55 \pm 0,01$   $\mu\text{mol trolox equivalente g}^{-1}$ ) e buriti ( $6,03 \pm 0,16$   $\mu\text{mol trolox equivalente g}^{-1}$  polpa).

Ercisli *et al.* (2012) em estudo de diferentes cultivares de nêspera descreveram valores (base úmida) entre 2,85 a 5,85  $\mu\text{mol trolox g}^{-1}$  fruto (ensaio DPPH) e 1,84 a 4,83  $\mu\text{mol trolox g}^{-1}$  fruto (ensaio ABTS).

Garzón e Wrolstad (2009) em avaliação da capacidade antioxidante de capuchinha (pétalas de cor laranja) obtiveram valores de 458  $\mu\text{mol trolox g}^{-1}$  flor e 91,9  $\mu\text{mol trolox g}^{-1}$  flor (em base úmida), respectivamente pelos ensaios ABTS e DPPH.

Vega-Gálvez *et al.* (2014) descreveram valores de  $94,07 \pm 4,06$   $\mu\text{mol trolox 100 g}^{-1}$  polpa de *physalis* (ensaio DPPH);  $2763,66 \pm 53,25$   $\mu\text{mol trolox 100 g}^{-1}$  polpa de *physalis* (ensaio FRAP) e  $3243,09 \pm 176,25$   $\mu\text{mol trolox 100 g}^{-1}$  polpa de *physalis* (ensaio ORAC), todos em base seca. Segundo estes pesquisadores, os diferentes resultados obtidos para cada ensaio, podem indicar uma diferença relativa na ação dos compostos antioxidantes, presentes nos extratos, para estabilização dos radicais estudados.

## **Conteúdo de fenólicos totais**

De acordo com a Tabela 1, o conteúdo de fenólicos totais variaram entre  $473,06 \pm 39,05$   $\mu\text{g GAE g}^{-1}$  polpa (nêspera) e  $2340,55 \pm 14,40$   $\mu\text{g GAE g}^{-1}$  flor (capuchinha), sendo

os extratos vegetais classificados na seguinte ordem decrescente: capuchinha > pequi > nêspera = *physalis*.

Ercisli *et al.* (2012) em estudo de diferentes cultivares de nêspera, obtiveram valores (base úmida) entre 140 a 253  $\mu\text{g GAE g}^{-1}$  fruto. Os pesquisadores verificaram diferença significativa ( $p < 0,01$ ) na composição química das cultivares, no entanto, a presença de um determinado composto bioativo em maior concentração, não resultou em maior capacidade antioxidante.

Para polpa de *physalis* foram descritos valores entre  $23,86 \pm 1,22$  mg GAE 100  $\text{g}^{-1}$  fruto (Torres-Ossandón *et al.*, 2018) e  $212,84 \pm 5,49$  mg GAE 100  $\text{g}^{-1}$  (Vega-Gálvez *et al.*, 2014), ambos em base seca.

O conteúdo total de fenólicos de flores de capuchinha (cor laranja) foi de  $687,7 \pm 161,3$  mg GAE 100  $\text{g}^{-1}$  (Garzón *et al.*, 2015).

Para polpa de pequi foram encontrados teores em torno de 95 mg GAE 100  $\text{g}^{-1}$  (Magalhães; Cardoso; Reis, 2018).

Em geral, observa-se variação no teor de fenólicos entre os resultados obtidos no presente estudo e os descritos na literatura. Olivares-Tenorio *et al.* (2016) comparando vários estudos sobre *physalis*, observaram grande variação no teor de compostos fenólicos (50 - 250 mg GAE 100  $\text{g}^{-1}$  fruto fresco). Essas variações foram atribuídas possivelmente aos diferentes métodos analíticos utilizados, aos procedimentos de extração, variedades/cultivares, localização do cultivo e estágio de maturação.

### **Correlação entre ensaios de capacidade antioxidante e compostos fenólicos totais**

A correlação entre os ensaios de avaliação da capacidade antioxidante (EI, K, ABTS e DPPH) e o conteúdo de fenólicos totais dos extratos de pequi, capuchinha, nêspera e *physalis* está descrita na Tabela 2.

Avaliando a Tabela 2, pode-se observar correlação positiva significativa entre os ensaios eletroquímicos EI e K (0,965) e entre os ensaios espectrofotométricos ABTS e DPPH (0,997).

Os ensaios ABTS e DPPH apresentaram boa correlação com o conteúdo de fenólicos totais.

A capacidade antioxidante estimada para cada extrato vegetal, pode ser resultante da ação conjunta de diferentes compostos com propriedades antioxidantes presentes nestes extratos. Portanto, deve-se ter cautela ao relacionar a ação antioxidante apenas a um grupo de substâncias.

**Tabela 2.** Resultados da correlação de Pearson entre ensaios de capacidade antioxidante e compostos fenólicos totais dos extratos vegetais

Fatores	Correlação			
	EI	K	ABTS	DPPH
EI		0,965*	-0,269	-0,289
K	0,965*		-0,072	-0,081
ABTS	-0,269	-0,072		0,997*
DPPH	-0,289	-0,081	0,997*	
Fenólicos totais	0,069	0,137	0,792	0,746

\*Correlação significativa ao nível de 5%. EI: índice eletroquímico. K: coeficiente de capacidade antioxidante, pelo ensaio de eletrorredução de oxigênio.

O teor de compostos fenólicos (expresso em equivalente ao ácido gálico) é amplamente utilizado para inferências sobre a capacidade antioxidante de matrizes alimentares. No entanto, devido à complexidade química dos extratos vegetais, a ação antioxidante não deve ser atribuída apenas a estes compostos. Segundo Paz *et al.* (2015), diferentes compostos antioxidantes podem agir de forma isolada, sinérgica ou antagônica, influenciando na capacidade antioxidante total de uma matriz. Além disso, o ensaio de Folin-Ciocalteu, apresenta como desvantagem a interferência por diversas substâncias não fenólicas, como açúcares, ácidos orgânicos, compostos nitrogenados e ácido ascórbico, podendo resultar em dados superestimados (Gregoris *et al.*, 2013; Ndhlala; Moyo; Van Staden, 2010; Prior; Wu; Schaich, 2005).

Romero *et al.* (2018) avaliando a relação entre composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos vegetais, observaram que não houve correlação entre a capacidade antioxidante e o teor total de compostos antioxidantes nos extratos. Segundo estes autores, o tipo de antioxidante extraído é mais relevante que sua quantidade na determinação da capacidade antioxidante total, já que cada componente pode ter ação antioxidante distinta dependendo do meio reacional.

Todos os extratos vegetais apresentaram ação antioxidante pelos ensaios eletroquímicos e espectrofotométricos nas condições experimentais do presente estudo, embora não tenha obtido correlação entre os ensaios. Isso pode ser devido às diferenças entre as metodologias utilizadas, sendo que cada ensaio aplicado apresenta suas próprias

características e princípios para avaliação da capacidade antioxidante (Shahidi; Zhong, 2015).

Portanto, é possível encontrar divergências entre a comparação de resultados da capacidade antioxidante obtidos por diferentes métodos. O ensaio eletroquímico expresso pelo K baseou-se na eletrorredução do oxigênio, enquanto os ensaios espectrofotométricos ABTS e DPPH basearam-se na redução dos radicais ABTS<sup>•+</sup> e DPPH<sup>•</sup>, respectivamente. O potencial de redução inerente de cada radical pode influenciar de forma distinta no favorecimento termodinâmico das reações redox em cada ensaio. Assim, a não correlação entre estes métodos no presente estudo, possivelmente ocorreu pelos diferentes mecanismos de reação entre os compostos antioxidantes dos extratos vegetais e o agente oxidante específico para cada teste.

O ensaio DPPH é limitado pelo potencial de redução do radical DPPH<sup>•</sup>. Este ensaio avalia a ação antioxidante de compostos termodinamicamente capazes de reagir com agentes com potencial redox abaixo do potencial de redução do radical DPPH<sup>•</sup> (radical sintético, não fisiológico). Assim, em ensaios que utilizam radicais com potenciais formais superiores ao radical DPPH<sup>•</sup>, como exemplo espécies reativas de oxigênio, as reações entre o radical e os compostos antioxidantes ocorrerão mais facilmente que no ensaio DPPH (Arteaga *et al.*, 2012), subestimando este método.

Neste sentido, uma vantagem do ensaio eletroquímico baseado na eletrorredução de oxigênio (aplicado neste estudo) é a utilização de um composto prova de interesse biológico, podendo ser mais sensível na avaliação da capacidade antioxidante total dos extratos vegetais.

Uma vantagem das medidas eletroquímicas em relação ao ensaio DPPH, é que os potenciais de oxidação de compostos individuais podem ser determinados com a mesma precisão, independente do caráter antioxidante desses compostos, desde que os picos de oxidação estejam bem definidos. Isto não se aplica ao ensaio DPPH, já que neste teste, quanto menor a ação antioxidante da matriz analisada, maior sua concentração necessária, podendo resultar em variações na absorbância e incidir em resultados distintos para uma mesma matriz analisada por diferentes pesquisadores (Arteaga *et al.*, 2012). Tal explicação pode ser associada favoravelmente ao ensaio voltamétrico baseado na determinação do índice eletroquímico utilizado neste estudo.

## Conclusão

Pelos ensaios eletroquímicos, *physalis* foi o que apresentou maior capacidade antioxidante, enquanto que pelos ensaios espectrofotométricos foi pequi e capuchinha.

O maior conteúdo de fenólicos (equivalente a ácido gálico) foi obtido pelo extrato de capuchinha.

Embora não tenha obtido correlação entre os ensaios eletroquímicos e espectrofotométricos aplicados, todos os extratos vegetais apresentaram ação antioxidante, sendo fontes alternativas de compostos com propriedades benéficas à saúde.

## Referências Bibliográficas

ALTUNKAYA, A.; GÖKMEN, V.; SKIBSTED, L. H. pH dependent antioxidant activity of lettuce (*L. sativa*) and synergism with added phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 190, p. 25–32, 2016.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 5 ed. Viçosa, MG: UFV, 2011, 601p.

ARRIBAS, A. S.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, M.; CHICHARRO, M. The role of electroanalytical techniques in analysis of polyphenols in wine. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 34, p. 78–95, 2012.

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. 17, n. 5, p. 5126–5138, 2012

AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, n. 3–4, p. 385–396, 2004.

BARBI, R. C. T.; TEIXEIRA, G. L.; HORNUNG, P.S.; AVILA, S.; HOFFMANN-RIBANI, R. *Eriobotrya japonica* seed as a new source of starch: Assessment of phenolic compounds, antioxidant activity, thermal, rheological and morphological properties. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 646–658, 2018.

BAZYLKO, A.; GRANICA, S.; FILIPEK, A.; PIWOWARSKI, J.; STEFANSKA, J.;

- OSINSKA, E.; KISS, A. K. Comparison of antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial activity and chemical composition of aqueous and hydroethanolic extracts of the herb of *Tropaeolum majus* L. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 88–94, 2013.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 71, p. 107–120, 2018.
- CHEN, G. L.; CHEN, S. G.; XIAO, Y.; FU, N. L. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 30 flowers. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 430–445, 2018.
- COSTA, L. C.; RIBEIRO, W. S.; BARBOSA, J. A. Compostos bioativos e alegações de potencial antioxidante de maracujá, cravo amarelo, rosa e capuchinha. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais** v. 16, n. 3, p. 279–289, 2014.
- ERCISLI, S.; GOZLEKCIB, S.; SENGULC, M.; HEGEDUSD, A.; TEPE, S. Some physicochemical characteristics, bioactive content and antioxidant capacity of loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.) fruits from Turkey. **Scientia Horticulturae**, v. 148, p. 185–189, 2012.
- ETZBACH, L.; PFEIFFER, A.; WEBER, F.; SCHIEBER, A. Characterization of carotenoid profiles in goldenberry (*Physalis peruviana* L.) fruits at various ripening stages and in different plant tissues by HPLC-DAD-APCI-MS<sup>n</sup>. **Food Chemistry**, v. 245, p. 508–517, 2018.
- FERNANDES, L.; CASAL, S.; PEREIRA, J. P.; SARAIVA, J. A.; RAMALHOSA, E. Edible flowers: A review of the nutritional, antioxidant, antimicrobial properties and effects on human health. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 60, p. 38–50, 2017.
- FERRERES, F.; GOMES, D.; VALENTÃO, P.; GONÇALVES, R.; PIO, R.; CHAGAS, E. A.; SEABRA, R. M.; ANDRADE, P. B. Improved loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars: Variation of phenolics and antioxidative potential. **Food Chemistry**, v. 114, n. 3, p. 1019–1027, 2009.

- GARZÓN, G. A.; WROLSTAD, R. E. Major anthocyanins and antioxidant activity of Nasturtium flowers (*Tropaeolum majus*). **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 44–49, 2009.
- GARZÓN, G. A.; MANNS, D. C.; RIEDL, K.; SCHWARTZ, S. J.; PADILLA-ZAKOUR, O. Identification of phenolic compounds in petals of nasturtium flowers (*Tropaeolum majus*) by high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry and determination of oxygen radical absorbance capacity (ORAC). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 6, p. 1803–1811, 2015.
- GOMES, S. M. C.; GHICA, M. E.; RODRIGUES, I. A.; GIL, E. S.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Flavonoids electrochemical detection in fruit extracts and total antioxidant capacity evaluation. **Talanta**, v. 154, p. 284–291, 2016.
- GOULAS, V.; MINAS, I. S.; KOURDOULAS, P. M.; VICENTE, A. R.; MANGANARIS, G. A. Phytochemical content, antioxidants and cell wall metabolism of two loquat (*Eriobotrya japonica*) cultivars under different storage regimes. **Food Chemistry**, v. 155, p. 227–234, 2014.
- GREGORIS, E.; LIMA, G. P. P.; FABRIS, S.; BERTELLE, M.; SICARI, M.; STEVANATO, R. Antioxidant Properties of Brazilian Tropical Fruits by Correlation between Different Assays. **BioMed Research International**, v. 13, p.1–8, 2013.
- KOIKE, A.; BARREIRA, J. C. M.; BARROS, L.; SANTOS-BUELGA, C.; VILLAVICENCIO, A. L.C.H.; FERREIRA, I. C.F.R. Irradiation as a novel approach to improve quality of *Tropaeolum majus* L. flowers: Benefits in phenolic profiles and antioxidant activity. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 30, p. 138–144, 2015.
- LEÃO, D. P.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; BASTOS, R.; COIMBRA, M.A. Physicochemical characterization, antioxidant capacity, total phenolic and proanthocyanidin content of flours prepared from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit by-products. **Food Chemistry**, v. 225, p. 146–153, 2017.
- LINO, F. M. A.; SÁ, 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.
- LUCHESE, C. L.; GURAK, P. D.; MARCZAK, L. D. F. Osmotic dehydration of physalis (*Physalis peruviana* L.): Evaluation of water loss and sucrose incorporation and the

quantification of carotenoids. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 1128–1136, 2015.

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

MACHADO, M. T. C.; MELLO, B. C. B. S.; HUBINGER, M. D. Study of alcoholic and aqueous extraction of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) natural antioxidants and extracts concentration by nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 450–457, 2013.

MAGALHÃES, F. S.; CARDOSO, V. L.; REIS, M. H. M. Sequential process with bioadsorbents and microfiltration for clarification of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit extract. **Food and Bioproducts Processing**, v. 108, p. 105–116, 2018.

MOKHTAR, S. M.; SWAILAM, H. M.; EMBABY, H. E. S. Physicochemical properties, nutritional value and techno-functional properties of goldenberry (*Physalis peruviana*) waste powder concise title: Composition of goldenberry juice waste. **Food Chemistry**, v. 248, p. 1–7, 2017.

NASCIMENTO, N. R. R.; ALVES, A. M.; SILVA, M. R.; NAVES, M. M. V. Antioxidant capacity of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp is preserved by freeze-drying and light-resistant packaging. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n. 1, p. 1–7, 2017.

NDHLALA, A. R.; MOYO, M.; VAN STADEN, J. Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules? **Molecules**, v. 15, p. 6905–6930, 2010.

OLIVARES-TENORIO, M. L.; DEKKER, M.; VERKERK, R.; BOEKEL, M. A. J. S. Health-promoting compounds in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.): Review from a supply chain perspective. **Trends in Food Science and Technology**, v. 57, p. 83–92, 2016.

OLIVARES-TENORIO, M. L.; VERKERK, R.; BOEKEL, M. A. J. S.; DEKKER, M. Thermal stability of phytochemicals, HMF and antioxidant activity in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). **Journal of Functional Foods**, v. 32, p. 46–57, 2017.

OLIVEIRA NETO, J. R.; REZENDE, S. G.; LOBÓN, G. S.; GARCIA, T. A.; MACEDO, I. Y. L.; GARCIA, L. F.; ALVES, V. F.; TORRES, I. M. S.; SANTIAGO, M. F.; SCHMIDT, F.; GIL, E. S. Electroanalysis and laccase-based biosensor on the

determination of phenolic content and antioxidant power of honey samples. **Food Chemistry**, v. 237, p. 1118–1123, 2017.

*OriginLab*, versão 8.0; OriginLab Corp., Northampton, MA, USA, 2007.

PAZ, M.; GÚLLON, P.; BARROSO, M. F.; CARVALHO, A. P.; DOMINGUES, V. F.; GOMES, A. M.; BECKER, H.; LONGHINOTTI, E.; DELERUE-MATOS, C. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 172, p. 462–468, 2015.

PINHEIRO, F. A.; OKUMURA, L. L.; SILVA, A. F. S.; SILVA, J. G.; FERREIRA, L. R.; BARCELLOS, E. S.; FONTE, E. A. F. Applicability of a voltammetric assay based on the electroreduction of oxygen to evaluate the antioxidant capacity of pequi. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 8, p. 1653–1662, 2018.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290–4302.

RAMADAN, M. F. Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (*Physalis peruviana*): An overview. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1830–1836, 2011.

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

ROMERO, M. P. R.; BRITO, R. E.; MELLADO, J. M. R.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, J.; MONTOYA, M. R.; RODRÍGUEZ-AMARO, R. Exploring the relation between composition of extracts of healthy foods and their antioxidant capacities determined by electrochemical and spectrophotometrical methods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 95, p. 157–166, 2018.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS<sup>•+</sup>. **Comunicado Técnico - Embrapa**, v. 128, 2007. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/426954/1/Cot128.pdf>. Acesso em: 19 fev. 2018.

SCHIASSI, M. C. E. V.; SOUZA, V. R.; LAGO, A. M. T.; CAMPOS, L. G.; QUEIROZ, F. Fruits from the Brazilian Cerrado region: Physico-chemical characterization, bioactive compounds, antioxidant activities, and sensory evaluation. **Food Chemistry**, v. 245, p. 305–311, 2018.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 757–781, 2015.

SYTAR, O.; HEMMERICH, I.; ZIVCAK, M.; RAUH, C.; BRESTIC, M. Comparative analysis of bioactive phenolic compounds composition from 26 medicinal plants. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, p. 631–641, 2018.

SWAIN, T.; HILLS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 19, p. 63–68, 1959.

TORRES-OSSANDÓN, M. J.; VEGA-GÁLVEZ, A.; LÓPEZ, J.; STUCKEN, K.; ROMERO, J.; DI SCALA, K. Effects of high hydrostatic pressure processing and supercritical fluid extraction on bioactive compounds and antioxidant capacity of Cape gooseberry pulp (*Physalis peruviana* L.). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 138, p. 215–220, 2018.

VEGA-GÁLVEZ, A.; LÓPEZ, J.; TORRES-OSSANDÓN, M. J.; GALOTTO, M. J.; PUENTE-DÍAZ, L.; QUISPE-FUENTES, I.; DI SCALA, K. High hydrostatic pressure effect on chemical composition, color, phenolic acids and antioxidant capacity of Cape gooseberry pulp (*Physalis peruviana* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, n. 2, p. 519–526, 2014.

### 3. CONCLUSÃO GERAL

O trabalho realizado possibilitou o desenvolvimento de um protocolo voltamétrico, baseado na eletrorredução do oxigênio, para avaliar a capacidade antioxidante da polpa de pequi. A partir da elaboração de extratos, foi possível comparar os resultados obtidos pela metodologia voltamétrica com ensaios espectrofotométricos tradicionais.

As técnicas eletroquímicas voltamétricas podem ser aplicadas para compreender a ação antioxidante de matrizes alimentares, pelo fato dos compostos antioxidantes serem eletroativos, sendo uma alternativa viável para análises desta natureza. Apesar das técnicas espectrofotométricas serem muito utilizadas para avaliação da capacidade antioxidante, apresentam limitações, como demanda de reagentes específicos, muitas vezes de alto custo e tóxicos, e a possibilidade de interferência de outros compostos que não os analitos de interesse, implicando na qualidade dos resultados. Como fatores limitantes à aplicação das técnicas voltamétricas, em âmbito laboratorial, pode-se mencionar a necessidade de um potenciostato e acessórios; necessidade de conhecimento prévio de eletroquímica para melhor entendimento do processo envolvido e definição dos parâmetros de análise, e escolha adequada do eletrodo de trabalho conforme o analito de interesse.

A aplicação do ensaio voltamétrico neste estudo demonstrou que a polpa de pequi, apresentou potencialidade como agente redutor, comparado aos padrões antioxidantes avaliados. Além disso, deve-se ressaltar que tanto o pH do meio (eletrólito de suporte), quanto os procedimentos de extração/solvente extrator influenciaram na capacidade antioxidante dos extratos de pequi, não podendo estes fatores serem negligenciados neste tipo de análise.

Na comparação da capacidade antioxidante de diferentes extratos vegetais, *physalis* apresentou maior ação antioxidante pelos ensaios eletroquímicos, enquanto pequi e capuchinha pelos ensaios espectrofotométricos.

Pelo trabalho descrito nesta tese, o protocolo voltamétrico, mostrou ser uma metodologia alternativa, apropriada para expressar a capacidade antioxidante de extratos vegetais, sobretudo por fornecer informações importantes do processo redox, podendo também ser aplicado a outros meios complexos. Assim, julga-se importante a realização de estudos futuros, com a aplicação do protocolo desenvolvido, para avaliar e comparar a capacidade antioxidante da polpa de pequi, proveniente de frutos de diferentes localidades, cultivares, maturação e tipo de colheita, já que estes fatores podem implicar em diferenças na composição química dos frutos e portanto, na sua ação antioxidante.