

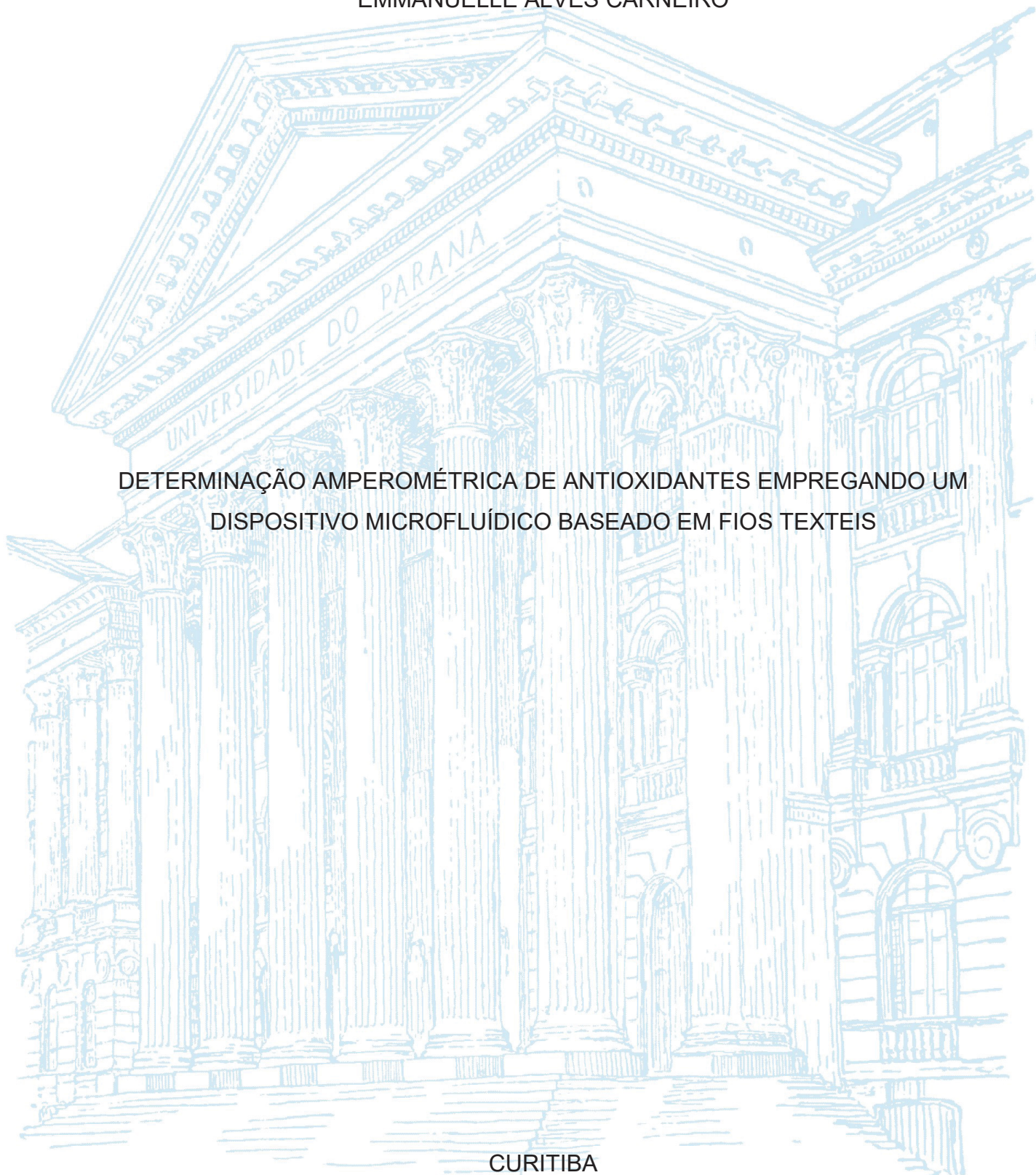
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EMMANUELLE ALVES CARNEIRO

DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DE ANTIOXIDANTES EMPREGANDO UM
DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO BASEADO EM FIOS TEXTEIS

CURITIBA

2017



EMMANUELLE ALVES CARNEIRO

DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DE ANTIOXIDANTES EMPREGANDO UM
DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO BASEADO EM FIOS TEXTÉIS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Fernando Bergamini

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino Jr.

CURITIBA

2017

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

C289d

Carneiro, Emmanuelle Alves

Determinação amperométrica de antioxidantes empregando um dispositivo microfluídico baseado em fios textéis [recurso eletrônico] / Emmanuelle Alves Carneiro. – Curitiba, 2017.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2017.

Orientador: Márcio Fernando Bergamini – Coorientador: Luiz Humberto Marcolino Júnior.

1. Antioxidantes. 2. Fibras textéis. 3. Detectores eletroquímicos. 4. Eletrodos. 5. Dispositivo microfluídico. I. Universidade Federal do Paraná. II. Bergamini, Márcio Fernando. III. Marcolino Júnior, Luiz Humberto. IV. Título.

CDD: 613.28

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894

TERMO DE APROVAÇÃO

**DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DE ANTIOXIDANTES
EMPREGANDO UM DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO BASEADO EM
FIOS TÊXTEIS**

por

EMMANUELLE ALVES CARNEIRO

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,

pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador: Marcio f. Bergamini
Prof. Dr. Márcio Fernando Bergamini
Dep. de Química – UFPR

André Luiz dos Santos
Prof. Dr. André Luiz dos Santos
Dep. de Química – UFU

Andrea
Prof.^a Dr.^a Andrea Pinto de Oliveira
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 24 de fevereiro de 2017.

Ao meu pai, Reginaldo
E à minha mãe, Célia (in memoriam),
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao professor Márcio Fernando Bergamini, pela orientação durante o desenvolvimento desse trabalho. Pela empolgação, paciência, dedicação e confiança, além de todo o conhecimento que adquiri neste período.

Ao professor Luiz Humberto Marcolino Jr., pela orientação, contribuições e disponibilidade.

À professora Andrea de Oliveira e ao Dr. Paulo Roberto Oliveira pelas grandes contribuições no exame de qualificação.

Aos professores avaliadores desta dissertação: André Luiz dos Santos e especialmente à professora Andrea de Oliveira, que vem acompanhando este trabalho desde o projeto.

Ao pessoal do LabSense, por toda a ajuda no desenvolvimento desse trabalho, mas principalmente pelos momentos de muitas risadas, cantorias, deboches e por tornarem todos os dias desse mestrado melhores. Em especial, gostaria de agradecer ao Deonir, que se disponibilizou a compartilhar seus conhecimentos em microfluídica.

A todos os meus amigos que a UFPR trouxe desde o PET-Química, principalmente à Bárbara, Gabriel, Gisa, Guilherme, Luize, Marianne, Paulo, Rayta e Tiago, não consigo nem imaginar como teriam sido todos esses anos sem vocês na minha vida. Muito obrigada!

À Raissa, Maycon e Carina, por sempre estarem presentes, me apoiarem e me incentivarem durante todos esses 10 anos.

Às meninas do BDNT, vocês não imaginam como mudaram a minha vida, sou grata por aprender a cada dia mais o que é amizade, empatia e querer ser alguém melhor.

A toda a minha família, em especial aos meus irmãos Lucas e Deborah, pela paciência e compreensão. À minha avó Maria de Lourdes e meus tios e tias por todo o carinho e orgulho expressado por todos eles durante minha trajetória de vida

Ao meu pai, Reginaldo. Não tem o que eu possa escrever aqui para agradecê-lo por ser meu alicerce, pela sua paciência, preocupação e compreensão. Sem o seu incentivo e doação durante esses dois anos, nada disso seria possível.

Em memória à minha mãe, Celia. Mãe, você sempre foi e sempre será meu maior incentivo e exemplo. Hoje eu só posso te agradecer por tudo que você fez no

tempo que nos foi dado e, mesmo agora você se foi, por me fazer a aprender a cada dia a ser mais forte.

RESUMO

Neste trabalho é descrito a construção e utilização de um dispositivo microfluídico eletroanalítico baseado em fio têxteis (μ TED) cuja estrutura foi obtida por meio de impressão 3D, tendo como matéria-prima o polímero ABS (acrilonitrila butadieno estireno), utilizando fios têxteis como canais microfluídicos e empregando eletrodos de carbono impressos como detector eletroquímico na determinação amperométrica de antioxidantes em amostras de vinhos. O comportamento eletroquímico dos antioxidantes escolhidos como padrões, sendo estes o ácido gálico e o ácido cafeico, foi estudado na faixa de pH de 2,0 – 6,0, aplicando-se a técnica de voltametria cíclica. Os parâmetros envolvidos na detecção amperométrica e no desempenho analítico, foram estudados e otimizados, utilizando condições experimentais que apresentaram as melhores respostas sendo estas uma vazão de $0,31 \mu\text{L s}^{-1}$, potencial de detecção de 0,30 V e volume de injeção de $2,0 \mu\text{L}$. O método proposto apresentou uma reprodutibilidade com desvios menores que 10% entre as medidas, uma resposta linear para o intervalo de concentração (LDR) de 5,0 a $1000,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ para ambos os antioxidantes e limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LOQ) de $8,0 \times 10^{-7}$ e $2,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para o ácido cafeico, e de $1,5 \times 10^{-6}$ e $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para o ácido gálico. A frequência analítica para o ácido cafeico foi de 72 injeções por hora, enquanto que para o ácido gálico esta foi de 43 injeções por hora. O estudo de espécies interferentes foi realizado com a adição de três diferentes concentrações de bissulfito de sódio, sendo uma 10x menor, igual e 10x maior, às soluções com concentração fixa dos padrões de antioxidantes, em que apenas em concentração 10x maior de interferentes houve a obtenção de sinais de corrente significativamente maiores do que os obtidos pela solução de padrões. A metodologia proposta foi aplicada para a determinação da capacidade antioxidante em amostras de vinho e os resultados foram comparados com os fornecidos pelo método espectrofotométrico utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, que é o método recomendado para a análise de polifenóis totais pela OIV (Organização Internacional da Uva e do Vinho). Foi observado a mesma variação nos valores de concentração de antioxidantes para os dois métodos, apresentando maior capacidade antioxidante para os vinhos tintos do que para o branco e apresentando uma capacidade antioxidante que segue a seguinte tendência para os diferentes tipos de uva testados: Carmenere > Cabernet Sauvignon > Sauvignon Blanc. O método proposto vem como uma alternativa interessante aos métodos espectrofotométricos, já que com o uso dos eletrodos de carbono impressos combinado a um sistema microfluídico, abre-se a possibilidade da construção de um sistema portátil e que permite a automação das medidas.

Palavras-chave: Sistemas microfluídicos; Dispositivo eletroquímico baseado em fios têxteis; Antioxidantes; Eletrodo impresso; Amperometria

ABSTRACT

This work describes the construction and use of a thread-based electroanalytical devices (μ TED) which structure was printed by a 3D printer using ABS (acrylonitrile butadiene styrene) polymer as substrate. Cotton threads were used as solution channels and screen-printed carbon electrodes (SPCE) as electrochemical detector for the amperometric determination of antioxidants in wine samples. The electrochemical behavior of the antioxidants chosen as standards, gallic acid and caffeic acid, was studied in the pH range of 2.0 - 6.0 by cyclic voltammetry. The parameters involved in the amperometric detection and the analytical performance were studied and optimized using experimental conditions that obtained the best responses (flow rate of $0.31 \mu\text{L s}^{-1}$, applied potential of 0.30 V and volume of injection of $2.0 \mu\text{L}$). Thus, the proposed method presented a residual standard deviation (RSD) for repeatability between the measurements less than 10%, a linear response for the concentration range (LDR) of 5.0 to $1000.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ for both antioxidants and limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) of 8.0×10^{-7} and $2.7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ for caffeic acid, and 1.5×10^{-6} and $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ for gallic acid. The analytical frequency for caffeic acid was 72 injections per hour, whereas for gallic acid this was 43 injections per hour. The study of concomitant species was carried out with the addition of three different concentrations of sodium bisulfite, being a 10x smaller, equal and 10x larger, to the solutions with fixed concentration of the antioxidant patterns, in which only in 10x greater concentration of interferents presented current signals significantly higher than those obtained by the standards solution. The proposed methodology was applied for the determination of antioxidant capacity in wine samples and the results were compared with those provided by the spectrophotometric method using the Folin-Ciocalteu reagent, which is the recommended method for the analysis of total polyphenols by the OIV (International Organization of Vine and Wine). It was observed a same variation in the values of antioxidant concentration for the two methods, presenting a greater antioxidant capacity for the red wines than for the white and presenting an antioxidant capacity that follows the following tendency for the different types of grape tested: Carmenere > Cabernet Sauvignon > Sauvignon Blanc. To sum up, the proposed method comes as an interesting alternative to spectrophotometric method, since with the use of screen-printed carbon electrodes combined with a microfluidic system, makes possible to construct a portable system and the automation of measurements.

Keywords: Microfluidic systems; Thread-based electroanalytical device; Antioxidants; Screen-printed electrode; Amperometry

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – (A) FÓRMULA ESTRUTURAL DA MOLÉCULA DE QUERCETINA E (B) FÓRMULA ESTRUTURAL DA MOLÉCULA DE CATEQUINA.....	20
FIGURA 2 - FÓRMULA ESTRUTURAL DO ÁCIDO GÁLICO	20
FIGURA 3 - FÓRMULA ESTRUTURAL DO ÁCIDO CAFEICO.....	21
FIGURA 4 - PARTES CONSTITUINTES DE UM ELETRODO IMPRESSO.....	28
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DO μ TED BASEADO EM FIOS DE ALGODÃO....	32
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DO ELETRODO IMPRESSO UTILIZADO NESTE TRABALHO.....	37
FIGURA 7 - ESQUEMA DO PROCESSO DE MONTAGEM DO μ TED E SUAS DIMENSÕES.....	39
FIGURA 8 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DO ÁCIDO CAFEICO $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ EM MEIO DE PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2 E ETANOL (1:1), $v = 50 \text{ mV S}^{-1}$	42
FIGURA 9 - MECANISMO PROPOSTO PARA A OXIDAÇÃO DO ÁCIDO CAFEICO.....	43
FIGURA 10 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DO ÁCIDO GÁLICO $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ EM MEIO DE PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2 E ETANOL (1:1), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	44
FIGURA 11 - MECANISMO PROPOSTO PARA OXIDAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO.....	45
FIGURA 12 - INTENSIDADE DE CORRENTE DE PICO ANÓDICA E POTENCIAL DE PICO DOS VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS EM SOLUÇÃO DE $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ DE (A) ÁCIDO CAFEICO E (B) ÁCIDO GÁLICO EM PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ EM DIFERENTES VALORES DE pH.	46
FIGURA 13 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS EM PBS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 CONTENDO $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ DE (A) ÁCIDO CAFEICO E (B) ÁCIDO GÁLICO SOBRE (A) ELETRODO DE CARBONO IMPRESSO vs Ag/AgCl IMPRESSO. (B) vs. Ag/AgCl.....	48
FIGURA 14 - FOTOGRAFIA DO μ TED ONDE SÃO INDICADOS OS PRINCIPAIS COMPONENTES E O PRINCÍPIO DE OPERAÇÃO DO DISPOSITIVO	49
FIGURA 15 - RELAÇÃO ENTRE O VOLUME DE SOLUÇÃO QUE FLUI PELO μ TED E O TEMPO.	51
FIGURA 16 - VARIAÇÃO DA RESPOSTA AMPEROMÉTRICA EM FUNÇÃO DO POTENCIAL APLICADO OBTIDA PARA O ÁCIDO CAFEICO NAS	

CONCENTRAÇÕES DE $5,0 \times 10^{-6}$ A $5,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ EM PBS 0,10 mol L ⁻¹ pH 2,0 PARA POTENCIAIS DE: 200, 300, 400 E 500 mV.	52
FIGURA 17 - VARIAÇÃO DA RESPOSTA AMPEROMÉTRICA EM FUNÇÃO DO POTENCIAL APLICADO OBTIDA PARA O ÁCIDO GÁLICO NAS CONCENTRAÇÕES DE $5,0 \times 10^{-6}$ A $5,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ EM PBS 0,10 mol L ⁻¹ pH 2,0 PARA POTENCIAIS DE: 200, 300, 400 E 500 mV.	53
FIGURA 18 - VARIAÇÃO DA RESPOSTA AMPEROMÉTRICA EM FUNÇÃO DO POTENCIAL OBTIDO PARA (a) ÁCIDO CAFEICO E (b) ÁCIDO GÁLICO A CONCENTRAÇÕES DE $5,0 \times 10^{-6}$ A $5,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ EM 0,10 mol L ⁻¹ DE PBS pH 2,0 PARA POTENCIAIS DE: 200, 300, 400 E 500 mV	54
FIGURA 19 - (A) SINAIS TRANSIENTES OBTIDOS PARA 10 INJEÇÕES DE ALÍQUOTAS DE 2µL DE ÁCIDO CAFEICO $1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹	55
FIGURA 20 - SINAIS TRANSIENTES OBTIDOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO CAFEICO.	57
FIGURA 21 - CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS PARA O (A) ÁCIDO CAFEICO NA FAIXA DE CONCENTRAÇÃO DE $1,0 \times 10^{-7}$ A $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ E (B) ÁCIDO GÁLICO NA FAIXA DE CONCENTRAÇÃO DE $5,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹	58
FIGURA 22 - COMPARATIVO ENTRE AS CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS PARA O ÁCIDO GÁLICO E O ÁCIDO CAFEICO NA FAIXA DE CONCENTRAÇÃO DE $5,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹	59
FIGURA 23 - VARIAÇÃO DAS CORRENTES DE PICO PARA O ÁCIDO CAFEICO (AC) EM FUNÇÃO DO SULFITO COMO INTERFERENTE EM CONCENTRAÇÕES 10x MENOR (AC + I1), IGUAL (AC+I2) E 10x MAIOR (AC + I3)	61
FIGURA 24 - VARIAÇÃO DAS CORRENTES DE PICO PARA O ÁCIDO GÁLICO (AG) EM FUNÇÃO DO SULFITO COMO INTERFERENTE EM CONCENTRAÇÕES 10x MENOR (AG + I1), IGUAL (AG+I2) E 10x MAIOR (AG + I3).....	62
FIGURA 25 - SINAIS TRANSIENTES OBTIDOS A PARTIR DE INJEÇÕES CONTENDO CONCENTRAÇÕES CONHECIDAS DE ÁCIDO CAFEICO (A) E ÁCIDO GÁLICO (B): (a) $5,0 \times 10^{-6}$; (b) $1,0 \times 10^{-5}$; (c) $2,5 \times 10^{-5}$; (d) $5,0 \times 10^{-4}$; (e) $7,5 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ E INJEÇÕES CONTENDO AMOSTRA DE VINHO: CABERNET SAUVIGNON (A1), CARMÉNÈRE (A2) E SAUVIGNON BLANC (A3).....	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESPECIFICAÇÕES DOS REAGENTES UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS.....	35
TABELA 2 - AMOSTRAS DE VINHOS ANALISADOS.....	36
TABELA 3 -. ESTIMATIVA DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM AMOSTRAS DE VINHO UTILIZANDO O MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU E O μ TED.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ROS – Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês *Reactive Oxygen Species*)
- RNS – Espécies Reativas de Nitrogênio (do inglês *Reactive Nitrogen Species*)
- BHA – Butil-hidroxi-anisol
- BHT – Butil-hidroxi-tolueno
- TBHQ – Butil-hidroquinona
- PG – Propil galato
- AC – Capacidade Antioxidante (do inglês, *Antioxidant Capacity*)
- ABS – Acrilonitrila butadieno estireno
- μTED – Dispositivo microfluídico eletroanalítico
- LDR – Faixa linear (do inglês, *Linear Dynamic Range*)
- DPV – Voltametria de pulso diferencial (do inglês, *differential pulse voltammetry*)
- LOD – Limite de detecção
- LOQ – Limite de quantificação
- PVC – Policloreto de vinila (do inglês, *polyvinyl chloride*)
- SPCE – Eletrodo de carbono impresso (do inglês, *screen-printed carbon electrode*)
- UV – Ultravioleta
- HDL – Lipoproteína de alta densidade (do inglês, *high density lipoprotein*)
- GC – Cromatografia Gasosa (do inglês, *gas chromatography*)
- HPLC – Cromatografia Líquida de alta eficiência (do inglês, *high performance liquid chromatography*)
- LC/MS/MS – Cromatografia Líquida com detecção por espectrometria de massa
- ABTS – 2,2 azinobis (3-etilbenzotiazolona-6-ácidosulfônico)
- DPPH – 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
- UV/VIS – Ultravioleta-visível
- SWV – Voltametria de Onda Quadrada (do inglês *Square Wave Voltammetry*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 VINHOS.....	16
1.2 RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES.....	18
1.3 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	21
1.4 ELETRODOS IMPRESSOS	27
1.5 MICROFLUÍDICA	29
2 OBJETIVOS	34
2.1 OBJETIVO GERAL	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3 METODOLOGIA	35
3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES	35
3.2 MATERIAIS	36
3.2.1 Amostras de vinho.....	36
3.2.2 Soluções.....	36
3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	37
3.3.1 Construção do μ TED	37
3.3.2 Avaliação da vazão do μ TED	39
3.3.3 Caracterizações eletroquímicas e procedimento analítico	39
3.3.4 Estudos de espécies concomitantes	40
3.3.5 Método comparativo: método de Folin-Ciocalteu	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 CARACTERIZAÇÃO VOLTAMÉTRICA DOS ANTIOXIDANTES	42
4.1.1 Ácido Cafeico	42
4.1.2 Ácido Gálico	43
4.2 EFEITO DO PH SOBRE O COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DOS ANTIOXIDANTES	45
4.3 DETERMINAÇÃO DOS POLIFENÓIS – SISTEMA μ TED UTILIZANDO ELETRODO IMPRESSO (EI).....	47
4.3.1 Caracterização voltamétrica dos antioxidantes sobre eletrodo de carbono impresso.....	47
4.3.2 Funcionamento do μ TED	49
4.3.3 Estudo da vazão.....	50

4.3.4 Efeito do potencial aplicado sobre a resposta amperométrica	51
4.3.5 Avaliação da repetibilidade da resposta amperométrica do μ TED	54
4.3.6 Desempenho analítico do μ TED na determinação de ácido cafeico e de ácido gálico.....	56
4.4 ESTUDO DE ESPÉCIES CONCOMITANTES	60
4.5 APLICAÇÃO DO μ TED NA ESTIMATIVA DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM AMOSTRAS DE VINHO.....	63
5 CONCLUSÃO	67
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 VINHOS

Os alimentos fornecem não apenas os nutrientes essenciais para a vida, mas também compostos bioativos que exercem um papel muito relevante na saúde humana, promovendo benefícios e reduzindo o risco do desenvolvimento de doenças. Com esta motivação, a relação entre dieta e saúde desenvolveu uma intensa pesquisa sobre compostos bioativos em alimentos, em que dentre estes alimentos, o vinho parece ser um componente essencial e pode ser parcialmente responsável pelas propriedades benéficas à saúde observadas, por exemplo, entre a população mediterrânea [1].

O ponto de partida para os estudos relacionando a ingestão de vinho a benefícios à saúde foi a partir do "Paradoxo Francês", proposto por Renaud e De Lorgeril [2]. O estudo relata que apesar desta população ter uma dieta tradicionalmente rica em gorduras saturadas, as taxas de infarto do miocárdio na França são 40% mais baixas do que no resto da Europa. Além deste, estudos de diferentes partes do mundo com grupos populacionais diversos sugeriram que o consumo moderado (1-2 copos por dia) de vinho reduz o risco de doenças cardiovasculares [3-5]. Os efeitos relatados podem ser associados às dietas suplementadas pelo consumo de vinho, pois há um aumento da capacidade antioxidante total no plasma, da lipoproteína HDL, atividade fibrinolítica e antitrombina. Além disso, há a redução dos danos oxidativos e de agregação plaquetária [6,7].

Entre os vinhos, o vinho tinto é considerado como tendo um maior efeito protetor, devido ao seu maior conteúdo em substâncias antioxidantes liberadas. Essas substâncias antioxidantes, principalmente polifenóis, são liberadas da pele da uva e sementes. Uma garrafa de vinho tinto contém um total de 1,8 g/L de polifenóis, enquanto que uma garrafa de vinho branco contém apenas 0,2 - 0,3 g/ L de polifenóis [5]. Na confecção do vinho branco, a pele e as sementes são removidas imediatamente do suco obtido, que é deixado fermentar sem elas. Como a capacidade antioxidante *in vitro* está fortemente correlacionada com o conteúdo total de polifenóis, os vinhos brancos apresentam cinco a dez vezes menos atividade antioxidante do que os vinhos tintos [8]. No entanto, o vinho branco contém

adicionalmente uma elevada quantidade de ácidos hidroxicinâmicos, tirosol e hidroxitirosol, que também são conhecidos por terem algumas propriedades antioxidantes.

Apesar de já existirem diversos estudos que correlacionassem o aumento da ingestão de vinho com uma melhora na saúde dos consumidores, havia ainda suposições de que este mesmo efeito poderia ser alcançado ingerindo-se outros tipos de bebidas alcoólicas como bebidas destiladas e cerveja [1]. Estas suposições motivaram trabalhos como os de Rimm *et al.* [9] e Gronbaek *et al.* [10] que relacionaram o consumo moderado de álcool proveniente de cervejas, bebidas destiladas e vinhos com a diminuição do risco de doenças cardíacas. Em ambos os estudos apenas com o consumo de vinho houve uma queda no risco de desenvolvimento de doenças cardíacas nas populações estudadas. Foi com base nestas conclusões, que os benefícios à saúde passaram a ser associados não apenas ao consumo de bebidas alcoólicas, mas sim ao consumo do vinho, principalmente ao vinho tinto, e fizeram com que a atenção dos pesquisadores se concentrasse em compreender e quantificar os compostos fenólicos.

Vários estudos têm sido realizados para diferenciar os efeitos dos componentes fenólicos e outros componentes não-alcoólicos do vinho dos efeitos do álcool. Al-Awwadi *et al.* [11] compararam a pressão arterial, peso cardíaco e espécies reativas de oxigênio em ratos cuja alimentação tinha sido suplementada com um extrato polifenólico proveniente de vinho tinto, etanol ou extrato polifenólico e etanol juntos. Em que tiveram como resultados que a ação do extrato polifenólico do vinho tinto isolado preveniu a hipertrofia cardíaca e a produção de espécies reativas de oxigênio, enquanto que o extrato quando consumido em associação com etanol foi capaz de causar o mesmo efeito e ainda prevenir a hipertensão em ratos com resistência insulínica alimentado com frutose. O que indica que o consumo de vinho pode oferecer um maior número de benefícios do que em produtos que tenham na sua composição apenas os compostos fenólicos sem a presença de etanol.

Pesquisas com humanos mostraram que a concentração de polifenóis no plasma aumentou significativamente após a ingestão de vinho tinto. A concentração de catequina, um dos constituintes fenólicos mais abundantes do vinho tinto, aumentou de 2 nmol/L para 91 ± 14 nmol/L em nove voluntários saudáveis, após o consumo de 120 mL de vinho tinto [12].

Visto todas as benfeitorias que podem ser alcançadas apenas pela ingestão diária e moderada de vinho e, que esses benefícios estão fortemente ligados à presença dos compostos fenólicos na composição dos vinhos, torna-se imprescindível entender como atuam esses compostos antioxidantes individualmente e os efeitos sinérgicos dos mesmos na presença de outros compostos bioativos.

1.2 RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES

Radicais livres podem ser definidos como espécies contendo um ou mais elétrons desemparelhados [13]. Este desemparelhamento de elétrons confere alta reatividade a essas moléculas, fazendo com que sejam capazes de facilmente extrair elétrons de outras moléculas que entrem em contato e, terem tempos de meia vida muito curtos [14]. Os radicais derivados do oxigênio e do nitrogênio representam a classe mais importante de espécies radicais geradas em sistemas vivos [15].

As espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*), assim como as espécies reativas de nitrogênio (RNS, do inglês *Reactive Nitrogen Species*) são, principalmente, produtos provenientes do mecanismo celular, que podem atuar de forma benéfica ou maligna no organismo dos seres vivos [16,17]. Sendo benéficos, em concentrações baixas ou moderadas, pois atuam modulando as cinases e fosfatases, que são essenciais nos mecanismos de sinalização celular e, que só ocorrem com o envolvimento de outras moléculas bioativas, provenientes da reação das ROS/RNS com os lipídeos da membrana celular [16,18]. Além disso, podem atuar na defesa contra agentes infecciosos [16].

Entretanto, quando em excesso, estes radicais livres podem atuar de forma nociva aos seres vivos, causando danos biológicos devido as modificações adversas aos componentes celulares, tais como lipídeos, proteínas e DNA [18], prejudicando o equilíbrio e gerando o estresse oxidativo [19]. Além do próprio organismo, alguns outros fatores podem atuar como meio para a geração de ROS e RNS, dentre estes, podem ser citados o fumo proveniente do cigarro, a poluição, a radiação UV e a alimentação, bem como a existência de alguns processos fisiopatológicos, tais como envelhecimento, obesidade, inflamações, entre outros [20].

O dano causado aos componentes celulares tende a se acumular e, com o passar dos anos, contribui para a degeneração das células, sendo responsáveis pelo desenvolvimento de algumas patologias, tais como doenças cardiovasculares, doença de Alzheimer, mal de Parkinson, câncer e diabetes [21-24]. Por isso, de modo a alcançar o equilíbrio entre os efeitos benéficos e os nocivos dos radicais livres, o organismo, quando exposto à radicais de uma variedade de fontes, passou a desenvolver uma série de mecanismos antioxidantes de defesa [25].

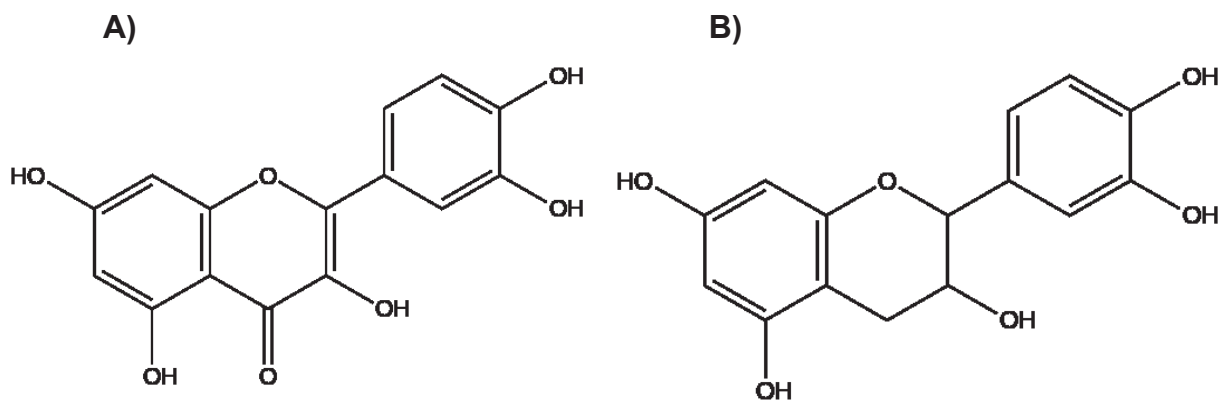
Diversas definições de antioxidantes podem ser encontradas na literatura, Halliwell e Gutteridge [26] definiram os antioxidantes como "qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação com a de um substrato oxidável, atrasa ou inibe significativamente a oxidação desse substrato", mas posteriormente os define como "qualquer substância que atrasa, impede ou remove o dano oxidativo a uma molécula alvo" [27]. Entretanto, Huang *et al* [28] define os antioxidantes como uma substância sintética ou natural adicionada a produtos para prevenir ou retardar a ação dos mesmos pela ação do oxigênio presente no ar, sob um ponto de vista biológico. Enquanto que em bioquímica e medicina os antioxidantes são definidos como enzimas ou substâncias orgânicas tais como vitamina E e β -caroteno, capazes de agir contra danos da oxidação em tecido animal.

Os mecanismos antioxidantes de defesa contra os ROS e RNS nos seres humanos, dependem da produção de antioxidantes endógenos e também dos antioxidantes exógenos, que são complementados por meio da dieta. Os antioxidantes endógenos podem ser divididos em enzimáticos e não-enzimáticos, sendo os enzimáticos a superóxido dismutase, a catalase, a glutathione peroxidase e os não-enzimáticos o ácido úrico, a albumina e as metaloproteínas [28,29]. Já os antioxidantes exógenos, podem ser de origem natural, tal como as vitaminas, flavonóides, antocianinas e alguns compostos minerais; ou de origem sintética, como é o caso do butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG) [29,30].

Dentre os antioxidantes de origem natural, os compostos fenólicos são os mais abundantes, e podem ser divididos em dois grupos: flavonóides e não flavonóides. Os denominados de flavonóides são os que apresentam a estrutura química descrita como C6-C3-C6 [31], dentre eles estão a quercetina (2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-tri-hidroxi-4H-cromen-4-ona) e a catequina (2-(3,4-dihidroxifenil)

-3,4-di-hidro-2H-cromeno-3,5,7-triol), que estão representados nas FIGURA 1A e FIGURA 1B.

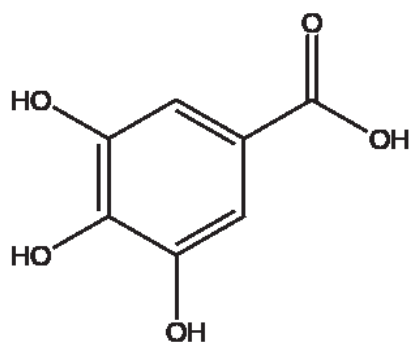
FIGURA 1 – (A) FÓRMULA ESTRUTURAL DA MOLÉCULA DE QUERCETINA E (B) FÓRMULA ESTRUTURAL DA MOLÉCULA DE CATEQUINA



FONTE: A autora (2017)

Já os denominados não flavonóides englobam a estrutura C6-C1, como é o caso do ácido hidróxibenzóico, do ácido elágico e do ácido gálico, este último possui fórmula estrutural representada na FIGURA 2.

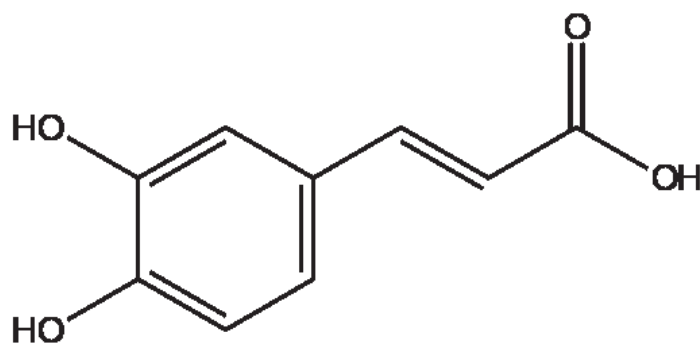
FIGURA 2 - FÓRMULA ESTRUTURAL DO ÁCIDO GÁLICO



FONTE: A autora (2017)

Dentre os compostos de estrutura C6-C3 podem-se citar o ácido caftárico, *p*-cumárico e ácido cafeico, cuja estrutura está representada na FIGURA 3. Os compostos de estrutura C6-C2-C6 são os estilbenos, *trans*-resveratrol e o resveratrol.

FIGURA 3 - FÓRMULA ESTRUTURAL DO ÁCIDO CAFEICO



FONTE: A autora (2017)

Bebidas como sucos de frutas, chás, café, vinhos, também óleos vegetais e sementes possuem grandes quantidades de antioxidantes, como polifenóis, vitamina C, vitamina E, β -caroteno e licopeno [31-36]. Uma vez que o consumo destes alimentos está diretamente relacionado à diminuição de doenças degenerativas [21-24,37,38], tem sido relevante o número de estudos objetivando o conhecimento da capacidade antioxidante de diversos tipos de alimentos, tais como os anteriormente citados, e que estão inseridos na dieta dos seres humanos.

1.3 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A medida da capacidade antioxidante (AC, *do inglês antioxidant capacity*) considera a ação cumulativa de todos os antioxidantes presentes no meio, proporcionando assim um parâmetro integrado ao invés da simples soma de antioxidantes mensuráveis [39]. Devido à complexidade das amostras, separar cada composto antioxidante e estudá-lo individualmente é dispendioso e ineficiente [28]. O que dificulta o desenvolvimento de um ensaio validado, que seja capaz de medir de forma confiável a capacidade antioxidante total em alimentos e amostras biológicas. O que torna o estudo dos antioxidantes tão complexo e rico em conteúdos reportados na literatura.

Neste contexto, serão apresentados alguns dos métodos analíticos desenvolvidos para estimar a capacidade antioxidante em amostras de interesse. Estes métodos diferem no mecanismo de geração das diferentes espécies de radicais e/ou moléculas-alvo, e na maneira como os produtos finais são medidos,

podendo utilizar das técnicas cromatográficas, espectrofotométricas e eletroquímicas como ferramentas de análise química.

Os métodos cromatográficos são os mais frequentemente utilizados para separação, identificação e detecção de antioxidantes. As técnicas mais utilizadas para este tipo de análise são as de cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em sua maioria, com detectores por espectrometria de massas ou UV-Vis.

Weingerl e colaboradores [40] fizeram um estudo utilizando cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas (LC/MS/MS) e UV-Vis (HPLC-UV/Vis) para a determinação de ácido gálico, catequina, epicatequina, resveratrol, quercetina, ácido dihidrobenzóico, ácido sinápico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido férulico, ácido elágico, ácido p-cumárico e ácido cártarico em 141 amostras de vinho. Em seguida, as mesmas amostras foram analisadas pelo método espectrofotométrico utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, e os resultados obtidos foram comparados aos encontrados a partir dos métodos cromatográficos. Com base nos padrões escolhidos, as técnicas cromatográficas apresentaram uma correlação satisfatória nas determinações, sendo que os resultados obtidos por HPLC-UV/Vis obtiveram resultados superestimados em torno de 15-20% em relação ao obtidos por LC/MS/MS. Entretanto, quando comparado os resultados obtidos por LC/MS/MS com o método espectrofotométrico, as discrepâncias foram significativas, indicando que o método utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu pode fornecer resultados superestimados para fins quantitativos com relação à capacidade antioxidante.

Métodos espectrométricos foram desenvolvidos empregando uma grande variedade de técnicas para a quantificação de compostos antioxidantes, porém a de maior reconhecimento e utilização envolve o emprego do reagente de Folin-Ciocalteu [28,31,40-44]. Esse reagente consiste em uma mistura de heteropoliácidos, ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico, nos quais tanto o molibdênio quanto o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6⁺ [45,46]. O reagente de Folin-Ciocalteu é conhecido por reagir com todas as espécies redutoras do meio, sob condições alcalinas, mudando sua coloração de amarelo para azul, tornando possível a detecção da espécie formada com o auxílio de um espectrofotômetro [47], no qual uma banda com comprimento de onda de 750 nm pode ser monitorada [41]. Mesmo sendo um método bastante empregado para a

estimativa de fenóis totais em diversas amostras, esta técnica não é seletiva, já que pode reduzir outros compostos não fenólicos, como açúcares, ácido ascórbico, entre outros, também presentes nas amostras. Assim, diversos compostos podem ser potencialmente redutores concomitantemente com o analito presente na matriz, o que pode contribuir na resposta obtida, fornecendo resultados superestimados [41]. Ainda dentre os métodos cuja detecção espectrofotométrica é empregada, pode-se citar dois deles que tem como princípio a reação entre os antioxidantes e radicais orgânicos, e que são denominados de acordo com as siglas dos seus radicais, por exemplo, DPPH [43,48,49] e ABTS [50-53].

O método DPPH utiliza um radical livre estável e comercialmente disponível, o 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•), em que a deslocalização do elétron no radical confere a este composto, cor roxa, cuja banda de absorção aparece em 520 nm em um espectro eletrônico na região UV-Vis. Quando este radical reage com um doador de hidrogênio, ocorre sua redução, levando ao desaparecimento da cor roxa [29]. Desta maneira, pode-se relacionar a quantidade de antioxidante existente no meio ao acompanharmos o decréscimo da intensidade da banda no supracitado comprimento de onda.

No método ABTS, para que ocorra a formação do radical catiônico (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS•⁺), que em solução apresenta cor verde-azulado, é necessário que sua forma reduzida seja oxidada pelo persulfato de potássio ou dióxido de manganês [29]. A reação entre a espécie ABTS•⁺ e os antioxidantes pode ser monitorada pelo desaparecimento da sua cor e, conseqüentemente, um abaixamento da absorbância na faixa entre 600 e 750 nm. Para este método, geralmente, a capacidade antioxidante é estimada a partir da correlação com uma curva analítica obtida da reação entre o radical catiônico e Trolox (2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico), que é um equivalente comercial da vitamina E [28,54]. Sendo assim, uma das limitações deste método pode ser atribuída ao fato de que o mesmo não estima a capacidade de inibição do processo de oxidação, mas demonstra a capacidade da amostra testada para reagir com o ABTS•⁺ [54], o que pode levar a obtenção de resultados equivocados.

Há ainda entre os métodos colorimétricos aqueles em que as reações de interesse envolvem a redução de complexos de ferro e cobre por antioxidantes, em que a mudança do estado de oxidação dos metais leva à alteração de cor na solução, que podem ser acompanhadas por um espectrofotômetro. O método de

determinação de antioxidantes totais por redução de ferro (FRAP, do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*) é baseado na capacidade de alguns antioxidantes reduzirem o complexo férrico amarelo, *bis*-[2,4,6-tripiridil-s-triazil] ferro(III) $\{[Fe^{III}(TPTZ)_2]^{3+}\}_v$ ao complexo ferroso azul, $[(Fe^{II}(TPTZ)_2)]^{2+}$, que pode ser monitorado em 593 nm [55]. Enquanto que o método de determinação de antioxidantes totais por cobre (CUPRAC) é baseado na redução de Cu(II) a Cu(I) por antioxidantes presentes na amostra. O ligante neocuproína (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina) forma um complexo com Cu(I), que ao contrário da sua espécie oxidada com Cu(II), apresenta coloração intensa sendo suscetível de ser quantificada espectrofotometricamente em 490 nm [28]. Assim como nos demais métodos espectrofotométricos, estes podem fornecer resultados superestimados, pois os complexos podem ser reduzidos por outras espécies que não são, de fato, antioxidantes. Além disso, o tempo de reação é um fator importante para estes ensaios, já que a cinética de cada processo depende das características dos antioxidantes presentes, logo cada espécie presente no meio reacional demanda quantidades singulares de tempo de reação.

As vantagens das técnicas espectrofotométricas frente às técnicas cromatográficas estão na simplicidade e baixo custo dos equipamentos, determinações utilizando medidas espectrofotométricas (DPPH, ABTS e FRAP) são simples e rápidas e só precisam de um espectrofotômetro UV-Vis, o que provavelmente explica a sua utilização generalizada em ensaio para determinação antioxidante. Entretanto, cada técnica, das apresentadas anteriormente, deve ser escolhida em função da natureza da amostra e a comparação só é válida para os mesmos tipos de amostras. O desenvolvimento de técnicas analíticas tem como objetivo simplificar os processos, diminuir o tempo de duração da análise obtendo procedimentos que oferecem maior sensibilidade, precisão e baixo limite de detecção.

As técnicas eletroquímicas aparecem como uma alternativa interessante para a determinação de muitos analitos, devido a sua fácil operação, alta sensibilidade, utilização de instrumentos portáteis e materiais de baixo custo. Tais técnicas oferecem uma vasta gama de métodos para análises dentre elas: coulometria, potenciometria, voltametria e amperometria, muitas vezes disponíveis em um mesmo equipamento. [56] Estas técnicas são classificadas de acordo com a propriedade elétrica utilizada para a quantificação do analito [57], como por exemplo:

- i. Coulometria: medida da quantidade de carga (Q) consumida para a conversão (oxidação ou redução) de uma determinada espécie.
- ii. Potenciometria: medida de potencial gerado pela alteração da concentração de uma espécie em uma célula eletroquímica.
- iii. Voltametria/Amperometria: medida da corrente gerada pela reação de oxidação ou redução de uma espécie química na superfície de um eletrodo.

Dentre as técnicas mais utilizadas para determinação de antioxidantes estão as voltamétricas e amperométricas. A voltametria uma das técnicas mais utilizadas, e está baseada na aplicação de uma diferença de potencial elétrico (varredura de potencial) a um eletrodo de trabalho, com a consequente medida da corrente elétrica obtida pela transferência de elétrons durante um processo redox [58-60].

A voltametria cíclica, em que o potencial varia linearmente de um valor inicial a um valor final e, em seguida a varredura é feita no sentido inverso, sendo capaz de fornecer os potenciais anódicos e catódicos, assim como as intensidades de corrente de pico para cada espécie presente na amostra. Devido a isto, pode ser considerada uma técnica fundamental e tem sido aplicada em diversos trabalhos [36,61-63].

Contudo, as técnicas voltamétricas pulsadas tem ganho destaque nos trabalhos mais atuais [35,62], juntamente à técnica de redissolução adsorptiva [64]. Neste método o eletrodo é imerso em uma solução contendo o analito e mantido sob agitação por vários minutos, promovendo a adsorção física do analito na superfície do eletrodo. Após o acúmulo de uma quantidade suficiente do analito, a agitação é interrompida e o material depositado é determinado por medidas voltamétricas [65] que podem ser pulsadas como voltametria de pulso diferencial (DPV) ou voltametria de onda quadrada (SWV), que fornecem baixos limites de detecção e quantificação frente à voltametria linear e cíclica.

Ziyatdinova e colaboradores [35] determinaram a capacidade antioxidante em amostras de café utilizando as técnicas de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial, utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas. O eletrodo forneceu resposta elétrica devido à oxidação dos ácidos hidroxicinâmicos (clorogênico, cafeico, p-cumárico e ferúlico), sendo o ácido clorogênico o que apresentou maior sensibilidade e o utilizado como padrão para expressar capacidade antioxidante em 100 mL de café, que foi determinado por voltametria de pulso diferencial, obtendo uma correlação positiva

entre a capacidade antioxidante do café com base na curva analítica a partir de ácido clorogênico e a capacidade de redução do complexo férrico baseado em titulação coulométrica com íons de hexacianoferrato (III) eletrogerados.

Dentre as técnicas eletroquímicas, a amperometria - que se baseia na medida da corrente elétrica sob um potencial aplicado constante, em que a corrente registrada é gerada devido à oxidação ou redução de uma espécie em análise, podendo ser relacionada à sua concentração - tem demonstrado significativa aplicabilidade no desenvolvimento de sensores e já tem garantido seu espaço comercialmente como, por exemplo, com os sensores de glicose.

A detecção amperométrica de antioxidantes vem sendo reportada na literatura com trabalhos como o de Blasco e colaboradores [41], em que é proposto um protocolo eletroquímico para determinação de “polifenóis total” em alimentos utilizando um sistema em fluxo (FIA) com detecção amperométrica com base em um eletrodo de carbono vítreo tendo como padrões ácido clorogênico e catequina, obtendo resultados comparáveis ao método espectrofotométrico padrão. E o de Sánchez Arribas e colaboradores [66] propõem, um método de determinação de polifenóis totais em vinhos com uso de eletrodos de carbono vítreo modificado com filmes de nanotubos de carbono de paredes múltiplas para o monitoramento contínuo de polifenóis em sistemas de fluxo. O desempenho desse eletrodo modificado foi avaliado e comparado aos eletrodos sem modificação por experimentos de voltametria cíclica e por FIA com detecção amperométrica para o monitoramento da resposta de gálico, cafeico, ferúlico e os ácidos p-cumárico. Os eletrodos modificados apresentaram maior sensibilidade e estabilidade de sinal que os sem modificação, e assim como o método proposto por Blasco, os resultados foram comparáveis ao método padrão.

Associada a esta gama de técnicas eletroquímica disponíveis, as análises eletroanalíticas possibilitam ainda a utilização de eletrodos confeccionados a partir de diferentes materiais eletródicos e tamanhos cada vez mais diferenciados. O desempenho das técnicas eletroquímicas está fortemente associado aos eletrodos utilizados, e deles se espera que funcionem de maneira contínua e reprodutível e, que sejam capazes de realizar medidas diretamente na matriz da amostra, sem preparação prévia, obtendo as informações em tempo real. Além disso, que sejam de fácil portabilidade e automação, miniaturizáveis e de baixo custo [58].

Os eletrodos à base de carbono são amplamente utilizados na Química Eletroanalítica, devido à sua ampla janela de potencial, baixo custo, grande área superficial e baixa corrente de fundo se comparado a outros materiais. Ainda, possibilitam a construção de eletrodos em diversas formas como o carbono vítreo, pasta de carbono, diamante, grafite, eletrodos impressos, entre outros [67,68]. Pode-se, então, destacar os eletrodos impressos, que vem como uma alternativa à miniaturização do sistema de três eletrodos, possibilitando a fabricação de um sistema completo contendo os eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, todos impressos no mesmo suporte. Além de permitir a confecção em diferentes configurações de forma comercial ou manualmente pelo método de serigrafia [69,70].

1.4 ELETRODOS IMPRESSOS

Os eletrodos impressos (EI) podem ser definidos como um filme condutor que é depositado sobre um suporte inerte, geralmente de cerâmica ou um polímero como PVC. Sobre esse filme condutor, é adicionado uma camada de uma tinta inerte a fim de delimitar a área do eletrodos [69].

A incorporação do sistema convencional de três eletrodos: eletrodo de trabalho (ET), eletrodo de referência (ER) e eletrodo auxiliar (EA) (FIGURA 4), utilizados em diversas medidas eletroquímicas em um único suporte, gerando um dispositivo com diversas vantagens: compacto e dimensões reduzidas gerando maior portabilidade, baixo custo, descartável, evitando problemas de contaminação e envenenamento de superfície são as características que tornam a aplicação dos eletrodos impressos bastante atraentes para aplicações eletroanalíticas [71].

FIGURA 4 – IMAGEM DE UM ELETRODO IMPRESSO COMERCIAL



FONTE: Dropsens (2017)

Atualmente são relatados diversos métodos de fabricação de EI, tais como a impressão a jato de tinta, rotogravura e a flexografia [72], entretanto na área dos EI, uma das técnicas de impressão mais utilizadas a baseada na tecnologia *silk-screen* [69,70,72,73].

A produção de eletrodos via *silk-screen* é equivalente à utilizada para a produção de estampas para tecidos. Uma tela contendo o *design* do eletrodo a ser impresso é colocada sobre um substrato que pode ser um plástico como polietileno tereftalato (PET), cloreto de polivinila (PVC), cerâmica ou alumina e a tinta condutora é forçada a passar pelo desenho pré-definido, formando um filme no formato desejado [69]. Após impressão da tinta condutora, o filme é seco a altas temperaturas e recoberto com tinta isolante com base em um molde delimitando a área dos eletrodos. Além disso, pela modificação dos eletrodos impressos torna-se possível o desenvolvimento dos mais variados sensores para atender a crescente demanda, principalmente nas áreas médica, industrial e ambiental, que necessitam de métodos de detecção portáteis [74].

Geralmente, as tintas condutoras utilizadas nos EI impressos por *silk-screen* são constituídas por três componentes básicos: um condutor metálico em pó (ouro, platina, prata) ou não metálico (grafite), um agente ligante (pó de vidro, resinas ou acetato de celulose) e um solvente (terpineol, 2-etoxietanol, ciclo-hexanona, etilenoglicol). O solvente proporciona a viscosidade adequada para o processo de impressão e volatilidade para cura térmica, enquanto que o agente de ligação melhora a resistência mecânica da tinta e a sua adesão no substrato [72].

No entanto, o emprego dos EI é uma alternativa frente ao uso de eletrodos convencionais, como, por exemplo, eletrodos de mercúrio, carbono vítreo, pasta de

carbono, ouro, platina, prata, entre outros. O maior atrativo destes métodos de impressão, aplicados ao desenvolvimento de eletrodos, consiste na substituição dos eletrodos sólidos, possibilitando a construção de sistemas mais simples, mais compactos e descartáveis. Portanto, eliminando os problemas provenientes do envenenamento da superfície do eletrodo, o que diminui as etapas de limpeza entre as análises, consequentemente a necessidade de um operador, oferecendo simplicidade no desenvolvimento de sensores portáteis e permitindo a automação do sistema [69].

1.5 MICROFLUÍDICA

Os sistemas em fluxo proporcionam aos procedimentos analíticos o aumento na frequência de obtenção de resultados e melhoram a precisão, porém há atualmente uma busca pela miniaturização dos sistemas analíticos visando ainda, uma diminuição das quantidades de amostras e reagentes e a possibilidade de portabilidade. Nesse sentido, os primeiros relatos foram feitos do início dos anos 50, a partir de estudos que possibilitassem a construção de um dispositivo capaz de liberar controladamente pequenas quantidades de líquidos, na faixa de nanolitros a picolitros. Estudos estes que forneceram a base para a tecnologia de jato de tinta atualmente [75] e fizeram com que miniaturização de sistemas se consolidasse e difundisse como uma sub-área do conhecimento e interesse da química analítica conhecida como microfluídica.

A microfluídica é definida como a ciência e tecnologia que tem por objetivo manipular pequenas quantidades de fluidos (entre microlitros e nanolitros) no interior de canais com dimensões micrométricas, sendo que a ciência em microfluídica se ocupa em estudar o comportamento de fluidos nos microcanais e a tecnologia se dedica a fabricação dos dispositivos ou sistemas microfluídicos, visando uma posterior aplicação [76].

A miniaturização dos dispositivos microfluídicos traz uma série de benefícios para os ensaios realizados nestes dispositivos. Uma vantagem óbvia é a redução no volume necessário de amostras, solventes e reagentes para a realização das análises. Comparado com o sistema convencional, um sistema microfluídico apresenta uma redução no volume de algumas ordens de grandeza (redução de mililitros para nanolitros), permitindo análises de volumes extremamente reduzidos

[75]. As demais vantagens associadas aos dispositivos microfluídicos incluem menor custo e rapidez por análise, menor consumo de energia, maior portabilidade, possibilidade de automação e simplificação de seus componentes [77-79].

A detecção dos analitos é uma etapa crucial em um dispositivo microfluídico, visto o alto grau de miniaturização destes sistemas. As características que um detector precisa ter em um dispositivo microfluídico incluem alta sensibilidade e razão sinal/ruído, capacidade de detecção em volumes mínimos (entre μL e fL) e tempo de resposta rápido. Portanto, as técnicas que geralmente são incorporadas aos dispositivos microfluídicos e apresentam bom desempenho são as técnicas de detecção óptica (fluorescência induzida por laser e quimioluminescência), detecção eletroquímica (condutometria, potenciometria e amperometria), espectrometria de massa (ionização por eletrospray - ESI e ionização e dessorção a laser assistida por matriz - MALDI) e detecção através de biosensores (ressonância de plasma de superfície, microbalança de cristal de quartzo, amperometria e biosensores térmicos) [80].

Um aspecto importante sobre os dispositivos microfluídicos está associado aos materiais empregados para a sua construção, os primeiros materiais utilizados para a fabricação foi o vidro baseado em processos que empregam a fotolitografia, por exemplo, como método de construção dos dispositivos, além de processos de deposição de metais e gravuras por via úmida ou seca [81]. Devido a sua resistência aos solventes orgânicos, facilidade no depósito de metais, alta condutividade térmica e mobilidade eletrosmótica estável, os dispositivos microfluídicos de silício e vidro são utilizados em eletroforese capilar, em micro-reações, formação de gotículas e na extração com solventes orgânicos. Porém, os dispositivos microfluídicos construídos com estes materiais apresentam algumas limitações que impedem sua ampla aplicação na microfluídica, entre elas estão o elevado custo de fabricação dos dispositivos, utilização de produtos químicos perigosos (como o HF), dificuldade na junção das partes dos dispositivos (necessidade de altas temperaturas e altas pressões), impossibilidade na permeação de gases e dificuldade na integração e/ou construção de microválvulas e microbombas [82].

Como uma alternativa para diminuir o custo de fabricação dos dispositivos microfluídicos e torná-los mais portáteis, o papel surgiu como um material promissor para a utilização em microanálises. Além de ser um material barato e disponível em grandes quantidades, o papel possui outras características favoráveis a sua

utilização em dispositivos microfluídicos: microcanais altamente hidrofílicos, o que faz com que o transporte de fluidos seja feito por ação capilar e dispense o uso de bombas; alta razão superfície-volume dos seus microcanais; filtragem de partículas da amostra; fácil modificação através da mudança na composição do papel ou por incorporação de espécies químicas ou bioquímicas em sua superfície; e cor branca, o que facilita as análises através dos métodos colorimétricos [83]. Em geral, as análises realizadas nos dispositivos microfluídicos em papel empregam os métodos de detecção eletroquímicos ou colorimétricos [84].

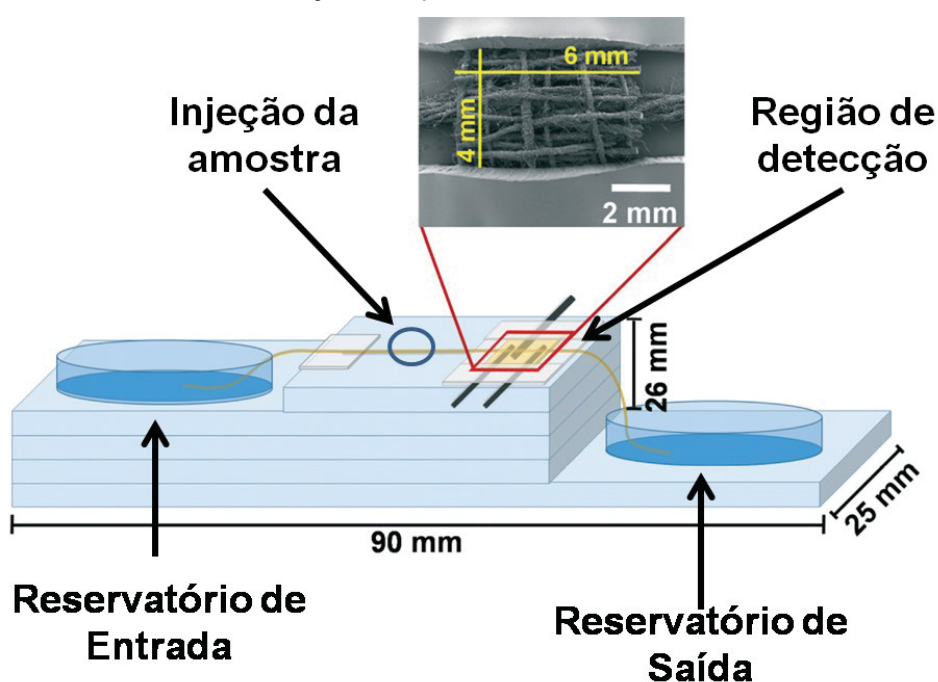
Entretanto, para a utilização do papel como um dispositivo microfluídico faz-se necessário a construção de barreiras hidrofóbicas que permitam que o líquido flua pelo microcanal confinado nas regiões hidrofílicas. Esses microcanais são construídos por meio de métodos de litografia ou impressão. Em algumas situações esta etapa de construção das barreiras hidrofóbicas para a criação dos canais, torna-se complicada, demorada, e muitos compostos utilizados não formam uma barreira hidrofóbica forte o suficiente para repelir amostras com baixa tensão superficial, causando a saída da amostra dos canais hidrofílicos [85].

Um material que recentemente surgiu como uma alternativa ao papel para a fabricação de microcanais são os fios têxteis, os quais se caracterizam por serem materiais porosos e fibrosos similares ao papel, além de serem de baixo custo e altamente disponíveis em todo o mundo. Outra semelhança com o papel se deve ao tipo de transporte a que o fluido é submetido, ou seja, por ação capilar. Esse efeito de capilaridade ocorre devido aos espaços presentes entre as fibras que compõe o fio, as quais atuam como uma bomba passiva e eliminam a necessidade da utilização de qualquer força externa para o transporte dos líquidos [86].

Além de materiais de baixo custo e processos de fabricação simples, dispositivos microfluídicos de baixo custo requerem um método de detecção rápido, sensível e facilmente integrado a estes dispositivos. Entre as técnicas normalmente utilizadas em dispositivos microfluídicos, as técnicas eletroquímicas apresentam algumas vantagens significativas para a realização de microanálises, pois o seu sistema de detecção, ou seja, os eletrodos, já são encontrados em diversas configurações miniaturizadas, sem perderem a sensibilidade em comparação aos eletrodos convencionais [87,88], podendo ser empregadas utilizando configurações eletrônicas simples, nas quais os sinais elétricos podem ser facilmente controlados e medidos através de sistemas digitais de aquisição e computadores [89].

Em nosso grupo de pesquisa foi desenvolvido um dispositivo microfluídico de baixo custo utilizando detecção eletroquímica (μ TED), utilizando placas de vidro como material para base do dispositivo e fios de algodão, proveniente de gaze utilizada para fins médicos, como canais por onde ocorre o transporte de eletrólito suporte e da solução contendo os analitos. O dispositivo proposto por Agustini e colaboradores [88] está descrito na FIGURA 5 e foi utilizado para determinação de acetaminofeno e diclofenaco com detecção por amperometria de múltiplo pulso.

FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DO μ TED BASEADO EM FIOS DE ALGODÃO



FONTE: Adaptado de Agustini et al. [88]

O funcionamento do μ TED é descrito basicamente pela solução que entra no microcanal do dispositivo (fios de algodão) através do reservatório de entrada e é transportada ao longo do dispositivo devido à ação capilar e à diferença de altura entre os reservatórios. A injeção do analito ($2,0 \mu\text{L}$) ocorre anteriormente à região de detecção o qual é transportado juntamente com o eletrólito de suporte para a região de detecção, onde ocorre a reação redox das espécies de interesse e os sinais de intensidade de corrente são registrados. Em seguida, o eletrólito de suporte e o analito são levados para o reservatório de saída. Os LODs encontrados para o acetaminofeno e diclofenaco foram de $1,4$ e $4,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. A frequência analítica foi de 45 injeções por hora e um baixo custo por dispositivo.

A fim de avaliar a potencialidade deste tipo de microdispositivo na determinação de antioxidantes, neste trabalho o sistema proposto por Agustini et al. [88] foi adaptado. A estrutura de vidro e os recipientes de entrada e saída, foram substituídos por uma única estrutura, que foi impressa em impressora 3D utilizando como matéria-prima o polímero ABS (acrilonitrila butadieno estireno), obtendo-se um novo microdispositivo com as mesmas dimensões que as do trabalho proposto. O sistema de detecção também foi alterado, passando a ser utilizado um eletrodo impresso como forma de miniaturizar o sistema de três eletrodos e os antioxidantes serão avaliados utilizando como padrões os polifenóis: ácido cafeico (AC) e ácido gálico (AG), que são espécies que são encontradas em grandes quantidades em amostras de vinho tinto e branco.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma metodologia para estimativa de antioxidantes em amostras alimentícias (vinhos) empregando um sistema microfluídico baseado em fios de algodão com detecção amperométrica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (i) Avaliar o comportamento voltamétrico dos padrões de antioxidantes escolhidos;
- (ii) Avaliar o comportamento voltamétrico dos padrões de antioxidantes escolhidos em diferentes pHs;
- (iii) Investigar a possibilidade da determinação simultânea de ácido cafeico e catequina empregando amperometria de múltiplo pulso acoplada a um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA);
- (iv) Avaliação da resposta dos antioxidantes por amperometria em um sistema hidrodinâmico;
- (v) Construir um dispositivo microfluídico baseado em fios têxteis e com materiais de baixo custo;
- (vi) Avaliar o dispositivo microfluídico com relação ao transporte de fluidos e desempenho eletroquímico;
- (vii) Utilizar o dispositivo microfluídico, sob condições otimizadas, na determinação de polifenóis;
- (viii) Utilizar o dispositivo microfluídico, sob condições otimizadas, na determinação da capacidade antioxidante em amostras de vinho.

3 METODOLOGIA

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

A TABELA 1 apresenta as informações sobre os reagentes utilizados no desenvolvimento deste trabalho, todos de grau analítico e utilizados sem purificação prévia. As soluções e diluições foram feitas em água destilada e purificada pelo sistema Milli-Q da Millipore, com resistividade maior que $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$. As medidas de pH das soluções foram realizadas em pHmetro Metrohm, Modelo 780, com eletrodo de vidro combinado Ag/AgCl/sat.

TABELA 1 - ESPECIFICAÇÕES DOS REAGENTES UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS

Reagente	Fórmula Química	Marca	Pureza
Ácido Cafeico	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$	Sigma Aldrich	$\geq 98,0\%$
Ácido Gálico	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$	Merck	$\geq 98,0\%$
Dihidrogenofosfato de potássio	KH_2PO_4	Carbo Erba	99,5%
Hidrogenofosfato dipotássico	K_2HPO_4	Synth	98,0%
Hidróxido de sódio	NaOH	Cromato	99,5%
Ácido fosfórico	H_3PO_4	Carlo Erba	85%
Etanol	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Vetec	PA
Reagente de Folin-Ciocalteu	-	Sigma Aldrich	PA
Carbonato de sódio	Na_2CO_3	Synth	PA

FONTE: A autora (2017)

3.2 MATERIAIS

Todos os materiais utilizados na fabricação do μ TED foram adquiridos no mercado local (Curitiba, PR, Brasil). Os materiais incluem fita adesiva dupla face, e gaze hidrófila de algodão. Os fios de algodão hidrofílico foram obtidos a partir do tecido das gazes hidrófilas de algodão.

3.2.1 Amostras de vinho

As amostras de vinho foram adquiridas no mercado local (Curitiba, PR) (TABELA 2). As amostras foram abertas, protegidas contra a luz solar e armazenadas na geladeira. As análises foram realizadas em poucos dias.

TABELA 2 - AMOSTRAS DE VINHOS ANALISADOS

Amostra	Cor	Tipo de uva / País	Ano	Marca
A1	Tinto	Cabernet Sauvignon – Chile	2015	Panul
A2	Tinto	Carmenere – Chile	2012	Casilleiro del Diablo
A3	Branco	Sauvignon Blanc – Chile	2015	Panul

FONTE: A autora (2017)

3.2.2 Soluções

A solução tampão fosfato (PBS, do inglês Phosphate Buffer Solution) com concentração analítica de 0,10 mol L⁻¹ foi preparada em diferentes pH (2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0) dissolvendo-se quantidades apropriadas de dihidrogenofosfato de potássio, hidrogenofosfato dipotássico e ácido fosfórico em água, o volume foi completado em um balão volumétrico. O ajuste do pH desejado foi realizado com hidróxido de sódio 1,0 mol L⁻¹ ou ácido nítrico 1,0 mol L⁻¹.

As soluções padrão dos antioxidantes (ácido gálico e ácido cafeico) foram preparadas dissolvendo-se quantidades apropriadas dos padrões em uma mistura 1:1 de solução tampão fosfato no pH de medida e etanol em um balão volumétrico. Todas as soluções estoque foram preparadas momentos antes do seu uso.

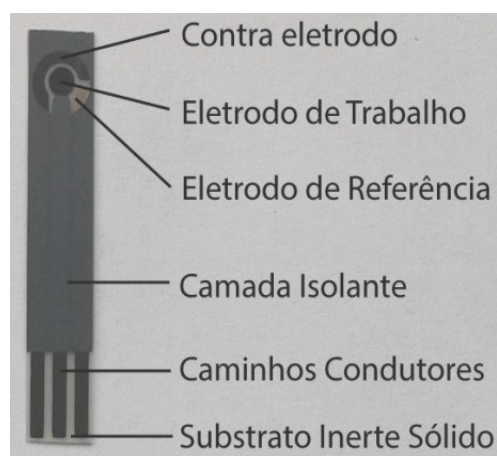
3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.3.1 Construção do μ TED

Para a construção do dispositivo microfluídico eletroanalítico (μ TED) foram utilizados como materiais a estrutura do microdispositivo impressa em impressora 3D, fios de algodão hidrofílico, fita adesiva dupla face e eletrodo impresso de carbono.

Os eletrodos impressos utilizados foram gentilmente cedidos pelo Prof. Craig Banks, Universidade metropolitana de Manchester (Inglaterra) e consistem em um eletrodo de trabalho e um contra eletrodo, ambos de grafite e um eletrodo de referência Ag/AgCl. O eletrodo de trabalho possui 3 mm de diâmetro e foram fabricados utilizando a impressora microDEK 1760RS. Para cada eletrodo fabricado, primeiramente uma camada de tinta comercial de grafite foi impressa em um filme de poliéster flexível (Autostat, 250 μ m de espessura). Após o tempo de cura da camada de grafite impresso, uma camada de pasta Ag/AgCl foi impressa sobre o substrato de poliéster para obtenção do eletrodo de referência Ag/AgCl. Finalmente, uma tinta dielétrica foi impressa sobre o substrato flexível de modo a realizar a cobertura das conexões e definir a área ativa do eletrodo, incluindo a área do eletrodo de trabalho [90]. O eletrodo está apresentado na FIGURA 6:

FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DO ELETRODO IMPRESSO UTILIZADO NESTE TRABALHO



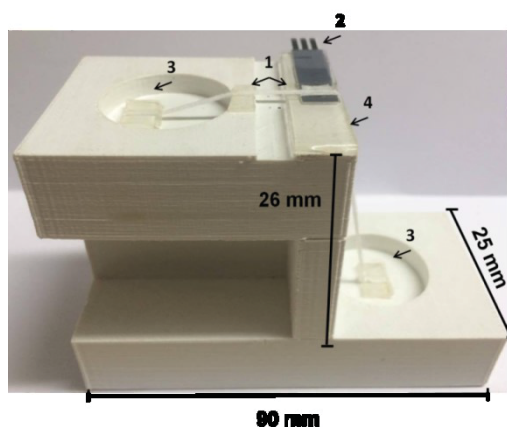
FONTE: A autora (2017)

Os fios de algodão hidrofílico foram obtidos a partir do tecido das gazes hidrófilas de algodão. Em todos os procedimentos, 09 fios de algodão são unidos por duas fitas adesivas, sem nenhuma torção e são utilizados como os microcanais do sistema microfluídico. O número de fios e o número de torções adequado para obtenção de maiores foi estudado por Agustini e colaboradores [91].

A estrutura do sistema microfluídico foi obtida por meio de impressão 3D, baseada no dispositivo microfluídico reportado por Agustini e colaboradores [88], tendo, portanto as mesmas dimensões (FIGURA 7). O material utilizado como substrato foi o polímero ABS (Acrlonitrilo-butadieno-estireno), utilizando uma impressora 3D UP3D – modelo Up Plus 2, com tamanho de camada de 0,15 mm e densidade de preenchimento 3 (em que 1 é o mais denso e 4 o menos denso).

A montagem do sistema foi feita sobre a estrutura e foram adicionados os materiais que compõe o dispositivo, em sequência descrita a seguir e ilustrada esquematicamente na FIGURA 7:

- (1) Posicionamento de um pedaço de fita adesiva dupla face perto do reservatório de entrada, que servirá como suporte para o fio ser fixado em uma altura semelhante ao eletrodo impresso e outro pedaço foi posicionado perto do reservatório de saída, que será necessário para acomodação do eletrodo impresso;
- (2) É feita a acomodação do eletrodo impresso sobre a fita adesiva fixada próxima ao reservatório de saída;
- (3) Colocação de dois pedaços de fita adesiva dupla face sobre as extremidades do eletrodo impresso para ajudar a delimitar a zona de detecção
- (4) Fixação do fio de algodão hidrofílico ao longo de todo o dispositivo, desde o reservatório de entrada até o reservatório de saída.

FIGURA 7 - ESQUEMA DO PROCESSO DE MONTAGEM DO μ TED E SUAS DIMENSÕES

FONTE: A autora (2017)

3.3.2 Avaliação da vazão do μ TED

Para a realização das medidas da taxa de fluxo da solução através do μ TED, foi utilizada uma balança analítica Mettler Toledo AL204 (Columbus, OH, USA), com precisão de $\pm 0,1$ mg, onde foi colocado sobre seu prato de pesagem um reservatório de acrílico para atuar como o reservatório de saída do dispositivo. Este reservatório de saída (situado no prato de pesagem da balança analítica) não é parte da estrutura impressa do dispositivo, mas foi mantido a uma diferença de altura de 26 mm do reservatório de entrada do μ TED com o auxílio de um suporte universal. A solução que passou pelo dispositivo microfluídico foi monitorada (durante 30 minutos) através da variação da massa do reservatório de saída, registrando a massa a cada minuto. Os valores de massa obtidos foram convertidos em volume considerando a densidade da água a 25°C ($0,9970\text{ g mL}^{-1}$). A vazão foi calculada relacionando o volume de solução que passou pelo μ TED com o tempo.

3.3.3 Caracterizações eletroquímicas e procedimento analítico

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas no μ TED, sendo utilizado um potenciostato/galvanostato μ Autolab tipo III (Metrohm Autolab, Utrecht, Holanda) controlado pelo programa NOVA 1.11. Os dados das análises foram tratados com o *software* OriginPro 8.

Durante as caracterizações eletroquímicas, foram empregadas as técnicas de voltametria cíclica e cronoamperometria, sendo os detalhes de cada procedimento descritos a seguir:

- Voltametria cíclica (CV) para caracterização dos antioxidantes utilizando eletrodo de carbono vítreo (GCE): 10 mL uma solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ dos antioxidantes tendo como eletrólito suporte uma mistura 1:1 de PBS ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,0) e etanol 99,8% foram adicionadas a uma célula convencional de três eletrodos (Contra-eletródo: Platina; Eletrodo de referência: Ag/AgCl, KCl saturada; Eletrodo de trabalho: GCE). A faixa de potencial aplicado foi de $-0,5 \text{ V}$ a $+1,3 \text{ V}$, velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , varredura de 10 ciclos para cada antioxidante.

- Voltametria cíclica para caracterização dos antioxidantes utilizando eletrodo de carbono impresso: o volume de uma gota ($\sim 20 \mu\text{L}$) de solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ dos antioxidantes tendo como eletrólito suporte uma mistura 1:1 de PBS ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,0) e etanol 99,8%, foi colocado sobre a superfície do eletrodo, de modo a cobrir os três eletrodos impressos. A faixa de potencial aplicado foi de $-0,5 \text{ V}$ a $+1,3 \text{ V}$ com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

- Cronoamperometria: o eletrólito de suporte (PBS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0) foi adicionado ao reservatório de entrada do μTED , o qual flui pelo dispositivo durante todo o tempo de análise. A solução do analito (ácido cafeico e ácido gálico) preparada em PBS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 era injetado diretamente no canal microfluídico (fio de algodão) com uma micropipeta em intervalos regulares em alíquotas de $2,0 \mu\text{L}$ a uma distância de fixa da região de detecção. Na cronoamperometria foram avaliados diferentes potenciais 200 mV ; 300 mV ; 400 mV e 500 mV .

3.3.4 Estudos de espécies concomitantes

Nas amostras estudadas, o sulfito é o único ingrediente concomitante na composição, portanto, para esta avaliação foram realizadas medidas da intensidade de corrente obtidas pela injeção das soluções dos padrões de antioxidantes de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de bissulfito de sódio (NaHSO_3) em três concentrações distintas, sendo elas 10x menor, igual e 10x maior que a concentração dos padrões.

Para isto, as medidas foram feitas tendo como solução transportadora PBS 0,10 mol L⁻¹ pH 2,0, que foi adicionada ao reservatório de entrada e fluiu pelos canais microfluídicos durante toda a análise. Foram então feitas 05 injeções de 2,0 µL dos antioxidantes e das misturas de antioxidantes e sulfito, aplicando um potencial de 300 mV ao eletrodo de trabalho. Os sinais de corrente obtidos para as espécies antioxidantes na presença e na ausência do interferente foram então comparadas.

3.3.5 Método comparativo: método de Folin-Ciocalteu

Como método comparativo, a determinação espectrofotométrica do teor de polifenóis totais foi realizada utilizando o método de Folin-Ciocalteu (FC), de acordo com o protocolo de microescala relatado para Waterhouse [92], tendo ácido gálico e ácido cafeico como padrões.

Para a preparação da curva de calibração, introduziram-se alíquotas de 20 µL de 0, 50, 100, 150, 250 e 500 mg/L dos antioxidantes em uma cubeta de quartzo, seguido de 1,58 ml de água e 100 µl de reagente FC. Após o tempo de reação de duração entre 6 - 8 minutos, foram adicionados 300 µl de solução de carbonato de sódio e a mistura foi mantida por 02 horas ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, e em seguida, medida a 750 nm utilizando um espectrofotômetro. O mesmo procedimento foi utilizado para as amostras de vinho, para vinhos brancos foi adicionada uma alíquota de 20 µL como para as soluções de calibração, sem nenhum pré-tratamento, mas no caso dos vinhos tintos, uma diluição de 10 vezes foi necessária.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

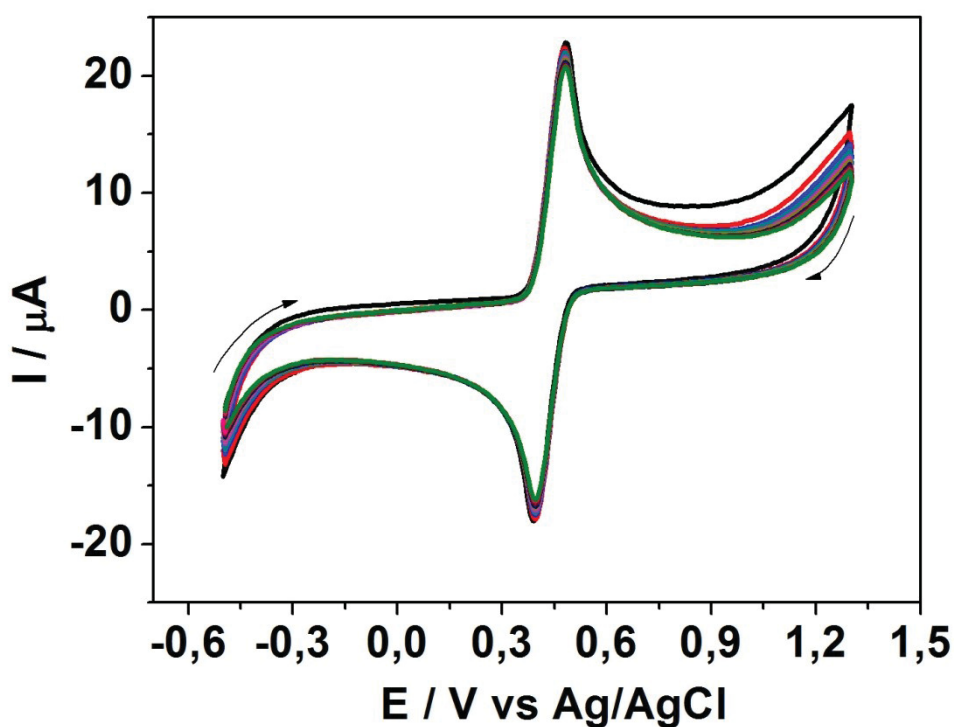
4.1 CARACTERIZAÇÃO VOLTAMÉTRICA DOS ANTIOXIDANTES

Como ponto de partida, fizeram-se estudos do comportamento voltamétrico dos antioxidantes escolhidos como padrões, sendo eles: o ácido gálico e ácido cafeico.

4.1.1 Ácido Cafeico

As medidas para o ácido cafeico foram realizadas sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo a uma varredura de potencial de -0,5 a +1,3 V, a uma velocidade de 50 mV s^{-1} para o ácido cafeico $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em uma solução 1:1 de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2 e etanol, como eletrólito suporte. Na FIGURA 8 estão apresentados os voltamogramas obtidos.

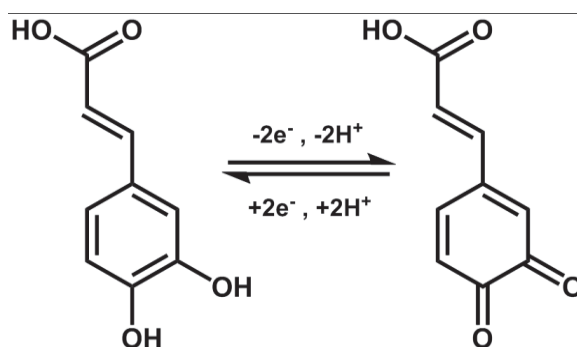
FIGURA 8 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DO ÁCIDO CAFEICO $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ EM MEIO DE PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2 E ETANOL (1:1), $v = 50 \text{ mV S}^{-1}$



FONTE: A autora (2017)

Os voltamogramas cíclicos apresentados na FIGURA 8 são característicos de uma reação eletroquimicamente reversível apresentando apenas um pico anódico em $E_{pa} = 482$ mV e um pico catódico em $E_{pc} = 388$ mV. Para o sistema estudado $(E_{pa} + E_{pc})/2 = 435$ mV, o que se aproxima muito dos valores de potencial padrão (E°) e potencial formal ($E^{\circ'}$) em diferentes condições de meio ácido para o par redox quinona-hidroquinona ($E^\circ = 455$ mV e $E^{\circ'} = 452$ mV em $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 , HClO_4 e HCl), o que pode ser um indicativo da formação da *o*-quinona (*o*-HCAF) envolvendo a transferência de dois prótons e dois elétrons [93], conforme a FIGURA 9.

FIGURA 9 - MECANISMO PROPOSTO PARA A OXIDAÇÃO DO ÁCIDO CAFEICO [94]



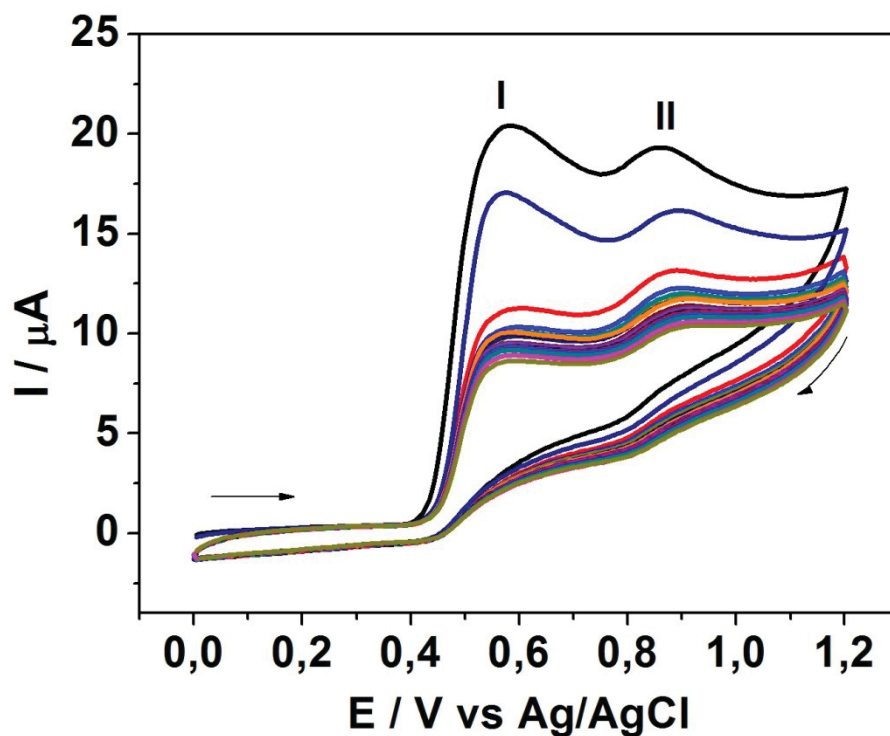
FONTE: A autora (2017)

Outra característica significativa está que mesmo após 10 ciclos, não houve mudança significativa na intensidade de corrente dos voltamogramas, o que indica que a espécie não tende a ficar adsorvida na superfície do eletrodo.

4.1.2 Ácido Gálico

As medidas para o ácido gálico foram realizadas sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo a uma varredura de potencial de 0,0 a 1,2 V, a uma velocidade de 50 mV s^{-1} em uma solução ácido gálico de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ 1:1 em meio de PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2 e etanol, como eletrólito suporte. A FIGURA 10 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos.

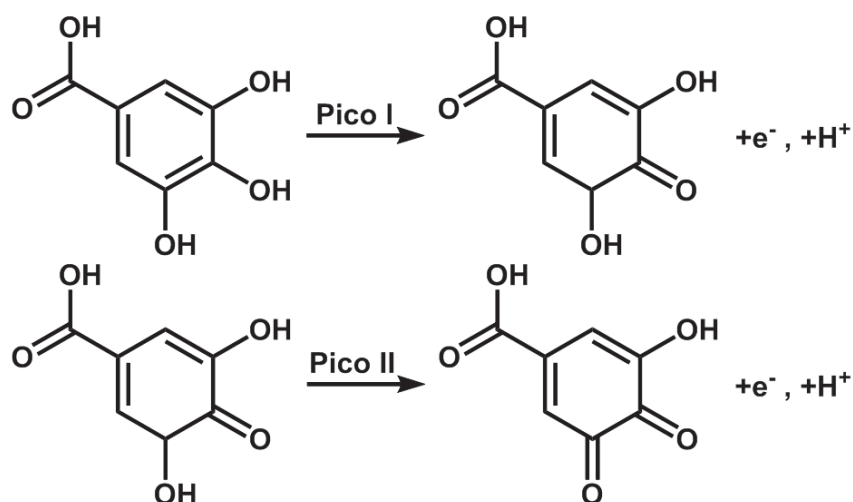
FIGURA 10 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DO ÁCIDO GÁLICO $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ EM MEIO DE PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2 E ETANOL (1:1), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$



FONTE: A autora (2017)

De acordo com os voltamogramas apresentados na FIGURA 10, a oxidação eletroquímica do ácido gálico é caracterizada por dois processos faradaicos, em que o pico I em $E = 577 \text{ mV}$ foi atribuído à formação do radical semiquinona, seguido da oxidação para a sua forma de quinona, representada pelo pico II em $E = 859 \text{ mV}$, aproximadamente. Ambos os processos envolvem um próton e um elétron, conforme pode ser visto na FIGURA 11, e a ausência de pico catódico indica a irreversibilidade do processo [95,96]. Observa-se, também, que após ciclos sucessivos há um decréscimo na intensidade de corrente de pico, que pode ser atribuída a adsorção dos produtos formados na superfície do eletrodo, o que dificulta a oxidação das espécies, devido ao bloqueio da superfície eletródica.

FIGURA 11 - MECANISMO PROPOSTO PARA OXIDAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO[95]

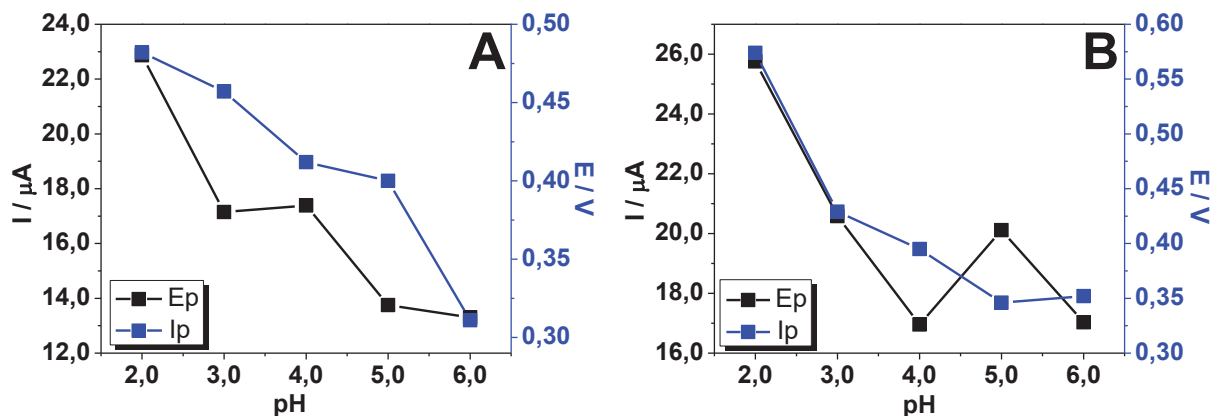


FONTE: A autora (2017)

4.2 EFEITO DO pH SOBRE O COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DOS ANTIOXIDANTES

A influência do pH sobre o perfil voltamétrico foi avaliada por voltametria cíclica em uma solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido cafeico e de ácido gálico em meio de PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ variando-se o pH em uma faixa de 2,0 a 6,0, a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , sobre um eletrodo de carbono vítreo. Para quantificar o efeito do pH, a partir dos voltamogramas cíclicos obtidos, foram medidas as intensidades de correntes de pico anódico (I_p) e o potencial de pico anódico (E_p) para cada um dos pHs testados. Os resultados podem ser verificados na FIGURA 12.

FIGURA 12 - INTENSIDADE DE CORRENTE DE PICO ANÓDICA E POTENCIAL DE PICO DOS VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS EM SOLUÇÃO DE $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ DE (A) ÁCIDO CAFEICO E (B) ÁCIDO GÁLICO EM PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ EM DIFERENTES VALORES DE pH. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$



FONTE: A autora (2017)

Para ambos os antioxidantes, apesar de algumas variações, pode-se observar uma tendência, que permite relacionar o aumento do pH com o deslocamento dos picos para potenciais menos positivos. O que demonstra a dependência dos prótons no processo redox dos antioxidantes. O deslocamento do E_{pa} para valores menos positivos, indica também uma maior facilidade de doação de elétrons, logo com o aumento do pH pode haver um favorecimento da atividade antioxidante do composto [93,94].

No entanto, com o aumento do pH observa-se um decréscimo na intensidade da corrente, esta relação pode estar associada à disponibilidade da espécie eletroativa no meio com base nas frações de antioxidantes na sua forma protonada e desprotonada de acordo com o pH. Para o ácido cafeico, por exemplo, que possui três hidrogênios ionizáveis, $pK_{a1} = 4,41$, $pK_{a2} = 8,64$ e $pK_{a3} = 12,5$ [93] de acordo com Giacomelli *et al.* [93] em pH 2,0 tem-se 99% de H_3CAF e 1% de H_2CAF^- ; pH 3,5: 88% de H_3CAF e 12% de H_2CAF^- ; pH 5,5: 8% de H_3CAF e 92% de H_2CAF^- ; pH 7,4: 94% de H_2CAF^- e 6% de HCAF^{2-} ; pH 8,5: 58% de H_2CAF^- e 42% de HCAF^{2-} . Com isso, pode-se explicar a dependência do pH para a intensidade de corrente, em pHs mais baixos há maior disponibilidade da espécie totalmente protonada do ácido cafeico, logo maior é o sinal de corrente obtido. Para o ácido gálico e seus derivados, a mesma dependência do pH foi verificada neste trabalho foi reportado por outros autores [96-98].

Sendo assim, o pH 2,0 foi escolhido como o mais adequado para ser aplicados nos demais estudos, uma vez que é a condição que favorece a obtenção de sinais com maiores intensidades de corrente, favorecendo a obtenção de um método mais sensível. Valores menores de pH não foram testados por não serem possíveis em meios tamponados e ainda por apresentarem potencial em causar danos deletérios aos eletrodos a serem utilizados assim como para estrutura do dispositivo.

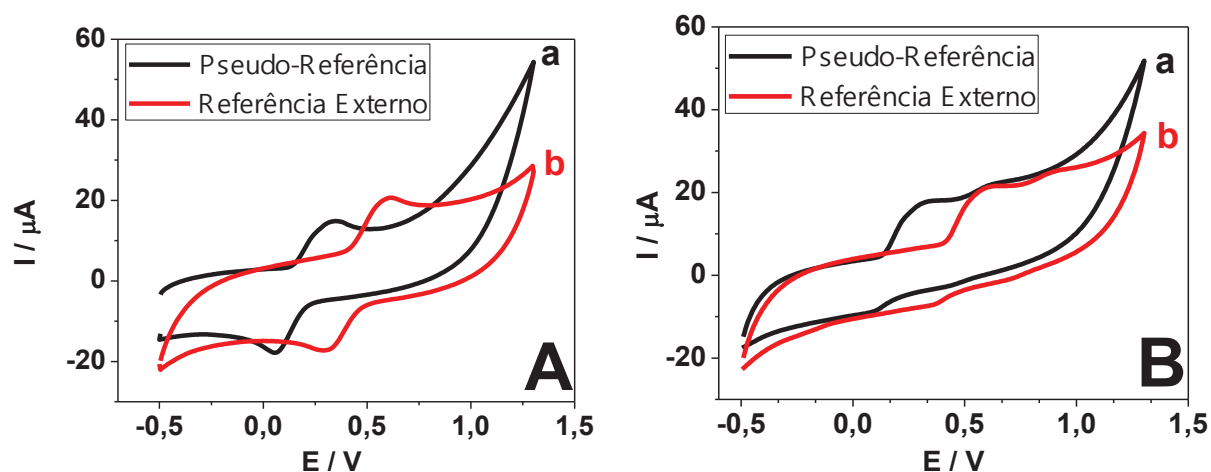
4.3 DETERMINAÇÃO DOS POLIFENÓIS – SISTEMA μ TED UTILIZANDO ELETRODO IMPRESSO (EI)

4.3.1 Caracterização voltamétrica dos antioxidantes sobre eletrodo de carbono impresso

A resposta voltamétrica dos padrões de antioxidantes escolhidos foi investigada sobre o EI, que consiste em um arranjo contendo três eletrodos sobre um substrato de poliéster, sendo o ET e o EA formados por uma tinta de carbono, enquanto que o eletrodo de referência é classificado como um eletrodo de pseudo-referência, formado pela deposição de uma camada de Ag/AgCl [90]. Baseado nisso, foram registrados voltamogramas para avaliar o comportamento voltamétrico das espécies estudadas e comparar o comportamento do eletrodo de pseudo-referência com um eletrodo de referência convencional.

As medidas foram realizadas utilizando-se uma solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ dos antioxidantes tendo como eletrólito suporte uma mistura 1:1 de PBS ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,0) e etanol 99,8%, a uma varredura de potencial de 0,5 V a 1,3 V com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Os voltamogramas cíclicos para o ácido cafeico e o ácido gálico são apresentados nas FIGURA 13-A e FIGURA 13-B, respectivamente.

FIGURA 13 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS EM PBS 0,10 mol L⁻¹ pH 2,0 CONTENDO 1,0 X 10⁻³ mol L⁻¹ DE (A) ÁCIDO CAFEICO E (B) ÁCIDO GÁLICO SOBRE (A) ELETRODO DE CARBONO IMPRESSO vs Ag/AgCl IMPRESSO. (B) vs. Ag/AgCl., v = 50 mV s⁻¹.



FONTE: A autora (2017)

O comportamento eletroquímico do ácido cafeico e do ácido gálico é semelhante aos previamente apresentados (FIGURA 8 e FIGURA 10) utilizando o arranjo de eletrodos convencional, o que indica que a mudança no eletrodo não interfere nos mecanismos de reação. Observa-se um deslocamento de aproximadamente -300 mV para ambos os antioxidantes no voltamograma obtido com o EI, quando comparado a um eletrodo de referência tradicional de Ag/AgCl/KCl 3,0 mol L⁻¹.

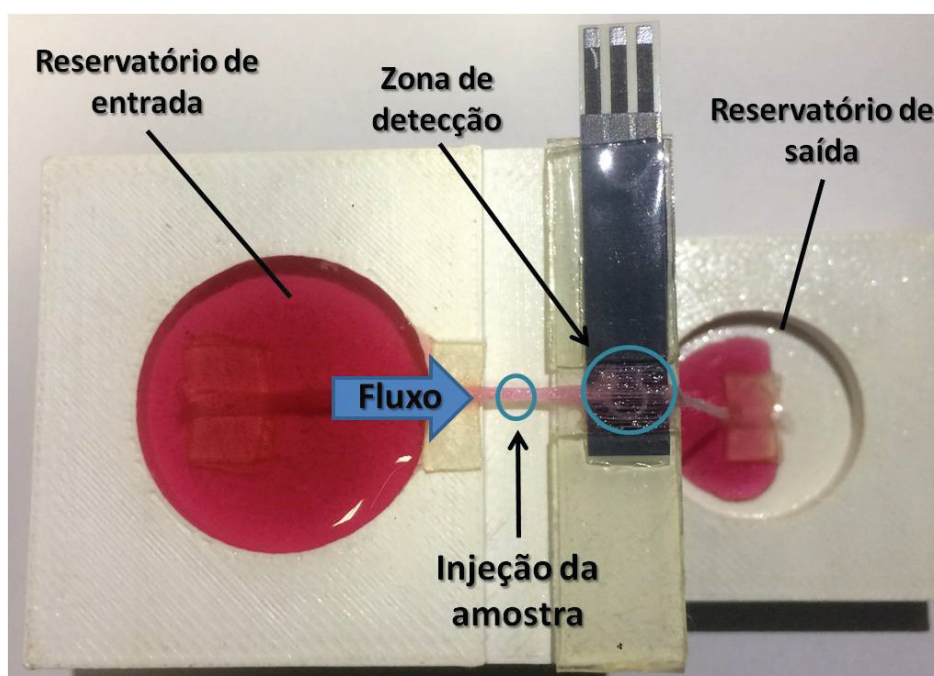
A repetibilidade entre medidas utilizando o mesmo eletrodo foi testada registrando três medidas consecutivas de voltametria cíclica, seguindo os mesmos parâmetros já citados anteriormente, na qual o desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*) para o sinal foi de 9,90% para o ácido cafeico e para o ácido gálico, o RSD foi de 6,45%. Os valores de potencial de pico não apresentaram variações significativas. Os maiores desvios observados para os valores de corrente de pico podem estar relacionados com os efeitos de acumulação dos produtos de oxidação dos antioxidantes na superfície do eletrodo, uma vez que as medidas foram realizadas em meio estático, favorecendo este efeito. Enquanto que, os desvios do potencial de pico, nas mesmas condições experimentais apresentam desvios bem pequenos, mostrando que o EI apresenta potencialidade na utilização para diversas medidas na detecção de polifenóis

A reprodutibilidade das medidas para diferentes eletrodos foi testada por meio de medidas de voltametria cíclica utilizando três diferentes EI, apresentando RSD para a corrente de pico e para o potencial de pico de oxidação do ácido cafeico de 2,83% e 2,09%, respectivamente. Enquanto que para o ácido gálico, os RSD para a corrente e potencial do primeiro pico de oxidação foram de 4,47% e 1,35%.

4.3.2 Funcionamento do μ TED

O μ TED foi desenvolvido com o intuito de eliminar a necessidade de qualquer sistema de bombeamento mecânico e utilizar pequenos volumes de solução, através de uma configuração simples e explorando as propriedades de capilaridade inerente aos fios de algodão para o transporte de líquidos. Para a demonstração do princípio de operação do μ TED e melhor visualização do caminho que a solução percorre ao longo do dispositivo, uma solução colorida foi usada ao invés do eletrólito de suporte (FIGURA 14).

FIGURA 14 - FOTOGRAFIA DO μ TED ONDE SÃO INDICADOS OS PRINCIPAIS COMPONENTES E O PRINCÍPIO DE OPERAÇÃO DO DISPOSITIVO



FONTE: A autora (2017)

A solução entra no microcanal do dispositivo através do reservatório de entrada e é transportada ao longo do μ TED devido à ação capilar gerada pelos

vários espaços presentes nos fios de algodão, bem como pela difusão da solução para dentro de cada fibra. Assim, o mecanismo de transporte da solução envolve inicialmente a força capilar gerada nos espaços nanométricos entre as fibrilas presentes na parede de celulose de cada fibra, e também pela difusão da solução para dentro de cada fibra. Em seguida, o excesso de solução ocupa os espaços entre as fibras e por fim os espaços entre os fios, movendo-se em ambos os casos por ação capilar [99-103] a uma distância fixa antes da zona de detecção ocorre a injeção do analito (2,0 μL), o qual é transportado juntamente com o eletrólito de suporte para a zona de detecção, onde está acomodado o eletrodo impresso. Sobre a superfície do eletrodo de trabalho, quando há aplicação de um potencial, ocorre a reação redox das espécies de interesse. Em seguida, o eletrólito de suporte e o analito seguem para o reservatório de saída.

As dimensões da estrutura do microdispositivo e os parâmetros tais volume de injeção do analito e quantidade de fios que compõem os microcanais foram adotados com base no trabalho de Agustini e colaboradores [88]. Em que volumes de injeções menores que 2,0 μL sofriam efeitos de dispersão na solução transportadora, tendo como resultados sinais transientes de menor intensidade. Enquanto que valores de injeção maiores que 2,0 μL , havia vazamento de uma porção de amostra injetada do canal microfluídico [91].

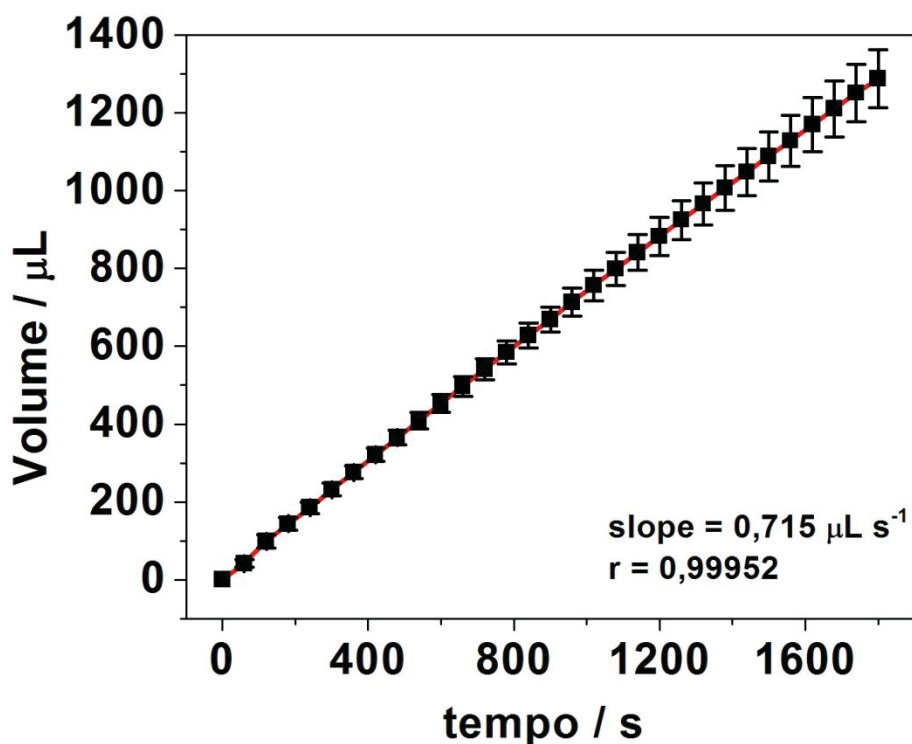
Sendo assim, além do perfil voltamétrico dos analitos sobre os eletrodos impressos que serão empregados como detector, foram verificadas algumas características do sistema proposto como, por exemplo, a vazão.

4.3.3 Estudo da vazão

Espera-se que um sistema em fluxo, a vazão da solução transportadora seja constante, e possibilite a realização de uma quantidade significativa de análises sem apresentar grandes oscilações que venham a causar divergências entre as medidas, estas que podem ser geradas por problemas inerentes ao transporte de eletrólitos e analitos ao longo do dispositivo.

Para estimar a vazão da solução no μTED , o volume de líquido que passou pelo dispositivo foi medido em função do tempo através do aumento de massa do reservatório de saída. A variação do volume em função do tempo está apresentada na FIGURA 15.

FIGURA 15 - RELAÇÃO ENTRE O VOLUME DE SOLUÇÃO QUE FLUI PELO μ TED E O TEMPO. BARRAS DE ERRO REPRESENTAM O DESVIO PADRÃO PARA ESTUDOS REALIZADOS EM TRÊS DIAS DIFERENTES



FONTE: A autora (2017)

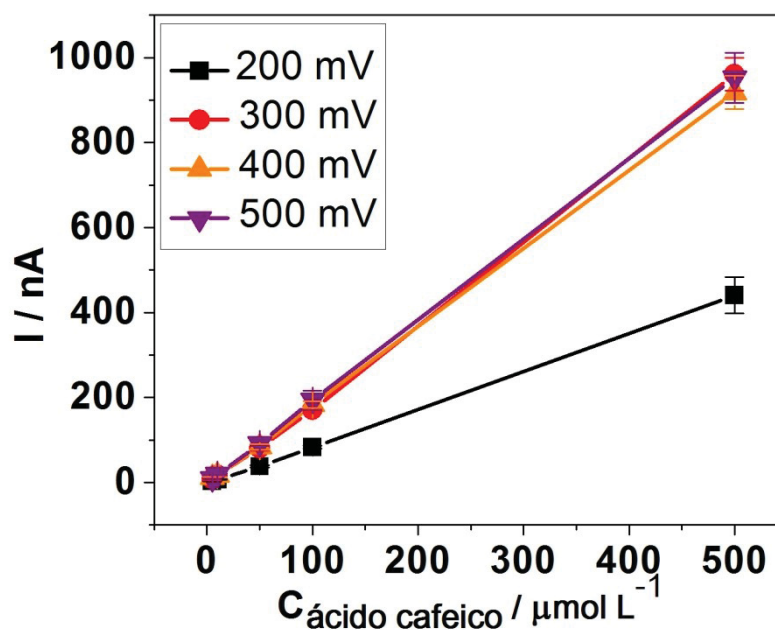
Os resultados revelaram que o volume de solução contido no reservatório de saída aumenta linearmente com o tempo, indicando um fluxo contínuo e livre de oscilações significativas ao longo de pelo menos 30 minutos ($R = 0,99952$). O coeficiente angular de $0,72 \mu\text{L s}^{-1}$ foi encontrado para a configuração empregada, o que representa uma vazão adequada para a análise em fluxo e maior que outros dispositivos propostos (valores relatados entre $0,0035$ e $0,17 \mu\text{L s}^{-1}$) com transporte de solução feito sem a utilização de sistemas de bombeamento de solução pelo dispositivo [104-106].

4.3.4 Efeito do potencial aplicado sobre a resposta amperométrica

A influência do potencial de detecção sobre a resposta amperométrica do ácido cafeico e do ácido gálico foi avaliada utilizando o μ TED para valores de potencial entre 200 e 500 mV (vs. pseudo-eletródo de referência), que foram escolhidos com base nos potenciais de pico obtidos na caracterização voltamétrica dos antioxidantes utilizando o EI.

Para cada potencial aplicado foram feitas sucessivas adições de concentrações na faixa de $5,0 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ dos polifenóis, utilizando PBS 0,10 mol L⁻¹ pH 2,0 como solução transportadora. Na FIGURA 16 e FIGURA 17 são apresentados os resultados obtidos para o ácido cafeico e ácido gálico, respectivamente.

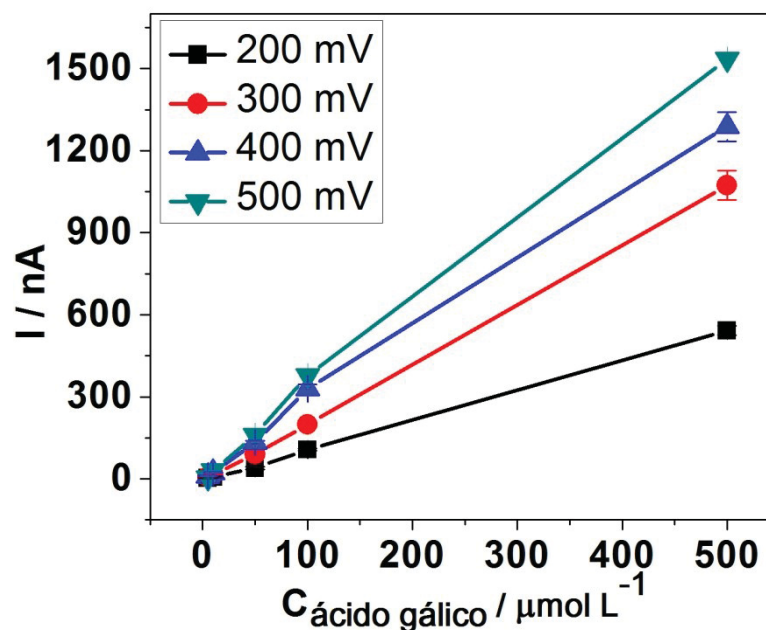
FIGURA 16 - VARIAÇÃO DA RESPOSTA AMPEROMÉTRICA EM FUNÇÃO DO POTENCIAL APLICADO OBTIDA PARA O ÁCIDO CAFEICO NAS CONCENTRAÇÕES DE $5,0 \times 10^{-6}$ A $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ EM PBS 0,10 mol L⁻¹ pH 2,0 PARA POTENCIAIS DE: 200, 300, 400 E 500 mV.



FONTE: A autora (2017)

Na FIGURA 16 pode-se observar que para o ácido cafeico há um aumento na sensibilidade com o aumento do potencial até 300 mV, acima desse valor não houve variação significativa. Valores de potencial menores que 200 mV apresentam variações muito pequenas dos sinais de corrente com a adição do analito. Esse comportamento é bem coerente com o perfil voltamétrico observado para esse analito empregando o eletrodo de carbono impresso como referência (FIGURA 13-A).

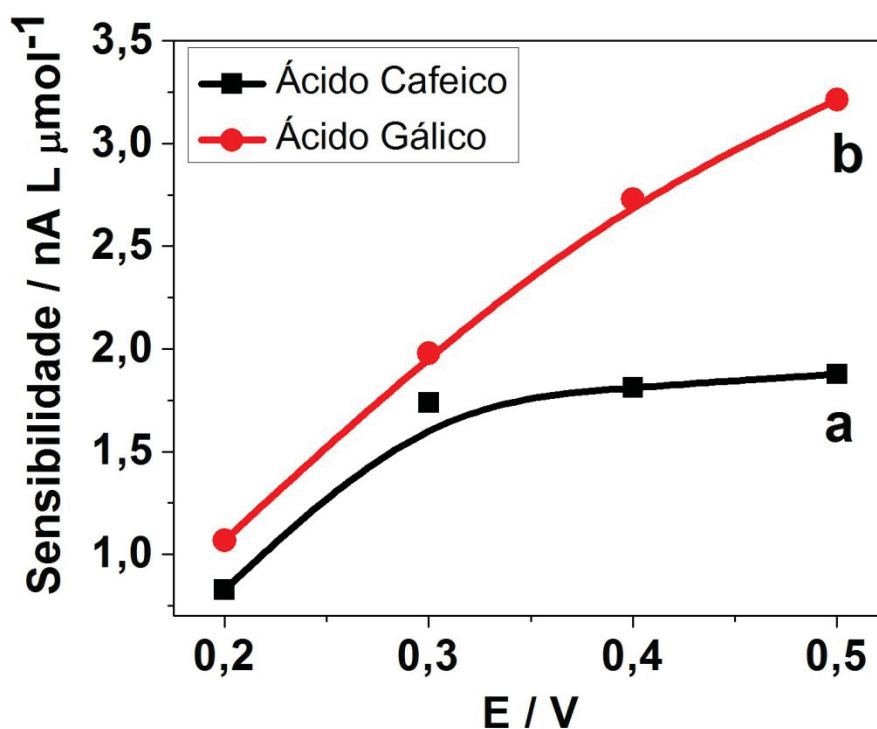
FIGURA 17 - VARIAÇÃO DA RESPOSTA AMPEROMÉTRICA EM FUNÇÃO DO POTENCIAL APLICADO OBTIDA PARA O ÁCIDO GÁLICO NAS CONCENTRAÇÕES DE $5,0 \times 10^{-6}$ A $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ EM PBS 0,10 mol L⁻¹ pH 2,0 PARA POTENCIAIS DE: 200, 300, 400 E 500 mV.



FONTE: A autora (2017)

Na FIGURA 17, observa-se que para o ácido gálico, o aumento da sensibilidade acompanha o aumento do potencial aplicado. Este aumento da sensibilidade pode ser explicado devido às duas etapas existentes na oxidação do ácido gálico, em que aumentando o potencial há o favorecimento da segunda etapa da reação por via eletroquímica e, conseqüentemente, um aumento do incremento de corrente. A FIGURA 18 apresenta a variação da sensibilidade obtida para cada uma das espécies avaliadas em função do potencial aplicado na detecção amperométrica.

FIGURA 18 - VARIAÇÃO DA RESPOSTA AMPEROMÉTRICA EM FUNÇÃO DO POTENCIAL OBTIDO PARA (a) ÁCIDO CAFEICO E (b) ÁCIDO GÁLICO A CONCENTRAÇÕES DE $5,0 \times 10^{-6}$ A $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ EM 0,10 mol L⁻¹ DE PBS pH 2,0 PARA POTENCIAIS DE: 200, 300, 400 E 500 mV



Fonte: A autora (2017)

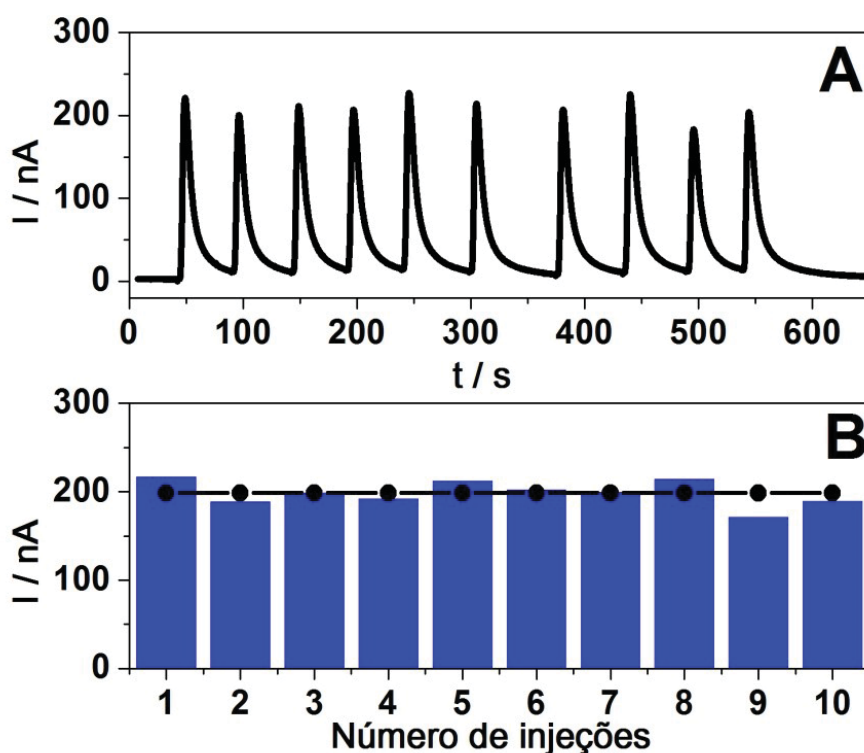
É possível verificar que as sensibilidades variam de forma semelhante para os dois compostos até um potencial de 300 mV e acima desse valor há uma diferença mais acentuada. Considerando a possibilidade de usar uma ou outra substância como padrão de calibração potencial adotado para medidas posteriores foi o de 300 mV, visto que este já é suficiente para promover a primeira etapa de oxidação para o ácido gálico, assim como a oxidação do ácido cafeico fornecendo sensibilidades semelhantes.

4.3.5 Avaliação da repetibilidade da resposta amperométrica do μ TED

É fundamental que um dispositivo microfluídico apresente repetibilidade entre as medidas para que este possa ser utilizado em ensaios analíticos, garantindo que os resultados obtidos sejam confiáveis e possam ser utilizados para a determinação das espécies de interesse. No μ TED, parâmetros tais como oscilação do fluxo do eletrólito, variações na injeção do analito, retenção do analito na zona de detecção e passivação da superfície dos eletrodos, podem afetar na repetibilidade das

respostas. Desta forma, a estabilidade das medidas realizadas com o μ TED foram avaliadas através da injeção sucessiva ($n = 10$) de solução de ácido cafeico (FIGURA 19) e de ácido gálico na concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em PBS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2, aplicando-se um potencial de 300 mV.

FIGURA 19 - (A) SINAIS TRANSIENTES OBTIDOS PARA 10 INJEÇÕES DE ALÍQUOTAS DE $2\mu\text{L}$ DE ÁCIDO CAFEICO $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. POTENCIAL APLICADO: 300 mV; ELETRÓLITO DE SUORTE: PBS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,00. (B) VALORES DE CORRENTE UTILIZADOS PARA O CALCULO DO RSD PARA O ÁCIDO CAFEICO OBTIDOS COM O μ TED. A LINHA PONTILHADA HORIZONTAL INDICA O VALOR MÉDIO DAS CORRENTES OBTIDAS



FONTE: A autora (2017)

Um RSD de 7,0% foi observado entre as medidas para o ácido cafeico (FIGURA 19-B), Além disso, a partir da FIGURA 19-A pôde-se verificar que a cada adição de ácido cafeico, a corrente retorna a linha base em aproximadamente 58 segundos. Com isso, pode-se estimar que utilizando o μ TED é possível alcançar uma frequência de injeções de 62 injeções por hora para este antioxidante.

O mesmo procedimento foi aplicado para o ácido gálico, obtendo-se um RSD de 7,4% entre as medidas e, pôde-se verificar que a cada adição de ácido gálico a corrente retornou a linha base em aproximadamente 83 segundos. Com isso, pode-

se estimar que utilizando o μ TED é possível alcançar uma frequência analítica de 43 injeções por hora para este antioxidante.

A diferença na frequência analítica para os antioxidantes pode estar relacionada a uma maior interação das espécies de ácido gálico pelas fibras do fio, fazendo com que seja necessária a passagem de uma maior quantidade de eletrólito para promover a limpeza completa da zona de detecção.

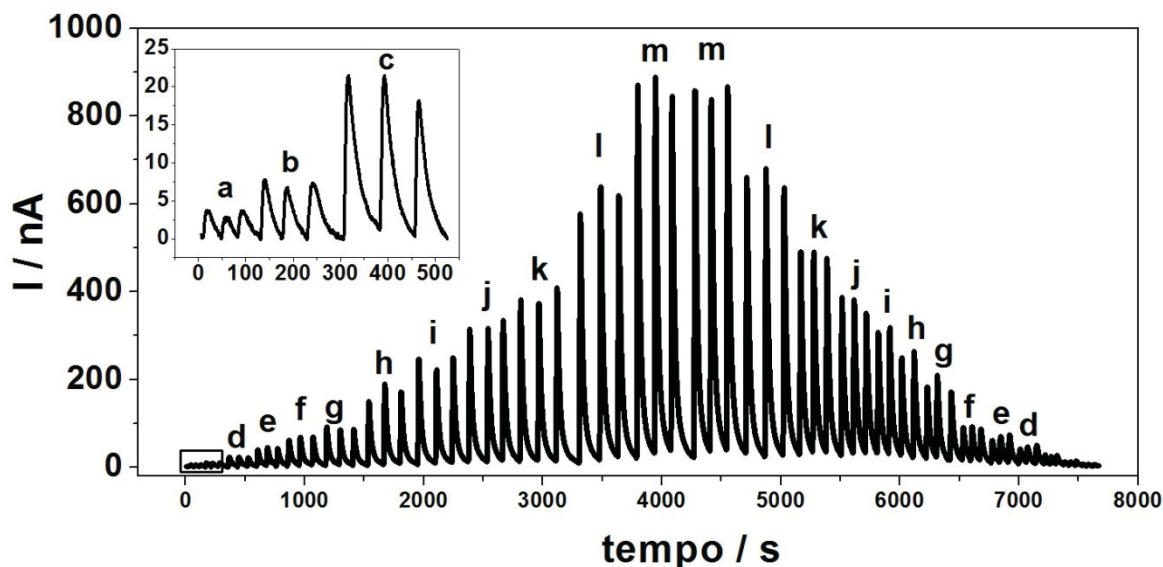
Os resultados de repetibilidade comprovam o funcionamento adequado do μ TED, indicando o fluxo constante do eletrólito, além de injeções reprodutíveis, estabilidade dos eletrodos e inexistência de efeitos de envenenamento do eletrodo, com valores de RSD menores ou similares a outros trabalhos em que foi utilizado microdispositivos com detecção eletroquímica [107,108]. É importante ressaltar que a montagem de diferentes dispositivos pode levar a pequenas variações nas respostas amperométricas, porém, isso é contornado pela calibração.

4.3.6 Desempenho analítico do μ TED na determinação de ácido cafeico e de ácido gálico

Depois de investigada a estabilidade da vazão e o efeito do potencial aplicado sobre a resposta do μ TED, foi realizado o estudo para verificar o desempenho analítico do dispositivo proposto para a determinação de ácido cafeico e ácido gálico. Os parâmetros considerados foram a faixa de resposta linear, sensibilidade e limites de detecção e quantificação para cada espécie.

Empregando as condições previamente otimizadas de pH (PBS 0,10 mol L⁻¹) e potencial aplicado (300 mV), construiu-se uma curva analítica com injeções de 2,0 μ L (n = 3 para cada concentração) no intervalo de concentração entre 1,0 x 10⁻⁶ a 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ para o ácido cafeico, cujos sinais transientes obtidos estão apresentados na FIGURA 20.

FIGURA 20 - SINAIS TRANSIENTES OBTIDOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO CAFEICO. (A) $1,0 \times 10^{-6}$ (B) $5,0 \times 10^{-6}$ (C) $1,0 \times 10^{-5}$ (D) $2,5 \times 10^{-5}$ (E) $5,0 \times 10^{-5}$ (F) $7,5 \times 10^{-5}$ (G) $1,0 \times 10^{-4}$ (H) $2,0 \times 10^{-4}$ (I) $3,0 \times 10^{-4}$ (J) $4,0 \times 10^{-4}$ (K) $5,0 \times 10^{-4}$ (L) $7,5 \times 10^{-4}$ (M) $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. SOLUÇÃO TRANSPORTADORA: PBS 0,10 mol L⁻¹ pH 2,00. POTENCIAL APLICADO DE 300 mV. INJEÇÕES DE 2,0 μ L



FONTE: A autora (2017)

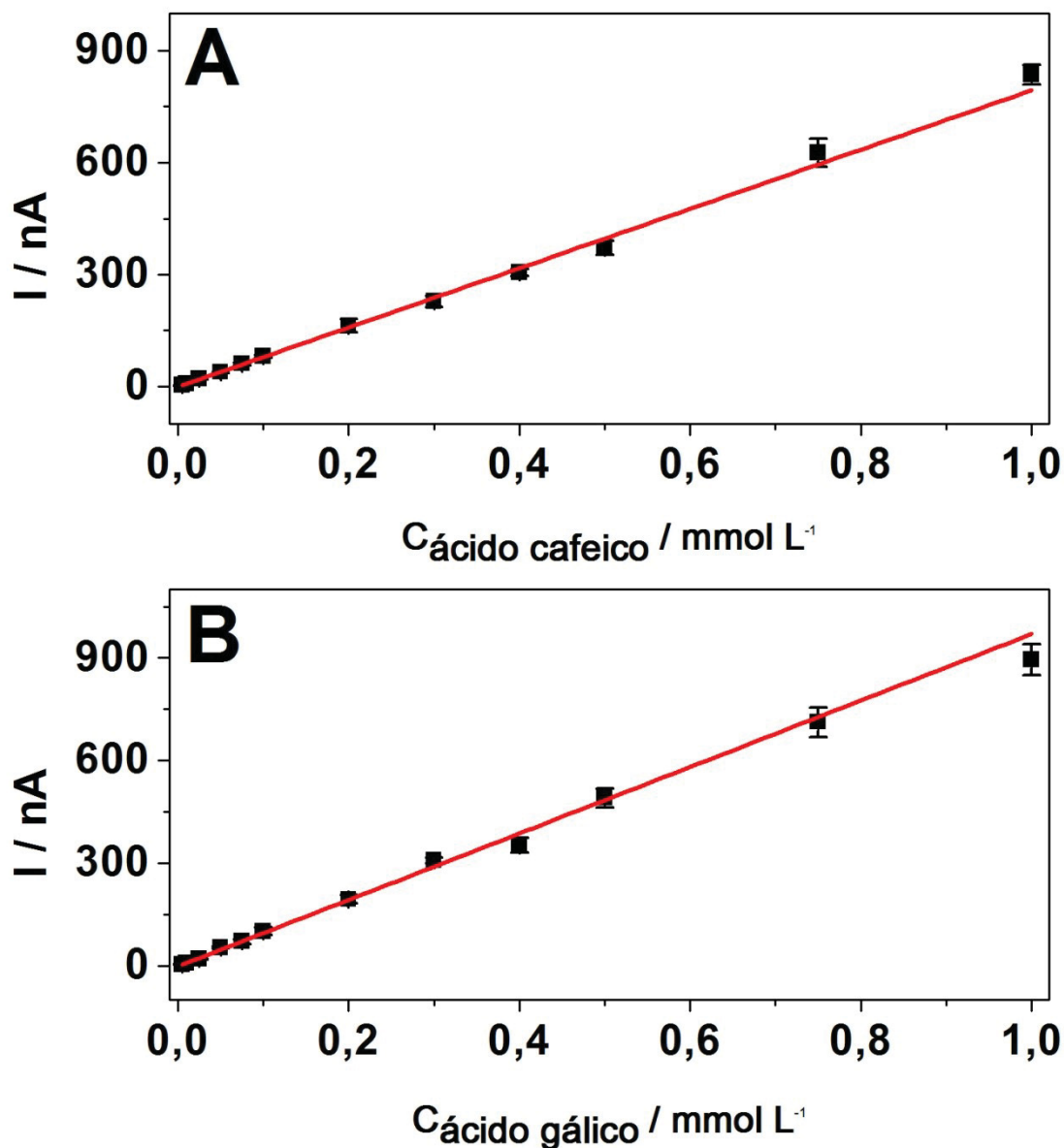
Foi observado um aumento linear na intensidade dos sinais transientes em função do aumento da concentração do ácido cafeico, FIGURA 20, os quais se apresentaram reprodutivos para as concentrações injetadas. Não foram observados efeitos de memória, a partir das injeções decrescentes, uma vez que apresentaram intensidades de corrente coerentes com as observadas no sentido crescente de mesma concentração, como mostram as barras de desvio padrão na FIGURA 21-A.

A partir da relação entre as intensidades dos sinais transientes e as respectivas concentrações de ácido cafeico foi possível obtenção da uma curva analítica, FIGURA 21-A, na qual pode ser observado um aumento linear da corrente em função do aumento da concentração do analito. Assim, foram realizados os cálculos dos parâmetros analíticos: sensibilidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ). A curva analítica do ácido cafeico apresenta uma boa linearidade por toda a faixa de concentração estudada, apresentando um $R^2 = 0,9977$, com sensibilidade de $0,83 \text{ nA L } \mu\text{mol}^{-1}$, LD ($3 \times \text{SD} / \text{slope}$) de $8,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e LOQ ($10 \times \text{SD} / \text{slope}$) de $2,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

As mesmas condições foram aplicadas para obtenção da curva analítica do ácido gálico com injeções ($n = 3$) no intervalo de concentração entre $5,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A intensidade dos sinais transientes para cada uma das

concentrações injetadas foi correlacionada e a curva analítica para o ácido gálico está apresentada na FIGURA 21-B.

FIGURA 21 - CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS PARA O (A) ÁCIDO CAFEICO NA FAIXA DE CONCENTRAÇÃO DE $1,0 \times 10^{-7}$ A $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ E (B) ÁCIDO GÁLICO NA FAIXA DE CONCENTRAÇÃO DE $5,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. SOLUÇÃO TRANSPORTADORA: PBS 0,10 mol L⁻¹ pH 2,00. POTENCIAL APLICADO DE 300 mV. INJEÇÕES DE 2,0 μ L.



FONTE: A autora (2017)

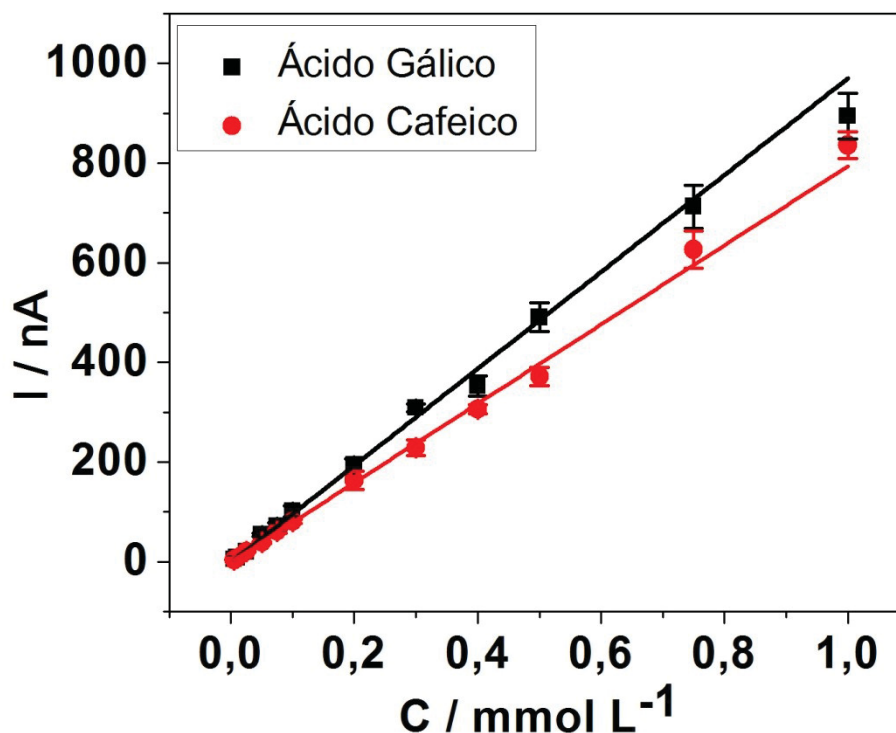
Assim como para o ácido cafeico, foi observado um aumento linear na intensidade dos sinais transientes em função do aumento da concentração do ácido gálico, sem efeitos de memória significativos, principalmente para concentrações

mais baixas, conforme pode ser observado pelas barras de desvio padrão na FIGURA 21-B.

Correlacionando as intensidades dos sinais transientes e das respectivas concentrações de ácido gálico foi possível obtenção da uma curva analítica, FIGURA 21-B, na qual pode ser observado um aumento linear da corrente em função do aumento da concentração do analito. Registrando-se uma linearidade com $R^2 = 0,9907$, sensibilidade de $0,98 \text{ nA L } \mu\text{mol}^{-1}$, LOD de $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e LOQ de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Comparando as curvas obtidas para os polifenóis (FIGURA 22), pode-se verificar que as sensibilidades para ambas as espécies são muito semelhantes, principalmente em concentrações mais baixas. O que é um excelente indicativo de que se podem fazer correlações entres estes padrões para determinações em amostras reais.

FIGURA 22 - COMPARATIVO ENTRE AS CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS PARA O ÁCIDO GÁLICO E O ÁCIDO CAFEICO NA FAIXA DE CONCENTRAÇÃO DE $5,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. SOLUÇÃO TRANSPORTADORA: PBS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,00. POTENCIAL APLICADO DE 300 mV. INJEÇÕES DE $2,0 \mu\text{L}$.



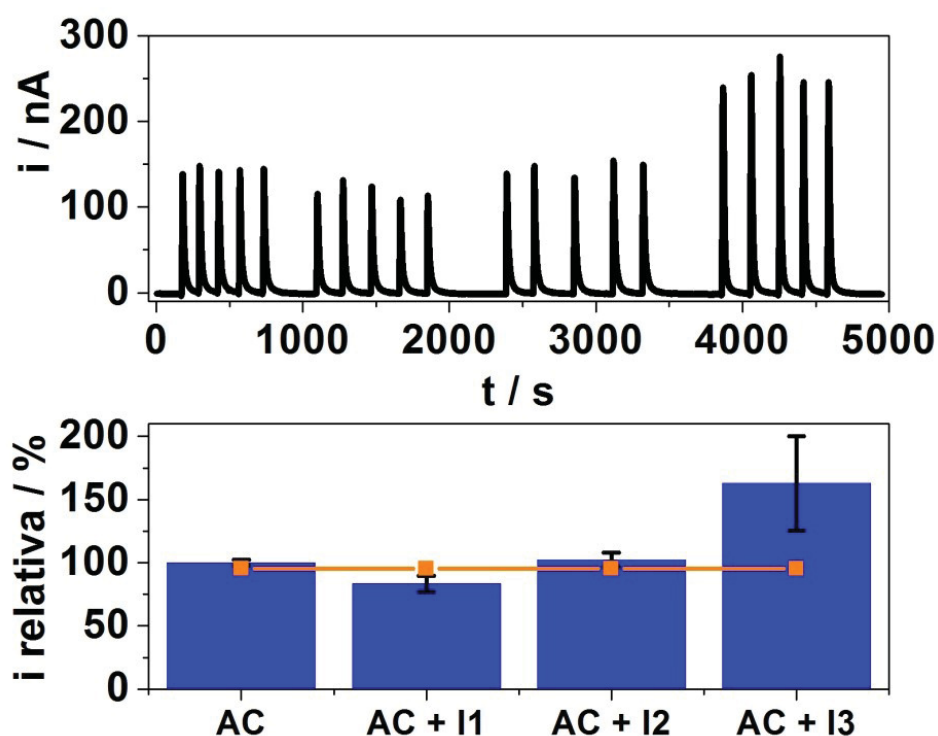
FONTE: A autora (2017).

4.4 ESTUDO DE ESPÉCIES CONCOMITANTES

Para o estudo das substâncias interferentes devem ser escolhidos compostos que apresentem potencialidade em causar alguma variação na magnitude de corrente faradáica dos antioxidantes. Nas amostras a serem estudadas, com base nas informações apresentadas nas embalagens, os únicos ingredientes relatados são uvas e sulfito, logo o sulfito foi tido como a única espécie capaz de causar alguma interferência nas medidas.

Sendo assim, o estudo de interferentes foi realizado estabelecendo uma comparação entre os valores de intensidade de corrente obtidos para uma solução de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de cada um dos antioxidantes, ácido cafeico (AC) e ácido gálico (AG), e as intensidades de corrente de soluções contendo uma mistura da solução do padrão com soluções em diferentes concentrações de bissulfito de sódio (NaHSO_3). Foram utilizadas concentrações de interferente 10 vezes menor (I1), a mesma que os padrões de antioxidantes (I2) e uma com concentração de interferente 10 vezes superior (I3). O efeito da espécie interferente foi verificado a partir da intensidade de corrente obtida com injeções de $2,0 \mu\text{L}$ ($n = 5$) para cada uma das soluções descritas, sob um fluxo de PBS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0, aplicando-se um potencial de 300 mV. Os resultados obtidos para o ácido cafeico estão apresentados na FIGURA 23.

FIGURA 23 - VARIAÇÃO DAS CORRENTES DE PICO PARA O ÁCIDO CAFEICO (AC) EM FUNÇÃO DO SULFITO COMO INTERFERENTE EM CONCENTRAÇÕES 10x MENOR (AC + I1), IGUAL (AC+I2) E 10x MAIOR (AC + I3)



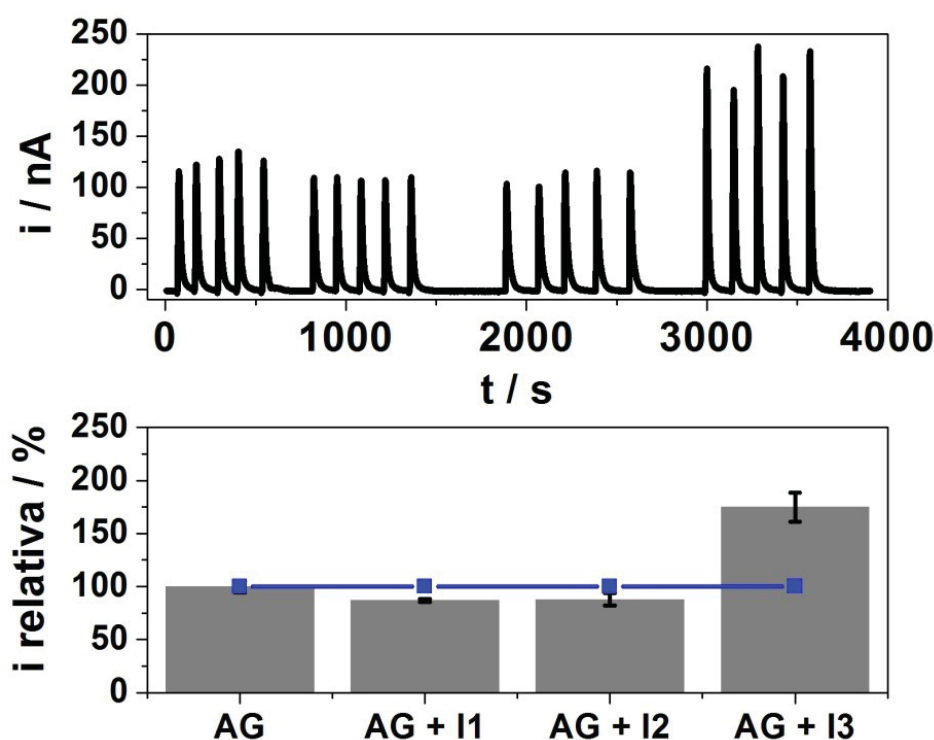
FONTE: A autora (2017)

Através de uma análise estatística (teste-t em um intervalo de confiança de 95%), confirma-se que não há variação significativa entre os valores de corrente obtidos para as soluções contendo apenas o padrão de ácido cafeico e as contendo concentração igual e menor do interferente. Sendo possível afirmar, estatisticamente, que nessas condições a presença de sulfitos não interfere nos sinais obtidos. Já para a concentração de sulfito 10x maior, foram registradas variações de corrente de pico de 62,9%. Entretanto, em amostras reais dificilmente serão encontradas situações nas quais as concentrações de sulfito serão maiores que a dos demais antioxidantes presentes, de acordo com a legislação brasileira vigente, implementada pela Resolução do Conselho Nacional da Saúde CNS/MS N.º 04, em 24 De Novembro De 1988 [109], o limite máximo permitido de agentes sulfitantes em vinhos é de 0,35 mg/L, que é significativamente menor que as concentrações geralmente encontradas em amostras de vinho [66,110,111] e nas amostras estudadas.

A fim de investigar a interferência da presença de sulfitos no sinal de resposta do ácido gálico, foram também utilizadas substâncias em três concentrações

distintas. Deste modo, foram feitas adições em de 2,0 μL ($n = 5$) da solução de ácido gálico com concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, e as soluções contendo o sulfito como interferente em concentração 10x menor, igual e 10x maior. A solução transportadora foi PBS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 e o potencial aplicado de 300 mV. Os resultados obtidos para o ácido gálico estão apresentados na FIGURA 24.

FIGURA 24 - VARIAÇÃO DAS CORRENTES DE PICO PARA O ÁCIDO GÁLICO (AG) EM FUNÇÃO DO SULFITO COMO INTERFERENTE EM CONCENTRAÇÕES 10x MENOR (AG + I1), IGUAL (AG+I2) E 10x MAIOR (AG + I3)



FONTE: A autora (2017)

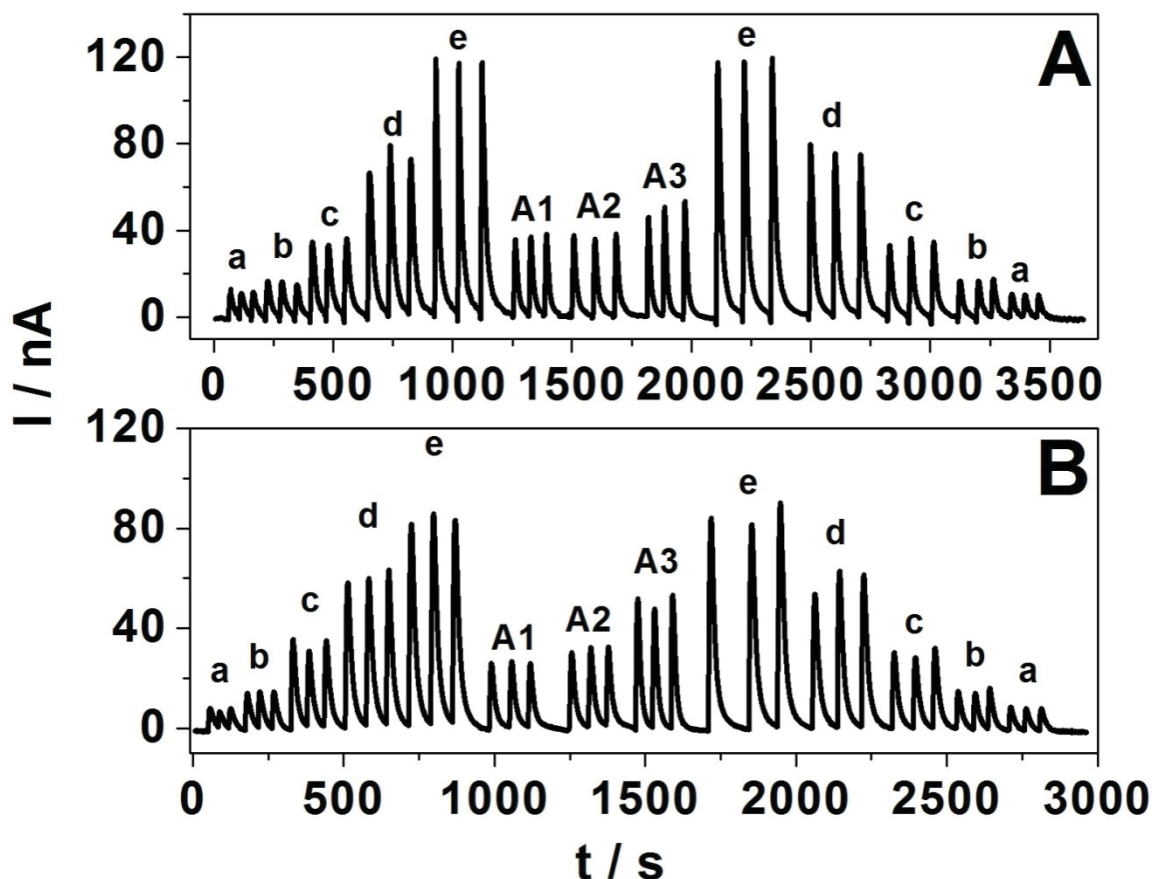
Assim como para o ácido cafeico, não há diferença significativa entre as intensidades de corrente obtidas para o ácido gálico na presença e na ausência de sulfito em concentrações 10x menor e igual, o que foi estatisticamente comprovado utilizando teste-t com intervalo de confiança de 95%. Além das quantidades de sulfito permitidas nas amostras reais serem significativamente menores que as de antioxidante, para serem analisadas este tipo de interferente podem ser facilmente eliminados, uma vez que o íon bissulfito é a espécie predominante em alimentos que apresentam pH entre 3 e 7, enquanto que em valores de pH menores que 3 e maiores que 7, o desvio do equilíbrio é direcionado para a formação de SO_2 molecular.

Há ainda outras espécies concomitantes no vinho como, por exemplo, os flavonoides: catequina e a quercetina. Estas espécies juntamente com resveratrol, estão presentes em grande quantidade nos vinhos [112,113] e apresentam comportamento eletroquímico bastante similar aos polifenóis estudados [113-115]. Por isso, elas sofrerão os processos redox e serão contabilizadas nos sinais de corrente gerados. São estes comportamentos eletroquímicos semelhantes que não permitem com que utilizando apenas as técnicas eletroquímicas seja possível identificar e quantificar as espécies antioxidantes individualmente.

4.5 APLICAÇÃO DO μ TED NA ESTIMATIVA DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM AMOSTRAS DE VINHO

O método desenvolvido foi aplicado na análise de três amostras de vinho, sendo duas delas de vinhos tintos e uma de vinho branco. As amostras de vinho tinto diferem entre si pelo tipo de uva utilizado, em que a amostra A1 é composta por uvas do tipo Cabernet Sauvignon e a amostra A2 de uvas do tipo Carménère, enquanto que o vinho branco é composto por uvas do tipo Sauvignon Blanc. Para a obtenção de uma estimativa da capacidade antioxidante tendo como padrão o ácido gálico e o ácido cafeico, as soluções das amostras de vinho foram preparadas por simples diluição em solução tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ (pH 2), sendo que para os vinhos tintos uma diluição de 1:100 foi necessária, enquanto que para o vinho branco uma diluição de 1:10 foi feita suficiente para obtenção de sinais de corrente utilizando-se do método amperométrico. A FIGURA 25 apresenta os sinais amperométricos obtido com a aplicação de um potencial de 300mV, referentes às soluções padrão do ácido cafeico (A) e para o ácido gálico (B) com concentrações variando entre 5,0 x 10⁻⁶ e 1,0 x 7,5 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ (a-e). Seguido dos sinais das amostras dos vinhos convenientemente diluídas em PBS 0,10 mol L⁻¹ pH 2,0.

FIGURA 25 - SINAIS TRANSIENTES OBTIDOS A PARTIR DE INJEÇÕES CONTENDO CONCENTRAÇÕES CONHECIDAS DE ÁCIDO CAFEICO (A) E ÁCIDO GÁLICO (B): (a) $5,0 \times 10^{-6}$; (b) $1,0 \times 10^{-5}$; (c) $2,5 \times 10^{-5}$; (d) $5,0 \times 10^{-4}$; (e) $7,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ E INJEÇÕES CONTENDO AMOSTRA DE VINHO: CABERNET SAUVIGNON (A1), CARMÉNÈRE (A2) E SAUVIGNON BLANC (A3). SOLUÇÃO TRANSPORTADORA: PBS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0. POTENCIAL APLICADO DE 300 mV. INJEÇÕES DE AMOSTRA E PADRÕES DE 2,0 μL .



FONTE: A autora (2017)

Para expressar a capacidade de antioxidantes como equivalentes de ácido gálico ou cafeico, o sinal de corrente obtido para as amostras de vinho foi utilizado na equação matemática proveniente da curva analítica para cada um dos padrões empregados. A capacidade antioxidante de cada amostra, que foram estimadas em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) e de equivalentes de ácido cafeico (CAE), são apresentados na TABELA 3.

As mesmas amostras de vinho foram analisadas, aplicando como o método comparativo o método espectrofotométrico utilizando o reagente Folin-Ciocalteu, que é o recomendado para a análise de polifenóis totais pela OIV (Organização Internacional da Uva e do Vinho). O reagente de FC consiste de mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstúico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6^+ porém, em presença de certos agentes redutores, como

os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica [46].

As medidas espectrofotométricas foram realizadas com base no protocolo de microescala adaptado para Waterhouse [92], utilizando ácido gálico e ácido cafeico como padrões. A amostra de vinho branco foi utilizada sem pré-tratamentos, enquanto que as amostras de vinho tinto necessitaram de uma simples etapa de diluição, sendo diluída na proporção 1:10. A capacidade antioxidante de cada amostra, que foram estimadas em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) e de equivalentes de ácido cafeico (CAE), assim como no método utilizando o μ TED, e são apresentadas na TABELA 3.

TABELA 3 -. ESTIMATIVA DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM AMOSTRAS DE VINHO UTILIZANDO O MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU E O μ TED

Amostra	μ TED		Método de Folin-Ciocalteu	
	(mg GAE L ⁻¹)	(mg CAE L ⁻¹)	(mg GAE L ⁻¹)	(mg CAE L ⁻¹)
A1	350,61	275,28	1981,95	892,70
A2	393,65	373,40	2611,54	2028,28
A3	72,434	50,514	290,66	209,71

FONTE: A autora (2017)

Comparando os resultados obtidos por ambos os métodos, podemos observar há uma mesma tendência na variação da concentração de antioxidantes, ou seja, em ambas as metodologias a concentração de polifenóis cresce no mesmo sentido A2>A1>A3. No entanto, não é possível estabelecer uma correlação linear entre os métodos, o que está de acordo com os relatos na literatura [41,116] que descrevem como uma das desvantagens do procedimento espectrofotométrico é a superestimação do teor total de polifenóis, uma vez que compostos tais como dióxido de enxofre e açúcares são capazes de reagir com o reagente de Folin-Ciocalteu também causando alteração na sua cor.

A desvantagem de fornecer uma superestimativa apresentada pelo método de Foulin-Ciocalteu faz com o que o método eletroquímico seja mais atrativo, pois permite uma maior seletividade na oxidação dos polifenóis presentes nas amostras e

o uso de amostras suficientemente diluídas, permitindo a redução da ação interferente. Além disso, utilizando o μ TED é possível alcançar baixos limites de detecção e quantificação, com menos gastos de reagentes e padrões e tempo reduzido de análise.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi realizada a construção e avaliação do desempenho analítico de um dispositivo microfluídico baseado em fios de algodão hidrofílico para a determinação de antioxidantes, tendo como padrões o ácido cafeico e o ácido gálico.

Dentre os diversos aspectos que merecem destaque com relação ao μ TED, as principais características podem ser associadas a um sistema em fluxo que oferece um processo de montagem simples; consumindo pequenos volumes de amostras/padrões (2,0 μ L por injeção) e apresenta uma vazão pequena e estável por períodos razoáveis de tempo o que assegura repetibilidade no transporte de massa e proporciona gastos baixos de solução transportadora.

A utilização de um conjunto e eletrodos impressos como célula de detecção mostrou-se extremamente simples e prática, pois em uma única etapa o arranjo todo é colocado no sistema e a não necessidade de modificação da superfície faz com que diminua o custo e o tempo de preparação do dispositivo. Pode-se destacar ainda, que utilizando o μ TED com sua estrutura impressa em impressora 3D, há uma redução nas etapas de montagem do sistema, eliminam-se as possíveis fontes de vazamento, tornando-se um sistema acessível a operadores leigos após breve treinamento ou ainda possibilitando a automação das medidas.

O desempenho analítico do μ TED para a determinação de antioxidantes foi muito promissor obtendo-se desvios menores de 10% na repetibilidade entre medidas e frequência analítica de 72 injeções / hora para o ácido cafeico e 43 injeções / hora para o ácido gálico. Além de LOD e LOQ de $8,0 \times 10^{-7}$ e $2,7 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para o ácido cafeico, e $1,5 \times 10^{-6}$ e $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para o ácido gálico.

Os resultados obtidos para as amostras mostraram pela primeira vez um sensor eficiente capaz de estimar a capacidade antioxidante de amostras de vinho utilizando a detecção eletroquímica combinada com o sistema μ TED. O método desenvolvido é uma alternativa interessante aos métodos espectrofotométricos, já que com o uso de eletrodos impressos combinado com um sistema microfluídico permite a portabilidade e automação das medidas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FERNÁNDEZ-MAR, M.I.; MATEOS, R.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; PUERTAS, B. & CANTOS-VILLAR, E., "Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review". *Food Chemistry*. 130(4): 797, 2012.
2. RENAUD, S. & DE LORGERIL, M., "Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease". *The Lancet*. 339(8808): 1523, 1992.
3. LIPPI, G.; FRANCHINI, M.; FAVALORO, E.J. & TARGHER, G. *Moderate red wine consumption and cardiovascular disease risk: beyond the "French paradox"*. in *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2010: © Thieme Medical Publishers.
4. ROTONDO, S.; DI CASTELNUOVO, A. & DE GAETANO, G., *The relationship between wine consumption and cardiovascular risk: from epidemiological evidence to biological plausibility*. 2001.
5. BERTELLI, A.A. & DAS, D.K., "Grapes, wines, resveratrol, and heart health". *Journal of cardiovascular pharmacology*. 54(6): 468, 2009.
6. AVELLONE, G.; DI GARBO, V.; CAMPISI, D.; DE SIMONE, R.; RANELI, G.; SCAGLIONE, R. & LICATA, G., "Effects of moderate Sicilian red wine consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis". *European Journal of Clinical Nutrition*. 60(1): 41, 2006.
7. LEIGHTON, F.; CUEVAS, A.; GUASCH, V.; PEREZ, D.; STROBEL, P.; SAN MARTIN, A.; URZUA, U.; DIEZ, M.; FONCEA, R. & CASTILLO, O., "Plasma polyphenols and antioxidants, oxidative DNA damage and endothelial function in a diet and wine intervention study in humans". *Drugs under experimental and clinical research*. 25(2-3): 133, 1998.
8. LUGASI, A. & HÓVÁRI, J., "Antioxidant properties of commercial alcoholic and nonalcoholic beverages". *Molecular Nutrition & Food Research*. 47(2): 79, 2003.
9. RIMM, E.B.; KLATSKY, A.; GROBBEE, D. & STAMPFER, M.J., "Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine, or spirits?". *BMJ*. 312(7033): 731, 1996.
10. GRONBAEK, M.; DEIS, A.; SORENSEN, T.I.A.; BECKER, U.; SCHNOHR, P. & JENSEN, G., "Mortality associated with moderate intakes of wine, beer, or spirits". *BMJ*. 310(6988): 1165, 1995.
11. AL-AWWADI, N.A.; BORNET, A.; AZAY, J.; ARAIZ, C.; DELBOSC, S.; CRISTOL, J.-P.; LINCK, N.; CROS, G. & TEISSEDRE, P.-L., "Red wine polyphenols alone or in association with ethanol prevent hypertension, cardiac hypertrophy, and production of reactive oxygen species in the insulin-resistant fructose-fed rat". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(18): 5593, 2004.
12. DONOVAN, J.L.; BELL, J.R.; KASIM-KARAKAS, S.; GERMAN, J.B.; WALZEM, R.L.; HANSEN, R.J. & WATERHOUSE, A.L., "Catechin is present as metabolites in

human plasma after consumption of red wine". *The Journal of nutrition*. 129(9): 1662, 1999.

13. HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J., "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease". *Biochemical journal*. 219(1): 1, 1984.

14. YU, B.P., "Cellular defenses against damage from reactive oxygen species". *Physiological reviews*. 74(1): 139, 1994.

15. MILLER, D.M.; BUETTNER, G.R. & AUST, S.D., "Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions". *Free radical biology and medicine*. 8(1): 95, 1990.

16. VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M. & TELSER, J., "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39(1): 44, 2007.

17. VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M. & MAZUR, M., "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer". *Chemico-Biological Interactions*. 160(1): 1, 2006.

18. POLI, G.; LEONARDUZZI, G.; BIASI, F. & CHIARPOTTO, E., "Oxidative stress and cell signalling". *Current medicinal chemistry*. 11(9): 1163, 2004.

19. HALLIWELL, B., "Commentary oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans". *Free radical research*. 25(1): 57, 1996.

20. PIETTA, P.-G., "Flavonoids as Antioxidants". *Journal of Natural Products*. 63(7): 1035, 2000.

21. GAN, Y.; TONG, X.; LI, L.; CAO, S.; YIN, X.; GAO, C.; HERATH, C.; LI, W.; JIN, Z.; CHEN, Y. & LU, Z., "Consumption of fruit and vegetable and risk of coronary heart disease: A meta-analysis of prospective cohort studies". *International Journal of Cardiology*. 183(0): 129, 2015.

22. CONSTANS, J.; BENNETAU-PELISSERO, C.; MARTIN, J.-F.; ROCK, E.; MAZUR, A.; BEDEL, A.; MORAND, C. & BÉRARD, A.M., "Marked antioxidant effect of orange juice intake and its phytochemicals in a preliminary randomized cross-over trial on mild hypercholesterolemic men". *Clinical Nutrition*, (0)

23. SERAFINI, M.; BELLOCCO, R.; WOLK, A. & EKSTRÖM, A.M., "Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer". *Gastroenterology*. 123(4): 985, 2002.

24. HARASYM, J. & OLEZKI, R., "Effect of fruit and vegetable antioxidants on total antioxidant capacity of blood plasma". *Nutrition*. 30(5): 511, 2014.

25. CADENAS, E., "Basic mechanisms of antioxidant activity". *Biofactors*. 6(4): 391, 1997.

26. HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C., "The definition and measurement of antioxidants in biological systems". *Free radical biology and medicine*. 18(1): 125, 1995.
27. HALLIWELL, B., "Biochemistry of oxidative stress". *Biochemical Society Transactions*. 35(5): 1147, 2007.
28. HUANG, D.; OU, B. & PRIOR, R.L., "The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(6): 1841, 2005.
29. AURELIA MAGDALENA, P. & GHEORGHE PETRE, N., "- Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review". 2012.
30. LITESCU, S.C.; TACHE, A.; RADU, G.-L.; DIACONU, M. & EREMIA, S.A., *Biosensors Applications on Assessment of Reactive Oxygen Species and Antioxidants*. 2011: INTECH Open Access Publisher.
31. BURNS, J.; GARDNER, P.T.; MATTHEWS, D.; DUTHIE, G.G.; LEAN, J. & CROZIER, A., "Extraction of Phenolics and Changes in Antioxidant Activity of Red Wines during Vinification". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(12): 5797, 2001.
32. ZHANG, H.; XI, W.; YANG, Y.; ZHOU, X.; LIU, X.; YIN, S.; ZHANG, J. & ZHOU, Z., "An on-line HPLC-FRSD system for rapid evaluation of the total antioxidant capacity of Citrus fruits". *Food Chemistry*. 172(0): 622, 2015.
33. ZIYATDINOVA, G.K.; NIZAMOVA, A.M.; AYTUGANOVA, I.I. & BUDNIKOV, H.C., "Voltammetric evaluation of the antioxidant capacity of tea on electrodes modified with multi-walled carbon nanotubes". *J Anal Chem*. 68(2): 132, 2013.
34. SZYDŁOWSKA-CZERNIAK, A.; DIANOCZKI, C.; RECSEG, K.; KARLOVITS, G. & SZŁYK, E., "Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods". *Talanta*. 76(4): 899, 2008.
35. ZIYATDINOVA, G.; AYTUGANOVA, I.; NIZAMOVA, A. & BUDNIKOV, H., "Differential Pulse Voltammetric Assay of Coffee Antioxidant Capacity with MWNT-Modified Electrode". *Food Anal. Methods*. 6(6): 1629, 2013.
36. GAZDIK, Z.; KRSKA, B.; ADAM, V.; SALOUN, J.; POKORNA, T.; REZNICEK, V.; HORNA, A. & KIZEK, R., "Electrochemical Determination of the Antioxidant Potential of Some Less Common Fruit Species". *Sensors*. 8(12): 7564, 2008.
37. ROSSI, M.; PRAUD, D.; MONZIO COMPAGNONI, M.; BELLOCCO, R.; SERAFINI, M.; PARPINEL, M.; LA VECCHIA, C. & TAVANI, A., "Dietary non-enzymatic antioxidant capacity and the risk of myocardial infarction: A case-control study in Italy". *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 24(11): 1246, 2014.
38. WOOTTON-BEARD, P.C. & RYAN, L., "Improving public health?: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages". *Food Research International*. 44(10): 3135, 2011.

39. GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; NATELLA, F. & SCACCINI, C., "Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data". *Free radical biology and medicine*. 29(11): 1106, 2000.
40. WEINGERL, V.; STRLIC, M. & KOCAR, D., "Comparison of Methods for Determination of Polyphenols in Wine by HPLC-UV/VIS, LC/MS/MS and Spectrophotometry". *Acta Chimica Slovenica*. 56(3): 698, 2009.
41. BLASCO, A.J.; ROGERIO, M.C.; GONZALEZ, M.C. & ESCARPA, A., ""Electrochemical Index" as a screening method to determine "total polyphenolics" in foods: A proposal". *Analytica Chimica Acta*. 539(1-2): 237, 2005.
42. LU, X.; WANG, J.; AL-QADIRI, H.M.; ROSS, C.F.; POWERS, J.R.; TANG, J. & RASCO, B.A., "Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of onion (*Allium cepa*) and shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy". *Food Chemistry*. 129(2): 637, 2011.
43. PRIOR, R.L.; WU, X.L. & SCHAICH, K., "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(10): 4290, 2005.
44. ROBBINS, K.S.; GONG, Y.; WELLS, M.L.; GREENSPAN, P. & PEGG, R.B., "Investigation of the antioxidant capacity and phenolic constituents of U.S. pecans". *Journal of Functional Foods*. 15(0): 11, 2015.
45. IKAWA, M.; SCHAPER, T.D.; DOLLARD, C.A. & SASNER, J.J., "Utilization of Folin–Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(7): 1811, 2003.
46. SOUSA, C.M.D.M.; SILVA, H.R.E.; VIEIRA-JR., G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.D.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.D.M.; BRANDÃO, M.S. & CHAVES, M.H., "Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais". *Química Nova*. 30: 351, 2007.
47. CAROCHO, M. & FERREIRA, I.C.F.R., "A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives". *Food and Chemical Toxicology*. 51(0): 15, 2013.
48. MOLYNEUX, P., "The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity". *Songklanakarin J Sci Technol*. 26(2): 211, 2004.
49. MAGIERA, S.; BARANOWSKA, I. & LAUTENSZLEGER, A., "UHPLC-UV method for the determination of flavonoids in dietary supplements and for evaluation of their antioxidant activities". *J. Pharm. Biomed. Anal.* 102: 468, 2015.

50. MARC, F.; DAVIN, A.; DEGLÈNE-BENBRAHIM, L.; FERRAND, C.; BACCAUNAUD, M. & FRITSCH, P., "[Studies of several analytical methods for antioxidant potential evaluation in food]". *Medecine sciences: M/S*. 20(4): 458, 2004.
51. FLOEGEL, A.; KIM, D.-O.; CHUNG, S.-J.; KOO, S.I. & CHUN, O.K., "Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods". *Journal of Food Composition and Analysis*. 24(7): 1043, 2011.
52. 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*. 26(9): 1231, 1999.
53. VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; TRONCOSO, A.M. & GARCÍA-PARRILLA, M.C., "The antioxidant activity of wines determined by the ABTS+ method: influence of sample dilution and time". *Talanta*. 64(2): 501, 2004.
54. KARADAG, A.; OZCELIK, B. & SANER, S., "Review of methods to determine antioxidant capacities". *Food Anal. Methods*. 2(1): 41, 2009.
55. BENZIE, I.F.; CHUNG, W. & STRAIN, J.J., "'antioxidant' (reducing) efficiency of ascorbate in plasma is not affected by concentration". *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 10(3): 146, 1999.
56. NI, Y. & KOKOT, S., "Does chemometrics enhance the performance of electroanalysis?". *Analytica Chimica Acta*. 626(2): 130, 2008.
57. HOLLER, F.J.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R. & PASQUINI, C., *Princípios de análise instrumental*. 2009: Bookman.
58. LOWINSOHN, D. & BERTOTTI, M., "Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos". *Química Nova*. 29: 1318, 2006.
59. JOO, S. & BROWN, R.B., "Chemical sensors with integrated electronics". *Chemical reviews*. 108(2): 638, 2008.
60. WANG, J., *Analytical electrochemistry*. 2006: John Wiley & Sons.
61. ZIYATDINOVA, G.; GAINETDINOVA, A.; MOROZOV, M.; BUDNIKOV, H.; GRAZHULENE, S. & RED'KIN, A., "Voltammetric detection of synthetic water-soluble phenolic antioxidants using carbon nanotube based electrodes". *Journal of Solid State Electrochemistry*. 16(1): 127, 2012.
62. 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., "Rapid determination of total polyphenolic content in tea samples based on caffeic acid voltammetric behaviour on a disposable graphite electrode". *Food Chemistry*. 173(0): 1059, 2015.
63. JANEIRO, P. & OLIVEIRA BRETT, A.M., "Catechin electrochemical oxidation mechanisms". *Analytica Chimica Acta*. 518(1–2): 109, 2004.

64. YARDIM, Y., "Electrochemical Behavior of Chlorogenic Acid at a Boron-Doped Diamond Electrode and Estimation of the Antioxidant Capacity in the Coffee Samples Based on Its Oxidation Peak". *J. Food Sci.* 77(4): C408, 2012.
65. SKOOG, D.; WEST, D.; HOLLER, F. & CROUCH, S., *Fundamentals of analytical chemistry*. 2013: Cengage Learning.
66. SÁNCHEZ ARRIBAS, A.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, M.; MORENO, M.; BERMEJO, E.; ZAPARDIEL, A. & CHICHARRO, M., "Analysis of total polyphenols in wines by FIA with highly stable amperometric detection using carbon nanotube-modified electrodes". *Food Chemistry*. 136(3–4): 1183,
67. USLU, B. & OZKAN, S.A., "Electroanalytical Application of Carbon Based Electrodes to the Pharmaceuticals". *Analytical Letters*. 40(5): 817, 2007.
68. APETREI, C.; APETREI, I.M.; DE SAJA, J.A. & RODRIGUEZ-MENDEZ, M.L., "Carbon Paste Electrodes Made from Different Carbonaceous Materials: Application in the Study of Antioxidants". *Sensors*. 11(2): 1328, 2011.
69. NASCIMENTO, V.B. & ANGNES, L., "Eletrodos fabricados por "silk-screen"". *Química Nova*. 21: 614, 1998.
70. LI, M.; LI, Y.-T.; LI, D.-W. & LONG, Y.-T., "Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays—A review". *Analytica Chimica Acta*. 734: 31, 2012.
71. BARTON, J.; GARCÍA, M.B.G.; SANTOS, D.H.; FANJUL-BOLADO, P.; RIBOTTI, A.; MCCAUL, M.; DIAMOND, D. & MAGNI, P., "Screen-printed electrodes for environmental monitoring of heavy metal ions: a review". *Microchimica Acta*. 183(2): 503, 2016.
72. GONZALEZ-MACIA, L.; MORRIN, A.; SMYTH, M.R. & KILLARD, A.J., "Advanced printing and deposition methodologies for the fabrication of biosensors and biodevices". *Analyst*. 135(5): 845, 2010.
73. RENEDO, O.D.; ALONSO-LOMILLO, M.A. & MARTÍNEZ, M.J.A., "Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications". *Talanta*. 73(2): 202, 2007.
74. HART, J.P. & WRING, S.A., "Screen-printed voltammetric and amperometric electrochemical sensors for decentralized testing". *Electroanalysis*. 6(8): 617, 1994.
75. MARK, D.; HAEBERLE, S.; ROTH, G.; VON STETTEN, F. & ZENGERLE, R., "Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications". *Chem. Soc. Rev.* 39(3): 1153, 2010.
76. WHITESIDES, G.M., "The origins and the future of microfluidics". *Nature*. 442(7101): 368, 2006.

77. NAHAVANDI, S.; BARATCHI, S.; SOFFE, R.; TANG, S.; MITCHELL, A. & KHOSHMANESH, K., "Microfluidic platforms for biomarker analysis". *Lab on a Chip*. 14(9): 1496, 2014.
78. LEI, K., "Microfluidic Systems for Diagnostic Applications: A Review". *Jala*. 17(5): 330, 2012.
79. KOVARIK, M.; ORNOFF, D.; MELVIN, A.; DOBES, N.; WANG, Y.; DICKINSON, A.; GACH, P.; SHAH, P. & ALLBRITTON, N., "Micro Total Analysis Systems: Fundamental Advances and Applications in the Laboratory, Clinic, and Field". *Anal. Chem.* 85(2): 451, 2013.
80. NGE, P.; ROGERS, C. & WOOLLEY, A., "Advances in Microfluidic Materials, Functions, Integration, and Applications". *Chemical Reviews*. 113(4): 2550, 2013.
81. ILIESCU, C.; TAYLOR, H.; AVRAM, M.; MIAO, J. & FRANSSILA, S., "A practical guide for the fabrication of microfluidic devices using glass and silicon". *Biomicrofluidics*. 6(1) 2012.
82. REN, K.; ZHOU, J. & WU, H., "Materials for Microfluidic Chip Fabrication". *Accounts of Chemical Research*. 46(11): 2396, 2013.
83. YETISEN, A.; AKRAM, M. & LOWE, C., "Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices". *Lab on a Chip*. 13(12): 2210, 2013.
84. LISOWSKI, P. & ZARZYCKI, P., "Microfluidic Paper-Based Analytical Devices (μ PADs) and Micro Total Analysis Systems (μ TAS): Development, Applications and Future Trends". *Chromatographia*. 76(19-20): 1201, 2013.
85. BALLERINI, D.; LI, X. & SHEN, W., "Patterned paper and alternative materials as substrates for low-cost microfluidic diagnostics". *Microfluidics and Nanofluidics*. 13(5): 769, 2012.
86. LI, X.; TIAN, J. & SHEN, W., "Thread as a Versatile Material for Low-Cost Microfluidic Diagnostics". *Acs Applied Materials & Interfaces*. 2(1): 1, 2010.
87. NYHOLM, L., "Electrochemical techniques for lab-on-a-chip applications". *Analyst*. 130(5): 599, 2005.
88. AGUSTINI, D.; BERGAMINI, M.F. & MARCOLINO-JUNIOR, L.H., "Low cost microfluidic device based on cotton threads for electroanalytical application". *Lab on a Chip*. 16(2): 345, 2016.
89. SASSA, F.; MORIMOTO, K.; SATOH, W. & SUZUKI, H., "Electrochemical techniques for microfluidic applications". *Electrophoresis*. 29(9): 1787, 2008.
90. RANA, S.; MITTAL, S.K.; SINGH, N.; SINGH, J. & BANKS, C.E., "Schiff base modified screen printed electrode for selective determination of aluminium(III) at trace level". *Sensors and Actuators B: Chemical*. 239: 17, 2017.

91. AGUSTINI, D.; BERGAMINI, M.F. & MARCOLINO-JUNIOR, L.H., "Characterization and optimization of low cost microfluidic thread based electroanalytical device for micro flow injection analysis". *Analytica Chimica Acta*. 951: 108, 2017.
92. WATERHOUSE, A.L., "Determination of total phenolics". *Current protocols in food analytical chemistry*, 2002.
93. GIACOMELLI, C.; CKLESS, K.; GALATO, D.; MIRANDA, F.S. & SPINELLI, A., "Electrochemistry of Caffeic Acid Aqueous Solutions with pH 2.0 to 8.5". *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 13: 332, 2002.
94. DA SILVA, L.F.; RAMOS STRADIOTTO, N. & OLIVEIRA, H.P., "Determination of caffeic acid in red wine by voltammetric method". *Electroanalysis*. 20(11): 1252, 2008.
95. SOUZA, L.P.; CALEGARI, F.; ZARBIN, A.J.G.; MARCOLINO-JÚNIOR, L.H. & BERGAMINI, M.F., "Voltammetric Determination of the Antioxidant Capacity in Wine Samples Using a Carbon Nanotube Modified Electrode". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(14): 7620, 2011.
96. GUNCKEL, S.; SANTANDER, P.; CORDANO, G.; FERREIRA, J.; MUNOZ, S.; NUNEZ-VERGARA, L.J. & SQUELLA, J.A., "Antioxidant activity of gallates: an electrochemical study in aqueous media". *Chemico-Biological Interactions*. 114(1–2): 45, 1998.
97. ABDEL-HAMID, R. & NEWAIR, E.F., "Electrochemical behavior of antioxidants: I. Mechanistic study on electrochemical oxidation of gallic acid in aqueous solutions at glassy-carbon electrode". *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 657(1–2): 107, 2011.
98. GHOREISHI, S.M.; BEHPOUR, M.; KHAYATKASHANI, M. & MOTAGHEDIFARD, M.H., "Simultaneous determination of ellagic and gallic acid in *Punica granatum*, *Myrtus communis* and Itriphal formulation by an electrochemical sensor based on a carbon paste electrode modified with multi-walled carbon nanotubes". *Analytical Methods*. 3(3): 636, 2011.
99. NILGHAZ, A.; WICAKSONO, D.; GUSTIONO, D.; MAJID, F.; SUPRIYANTO, E. & KADIR, M., "Flexible microfluidic cloth-based analytical devices using a low-cost wax patterning technique". *Lab on a Chip*. 12(1): 209, 2012.
100. BALLERINI, D.; LI, X. & SHEN, W., "Flow control concepts for thread-based microfluidic devices". *Biomicrofluidics*. 5(1) 2011.
101. BENLTOUFA, S.; FAYALA, F. & BENNASRALLAH, S., "Capillary Rise in Macro and Micro Pores of Jersey Knitting Structure". *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*. 3(3): 47, 2008.
102. NILGHAZ, A.; BAGHERBAIGI, S.; LAM, C.; MOUSAVI, S.; CORCOLES, E. & WICAKSONO, D., "Multiple semi-quantitative colorimetric assays in compact

embeddable microfluidic cloth-based analytical device (μ CAD) for effective point-of-care diagnostic". *Microfluidics and Nanofluidics*. 19(2): 317, 2015.

103. YU, B. & LEE, L., "A simplified in-plane permeability model for textile fabrics". *Polymer Composites*. 21(5): 660, 2000.

104. ZHOU, C.; MU, Y.; YANG, M.; SONG, Q.; ZHANG, Y.; WU, Z.; XIANG, L.; JIN, W. & JIN, Q., "A gravity-induced flow injection system for surface plasmon resonance biosensor". *Talanta*. 112: 95, 2013.

105. LANKELMA, J.; NIE, Z.; CARRILHO, E. & WHITESIDES, G.M., "Paper-based analytical device for electrochemical flow-injection analysis of glucose in urine". *Analytical chemistry*. 84(9): 4147, 2012.

106. HUANG, Y.-Z.; DU, W.-B.; PAN, J.-Z. & FANG, Q., "Microfluidic chip-based valveless flow injection analysis system with gravity-driven flows". *Analyst*. 133(9): 1237, 2008.

107. SAMEENOI, Y.; KOEHLER, K.; SHAPIRO, J.; BOONSONG, K.; SUN, Y.; COLLETT, J.; VOLCKENS, J. & HENRY, C.S., "Microfluidic Electrochemical Sensor for On-line Monitoring of Aerosol Oxidative Activity". *Journal of the American Chemical Society*. 134(25): 10562, 2012.

108. WISITSORAAT, A.; SRITONGKHAM, P.; KARUWAN, C.; PHOKHARATKUL, D.; MATUROS, T. & TUANTRANONT, A., "Fast cholesterol detection using flow injection microfluidic device with functionalized carbon nanotubes based electrochemical sensor". *Biosensors and Bioelectronics*. 26(4): 1514, 2010.

109. BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução CNS/MS n.º 04, de 24 de novembro de 1988, Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/legislacao/>, Acesso em 13 de fevereiro de 2017

110. RODRÍGUEZ-DELGADO, M.-Á.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, G.; CONDE-GONZÁLEZ, J.-E.A. & PÉREZ-TRUJILLO, J.-P., "Principal component analysis of the polyphenol content in young red wines". *Food Chemistry*. 78(4): 523, 2002.

111. ADAMSKI, J.; KOCHANA, J.; NOWAK, P. & PARCZEWSKI, A., "On the electrochemical biosensing of phenolic compounds in wines". *Journal of Food Composition and Analysis*. 46: 1, 2016.

112. HAYEK, T.; FUHRMAN, B.; VAYA, J.; ROSENBLAT, M.; BELINKY, P.; COLEMAN, R.; ELIS, A. & AVIRAM, M., "Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation". *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 17(11): 2744, 1997.

113. AUGER, C.; TEISSEDRE, P.-L.; GÉRAIN, P.; LEQUEUX, N.; BORNET, A.; SERISIER, S.; BESANÇON, P.; CAPORICCIO, B.; CRISTOL, J.-P. & ROUANET, J.-M., "Dietary wine phenolics catechin, quercetin, and resveratrol efficiently protect

hypercholesterolemic hamsters against aortic fatty streak accumulation". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(6): 2015, 2005.

114. MAOELA, M.S.; AROTIBA, O.A.; BAKER, P.G.; MABUSELA, W.T.; JAHED, N.; SONGA, E.A. & IWUOHA, E.I., "Electroanalytical determination of catechin flavonoid in ethyl acetate extracts of medicinal plants". *Int. J. Electrochem. Sci.* 4: 1497, 2009.

115. BRETT, A.M.O. & GHICA, M.E., "Electrochemical oxidation of quercetin". *Electroanalysis*. 15(22): 1745, 2003.

116. ESCARPA, A. & GONZÁLEZ, M.C., "Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods". *Analytica Chimica Acta*. 427(1): 119, 2001.