

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

JOSÉ ROBERTO DE JESUS DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E
COMPOSTOS FENÓLICOS EM MAÇÃS, COM E SEM O USO DE BIOFILME
COMESTÍVEL**

CAMPO MOURÃO

2023

JOSÉ ROBERTO DE JESUS DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E
COMPOSTOS FENÓLICOS EM MAÇÃS, COM E SEM O USO DE BIOFILME
COMESTÍVEL**

**Evaluation of the antioxidant activity of acetylsalicylic acid and phenolic
compounds in apples, with and without the use of edible biofilm**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Licenciado em Licenciatura em Química da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR).

Orientador(a): Dra. Daniela Aline Barancelli.

Coorientador(a): Dra. Regiane da Silva Gonzalez.

CAMPO MOURÃO

2023



Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

JOSÉ ROBERTO DE JESUS DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E
COMPOSTOS FENÓLICOS EM MAÇÃS, COM E SEM O USO DE BIOFILME
COMESTÍVEL**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação/
apresentado como requisito para obtenção do título de
Licenciado em Licenciatura em Química da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR).

Data de aprovação: 05/abril/2023

Daniela Aline Barancelli
Doutora
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Regiane da Silva Gonzalez
Doutora
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Estela dos Reis Crespan
Doutora
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Marcilene Ferrari Barrichello Consolin
Doutora
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

CAMPO MOURÃO
2023

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, sobre todas e todos, os meus agradecimentos são aos meus pais, Valter e Silvia, por toda educação baseada no amor, carinho, respeito e apoio que me foi dedicada e que me serviu para chegar até aqui e que, com certeza, continuará sendo minha base para alcançar sonhos e objetivos futuros. Por sempre e em qualquer circunstância, estarem ao meu lado, me instruindo sempre andar por caminhos do bem, da lealdade e da honestidade.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Daniela Aline Barancelli e minha coorientadora Profa. Dra. Regiane da Silva Gonzalez, pela sabedoria com que me guiaram nesta trajetória, pelos ensinamentos que me foram passados e que vão além do que este trabalho possa representar e por acreditarem em mim até quando eu mesmo desacreditei que seria capaz.

À todos os professores e todas as professoras que de alguma forma estiveram presentes em minha jornada acadêmica e, em especial, à Profa. Dra. Estela dos Reis Crespan por ser uma das pessoas com maior senso humanitário que conheci no período de estudos e que, como professora e coordenadora de curso, nunca mediu esforços para manter a qualidade do curso e o bem-estar dos estudantes. À Profa. Dra. Natália Neves Macedo Deimling, pelos ensinamentos didáticos e pedagógicos que guiarão minha carreira profissional quanto químico licenciado e ao Prof. Dr. Gustavo Pricinotto pela nossa relação de amizade que foi estabelecida, por todo carinho e apoio para que eu não desistisse dos meus objetivos. Pela oportunidade que me foi dada de participar por todos esses anos de um projeto social tão lindo como o Projeto Solidário 29 de Abril que me proporcionou momentos únicos que me agregaram não só profissionalmente, mas também humanamente. Só tenho a agradecer e desejar muita luz e amor no seu caminho.

Gostaria de deixar registrado também, o meu reconhecimento aos meus familiares e amigos que forma direta ou indireta contribuíram para que eu pudesse vencer esse desafio.

Enfim, a todos os que por algum motivo contribuíram para o desenvolvimento e realização deste trabalho.

RESUMO

Estresse oxidativo é o termo designado que explica a superprodução dos radicais livres comparados à produção de substâncias antioxidantes por processos biológicos. Por meio do processo oxidativo, esse desequilíbrio é responsável por gerar consequências deletérias no organismo como, por exemplo, modificação em moléculas de DNA e RNA, envelhecimento precoce e morte celular, desenvolvimento de doenças degenerativas, cardiovasculares e cancerígenas, dentre outros prejuízos à saúde. Como medida de correção para evitar a oxidação, as substâncias antioxidantes, que são aquelas que neutralizam a ação dos radicais livres, são produzidas pelo próprio sistema biológico, assim como, podem ser ingeridas através de dieta baseada no consumo de frutas e legumes ricos em vitaminas, carotenoides e compostos fenólicos. Diante disso, nas últimas décadas, diversos estudos e pesquisas têm sido realizadas para o desenvolvimento de produtos com propriedades e atividades antioxidantes. Portanto, o presente trabalho realizou testes comparativos em maçãs sem e com a aplicação de biofilme comestível, através do sequestro de radicais livres pela molécula de DPPH, avaliação da peroxidação lipídica da maçã pelo método de TBARS e de determinação dos compostos fenólicos totais utilizando o reagente FC para determinar a atividade antioxidante utilizando compostos bioativos como, a curcumina e o ácido salicílico, que contam com a presença do grupo fenol na sua estrutura – o que confere à substância a propriedade antioxidante – e o ácido acetilsalicílico, que não dispõe de um grupo fenol na estrutura. De acordo com as avaliações que foram realizadas observou-se que a melhor atividade antioxidante aconteceu nas maçãs que foram submetidas ao tratamento com a solução de curcumina, além de que, a aplicação do biofilme comestível também serviu como uma boa alternativa para o aumento da conservação e tempo de vida desta fruta.

Palavras-chave: estresse oxidativo; ácido acetilsalicílico; curcumina; biofilme comestível.

ABSTRACT

Oxidative stress is the designated term that explains the over production of free radicals compared to the production of antioxidant substances by biological processes. Through the oxidative process, this imbalance is responsible for generating deleterious consequences in the body, such as modification in DNA and RNA molecules, premature aging and cell death, development of degenerative, cardiovascular and cancer diseases, among other health problems. As a corrective measure to prevent oxidation, antioxidant substances, which are those that neutralize the action of free radicals, are produced by the biological system itself, and can also be ingested through a diet based on the consumption of fruits and vegetables rich in vitamins, carotenoids and phenolic compounds. In view of this, in recent decades, several studies and research have been carried out for the development of products with antioxidant properties and activities. Therefore, the present work carried out comparative tests on apples with and without the application of edible biofilm, through the scavenging of free radicals by the DPPH molecule, evaluation of the lipid peroxidation of the apple by the TBARS method and determination of the total phenolic compounds using the reagent FC to determine the antioxidant activity using bioactive compounds such as curcumin and salicylic acid, which have the presence of the phenol group in their structure – which gives the substance the antioxidant property – and acetylsalicylic acid, which does not have a group phenol in the structure. According to the evaluations that were carried out, it was observed that the best antioxidant activity occurred in the apples that were submitted to the treatment with the curcumin solution, in addition to that, the application of the edible biofilm also served as a good alternative to increase the conservation and life span of this fruit.

Keywords: oxidative stress; acetylsalicylic acid; curcumin; edible biofilm.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo Geral	18
2.2	Objetivos Específicos	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	Estresse Oxidativo	19
3.2	Antioxidantes	20
3.3	Compostos fenólicos como antioxidantes	22
3.4	Curcumina	24
3.5	Ácido Salicílico	27
3.6	Ácido Acetilsalicílico	29
3.7	Avaliação da atividade antioxidante	30
3.7.1	Determinação da atividade antioxidante pelo sequestro do radical livre da molécula de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).....	31
3.7.2	Determinação da atividade antioxidante pelo método de substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	33
3.7.3	Determinação da atividade antioxidante pelo método de Folin-Ciocalteu (FC)	34
3.8	Biofilmes comestíveis	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	Reagentes e soluções	37
4.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	37
4.3	Ponto de fusão	37
4.4	Espectrofotômetro	37
4.5	Síntese do Ácido Acetilsalicílico	37
4.6	Preparação das amostras de maçã	38
4.7	Produção do biofilme de alginato de sódio	40
4.8	Preparação das amostras de maçã sob aplicação do biofilme de alginato de sódio	40
4.9	Avaliação da atividade antioxidante	41
4.10	Preparação para avaliação da atividade antioxidante através do método DPPH	42
4.11	Preparação para avaliação da atividade antioxidante através do método de TBARS	43

4.12	Preparação para avaliação da atividade antioxidante através do método FC	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	Síntese do ácido acetilsalicílico	45
5.2	Teste de pureza	47
5.3	Análise estrutural do AAS através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio	48
5.4	Avaliação da atividade antioxidante	49
5.4.1	Avaliação da atividade antioxidante por método de DPPH.....	49
5.4.2	Avaliação da atividade antioxidante pelo método de TBARS	52
5.4.3	Avaliação da atividade antioxidante pelo método de FC	54
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo é o termo designado para definir o desequilíbrio que favorece a produção dos radicais livres em comparação à capacidade biológica de sintetização dos antioxidantes. A superprodução dos radicais livres é responsável por causar danos celulares através do processo oxidativo como, por exemplo, o envelhecimento e morte das células, modificações estruturais em moléculas, assim como, em carboidratos, proteínas e lipídios. Além disto, o favorecimento da síntese dos radicais livres se relaciona com o aparecimento e desenvolvimento de doenças cardiovasculares, degenerativas e cancerígenas (WOLPE; GRANZOTI; PORSCH, 2019; ALVES; ABREU, 2021).

A reação que descreve o processo oxidativo acontece através da tentativa dos radicais livres em adquirirem estabilidade. Dessa forma, quando não é possível um radical livre se ligar a outro, capturam elétrons de outras moléculas saudáveis que após esse sequestro, se transformam em outros radicais livres e assim sucessivamente, dando continuidade a uma reação em cadeia que pode ser interrompida, a menos que haja a interferência de substâncias antioxidantes (SANTOS; OLIVEIRA, 2014).

Os radicais livres são definidos por Silva *et al.*, (2016) como sendo as moléculas com átomos altamente reativos, que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Esse elétron desemparelhado na estrutura dos radicais livres aparece nos átomos de oxigênio ou de nitrogênio formando as espécies reativas que são conhecidas como ERO (espécies reativas de oxigênio) ou ERN (espécies reativas de nitrogênio) (REZENDE, 2010).

A produção dos radicais livres é realizada pelo organismo de maneira contínua e natural ou em função de algum distúrbio dos processos metabólicos para agirem como transferidores de elétrons favorecendo diversas reações bioquímicas como, por exemplo, geração de energia fertilização do óvulo, ativação de genes, e participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção que são fundamentais para a manutenção e bom funcionamento dos organismos (BARBOSA *et al.*, 2010).

No entanto, essas consequências deletérias causadas pela presença excessiva dos radicais livres são combatidas pelas substâncias antioxidantes, que são as substâncias que possuem a capacidade de diminuir ou inibir os prejuízos causados

pelo fenômeno da oxidação em cadeia em virtude de serem compostos capazes de neutralizar a ação dos radicais livres (VERRUCK; PRUDENCIO; SILVEIRA, 2018; VIANA; ARENARI, 2019).

Tais substâncias antioxidantes são produzidas pelo organismo, assim como, podem ser obtidas através de dietas baseadas no consumo de frutas, verduras e legumes, ricos em vitaminas A, C e E, minerais, carotenoides e compostos fenólicos (VERRUCK; PRUDENCIO; SILVEIRA, 2018; SANTOS; OLIVEIRA, 2014).

Nos últimos anos, diversos estudos têm sido desenvolvidos para avaliarem a potência e eficiência das substâncias antioxidantes obtidas de forma natural por meio de frutas, legumes e plantas cultivadas em solo nacional e que sejam consumidas pela população como parte da dieta ou como elementos que integram os procedimentos de medicina popular.

A curcumina faz parte dessa classe de produtos que possui propriedade antioxidante devido à presença de grupos hidroxila e metóxi na sua estrutura química, fazendo com que, através de diversos mecanismos, a produção de radicais livres sintetizados por importantes enzimas seja cessada ou diminuída (JACKUBCZYK *et al.*, 2020; TEIXEIRA *et al.*, 2022).

Segundo a Associação Brasileira de Produtores de Maçã (ABPM, 2016), a maçã – que ocupa a terceira posição dentre as frutas mais consumidas no Brasil, tendo à sua frente apenas a laranja e a banana – apresenta diversos benefícios para a saúde através das propriedades medicinais que possui devido a sua composição nutricional bastante diversificada que inclui água, carboidratos, proteínas, fibras, compostos vitamínicos, dentre outros compostos, como mostradas na Tabela 1 (RODRIGUES *et al.*, 2021).

Tabela 1 – Compostos e valores nutritivos presentes em 100 gramas de maçã das qualidades Fuji e Gala

Valor Energético	59 kcal	Ferro	0,18 mg
Água	83,93 g	Vitamina A	58 mcg
Carboidratos	15,25 g	Vitamina B1	0,01 mcg
Lipídios	0,36 g	Vitamina B2	0,01 mcg
Proteínas	0,19 g	Vitamina B5	0,06 mcg
Fibra Alimentar	2,7 g	Vitamina B6	0,04 mcg
Sódio	0 mg	Vitamina B9	2,9 mcg
Cálcio	7 mg	Vitamina C	5,7 mcg

Potássio 115 mg Vitamina E 0,32 mcg

Fonte: Associação Brasileira de Produtores de Maçãs. Disponível em:
<https://www.abpm.org.br/valor-nutricional>

Além destes, outros compostos que fazem parte da composição da maçã são conhecidos como compostos fenólicos e são esses que confere à fruta a propriedade antioxidante (Tabela 2).

Tabela 2 – Composição fenólica da maçã

Ácidos Hidroxicinâmicos	Ácido Clorogênico
Flavanóis	Catequina Epicatequina
Procianidinas	Procianidina b1 Procianidina b2
Flavonóis	Quercetina-3-glucósido Canferol-3-glucósido Quercetina-3-ramnósido
Chalconas	Floridizina

Fonte: RODRIGUES *et al.* (2021). Disponível em:
<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/22348/20438>

Dentro desse grupo de compostos fenólicos vale destacar a presença de dois subgrupos: o primeiro diz respeito aos ácidos fenólicos que incluem o ácido hidroxicinâmicos e hidroxibenzoicos, representados pelo ácido clorogênico. O segundo subgrupo está relacionado com os flavonóides, que incluem substâncias como a catequina e epicatequina, que fazem parte da classe dos flavonóis e as

quercetinas e seus derivados glicosados que participam da classe dos flavonóis (RODRIGUES *et al.*, 2021; COSTA, 2020).

O teor e os tipos de compostos fenólicos podem ser variados de acordo com a variedade da maçã, as condições de cultivo e de mudanças climáticas, estado de maturação, assim como, podem ser alterados durante o processo de armazenamento, em virtude da sua facilidade em participarem em reações de oxidação que resulta na sua degradação e perda de propriedades físico-químicas associadas ao sabor, textura e valor nutricional e decaimento do seu tempo de vida (LIMA, 2008; COSTA, 2020).

Como alternativa para poupar as maçãs dos efeitos que causam o aceleração do processo oxidativo, principalmente em virtude de fatores do meio externo, existe a possibilidade de realizar a aplicação de um biofilme comestível na fruta para minimizar os danos da oxidação e desacelerar o seu processo de deterioração e envelhecimento, conservando assim, as suas propriedades físico-químicas (MALDONADO *et al.*, 2017).

Grande parte dos biofilmes utilizados são preparados a partir de materiais biológicos que não apresentam altos teores de poluição nem de toxicidade, que sejam biodegradáveis e compatíveis com diversos alimentos e que apresentem baixo custo, tanto em questão de matéria-prima quanto de processo de produção. Além dessas, os biofilmes comestíveis apresentam outras propriedades relacionadas à suas características físicas, pois não apresentam aspectos pegajosos ou melosos, são brilhantes e transparentes (FAKHOURI *et al.*, 2007, p. 369; GONÇALVES *et al.*, 2015; MALDONADO *et al.*, 2017, p. 61).

Sendo assim, a necessidade de se realizar a avaliação e determinação da atividade antioxidante em diferentes tipos de alimentos se deve ao fato de que é preciso tomar conhecimento acerca do seu potencial antioxidante antes do consumo, bem como, se obter uma estimativa do seu tempo de vida, levando em consideração as reações que podem resultar na diminuição da sua qualidade e perda do seu valor nutricional (LIMA, 2008).

Existem diversos métodos que são capazes de avaliar e determinar a atividade antioxidante nos alimentos e alguns deles se destacam pela sua rapidez, alta confiabilidade e precisão e baixo custo para execução (LIMA, 2008). Dentre essas técnicas mais utilizadas, é conveniente considerar algumas, como a que acontece através da utilização da molécula reagente 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) da qual se avalia o sequestro do radical livre do reagente pela maçã, reduzindo o DPPH à

hidrazina. O ensaio que faz uso do ácido tiobarbitúrico (TBARS) avalia os produtos da peroxidação lipídica em ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas microsomas. Por fim, o método Folin-Ciocalteu (FC) que serve como um indicador sobre a presença de compostos fenólicos totais presentes na maçã.

Sendo assim, este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antioxidante do ácido acetilsalicílico sintetizado, fazendo um comparativo com compostos fenólicos (ácido salicílico e curcumina) pela análise do tempo de estocagem no fruto da maçã com e sem a aplicação de um biofilme comestível, utilizando os métodos para a determinação de sequestro do radical livre pela molécula de DPPH, avaliação da peroxidação lipídica da maçã pelo método de TBARS e de determinação dos compostos fenólicos totais utilizando o reagente FC.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antioxidante do ácido acetilsalicílico sintetizado comparando-o com compostos fenólicos (ácido salicílico e curcumina) por tempo de estocagem em maçãs, com e sem o uso de biofilme comestível.

2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar o ácido acetilsalicílico através de metodologia tradicional e analisar a estrutura através de RMN de Hidrogênio, teste de pureza e ponto de fusão;
- Avaliar a atividade antioxidante do AAS através dos métodos: DPPH, TBARS e FC utilizando a maçã como fonte de análise;
- Avaliar a atividade antioxidante de compostos fenólicos: AS e curcumina através dos métodos: DPPH, TBARS e FC utilizando a maçã como fonte de análise;
- Produzir e aplicar o biofilme comestível de alginato de sódio nas maçãs para avaliar a sua atividade antioxidante após o tratamento em solução de AS, AAS e curcumina;
- Fazer um comparativo da atividade antioxidante de compostos fenólicos e o ácido acetilsalicílico em maçãs.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Estresse Oxidativo

Nas últimas décadas, diversos estudos e pesquisas têm se voltado para o desenvolvimento de produtos naturais com propriedades e atividades antioxidantes. Essa visibilidade ao assunto se dá ao fato de termos a oxidação como um processo químico fundamental para vida aeróbia e para a sobrevivência das células que compõem os organismos animais e vegetais (ALVES *et al.*, 2010; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Alves *et al.* (2010, p. 2202) define o processo de oxidação como a conversão de uma substância química em um derivado com menor número de elétrons, ou seja, acontece quando em uma substância há a perda de um ou mais elétrons que são transferidos para outra substância. Processo esse que é conhecido por ser oposto ao processo de redução, que é quando há a o ganho e incorporação de um ou mais elétrons em determinada substância.

Em paralelo ao processo de oxidação, existe a produção contínua e natural dos radicais livres, que são moléculas que possuem um par de elétrons desemparelhados na sua camada mais externa e que no caso dos átomos de oxigênio ou de nitrogênio formam, consecutivamente, as espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Esses radicais livres, quando sintetizados em proporções adequadas, possuem a função de mediadores de transferência de elétron para as diversas reações bioquímicas que acontece nos organismos e que estão ligadas à produção de energia, regulação do crescimento celular, fagocitose, fertilização do óvulo, ativação de genes, síntese de substâncias biológicas importantes, e participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção (BARBOSA *et al.*, 2010; ALVES *et al.*, 2010).

Contudo, o excesso da produção dos radicais livres pode ser responsável pela falha do processo oxidativo e apresentar efeitos colaterais, uma vez que, reagem diretamente com as macromoléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA) e do ácido ribonucleico (RNA), assim como, causar alterações na estrutura e funções das células e de outras substâncias oxidáveis responsáveis pelo envelhecimento precoce e surgimento de doenças como, por exemplo, o câncer, doenças degenerativas, cardiovasculares e neurológicas, catarata, disfunções cognitivas, o declínio do

sistema imunológico – que pode ser fator agravante em casos de doenças autoimune como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) – dentre outras (ALVES *et al.*, 2010; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Assim como nas células do organismo animal, os radicais livres também atuam de forma deletéria em células dos organismos vegetal, tendo a peroxidação lipídica como a principal causa da deterioração dos corpos graxos e, por consequência, a alteração de determinadas propriedades dos alimentos como o odor, a textura e o sabor, bem como sua diminuição da qualidade nutricional (ALVES *et al.*, 2010).

3.2 Antioxidantes

Como medida de combate, os organismos vivos sintetizam substâncias antioxidantes que são as substâncias que, quando presentes em menores concentrações do que as do substrato oxidável, possuem a capacidade de diminuir ou inibir os prejuízos causados pelo fenômeno da oxidação em cadeia em virtude de serem compostos capazes de neutralizar a ação dos radicais livres e espécies não radicalares ou indiretamente quando contribui para o desenvolvimento de sistemas enzimáticos, tendo a mesma capacidade (DEL RÉ; JORGE, 2012; JASKI; LOTÉRIO; SILVA, 2014; VIANA; ARENARI, 2019).

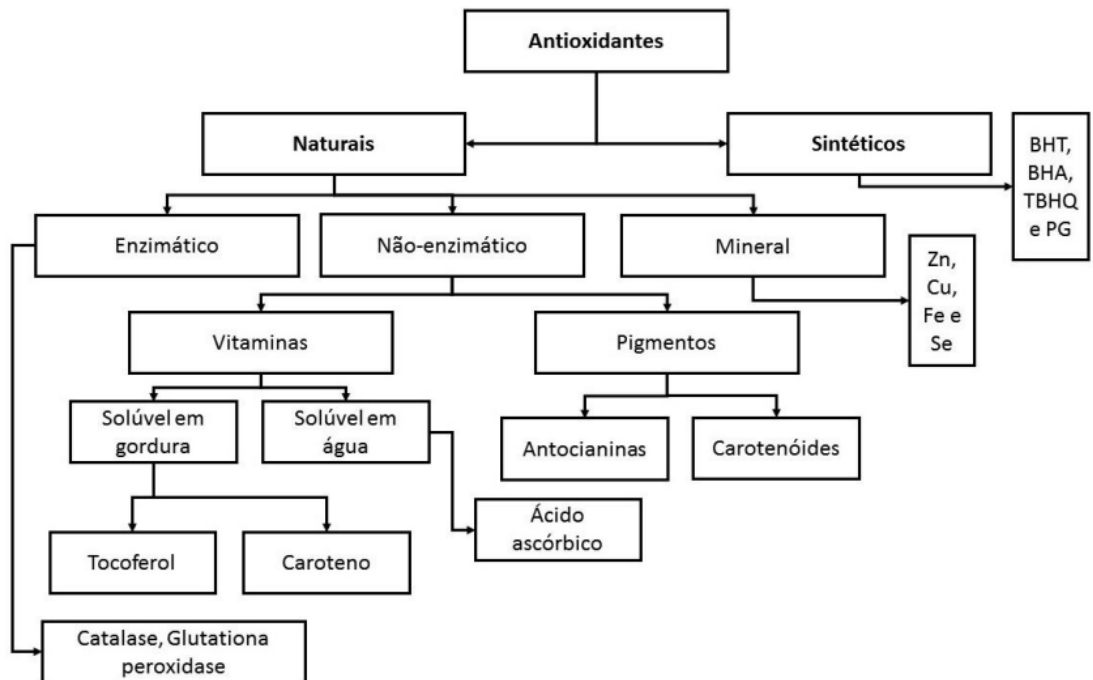
Tais ações podem ser alcançadas por meio de diferentes mecanismos de ação: impedindo a formação dos radicais livres ou espécies não radicais (sistemas de prevenção), impedindo a ação desses (sistemas varredores) ou, ainda, favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo) (BARBOSA *et al.*, 2010).

De modo geral, os antioxidantes podem ser classificados como sintéticos que são, na sua maioria, utilizados no processo de produção de alimentos processados e que apresentam potenciais tóxicos podendo agravar ou desenvolver danos à saúde diante de uma exposição aguda e prolongada como, por exemplo, diferentes tipos de câncer, alterações hepáticas, redução do nível de hemoglobina e a hiperplasia de células basais, e por esse motivo pesquisas e estudos têm sido desenvolvidas para substituir esses antioxidantes pela classe dos antioxidantes naturais, abundantemente presentes nos vegetais, que tem como as substâncias mais ativas os compostos fenólicos, como os flavonoides, os tocoferóis, ácidos fenólicos e extratos de plantas (FALCÃO, 2016, p. 38; SANTOS *et al.*, 2018, p. 456; VIANA; ARENARI 2019, p. 8).

Por se tratar de um processo fisiológico, até mesmo no organismo humano, a natureza dos antioxidantes que contrabalançam a oxidação pode ser endógena ou exógena. Dentro do grupo dos antioxidantes que tem a sua origem endógena estão as enzimas glutathiona-peroxidase, catalase, metionina-redutase e superóxido dismutase, as quais atuam em conjunto (SANTOS *et al.*, 2018, p. 456; VIANA; ARENARI 2019, p. 8). Além destes, outras substâncias com a mesma habilidade, conhecidos como antioxidantes exógenos e que, na sua maioria, são não enzimáticos, podem ser obtidas através de fontes externas que envolvem uma dieta baseada na ingestão de vitaminas, minerais e compostos fenólicos (ALVES *et al.*, 2010 p. 2022; BICAS, 2019, p. 25).

Em suma, Falcão (2016, p. 28) representa detalhadamente, através da Figura 1, a classificação das substâncias antioxidantes.

Figura 1 – Classificação dos antioxidantes



Fonte: Falcão (2016, p. 28).

Frente ao exposto, tem-se que o estresse oxidativo acontece quando a produção de substâncias antioxidantes é inferior da produção de radicais livres que podem ser identificados e quantificados (BARBOSA *et al.*, 2010).

3.3 Compostos fenólicos como antioxidantes

Dentre os antioxidantes que estão presentes em maior quantidade na natureza, estão os metabólitos que pertencem à classe dos compostos fenólicos, definidos por Rahate; Madhumita; Prabhakar (2021) como:

“[...] metabólitos secundários das plantas que desempenham um papel fundamental no fornecimento de proteção contra herbívoros e doenças microbianas, além de proteger contra os raios ultravioletas e atrair animais polinizadores e dispersores de sementes” (GALVÃO, 2021, p. 15 apud RAHATE; MADHUMITA; PRABHAKAR, 2021).

Os flavonoides são definidos como um grupo abrangente de metabólitos secundários que faz parte da classe dos polifenóis – compostos que apresentam diversos grupos fenólicos em suas estruturas químicas – que são componentes de baixo peso molecular. As chalconas, flavonas, flavanonas, flavonóis, di-hidroflavonóis (flavononois), isoflavonas, antocianinas, antocianidinas, auronas, são conhecidas por serem as diferentes classes que compõem o grupo dos flavonoides (MARCUCCI *et al.*, 2021, p. 06).

Além da presença em plantas, estes metabólitos fazem parte da composição de alguns alimentos sendo responsáveis por desenvolver diversas funções ligadas inibição da peroxidação lipídica, resultando na preservação e qualidade de sabor, textura, adstringência e odor, devido suas propriedades antioxidantes (MARCUCCI *et al.*, 2021, p. 05).

As principais fontes de compostos fenólicos são frutas cítricas, como limão, laranja e tangerina, além de outras frutas, como a cereja, uva, ameixa, pera, maçã e mamão, sendo encontrados em maiores quantidades na polpa que no suco da fruta. A pimenta verde, brócolis, repolho roxo, cebola, alho, tomate, nozes, entre outros, também são excelentes fontes destes compostos (MARCUCCI *et al.*, 2021, p. 05).

A eficiência da atividade antioxidante dos compostos fenólicos está diretamente relacionada com a sua estrutura química – formada por, no mínimo, um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos – e suas propriedades redutoras, sendo que, estas características são de fundamental importância e responsáveis por conferir o sequestro de radicais livres, o que resulta na neutralização dos agentes oxidantes, assim como, garantir a ação como quelantes de íons metálicos que são capazes de catalisar reações oxidativas em alimentos (BICAS, 2019).

Sendo assim, tem-se que em relação à reatividade e sequestro dos radicais livres está inversamente relacionada na capacidade de oxidação dos flavonoides, ou seja, quanto menor for o seu potencial de oxidação, maior será sua atividade como

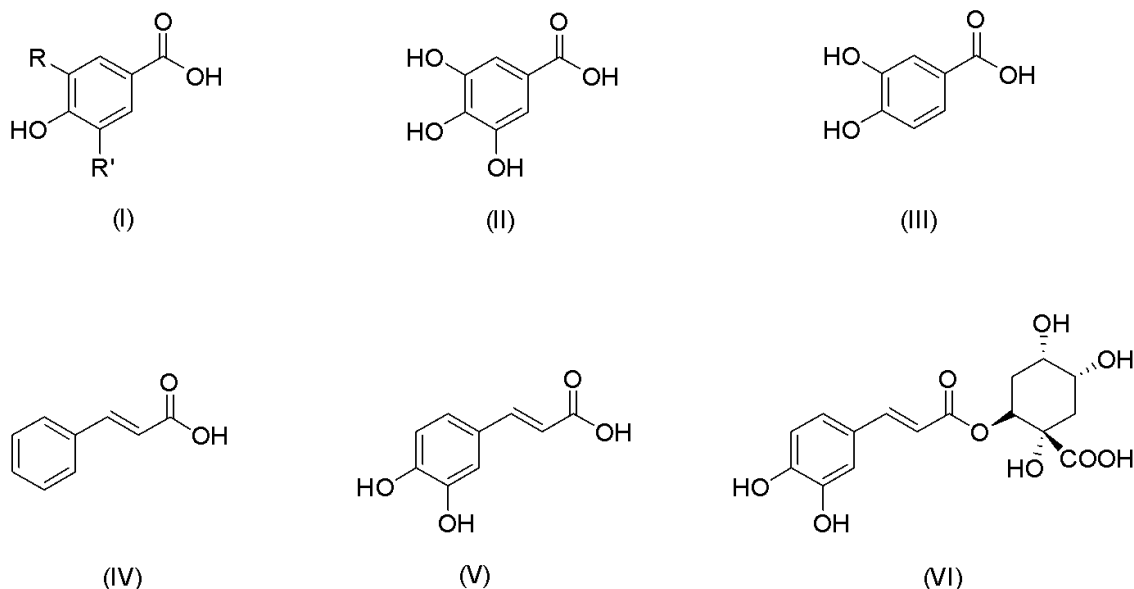
sequestrador desses radicais livres. Ao se considerar a estrutura química dos compostos flavonoides, a relação é de proporcionalidade e quanto maior a quantidade de hidroxilas, maior será a sua atividade como doador de elétrons. (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006, p. 122).

Estes compostos que são encontrados em plantas e vegetais, na sua maioria, são biossintetizados a partir da fenilalanina ou da tirosina, e são classificados desde compostos simples como, por exemplo, os ácidos fenólicos, à compostos conjugados ou complexos que são moléculas altamente polimerizadas, tais como a suberina e a lignina (GALVÃO, 2021).

Seguindo a taxonomia, dentro da classe dos compostos fenólicos originários das leguminosas, muitas vezes em níveis elevados, existem algumas subclasses classificadas de acordo com suas estruturas e propriedades e dentre as principais, ainda podem ser citadas além dos ácidos fenólicos – que se subdividem ainda em derivados do ácido benzoico (I) (ácido gálico (II) e ácido protocatecuico (III)) e derivados de ácido cinâmico (IV), ácido cafeico (V) e o ácido clorogênico (VI) (Figura 2) – e das ligninas, os flavonoides, antocianinas, procianidinas, taninos, dentre outros. Entretanto, existem algumas subclasses de flavonoides que podem ser restritos taxonomicamente, tal como as isoflavonas, que são limitados quase exclusivamente para leguminosas, assim como, as cumarinas (FALCÃO, 2016, p. 29).

A atividade antioxidante dos flavonoides depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores: reatividade como agente doador de H e elétrons, estabilidade do radical flavanoil formado, reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interação com as membranas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006, p. 122).

Figura 2- Estrutura química de compostos fenólicos



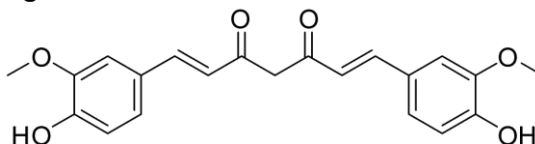
Fonte: Autoria própria (2023).

3.4 Curcumina

A curcumina é uma molécula cuja estrutura é simétrica com massa molecular correspondente ao valor de 368,39 g/mol e ponto de fusão, para amostras isoladas, igual a 183°C, porém, esse valor tido como um valor teórico porque dificilmente será obtido na prática, ou seja, devido aos aditivos naturais presentes nos materiais comerciais utilizados para análise, o ponto de fusão da curcumina é suscetível a sofrer alterações (GRYNKIEWICZ & SLIFIRSKI, 2012, p. 202).

O isolamento da curcumina foi, originalmente, realizado por Vogel em 1815, e a estrutura química da curcumina foi identificada e confirmada somente em 1910 por Lampe e Milobedzka como [1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona] que, posteriormente, no ano de 1913, confirmaram a rota biossintética da curcumina. Já a composição atômica que descreve a, estruturalmente, a curcumina é dada por $C_{21}H_{20}O_6$ (Figura 3) (GRYNKIEWICZ & SLIFIRSKI, 2012, p. 202).

Figura 3 – Fórmula estrutural da curcumina



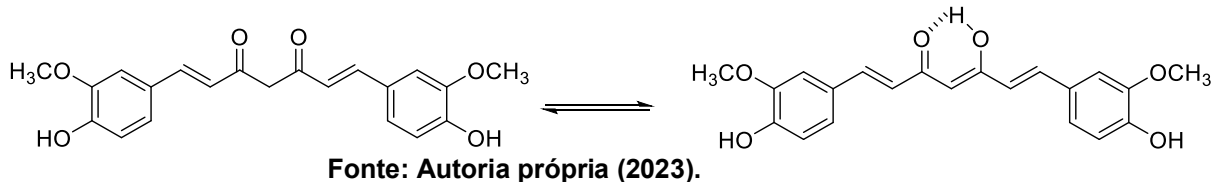
Fonte: Autoria própria (2023).

O diferuloilmetano, ou popularmente conhecido como curcumina, é um pó cristalino, de coloração amarela escura, pertencente ao subgrupo dos curcuminoides

que derivam dos flavonoides. Possui solubilidade baixa em água e éter, solubilidade moderada em hexano, ciclohexano, tetracloreto de carbono e tetrahydrofurano, no entanto, sua solubilidade é alta em solventes orgânicos como, por exemplo, etanol, metanol, acetona, dimetilformoldeído, clorofórmio, dentre outros (GRYNKIEWICZ & SLIFIRSKI, 2012, p. 202; COLLINO, 2014, p.30).

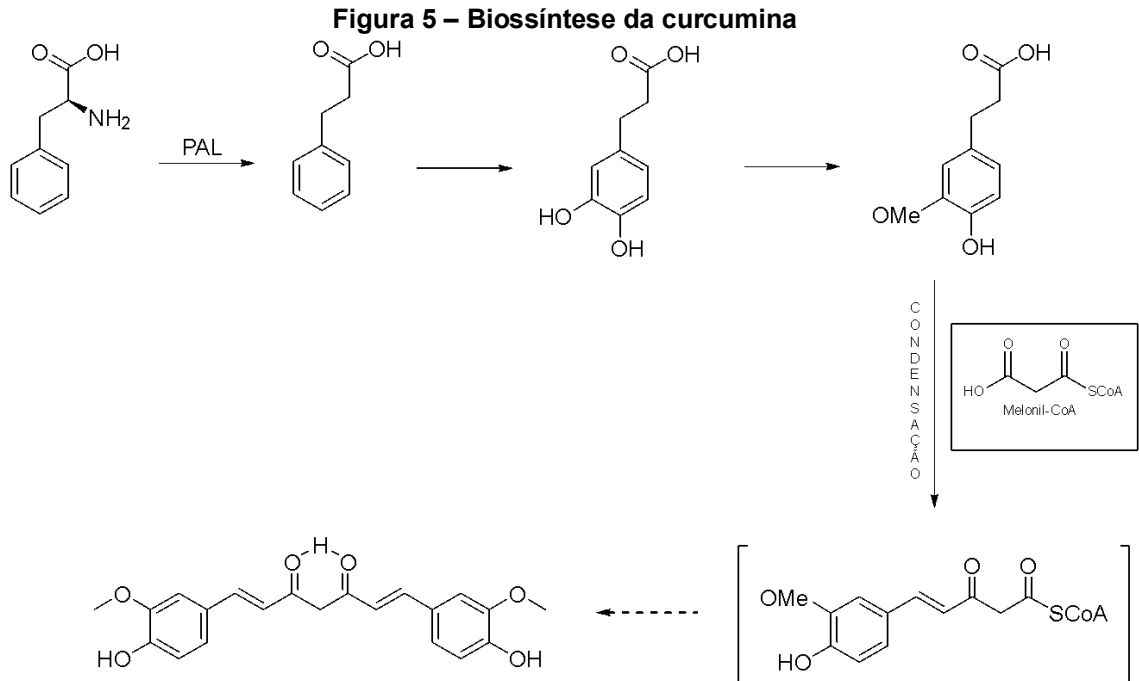
A estrutura molecular da curcumina é formada por dois anéis metoxifenóis ligados simetricamente à porção β -dicetona que é responsável pela transferência intramolecular do átomo de hidrogênio, o que permite a curcumina exibir um tautomerismo ceto-enólico (Figura 4) (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015, p. 541).

Figura 4 – Equilíbrio tautomérico ceto-enólico da curcumina



Este equilíbrio depende parcialmente do valor do pH e da polaridade do solvente, ou seja, referente à polaridade das soluções, nas que são apolares, a curcumina aparece na forma de enol, buscando estabilidade através das pontes de hidrogênio entre as moléculas e nos solventes polares, a curcumina assume a forma dicetona. Quanto ao pH, quando sofre variação na faixa entre 3 e 7 (ácido e neutro), existe a predominância da forma cetônica e a curcumina age como doador de prótons e em valores de pH acima de 8 (básico), prevalece a forma enólica da curcumina que age como uma doadora de elétrons. A molécula da curcumina apresenta também, em sua estrutura, a isomeria geométrica que permite que essa molécula coexista sob duas conformações possíveis: “cis” e “trans” (ESATBEYOGLU *et al.*, 2012, p. 531; COLLINO, 2014, p. 31; SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015, p. 541).

Biossinteticamente, a obtenção dos pigmentos curcuminoides acontece através do ácido cinâmico – proveniente da desaminação do aminoácido fenilalanina pela enzima fenilalanina amonialiase (PAL) – por meio da rota do chiquimato ou ácido chiquímico. Dessa forma, o ácido cinâmico deve participar de reações de oxidação e metilação para a formação do ácido ferúlico que, seguindo a proporção 2:1, ou seja, duas moléculas de ácido ferúlico, possuindo os grupos acetil e malonil, que participam de uma reação de condensação, na presença da coenzima A (malonil-CoA) para sintetizar uma molécula de curcumina (Figura 5) (MARTINS, 2012, p. 6; COLLINO, 2014, p. 30).



Desde a sua descoberta, a curcumina passou a ser alvo de diversos grupos de estudos e pesquisas de diferentes áreas, devidos as suas propriedades físico-químicas e biológicas. Hoje em dia, a maior ocorrência do uso da curcumina, na sua forma de pó seco, acontece como um tempero alimentício – conhecido também como açafrão da terra ou por servir de base para o curry – que é um dos mais utilizado pelo mundo e, em especial, na região continental da Índia. Além de servir como uma especiaria na culinária, a curcumina também é utilizada como corante alimentício natural devido sua alta capacidade de pigmentação (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015, p. 539).

Em paralelo à sua função de agregar coloração e sabor aos alimentos, o uso curcumina para fins medicinais acontece devido às suas propriedades biológicas – juntamente com a boa tolerabilidade e baixa toxicidade – que advém do seu perfil estrutural que é relacionado à sua natureza fenólica, caracterizando sua atividade antioxidante.

Devido à presença de grupos hidroxila e metóxi na sua estrutura química, a curcumina possui variadas propriedades biológicas, principalmente em ação antimicrobiana, antioxidante, antitumoral e anti-inflamatória (JACKUBCZYK *et al.*, 2020).

Em relação à sua atividade antioxidante, a curcumina, através de múltiplos mecanismos de ações é capaz de interferir no funcionamento de enzimas

relacionadas à produção de radicais livres, assim como, é capaz de inibir a atividade de enzimas como a lipo-oxigenases, oxidase e ciclooxigenase que acabam gerando espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) (TEIXEIRA *et al.*, 2022, p. 05).

Além disso, a curcumina apresenta algumas atividades antioxidantes e de eliminação de radicais livres pelo processo de peroxidação, isso se deve a sua extensa estrutura química, especialmente as ligações de carbono, o que contribui para tal efeito. Dessa forma, esse composto apresentou uma elevada potência para a inibição da peroxidação lipídica, protegendo assim, a membrana celular de danos oxidativos. Com isso, inúmeras aplicabilidades a curcumina demonstrou eficiência em seus aspectos antioxidantes, podendo inibir danos oxidativos que podem ser causados em alguns órgãos vitais como o cérebro e rim, já no sistema reprodutivo essa atividade da curcumina apontaram uma certa proteção da atividade estruturas e funcional dos espermatozoides, principalmente quando os danos oxidativos das células germinativas estão em níveis elevados, sendo importante para o sistema reprodutivo (TEIXEIRA *et al.*, 2022, p. 05).

A curcumina pode alterar a expressão genética envolvida na defesa antioxidante para eliminar pequenas moléculas oxidativas e inibir a peroxidação lipídica nas membranas celulares, minimizando a resposta inflamatória associada a aterosclerose. Em modelo animal com resistência à insulina, a curcumina contribuiu para o aumento da atividade de enzimas como glutathione, glutathione reductase, superóxido dismutase, catalase e peroxidase, favorecendo a defesa antioxidante (PANAHI *et al.*, 2018).

No entanto, apresenta um fator limitante quanto a sua eficácia terapêutica que é a baixa biodisponibilidade que se relaciona com a má absorção pelo organismo e rápida metabolização e eliminação, quando administrada por via oral (GUPTA *et al.*, 2012, p. 115).

Esse fator que limita a eficiência da curcumina é o que tem estimulado diversas pesquisas e propostas para melhorar a biodisponibilidade deste polifenol, uma vez que, a curcumina tem se mostrado uma molécula altamente pleiotrópica e nutracêutica, que pode ser empregada para prevenir e tratar doenças multigênicas complexas como, por exemplo, as doenças cardiovasculares, doenças metabólicas, câncer, doenças neurológicas e degenerativas (GUPTA *et al.*, 2012, p. 116).

3.5 Ácido Salicílico

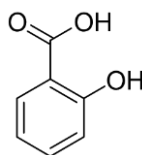
O ácido salicílico (AS) é um composto derivado do pó da casca do salgueiro pertencente à espécie *Sallix Alba* que foi prescrito por Hipócrates (460 – 377 a.C.) para tratamentos de dores inflamatórias e para o alívio das dores do parto. Em 1763,

o reverendo Edmund Stone descobriu a propriedade antipirética que o fármaco possui e desde então passou a ser utilizado no tratamento contra a febre (MONTINARI; MINELLI; DE CATERINA, 2018).

A primeira síntese laboratorial do AS aconteceu no ano de 1829 e foi realizada pelo farmacêutico francês Henri Leroux e pelo químico italiano Raffaele Piria. A síntese foi realizada através da reação entre a salicina (isolada do salgueiro) e o metil salicilato (proveniente do óleo de gaultéria) formando o AS que passou a ser comercializado posteriormente (SPITZ, 2008). Contudo, além do gosto desagradável, o medicamento causava lesões na parede do estômago devido suas propriedades queratolíticas, ou seja, sua capacidade de esfoliação e corrosão (ARAÚJO, 2017).

O AS é um beta-hidrácido e um composto aromático bifuncional – possui dois grupos funcionais, sendo eles: o grupo carboxila (-COOH) que caracteriza o ácido carboxílico e o outro é o fenol que é representado pelo grupo (-OH) ligado diretamente ao anel aromático (Figura 6) (MENDES; PERUCH; FRITZEN, 2012).

Figura 6 – Fórmula estrutural do ácido salicílico



Fonte: Autoria própria (2023).

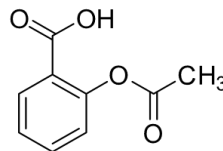
A aplicabilidade do AS está relacionada à área da medicina dermatológica e estética, sendo utilizado na realização de peeling químico no tratamento contra a acne, pois afina a camada espessada da pele e age evitando a contaminação por bactérias e fungos. Outros tratamentos semelhantes que visam à redução de cicatrizes e deformidades cutâneas (rugos, descamação da pele ou do couro cabeludo) e a oleosidade fazem uso do AS, sendo assim, é encontrado em diversos produtos de cosméticos e higiene pessoal, como cremes, shampoos e sabonetes (ARAÚJO, 2017).

Na área farmacêutica, o uso do AS foi substituído pela sua forma acetilada que recebeu o nome de ácido acetilsalicílico (AAS), que é comercializado como Aspirina®. Este composto possui efeitos semelhantes aos do seu precursor, porém, com menor índice de toxicidade e com menos efeitos colateral sendo um dos fármacos mais consumidos no mundo (MONTINARI; MINELLI; CATERINA, 2018).

3.6 Ácido Acetilsalicílico

Apesar do sucesso comercial que o Ácido Salicílico fez na época como medicamento, os químicos e farmacêuticos se preocupavam com os efeitos colaterais e o teor de toxicidade que o composto apresentava. Foi então, que em 1897 que o químico Felix Hoffmann que trabalhava para a indústria farmacêutica Bayer produziu um novo composto que derivava do Ácido Salicílico. Com um radical acetil adicionado à hidroxila ligada diretamente ao anel aromático, deu-se origem a um éster de acetato que apresentou propriedades semelhantes, porém, apresentando uma menor taxa de toxicidade e corrosividade devido a sua característica de ser um ácido mais fraco. Este ficou conhecido como Ácido Acetilsalicílico (AAS) (Figura 7) e passou a ser comercializado com o nome de Aspirina® (LIMA, 2011; LIMA; ALVIM, 2018.).

Figura 7 – Fórmula estrutural do Ácido Acetilsalicílico



Fonte: Aatoria própria (2023).

O AAS foi o primeiro medicamento a ser sintetizado em laboratório e não comercializado como produto final de sua matéria-prima e também o primeiro a ser vendido em forma de tabletes de uso oral para combater às dores leves e moderadas, uma vez que seu efeito é mais fraco do que seu precursor. Atualmente, este é um dos fármacos mais utilizados no mundo, com seu consumo médio excedendo à marca de 20.000 toneladas por ano (LIMA, 2018).

Além das propriedades apresentadas, o AAS também apresenta a ação vasodilatadora, ou seja, a capacidade de dilatar os vasos sanguíneos facilitando o fluxo de sangue no nosso corpo e melhorando o transporte de oxigênio para os músculos e por essa razão, o fármaco é frequentemente usado para combater doenças cardiovasculares.

Alguns estudos demonstraram que o uso de AAS, tanto na prevenção primária (pessoas com idade acima de 40 anos com pelo menos dois fatores de risco: HAS, diabetes mellitus e/ou dislipidemia), quanto na prevenção secundária (pacientes com história de AVC isquêmico, IAM e/ou com angina pectoris) pode levar a uma importante redução de eventos cardiovasculares, que pode ser de até 40%. (VIANNA; GONZÁLEZ; MATIJASEVICH, 2012).

O AAS age também como um inibidor da enzima ciclooxigenase que responsável pela produção de plaquetas e, isto significa que, a produção e a

agregação de plaquetas são reduzidas evitando os trombos arteriais e conseqüentemente o sangue se torna mais fluido e o sangramento, em casos especiais, mais prolongados.

É logo após ser ingerido através da via oral que o AAS inicia seu processo farmacocinético, sendo rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal voltando a se tornar ácido salicílico e dessa forma é absorvido e transportado para todas as partes do organismo. O AAS e seus metabólitos são excretados principalmente por via renal (ANVISA, 2011). Seu metabolismo de excreção é um fator que depende da concentração que o composto foi administrado, ou seja, para doses baixas, pode demorar de 2 a 3 horas e para doses altas, o tempo de vida-útil do fármaco no corpo pode durar até 15 horas.

3.7 Avaliação da atividade antioxidante

Para Lima (2008, p. 38)

A determinação da atividade antioxidante dos alimentos, além de predizer o potencial antioxidante do alimento antes de ser ingerido, é importante para avaliar a proteção contra a oxidação e a deterioração do alimento, reações que podem levar à diminuição da sua qualidade e do seu valor nutricional (LIMA, 2008, p.38).

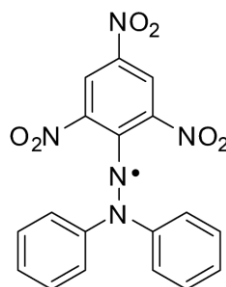
Para que ocorra a determinação da atividade antioxidante em substâncias do sistema biológico e alimentos, existem diversos métodos capazes de determinar a atividade antioxidante de substâncias e alimentos, mas todos eles têm em comum a presença de um agente oxidante, um substrato adequado e uma estratégia de medida do ponto final (LIMA, 2008, p.38).

Tais métodos utilizados para a caracterização de atividades antioxidantes são divididos em dois grupos, sendo o primeiro pouco aplicado devido os altos custos em relacionados aos instrumentos utilizados e que é baseado na captura de radicais livres através da técnica analítica de espectrometria de ressonância de spin de elétrons (ESR) e o segundo grupo que envolve técnicas in vitro que são mais utilizadas e que acontecem através da determinação da oxidação de uma molécula alvo como, por exemplo, os lipídios, as proteínas e os ácidos nucleicos pelos radicais livres que leva à formação de grupos carbonila, que podem ser detectados através da reação com o 2,4- dinitrofenilhidrazina (DPPH) (LIMA, 2008, p.39).

3.7.1 Determinação da atividade antioxidante pelo sequestro do radical livre da molécula de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Este ensaio – que é um dos mais utilizados devido sua rapidez, alta confiabilidade e estabilidade na ausência da luz – é baseado na descoloração da solução contendo a molécula de DPPH (Figura 8) que é caracterizada como um radical orgânico de nitrogênio livre e estável devido à presença de elétron desemparelhado, o que lhe confere uma coloração violeta escura descrita por uma banda de absorção em etanol em um intervalo de 515-520 nm (SUCUPIRA *et al.*, 2012, p. 266; PIRES *et al.*, 2017, p. 02).

Figura 8 – Fórmula estrutural da molécula de DPPH



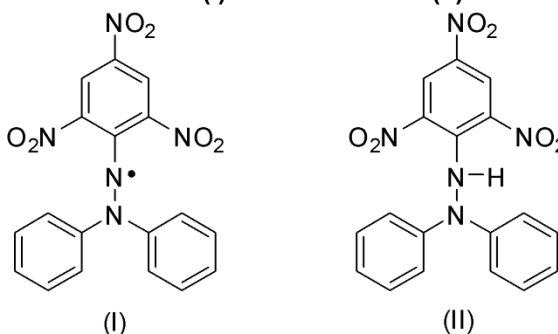
Fonte: Autoria própria (2023).

Segundo Oliveira (2015, p. 37):

O método DPPH foi desenvolvido por Blois (1958) para determinar a atividade antioxidante de varias substâncias utilizando um radical livre estável semelhante, α -difenil- β -picrilhidrazila. Esse método foi depois modificado por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995) para determinar o potencial antioxidante de compostos fenólicos e de amostras biológicas [...] (OLIVEIRA, 2015, p. 37).

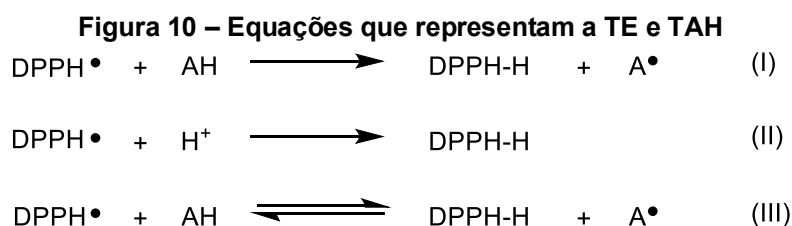
Quando uma substância doadora de átomos de hidrogênio é adicionada a solução que contém moléculas de DPPH, acontece a mudança da coloração de púrpura para violeta claro ou amarelo pálido através da redução da sua forma radicalar (I) para não-radicalar (II), dando origem à hidrazina (Figura 9) (ALVES, *et al.*, 2010, p. 2204; SUCUPIRA *et al.*, 2012, p. 266)

Figura 9 – Estrutura radicalar (I) e não-radicalar (II) da molécula de DPPH



Fonte: Autoria própria (2023).

Existem dois métodos utilizados na determinação da capacidade antioxidante que são capazes de neutralizar ou reduzir o radical livre da molécula de DPPH, sendo que, um é baseado na transferência de elétrons (TE) (I) e o outro consiste na transferência de um átomo de hidrogênio (TAH) (II) (GÜLÇİN, 2012). As equações de ambos os processos podem ser vistas, consecutivamente, conforme a Figura 10 a seguir:



Fonte: Autoria própria (2023).

Além disso, pela equação 3, é possível observar que o mecanismo de reação de transferência de hidrogênio entre o radical DPPH e o antioxidante (AH) pode ser reversível, sendo que o DPPH-H poderá se converter na forma de DPPH (OLIVEIRA, 2015, p. 37).

Contudo, em relação ao uso do DPPH para determinar a atividade antioxidante de compostos fenólicos, existem algumas limitações relacionadas com diversidade de protocolos existentes desde a primeira aplicação até os dias atuais, tendo como consequência a dificuldade em identificar e determinar a capacidade antioxidante de uma determinada substância, assim como, realizar comparativos entre os resultados obtidos através da avaliação antioxidante devido à despadronização destes métodos (OLIVEIRA, 2015, p. 39).

O tipo de solvente utilizado para dissolver o reagente DPPH é outro inconveniente deste método, pois a solubilização do DPPH é facilitada em meio orgânico (metanol ou etanol), sendo que assim, a doação de um átomo de hidrogênio da própria molécula de álcool aumenta a solubilidade e a taxa constante de transferência de hidrogênio para o radical DPPH, principalmente para o átomo de nitrogênio que está ligado aos dois anéis aromáticos. Apesar dessa desvantagem, é indicado que se priorize as metodologias que utilizam os solventes de menor toxicidade (OLIVEIRA, 2015, p. 39).

Em meio aquoso, a solubilidade do DPPH é afetada, passando por uma diminuição, o que pode interferir na avaliação da capacidade antioxidante, tornando o

radical DPPH pouco acessível para a reação com as amostras antioxidantes, afetando assim a transferência de elétron ou de hidrogênio (MAGALHÃES *et al.*, 2008).

Outro fator que limita a aplicação dos métodos de avaliação antioxidante via DPPH está associado à presença da luz que é responsável pelo processo de fotoxidação de espécies radicalares presentes na solução reagente, ou seja, independente do protocolo seguido, o indicado é que o procedimento seja realizado em ambiente escuro (MAGALHÃES *et al.*, 2008; GÜLÇİN, 2012; OLIVEIRA; BARBOSA; FLORES, 2021, p. 402).

3.7.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método de substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação da atividade antioxidante através do método de TBARS surgiu através de John A. Buege e Steven D. Aust e tem como objetivo principal avaliar os produtos da peroxidação lipídica ou da lipoperoxidação (LPO), como também é conhecida, em membrana microssoma através do ataque de EROS e radicais livres à lipídios poli-insaturados que possuem em sua estrutura duas ou mais ligações duplas entre carbonos, o que os tornam vulneráveis aos ataques. (ARNHOLD; HECK, 2014; OLIVEIRA, 2021).

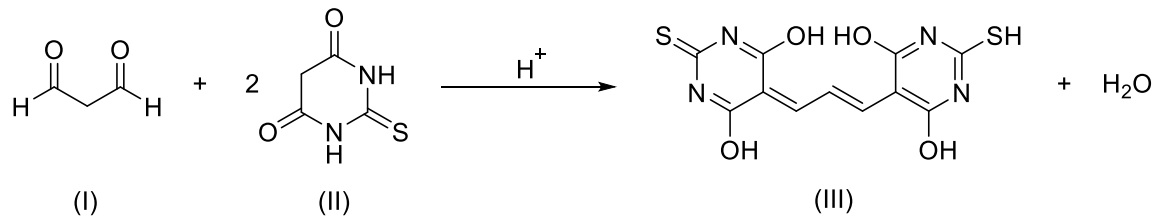
A LPO, basicamente, consiste na abstração do hidrogênio a partir de um átomo de carbono e a incorporação de oxigênio molecular a um ácido graxo poli-insaturado (AGPI), resultando na formação de radicais peroxil e hidroperóxidos lipídicos (LOOH). O radical hidroxila é conhecido como a EROS que inicia a peroxidação. No processo final, ocorre a propagação dos radicais lipídicos e peroxila (R-C e-ROO), que são produzidos, até que destruam a si próprios (OLIVEIRA, 2021, p. 23).

O processo de peroxidação lipídica acontece em baixos níveis no organismo humano e de maneira contínua e natural controlada por mecanismos biológicos de compensação e quando acontece o descontrole desse processo em favor do aumento da LPO, o estresse oxidativo pode aparecer como sendo uma das consequências (OLIVEIRA, 2021).

Os peróxidos são produtos primários do processo de oxidação e, na sua decomposição, são gerados compostos de diferentes naturezas, que são conhecidos como produtos secundários. Dentre esses compostos secundários produzidos, o malonaldeído (MDA) (I) – derivado da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados – é

o principal e reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (II), em meio ácido e sob alta temperatura, para formar um aduto MDA-TBA com pigmentação rósea ou avermelhada (III), que apresenta um máximo de absorção a 532-535 nm (FIGURA 11) (SUCUPIRA *et al.*, 2012, p. 265).

Figura 11 – Reação entre o MDA e TBA para obtenção de um cromóforo pigmentado



Fonte: Autoria própria (2023).

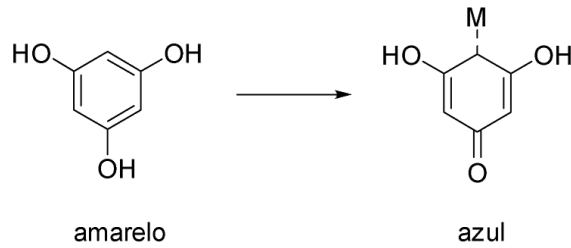
Devido o teste de TBARS avaliar a extensão da oxidação lipídica de forma geral, o resultado obtido não é específico, pois, outros materiais biológicos do alimento, como proteínas e nitritos, também podem reagir com o TBA e interferir no resultado da análise (BERTOLIN *et al.*, 2011, p. 305).

3.7.3 Determinação da atividade antioxidante pelo método de Folin-Ciocalteu (FC)

Este ensaio determina a quantidade de compostos fenólicos totais de substâncias orgânicas em bebidas e vegetais através do reagente FC via reação de oxi-redução. Por se tratar de um método colorimétrico e espectrofotométrico, é baseado na interação entre as substâncias redutoras com o reagente de FC, que é uma solução com coloração amarelada, formada através da mistura entre o ácido fosfotúngstico (H₃PW₁₂O₄₀) e o ácido fosfomolibdico (H₃PMO₁₂O₄₀). (PIRES *et al.*, 2017, p. 01).

A cor característica do reagente de FC se deve ao fato do molibdênio presente na solução formar um complexo com estado de oxidação igual à VI e quando certos agentes redutores, como os compostos fenólicos ou outros de natureza não fenólica, reduz os ácidos fosfomolibdico-fosfotúngstico pelas hidroxilas fenólicas, o resultado é um óxido com estado de oxidação igual a V, que apresenta coloração azul (Figura 12) (REZENDE, 2010, p. 11).

Figura 12 – Mudança estrutural do reagente FC em função da reação



Fonte: Autoria própria (2023).

A reação deve acontecer em meio básico, considerando o carbonato de sódio (Na_2CO_3) como a base mais indicada. Sendo assim, para Pires *et al.* (2017, p. 01):

Um meio com pH alcalino propicia que substâncias redutoras, como as substâncias fenólicas, dissociem um próton, levando à formação do ânion fenolato. Este ânion é capaz de reduzir o reagente de FC formando óxido de tungstênio (W_8O_{23}) e óxido de molibdênio (Mo_8O_{23}). Estes óxidos possuem coloração azul que é detectável na banda do espectro de 760 nm, possibilitando a quantificação dessas substâncias através da espectrofotometria (PIRES *et al.*, 2017, p.01).

3.8 Biofilmes comestíveis

Alguns tipos de vegetais como frutas e legumes podem apresentar propriedades como níveis elevados no teor de umidade e a presença de fitoquímicos como os carotenoides, flavonoides e polifenóis que as levam a reações químicas que provocam o escurecimento enzimático, tendo como consequências a perda de atributos como cor, textura, sabor e valor nutricional que servem como referências para o consumidor no momento da compra, assim como, a degradação oxidativa dos compostos fenólicos pela atuação das enzimas polifenoloxidase e peroxidase, sendo esse tipo de reação uma das maiores problemáticas da indústria de alimentos, pois, manter a integridade dessas características é extremamente importante para a qualidade e aceitação desses produtos (GONÇALVES *et al.*, 2015; MALDONADO *et al.*, 2017, p. 61).

O produto final da oxidação é a quinona, que forma pigmentos escuros insolúveis, denominados melaninas. A ação dessas enzimas é acompanhada de mudanças indesejáveis na aparência e nas propriedades organolépticas do produto, resultando na diminuição da vida de prateleira e do valor de mercado (GONÇALVES *et al.*, 2015).

Sendo assim, umas das maneiras alternativas para que essa reação seja retardada é através do uso de biofilmes comestíveis – com o objetivo de inibir ou reduzir a migração de umidade, oxigênio, dióxido de carbono, lipídios e aromas preservando a qualidade e prolongando a vida de prateleira de frutas, legumes e hortaliças – que são preparados a partir de materiais biológicos e que além de não serem materiais poluentes, são biodegradáveis, atóxicos (podendo ser consumido

com o alimento ou retirado com água) e apresentarem baixo custo, tanto em questão de matéria-prima quanto de processo de produção. Além dessas, os biofilmes comestíveis possuem alta compatibilidade com diversos alimentos e apresentam outras propriedades relacionadas à suas características físicas, pois não apresentam aspectos pegajosos ou melosos, são brilhantes e transparentes (FAKHOURI *et al.*, 2007, p. 369; GONÇALVES *et al.*, 2015; MALDONADO *et al.*, 2017, p. 61).

Dentre os biopolímeros mais utilizados na produção de biofilmes comestíveis estão as substâncias das classes dos lipídios, proteínas e polissacarídeos que incluem compostos como a celulose, amido e seus derivados, alginato, quitosana, pectina e gomas que apresentam uma barreira à umidade, em virtude da sua natureza hidrofílica, preservando assim os alimentos. São classificados como: cobertura que se relaciona com aqueles alimentos que passam por um processo de aplicação de um material dando origem a uma fina camada formada diretamente na superfície do produto ou como filme quando essa camada é preparada separadamente e adicionada ao produto (FAKHOURI *et al.*, 2007, p. 369; LIN & ZHAO, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2015).

Sendo assim, em relação aos materiais que dão origem aos biofilmes comestíveis, LIN & ZHAO (2007) defende que:

O alginato proporciona alta viscosidade aparente, mesmo com baixas concentrações, devido ao seu alto peso molecular e rígida estrutura. Uma de suas propriedades é a capacidade de formar géis termoestáveis fortes ao reagir com cátions polivalentes, principalmente íons cálcio. Dessa forma, a presença desses aditivos pode garantir a manutenção da cor e do sabor, reduzindo a oxidação, a descoloração e, conseqüentemente, a carga microbiana (LIN & ZAO, 2007)

Segundo Fakhouri *et al.* (2007, p. 369) por estarem em contato com os alimentos, é desejável que os filmes e coberturas comestíveis apresentem propriedades sensoriais neutras (transparente, inodoro e insípido), de modo a não alterar a qualidade dos alimentos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e soluções

Os solventes foram obtidos de fontes comerciais e utilizados sem purificação prévia.

4.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

O espectro de RMN ^1H foi obtido em espectrômetro Bruker NMR, modelo AVANCE III, que opera nas frequências 300,06 MHz (Departamento de Química - UEM). Os deslocamentos químicos (δ) estão relacionados em parte por milhão (ppm), em relação ao pico residual do tetrametilsilano (TMS, utilizado como padrão interno para os espectros de prótons) em CDCl_3 , colocando-se entre parênteses a multiplicidade (s = singleto, d = dubleto, t = tripleto, m = multiplete), o número de hidrogênios deduzido da integral relativa e a constante de acoplamento (J) em Hertz (Hz) e os deslocamentos químicos (δ) para o espectro de RMN de Hidrogênio.

4.3 Ponto de fusão

O valor de ponto de fusão (P.F.) foi determinado em um aparelho da marca Fisatom, modelo 433, localizado no laboratório G006, bloco G, Utfpr – CM.

4.4 Espectrofotômetro

O espectrofotômetro usado foi um aparelho da marca Kasuaki, modelo IL-226-NM-BI, com faixa visível de 325 à 1000nm, localizado no laboratório G004, bloco G, Utfpr – CM.

4.5 Síntese do Ácido Acetilsalicílico

A síntese do AAS aconteceu por meio da reação de acetilação do ácido salicílico utilizando o anidrido acético como agente acilante e ácido sulfúrico como catalisador.

Inicialmente, pesou-se 2,0 g de ácido salicílico que foi transferido para um béquer de 250 mL, adicionou-se 4 mL de anidrido acético e, cuidadosamente, 6 gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. Através de uma chapa de aquecimento e com

agitação magnética, aqueceu-se o béquer contendo os reagentes em banho-maria com temperatura entre 50° C e 60° C durante 15 minutos. Agitou-se a mistura em tempos intermitentes com um bastão de vidro para promover a liberação de vapores.

Removeu-se o béquer do banho-maria e adicionou-se 30 mL de água destilada gelada, deixando-o esfriar em repouso ao ar para que o pó cristalino fosse formado. Devido à dificuldade para tal formação, resfriou-se o produto da reação em banho de gelo para acelerar o processo de solidificação e aumentar o rendimento do produto. Após a formação completado pó cristalino, utilizando o funil de Büchner, realizou-se a filtração sob sucção e lavou-se os cristais com 5 mL de água destilada gelada por duas vezes para que o odor do ácido acético fosse eliminado.

Para a realização do cálculo de rendimento, pesou-se o papel filtro antes da lavagem e filtragem dos cristais e depois da secagem total contendo o produto obtido pela reação. Registrou-se os seus respectivos valores.

4.6 Preparação das amostras de maçã

Para o desenvolvimento deste trabalho seguiu-se a metodologia adaptada de Fontes *et al.*, (2008) e, inicialmente, higienizou-se cinco maçãs, do tipo Gala – que foram obtidas através de um comércio local da cidade de Campo Mourão, PR e selecionadas de acordo com as condições de estrutura e grau de maturação – em 1 L de solução aquosa de hipoclorito de sódio 5% durante 10 minutos (Figura 13)

Figura 13- Higienização das maçãs em solução de hipoclorito de sódio



Fonte: Autoria própria (2023).

Após a higienização das maçãs, descascou-se e cortou-se todas em oito pedaços de tamanhos proporcionais utilizando uma faca de aço inoxidável (Figura 14)

Figura 14 – Processo de corte dos pedaços de maçã para preparação da amostra



Fonte: Autoria própria (2023).

Separou-se e embrulhou-se os pedaços de maçã em quatro porções de nove pedaços e, posteriormente, destinou-se cada uma das porções para cada uma das quatro soluções preparadas (Figura 15).

Figura 15 – Processo de separação e armazenamento das maçãs



Fonte: Autoria própria (2023).

Todas as soluções foram formadas, em béqueres separados, por 200 mL de água destilada e, com exceção da Solução 1, adicionou-se soluto nas demais. Na Solução 2, adicionou-se 0,1 g de AS, na Solução 3 adicionou-se 0,1 g de AA, formando soluções de concentração 0,05%, e na Solução 4 adicionou-se 0,01g de curcumina, e a concentração foi equivalente a 0,005%.

Mergulhou-se, respectivamente, cada uma das porções de maçãs nas soluções durante 2 minutos e após este tempo, escorreu-se a solução das porções de maçãs. Embrulharam-se, separadamente e por porção, os pedaços de maçã em plástico filme e armazenou-se na geladeira (Figura 16).

Figura 16 – Soluções de tratamento de curcumina e AS, respectivamente, para os pedaços de maçã



Fonte: Autoria própria (2023).

4.7 Produção do biofilme de alginato de sódio

Seguindo a metodologia proposta por Fontes *et al.*, (2008), em um béquer de 1,5 L colocou-se 1 L de água destilada a temperatura ambiente. Posicionou-se o béquer ao centro de um agitador de alta rotação e adicionou-se, lentamente, o alginato de sódio comercial a fim de se obter uma solução a 2% (p/p). A agitação foi mantida por durante 10 minutos até que o polissacarídeo fosse dissolvido completamente.

4.8 Preparação das amostras de maçã sob aplicação do biofilme de alginato de sódio

Este procedimento metodológico foi adaptado de Fontes *et al.*, (2008) e, portanto, utilizou-se de duas maçãs e seguiu-se com os mesmos processos já descritos acima em relação à seleção, higienização e corte para o preparo de porções de maçã.

Preparou-se, em béqueres diferentes, quatro soluções contendo 150 mL da solução de alginato de sódio 2%. Na Solução 1, não foi adicionado nenhum soluto. Nas soluções 2 e 3, adicionou-se 0,75 g de AS e AAS, respectivamente, e na Solução 4 foi adicionado 0,075 g de curcumina como solutos de compostos bioativos. Tendo as soluções preparadas, foram separadas quatro porções de maçãs contendo três pedaços cada.

Submeteu-se, cada uma das porções de maçã, separadamente, em mergulho nas respectivas soluções por 5 segundos e após este tempo, mergulhou-se as porções em soluções de 80 mL de cloreto de cálcio 2% por 5 segundos, para que os polímeros fossem reticulados e, posteriormente, escorreu-se pelo tempo de 5 segundos, os pedaços de maçãs em peneira até que estivessem secos (Figura 17).

Após esta etapa do procedimento, as porções foram embrulhadas separadamente e armazenadas na geladeira.

Figura 17 – Processo de submersão dos pedaços de maçã sob a aplicação do biofilme de alginato de sódio em cloreto de cálcio



Fonte: Autoria própria (2023).

4.9 Avaliação da atividade antioxidante

Contou-se como dia 0 o dia pelo qual as maçãs foram higienizadas, descascadas, cortadas, separadas e mergulhadas na solução, assim como, dia 3 para três dias após o processo de preparação e dia 5 para cinco dias após o procedimento de preparo. Sendo assim, seguiu-se o experimento prático tendo os mesmos procedimentos para os dias 0, 3 e 5.

Dessa forma, para os três dias de análises, foi utilizado um pedaço de maçã, de cada uma das porções armazenadas, acrescentou-se 1 mL de ácido fosfórico 4% para inibir a oxidação das amostras de maçã e macerou-se a mistura em um almofariz com o auxílio de um pistilo. De uma amostra de substrato macerado da maçã, fracionou-se e depositou-se em três tubos identificados, para que os testes fossem realizados em triplicata, conforme mostrado na Figura 18.

Figura 18 - .Preparação das amostras de maçã para avaliação antioxidante



Fonte: Autoria própria (2023).

4.10 Preparação para avaliação da atividade antioxidante através do método DPPH

A ação antioxidante será avaliada com algumas adaptações, de acordo com a metodologia feita por Nascimento *et al.*, (2011), da qual o preparo da solução de DPPH ocorreu imediatamente ao uso, sendo necessário para isto, aferir 0,008 g do reagente DPPH, cuja massa foi dissolvida em 2,5 mL de metanol PA. Em seguida, em um erlenmeyer, diluiu-se essa quantidade em 50 mL de álcool metílico 80% (v/v). Transferiu-se a mistura para um frasco de vidro âmbar, devidamente higienizado e identificado. Devido à necessidade de se preparar a solução de DPPH como reagente, tal procedimento, realizado no Dia 0, repetiu-se para os dias 5 e 7.

Adicionou-se 1 mL da solução preparada de DPPH dentro dos tubos que continham o substrato macerado do pedaço de maçã, com o auxílio de uma pipeta volumétrica automática e deixou-se a mistura reagir em repouso durante 30 minutos em ambiente totalmente escuro.

Para a produção da solução branco de controle de DPPH, adicionou-se em um tubo 1 mL da solução de DPPH e em seguida 1 mL de solução aquosa de álcool metílico 50%.

Após o esgotamento do tempo, para determinar a atividade antioxidante do DPPH sob a utilização do substrato de maçã, transferiu-se 1 mL da solução controle para uma cubeta de quartzo e realizou-se leituras subsequentes utilizando espectrofotômetro de UV visível no comprimento de onda igual a 515 nm, assim como, realizou-se com as demais amostras.

Os valores de das leituras de absorbância foram registradas e utilizadas como dados para a construção de um gráfico de percentual de sequestro do radical livre (%SRL) do DPPH, através do reagente DPPH, que foi calculado através fórmula expressa pela Equação 1:

Equação 1 – Fórmula para cálculo do percentual de sequestro de radical livre

$$\% SRL = \left[\frac{(C - A)}{C} \right] \times 100$$

Fonte: Autoria própria (2023).

Onde:

% SRL = percentual de sequestro de radicais livres

C = absorbância do controle

A = absorbância da amostra em solução.

4.11 Preparação para avaliação da atividade antioxidante através do método de TBARS

O procedimento para esta atividade será adaptado da metodologia proposta por Papastergiadis *et al.*, (2012). Sendo assim, mediu-se em uma proveta 100 mL de ácido acético e, em seguida, pesou-se, na balança analítica, 0,663 g de ácido tiobarbitúrico. Transferiram-se os reagentes para um frasco de vidro âmbar, devidamente higienizado e identificado, para formar a solução através da diluição do TBA.

Para a solução controle, diluiu-se em um tubo de ensaio 1 mL da solução de TBARS em 1 mL de água destilada.

Adicionou-se, aos tubos que continham os macerados dos pedaços de maçã, 1 mL da solução de TBARS e em seguida submeteu-se os tubos em banho-maria, com temperatura de 100° C durante 30 minutos. Após esse tempo, tubos foram retirados do banho-maria e resfriados ao ar livre até que estivessem em temperatura ambiente.

Depois que a mistura resfriou, transferiu-se 1 mL da solução controle para uma cubeta de quartzo e realizou-se a sua leitura, assim como, posteriormente, as leituras das demais amostras utilizando espectrofotômetro de UV visível pelo comprimento de onda de 532 nm.

Os dados de absorvância obtidos a partir das leituras foram convertidos em concentração, através da Equação 2, utilizando o valor do coeficiente de absorvância molar do TBARS (ϵ , 155 mmol.L⁻¹) para a construção do gráfico.

Equação 2: Fórmula para calcular a concentração de TBARS

$$C = \frac{A}{\epsilon} \times 1000$$

Fonte: Autoria própria (2023).

Onde:

C = concentração (mmol/L)

A = absorvância da amostra

ϵ = absorvância molar do TBARS (155 mmol.L⁻¹)

4.12 Preparação para avaliação da atividade antioxidante através do método FC

A preparação para o teste quantitativo de conteúdos fenólicos totais será de acordo com o procedimento de *Folin-Ciocalteu* com algumas adaptações das metodologias propostas por Carmona-Hernandez; Taborda-Ocampo; e González-Correa (2021). Para o desenvolvimento prático, pesou-se na balança analítica, 0,288 g de ácido fosfotúngstico e, posteriormente, 0,1825 g de ácido fosfomolibdico. Em uma proveta, mediu-se 50 mL de álcool metílico. Transferiram-se todos os reagentes para um frasco higienizado e identificado de vidro âmbar.

A solução controle foi preparada a partir da diluição de 1 mL da solução de reagente FC em 1 mL de solução aquosa de etanol 50%.

Nos tubos contendo o substrato da maçã, adicionou-se 1 mL da solução de FC e, em seguida, 0,3 mL de etanol padrão. Colocou-se a mistura em um ambiente escuro por 7 minutos. Após a reação, adicionou-se 0,4 mL de solução de bicarbonato saturado.

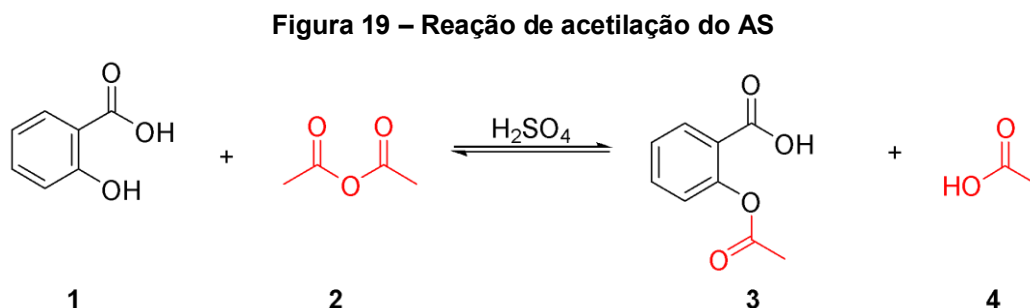
Após o bicarbonato ter reagido com a mistura, transferiu-se 1 mL da amostra controle na cubeta de quartzo e realizou-se a sua leitura e, posteriormente, realizou-se a leitura das demais amostras.

Os valores de absorbância das amostras foram registrados e utilizados para a construção do gráfico.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese do ácido acetilsalicílico

O AAS, que é o princípio ativo do medicamento Aspirina® (Da Luz *et al.*, 2019), tem como uma de suas possibilidades de síntese a reação de acetilação do ácido salicílico (**1**) através da reação de substituição nucleofílica do grupo hidroxila fenólico sobre o carbono carbonílico do anidrido acético (**2**) em meio ácido, utilizando o ácido sulfúrico como catalisador, formando o ácido acetilsalicílico (**3**) como produto e o ácido acético (**4**) como subproduto da reação (MENDES; PERUCH; FRITZEN, 2012) (Figura 19).



Fonte: Autoria própria (2023).

A reação de acetilação se apresenta como uma das mais importantes reações na síntese orgânica, tendo em vista que o grupo acetil pode ser convencionalmente utilizado na proteção de grupos funcionais como álcoois, amins, fenóis, tióis e dentre outros (ANBU *et al.*, 2019, p. 69).

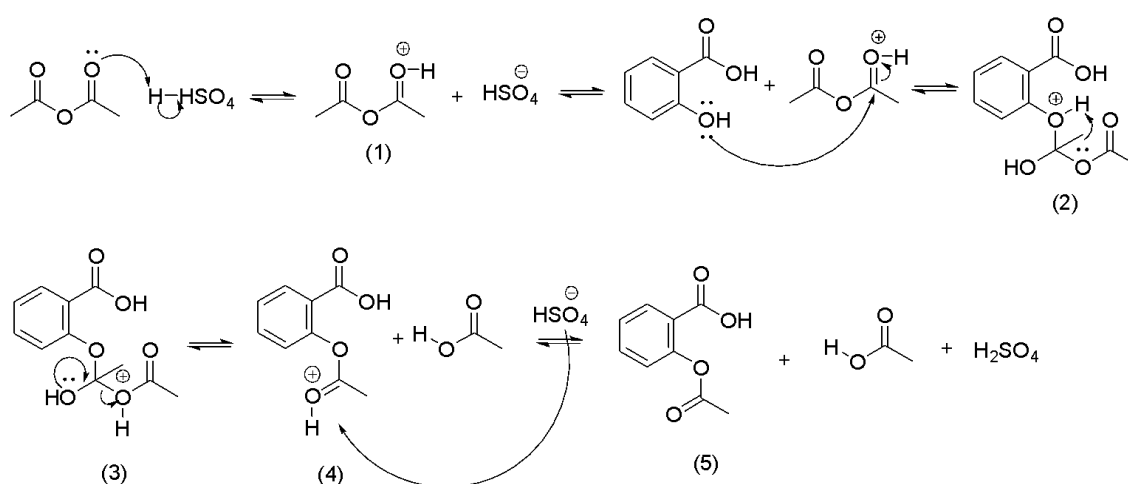
Além de servir como um mecanismo de proteção do grupo hidroxila, a reação de acetilação é responsável por alterar as propriedades físico-químicas como, por exemplo, polaridade, elasticidade, capacidade de absorção ou troca de íons, resistência a ataque microbiológico e térmico dos produtos, proporcionando a estas substâncias uma maior atividade biológica do composto acetilado (SILVA, 2014).

Em se tratando da obtenção do ácido acetilsalicílico, a acetilação da molécula precursora (ácido salicílico) levou ao aumento do potencial analgésico do fármaco, bem como diminuiu a ocorrência de efeitos colaterais relativos a hemorragias gastrintestinais (Massabni, 2006, apud Da Luz *et al.*, 2019).

A acetilação em uma molécula acontece quando, através de uma reação química, se liga por ligação simples, um grupo acetila – radical que contém um grupo metila ($\bullet\text{CH}_3$) – ao elétron disponível do carbono da carbonila que ao mesmo tempo está ligado ao radical R da molécula (MENDES; PERUCH; FRITZEN, 2012).

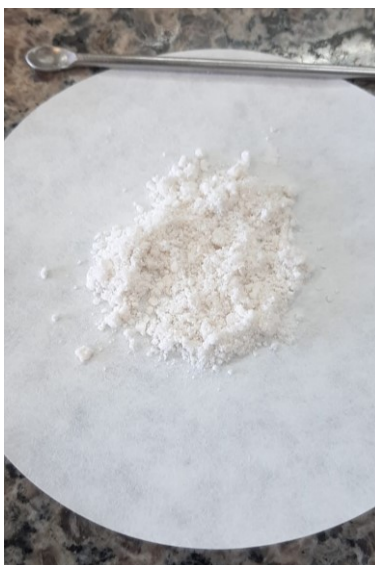
O mecanismo proposto para a reação e síntese do AAS pode ser observado na Figura 20. A reação ocorre por meio de um mecanismo de catálise ácida e inicialmente ocorre a protonação dos átomos de oxigênio do anidrido (1), promovida pelo ácido forte. Por consequência, o caráter eletrofílico do carbono ligado àquele átomo de oxigênio do anidrido acético aumenta e, dessa forma, é atacado pelo par de elétrons do átomo de oxigênio da hidroxila fenólica, gerando o intermediário tetraédrico da reação (2). Essa primeira etapa da reação é classificada como adição. Em seguida, por meio de etapas intermoleculares, ocorre a transferência de próton do intermediário 2, gerando a espécie 3. Consequentemente, a formação de nova ligação dupla entre carbono e oxigênio em 3 leva à eliminação do grupo abandonador (ácido acético). A consequente desprotonação do produto acetilado (4) implica a obtenção do ácido acetilsalicílico (5) e restauração do catalisador (DOMINGUES; MAGALHÃES; SANDRI, 2022, p. 108).

Figura 20 – Mecanismo para a síntese de AAS via catálise ácida



Fonte: Autoria própria (2023).

Como produto obtido da reação de síntese do AAS, foi formado um sólido de coloração branca (Figura 21), com rendimento de 57% e que, através do Teste de Ponto de Fusão (PF) e da análise de RMN de Hidrogênio, confirmou-se a estrutura da molécula e o sucesso do procedimento que seguiu a metodologia tradicional (BRUICE, 2005 apud DOMINGUES; MAGALHÃES; SANDRI, 2022, p. 108).

Figura 21 – Ácido acetilsalicílico sintetizado

Fonte: A autoria própria (2023).

5.2 Teste de pureza

O teste de pureza – que confirma a acetilação completa do AS – apresenta caráter qualitativo e foi realizado através da reação entre o AAS, como produto formado, com uma solução alcoólica de cloreto de ferro (III) (FeCl_3). O fenol presente na estrutura do AS em contato com o íon Fe^{3+} do cloreto de ferro forma um complexo que apresenta coloração violeta. Devido à proteção dada à hidroxila do fenol pela acetilação, o AAS, que não possui o fenol na sua estrutura não sofre complexação e, por esse motivo, a cor observada se mantém característica do FeCl_3 que é amarela (PAZINATO *et al.*, 2012, p. 23).

O teste de pureza utilizando o cloreto de ferro (III) foi utilizado para avaliar a presença de ácido acetilsalicílico e está representado pela Figura 22. A amostra controle, contém o AS, tubo de ensaio do lado esquerdo, devido à presença do grupo fenol presente no AS, o complexo é formado e por isso apresenta coloração violeta. Já no tubo de ensaio do lado direito, está contida a amostra com o produto obtido pela reação de acetilação do ácido salicílico e isto significa que, devido à ausência do grupo fenólico, o íon Fe^{3+} não forma o complexo e a amostra mantém a coloração característica do reagente de cloreto de ferro III, que é amarela.

Figura 22 – Teste de pureza do AAS

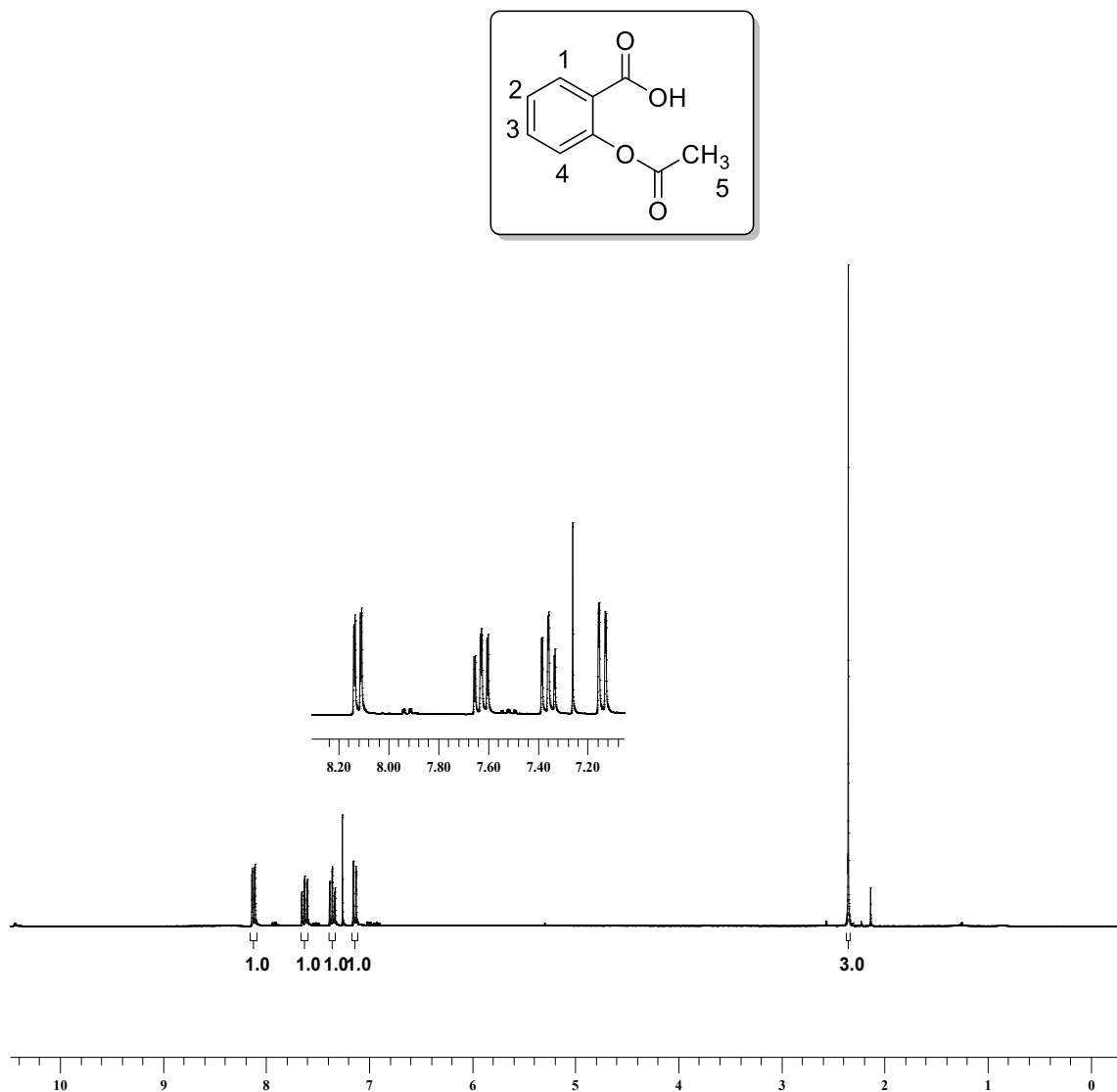


Fonte: Autoria própria (2022)

5.3 Análise estrutural do AAS através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

A identificação e caracterização do composto ácido acetilsalicílico sintetizado foi realizada através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Hidrogênio (^1H), conforme pode ser observado na Figura 23.

Figura 23 – Espectro de RMN 1H (200 MHz) do composto ácido acetilsalicílico (3) em CDCl₃



Fonte: Autoria própria (2023).

Como pode ser observado na região de 8,13 ppm até 7,31 ppm encontram-se os hidrogênios referentes ao anel aromático, sendo 4 H. Em 2,35 ppm encontra-se o singlete referente aos três hidrogênios alquílicos da metila (CH₃). Estes dados estão de acordo com os encontrados na literatura.

5.4 Avaliação da atividade antioxidante

5.4.1 Avaliação da atividade antioxidante por método de DPPH

A molécula orgânica de DPPH, que é definida como sendo um radical livre nitrogenado, estável na ausência de luz e que apresenta uma coloração violeta escuro

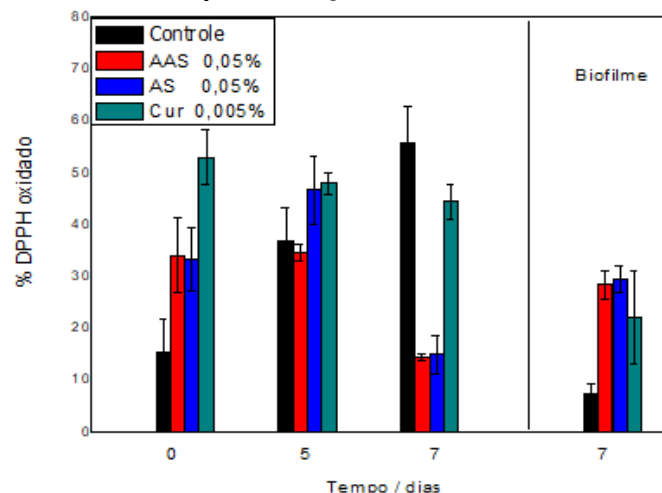
e que após reagir com substâncias que apresentam atividades antioxidantes, torna-se amarelada (KEDARE; SINGH, 2011).

Tal método analítico que faz parte das testagens de atividade antioxidante de compostos fenólicos foi desenvolvido por Blois em 1958, sendo um dos mais utilizado atualmente para a realização de análise de antioxidantes solúveis em meios orgânicos, assim como, é bastante aplicado à análise desta atividade em frutas e outros vegetais devido sua rapidez, praticidade, precisão e alta confiabilidade em ambientes com ausência de luz e baixo custo de execução (SILVEIRA, 2018; SUCUPIRA, 2012).

Com o DPPH diluído em metanol, este ensaio tem como objetivo medir a capacidade de determinada substância em capturar o radical da molécula de DPPH, cuja caracterização se dá por espectrofotometria com banda de absorção máxima em cerca de 515 nm. O decaimento das leituras de absorbâncias acontece em função da presença de compostos reativos, a exemplo de compostos fenólicos presentes no substrato da maçã, e que são responsáveis pela redução da molécula de DPPH à hidrazina (KEDARE; SINGH, 2011).

Todas as análises foram realizadas em triplicata, cujos resultados deste tratamento possibilitaram a construção do gráfico representado na Figura 24, que indica o percentual de sequestro de radicais livres de moléculas de DPPH em função dos dias, para cada uma das soluções de tratamento para a maçã. O mesmo gráfico representa em paralelo, as análises realizadas para as amostras de maçã sob aplicação do biofilme de alginato de sódio no período de sete dias.

Figura 24 – Percentual de sequestros de radicais livres em função das soluções de tratamento para a maçã em diferentes dias



Fonte: Autoria própria (2023).

Inicialmente, comparando as amostras de substratos de maçãs conservadas apenas na água destilada (Controle), observa-se o aumento da taxa de sequestro de radicais livres, tendo como consequência a redução do reagente DPPH à hidrazina de acordo com o aumento do intervalo de tempo entre as análises realizadas, de acordo com os diferentes dias de estocagem.

O aumento de %SRL da solução controle indica que, durante o processo de estocagem em geladeira, há a oxidação da maçã, gerando moléculas responsáveis pelo processo de redução do DPPH. Isto indica que o processo oxidativo natural da maçã minimamente processada não teve suas atividades interrompidas ou desaceleradas pela refrigeração. Este fator que tem como consequência a deterioração da maçã foi comparado ao tratamento com soluções compostos bioativos (AAS, AS e curcumina).

A variação mostrada entre os dias 0 e 5 para as soluções de tratamento com aditivo de compostos bioativos são pouco significativas, levando em consideração a margem de erro que se aplica em cada uma das análises. Este resultado pode ser indicativo da redução do processo oxidativo natural da maçã devido a presença dos compostos bioativos.

A estabilidade na resposta que houve para o intervalo de 5 dias se manteve no dia 7 apenas para a curcumina, uma vez que, para os compostos AAS e AS, observa-se a diminuição da capacidade de sequestro de radical livre. A diminuição da %SRL pelo AAS e AS indicam uma possível inativação destes compostos em detrimento da reação do DPPH com os compostos fenólicos reativos da maçã. Neste caso este resultado pode ser associado a inativação do AAS e AS por moléculas oxidativas presentes na maçã após o período de 5 dias de estocagem.

A estabilidade da taxa da curcumina em sequestrar os radicais livres pode estar relacionada ao fato da própria substância apresentar maior efetividade frente ao processo oxidativo natural da maçã. A curcumina apresenta além da possibilidade de atividade antioxidante referente aos grupos fenólicos também a presença de metileno α às carbonilas (SUETH-SANTIAGO, *et al.*, 2015, p. 547).

De acordo com Vitor Sueth-Santiago *et al.* (2015, p. 547):

Em ambos os casos, a atividade antioxidante está relacionada à doação de hidrogênio radicalar, que reage com espécies reativas de oxigênio (EROs) e neutraliza possíveis danos celulares, decorrentes da presença desses intermediário (SUETH-SANTIAGO, *et al.*, 2015, p. 547).

Neste caso a própria curcumina pode estar interagindo com o reagente DPPH ao invés dos compostos fenólicos presentes na maçã.

As análises realizadas com a presença do biofilme aplicado nas maçãs indicam que o alginato de sódio pode ser capaz tanto de isolar a superfície das maçãs evitando, assim, a liberação dos compostos fenólicos produzidos pela própria fruta quanto reduzir, retardar ou inibir o desenvolvimento de espécies oxidativas que são responsáveis pelo processo oxidativo que as frutas e vegetais sofrem e que acarretam na sua deterioração e perda de uma série de propriedades físico-químicas ligadas ao sabor, textura e valor nutricional, diminuindo seu tempo de vida (LIMA, 2008; GOLÇALVES *et al.*, 2015).

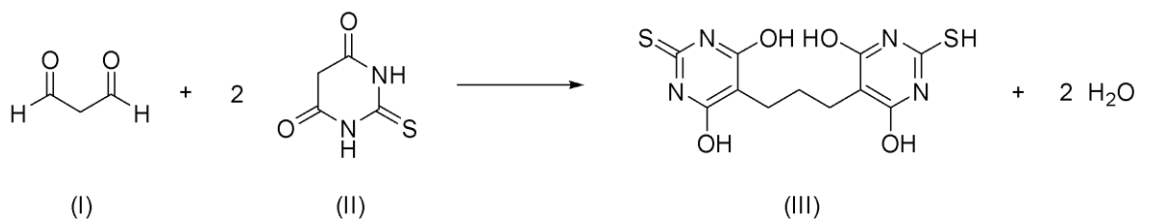
Esta colocação fica evidente quando o gráfico expressa as taxas de %SRL das soluções de tratamento com a presença de compostos bioativos com valores consideravelmente mais altos do que na que apresenta a solução controle. É possível que esta diferença seja em função do próprio alginato apresentar princípio ativo capaz de reagir com o DPPH e elevar sua capacidade como sequestrador de radicais livres.

5.4.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de TBARS

O teste de TBARS é definido como um indicativo de peroxidação lipídica do meio, que pode ser evidenciado através da reação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA) e que gera, como consequência, o principal produto secundário que é o malonaldeído (MDA). O MDA é um aldeído altamente reativo bastante utilizado como biomarcador para testes relacionados ao estresse oxidativo (DUARTE, 2012; ARNHOLD; HECK, 2014).

O complexo formado entre o MDA e TBA, que apresenta cor rósea (Figura 25), é um cromóforo possível de ser lido pelo espectrofotômetro de UV/visível pela região de 523 nm (DUARTE, 2012).

Figura 25 – Reação entre o MDA e TBA para obtenção de um cromóforo pigmentado

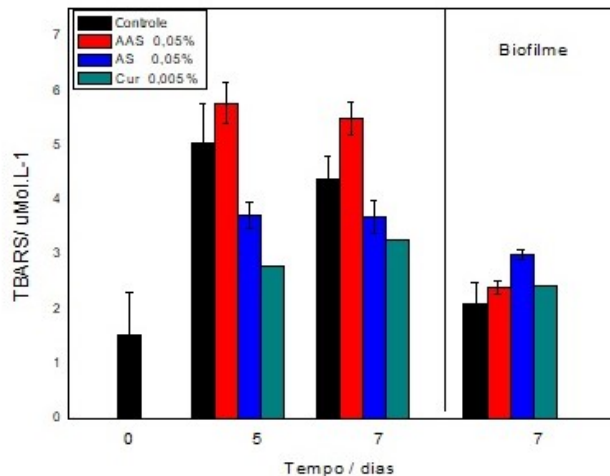


Fonte: Autoria própria (2023).

Os valores de leituras registradas pelas leituras de absorvâncias foram convertidos em concentrações através da Equação 2 que utiliza o valor de absorvidade molar do reagente TBARS e resulta nos valores de concentrações ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) em função dos dias de acordo com as soluções de tratamento para as maçãs.

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados registrados possibilitaram a construção do gráfico representado pela Figura 26, que indica uma relação direta de proporcionalidade entre a concentração de TBARS com peroxidação lipídica.

Figura 26 – Concentração de reagente TBARS em função das soluções de tratamento para as maçãs em diferentes dias



Fonte: Autoria própria (2023).

O gráfico expressa uma relação diretamente proporcional entre a concentração de TBARS e da peroxidação lipídica, ou seja, quanto maior for a concentração do reagente maior será a atividade oxidante sofrida pela maçã.

Para as amostras tratadas somente com água, existe a presença de compostos responsáveis pelo desenvolvimento do processo peroxidativo produzidos pela maçã, causando o aumento da concentração do TBARS. Este resultado indica que o processo natural de oxidação da maçã pode decorrer da peroxidação lipídica e conseqüente a formação de compostos como o MDA, conforme pode ser observado observando o dia 0 e dia 5.

Com relação ao tratamento das maçãs com os compostos bioativos, é possível perceber que o AAS apresenta resultados similares ao tratamento apenas com água (controle). Entretanto o AS e a Curcumina apresentam redução da

peroxidação lipídica em comparação com o controle, o que sugere os benefícios destes compostos na conservação das propriedades da maçã. Vale ressaltar ainda que a curcumina, neste caso, apresentou melhor resposta visto que a concentração utilizada nos testes foi 10 vezes menor que para os demais compostos bioativos testados (AAS e AS).

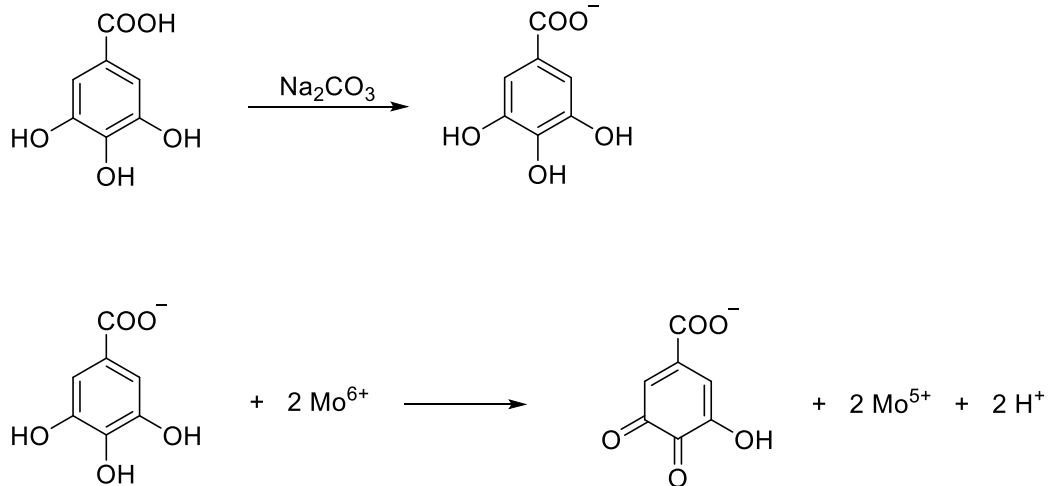
Com relação às maçãs que foram tratadas com o biofilme na presença de compostos ativos, as mesmas tiveram os valores de suas concentrações bem próximas entre si e também ao controle do dia zero da amostra sem a aplicação do biofilme. Este resultado demonstra a eficiência do alginato para a manutenção e conservação das maçãs, devido a formação de uma película de biofilme na superfície das maçãs que melhora a atividade dos compostos bioativos e reduz o processo de peroxidação lipídica.

5.4.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de FC

Um dos métodos mais utilizados para a determinação de fenóis totais presentes em vegetais e bebidas é realizado através do reagente FC. O ensaio, que é de caráter espectrofotométrico, é também baseado na reação de redução dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico pelas hidroxilas fenólicas, gerando óxidos complexados de tungstênio (W_8O_{23}) e de molibdênio (Mo_8O_{23}), responsáveis pela mudança na coloração de amarelo para azul. Esse complexo pode ter sua absorvância lida por um espectrofotômetro na região de 732 nm (REZENDE, 2010).

A reação que mede a presença de fenóis totais nos substratos das maçãs acontece em meio básico, à partir da desprotonação dos compostos fenólicos (1) que geram ânions carboxilatos (2) como produto, produzindo uma reação de oxirredução entre o ânion gerado e o reagente FC, pela qual o molibdênio é reduzido alterando a coloração do meio reacional de amarelo (3a) para azul (3b), conforme mostrado na Figura 27 (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Figura 27 – Reação do ácido gálico como padrão com molibdênio presente do reagente FC

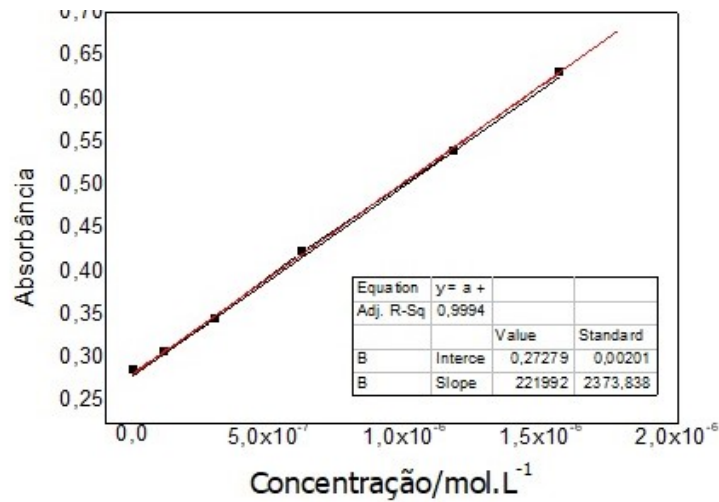


Fonte: Autoria própria (2023).

O ensaio que utiliza o reagente de FC é altamente utilizado em estudos e pesquisas acerca das propriedades antioxidantes de produtos naturais, medindo a capacidade redutora das amostras de maneira simples e precisa. Contudo, este método é capaz de apresentar fatores limitantes ligados à superestimação do conteúdo fenólico devido à presença de compostos não fenólicos presente na composição da amostra complexas analisada como, por exemplo, vitamina C, açúcares, aminoácidos, carotenoides e outras espécies que reagem com o FC podendo causar interferências nas leituras (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Para conversão dos dados de absorbância em concentração foi construído uma curva de calibração (Figura 28) construída a partir da leitura da absorbância de concentrações variando entre $1,7 \cdot 10^{-6}$ a $4,7 \cdot 10^{-9}$ mol.L⁻¹. A partir da obtenção da equação de reta pode-se observar que o limite de detecção da metodologia utilizada foi de 0,272.

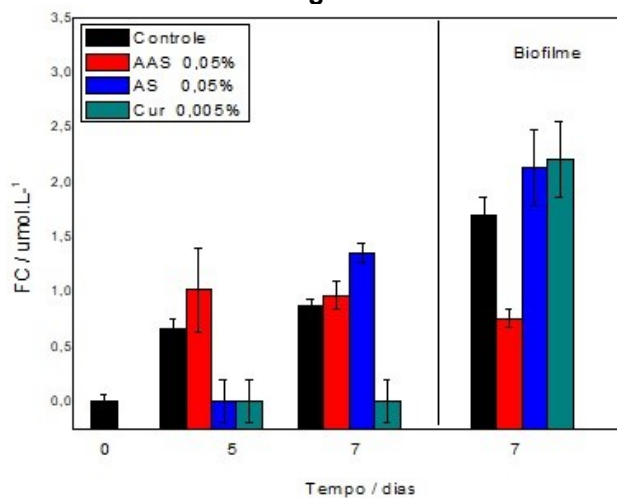
Figura 28 – Gráfico de curva de calibração para o reagente FC



Fonte: Autoria própria (2023).

Os testes foram realizados em triplicata e os valores registrados sobre as absorbâncias estão expressos através do gráfico da Figura 29.

Figura 29 – Gráfico de determinação de fenóis totais presentes no substrato da maçã através do reagente FC



Fonte: Autoria própria (2023).

Foi observado que a conservação da maçã minimamente processada apenas por refrigeração (controle) não é um processo eficaz, uma vez que com o passar do tempo há aumento do conteúdo fenólico total detectado, resultante do processo oxidativo da maçã. Isso pode ser observado no gráfico onde no dia 5 e no dia 7 houve um aumento na quantidade de conteúdo fenólico em relação ao dia zero. Isso demonstra que a maçã está sendo oxidada num processo natural e que está aumentando a quantidade de compostos fenólicos no meio. De acordo com Costa

(2020) durante o processo de oxidação da maçã naturalmente são formados compostos fenólicos.

O conteúdo e composição em compostos fenólicos na maçã varia com a variedade, condições de cultivo, condições climáticas, estado de maturação dos frutos, e podem ser alterados durante o processamento e armazenamento devido à sua facilidade em participarem em reações de oxidação (COSTA, 2020).

Para o intervalo de 5 dias, com relação ao tratamento com AAS pode ser verificado que não houve capacidade do mesmo em evitar ou mesmo retardar o processo de oxidação natural da maçã, devido ao alto valor de conteúdo fenólico detectado. Entretanto os compostos AS e Curcumina apresentaram atividade antioxidante para a maçã.

De acordo com os registros presentes no gráfico observa-se que no dia sete a curcumina manteve a mesma concentração de compostos fenólicos totais na maçã em relação ao dia 5. Dessa forma, a curcumina demonstrou ser o composto com a melhor atividade antioxidante.

Apesar da curcumina e o AS serem compostos fenólicos, nesta análise são quantificados os compostos reativos ao FC, sendo que a presença de compostos fenólicos reativos devido o processo oxidativo da maçã são superiores em quantidade aos fenóis derivados da curcumina e do AS. Tanto a curcumina quanto o AS são usados em pequenas quantidades sendo ainda os substratos das maçãs deixado em contato com os mesmos por um curto intervalo de tempo, acarretando na pequena absorção dos mesmos pela maçã.

Com relação ao tratamento com biofilme de alginato pode ser observado que a presença de alginato pode ser quantificada pela técnica de FC uma vez que houve aumento de concentração de conteúdo fenólico para todas as análises com exceção do AAS, quando comparado com o tratamento no dia zero para o controle.

Uma limitação deste método é a possibilidade de ocorrer a superestimação do conteúdo fenólico causado pela interferência de compostos presentes na amostra, como descrito anteriormente. Nesse caso, o alginato que é um polissacarídeo está sendo quantificado e causando o aumento do conteúdo fenólico como observado no gráfico.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A solução de tratamento para as maçãs contendo a curcumina como composto bioativo apresentou para os testes de DPPH, TBARS e FC os melhores resultados quanto à inibição e neutralização da ação oxidante na fruta.

Para o ensaio baseado no uso do reagente de DPPH, a curcumina manteve a estabilidade da ação oxidativa por um maior espaço de tempo, prolongando, assim, o tempo de vida da maçã, o que não acontece com os demais compostos bioativos. No ensaio que utiliza o reagente TBARS, a curcumina foi o composto que mais apresentou o decréscimo da concentração no decorrer dos dias, ou seja, a peroxidação lipídica, neste caso, foi menor quando comparada com a peroxidação lipídica sofrida pela maçã tratada nas demais soluções. Por fim, no teste que utiliza o reagente de FC, verificou-se também que houve melhor resposta para a curcumina, seguido pelo AS, mas este por um menor período de tempo. Entretanto, a metodologia utilizada impossibilitou a avaliação do efeito do biofilme no processo de conservação da maçã.

Além destes, existem outros benefícios na utilização da curcumina como recurso de tratamento para inibição ou diminuição do processo oxidativo que estão ligados ao custo-benefício, uma vez que, a concentração da solução à base de curcumina foi menor do que os demais compostos, ou seja, foi utilizado uma quantidade de curcumina cerca de 10 vezes menor que para a produção das soluções.

Além de a curcumina apresentar bons resultados como agente antioxidante, a aplicação do biofilme também apresentou resultados satisfatórios, pois, a fina camada do biomaterial atua como um revestimento protetor para a maçã contra os fatores externos que causam o aceleração da sua degradação. Desta forma, a maçã tem o seu tempo de vida aumentado e suas propriedades físicas e químicas conservadas.

REFERÊNCIAS

- ALVES, G. G.; ABREU, T. P. Estresse oxidativo e sua influência na patogênese da doença de alzheimer. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, [S. l.], v. 7, n. 9, p. 915–928, 2021. Disponível em: <<https://periodicorease.pro.br/rease/article/view/2294>> Acesso em: 15 de dezembro de 2022.
- ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202-2210, 2010. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/qn/a/XS9CsdV86YbjrxfMjLGmXVL/?format=pdf&lang=pt>> Acesso em: 25 de outubro de 2022.
- ANBU, N.; NAGARJUN, N.; JACOB, M.; KALAIARASI, J. M. V. K.; DHAKSHINAMOORTHY, A. Acetylation of alcohols, amines, phenols, thiols under catalyst and solvent-free conditions. **Chemistry**, v.1, n.1, p.69-79, 2019. Disponível em:< http://qnesc.s bq.org.br/online/qnesc44_2/QNESC_completabaixa.pdf#page=5> Acesso em: 14 de novembro de 2022.
- ARNHOLD, A. L.; HECK, T. G. Método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (tbars), e sua importância para a avaliação da peroxidação lipídica em diversas aplicações. **Salão do Conhecimento**, Seminário de Iniciação Científica, Setembro de 2014, Ijuí. Disponível em: <<https://www.publicacoeseventos.unijui.edu.br/index.php/salaocohecimento/article/view/3423>> Acesso em: 11 de novembro de 2022.
- BARBOSA, K. B. F. *et al.* Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Rev Nutr**, Patos de Minas, v. 23, n. 4, p. 629-43, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rn/a/Fvg4wkYjZPgFs95f4chVjx/?lang=pt> Acesso em: 20 de outubro de 2022.
- BARREIROS, A. L.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, Salvador, v. 29, p. 113-123, 2006. Disponível em:< <https://www.scielo.br/j/qn/a/K9hDbHkb3kpgLz7fg7k/> > Acesso em: 25 de outubro de 2022.
- BERTOLIN, T. E. *et al.* Ficocianina, tocoferol e ácido ascórbico na prevenção da oxidação lipídica em charque. **Brazilian Journal of Food Technology**, Passo Fundo, v. 14, p. 301-307, 2011. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/bjft/a/BLv4P6pYfv3kjHqyLpd7DNR/abstract/?lang=pt>> Acesso em: 20 de novembro de 2022.
- BICAS, T. C. **Efeitos do extrato hidroalcoólico das folhas de Syzygium malaccense e Moringa oleífera sob estresse oxidativo em ratos diabéticos**

induzidos por estreptozotocina. 2019. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2019.

CARMONA-HERNANDEZ, J.C., TABORDA-OCAMPO, G E GONZÁLEZ-CORREA, C. H. **Folin-Ciocalteu Reaction Alternatives for Higher Polyphenol Quantitation in Colombian Passion Fruits.** Int J Food Sci. v. 2021, p. 1-10, Janeiro de 2021.

COLLINO, Luma. Curcumina: de especiaria à nutracêutico. 2014. **Trabalho de Conclusão de Curso**, UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2014.

CORREIA, C. R. D.; MUSCARÁ, M. N.; BARRETO, R. L. Óxido Nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova.** Vol. 28, n. 6, p. 1046-1054, 2005. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol28No6_1046_19-RV04321.pdf>. Acesso em: 06 de nov. de 2022.

COSTA, L. F. G. A. **Desenvolvimento de um sumo de maçã turvo.** 2020. Tese (Doutorado em Processos Químicos) - Universidade de Aveiro, Arveiro, 2019.

DA LUZ, L. T. S.; *et al.* Avaliação e otimização das condições de obtenção do ácido acetilsalicílico para fins didáticos. **Educación Química**, Ciudad de Mexico, v. 30, n.2, p.54-69, 2019.

DEL RÉ, P.V.; JORGE, N. Especiarias como Antioxidantes Naturais: Aplicações em Alimentos e Implicação na Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.2, p.389-399, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpm/a/pDztw6sV5YYJCDSKPJJjFTP/abstract/?lang=pt>
Acesso em: 26 de out. de 2022

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre Óxido Nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, vol. 39, n.4, p. 343-350, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpm/v39n4/18548.pdf>>. Acesso em: 06 de nov. de 2022.

DOMINGUES, L. A.; MAGALHÃES, C. G.; SANDRI, M. C. Síntese do Ácido Acetilsalicílico: Uma proposta para Laboratórios de Graduação empregando a Química Verde. **Química Nova na Escola.** – São Paulo, vol. 44, N° 2, p. 105-114, 2022. Disponível em: http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc44_2/03-ODS-84-21.pdf
Acesso em: 04 de novembro de 2022.

DUARTE, A.F. S. Estudo fitoquímico, toxicidade e atividades biológicas: (antioxidante, antimicrobiana e alelopática) de cascas do caule de *Guettarda uruguensis* Cham. & Schldtdl. **Rubiaceae.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – UFPR, Curitiba, 2012. Disponível em: <<https://www.acervodigital.ufpr.br/btream/handle/1884/23/R%20-%20D%20-%20ANA%20FLAVIA%.pdf?seque=1&isAllowed=y>> Acesso em: 27 de nov. de 2022

ESATBEYOGLU, T. *et al.* Curcumin-From Molecule to Biological Function. **Angewandte Chemie International Edition**, [S. l.], v. 51, n. 22, p. 5308–5332, 2012.

FAKHOURI, F. M. *et al.* Filmes e coberturas comestíveis compostas à base de amidos nativos e gelatina na conservação e aceitação sensorial de uvas Crimson. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 369-375, 2007.. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/yBBLqDqXVWhZsBcHL6nFFhn/?format=pdf&lang=pt> Acesso em: 12 de nov. de 2022.

FALCÃO, H. R. C. **Síntese e caracterização de novo antioxidante fenólico derivado da biomassa da castanha de caju para biodiesel por método eletroanalítico**. 2016. Tese (Doutorado em Química) - Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016. Disponível em: <<https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/22043>> Acesso em: 30 de out. de 2022.

FONTES, L. C. B. *et al.* Conservação de maçã minimamente processada com o uso de películas comestíveis. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 872-880, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/RcDkYbdF6fCqGVcMMFmQmjy/?lang=pt#>. Acesso em: 13 de abr. de 2023.

GALVÃO, L. L. P. **A influência do tratamento térmico sobre o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante de leguminosas: uma revisão narrativa**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) – Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/33402> Acesso em: 31 de out. de 2022

GARCÍA, M. E. M.; FERNÁNDEZ S., I.; FUENTES, L., A. **Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu**. 2015. Disponível em: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia%20Mart%c3%adnez%20et%20al.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acesso em: 22 de nov. de 2022.

GONÇALVES, L. T. *et al.* Avaliação da influência de cobertura de alginato na secagem de maçã fuji. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, São Carlos, v. 2, n. 1, p. 1685-1692, 2015. Disponível em: <http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/enemp2015/SE-607.pdf>. Acesso em: 26 de nov. de 2022.

GRYNKIEWICZ, G.; ŚLIFIRSKI, P. Curcumin and curcuminoids in quest for medicinal status. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 59, n. 2, p. 201-212, 2012. Disponível em: <<https://ojs.ptbioch.edu.pl/index.php/abp/article/view/2139/775>> Acesso em 31 de out. de 2022

GÜLCIN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of toxicology**, Erzurum, v. 86, n. 3, p. 345-391, 2012. Disponível em: <<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s00204-011-0774-2.pdf>> Acesso em: 20 de nov. de 2022.

GUPTA, S. C. *et al.* Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. **Natural Product Reports**, Texas, v. 28, n. 12, p. 1937–1955, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2720745/pdf/ijn-4-115.pdf>> Acesso em: 31 de out. de 2022

Hammer, G. B. *et al.* Safety and Efficacy of Sodium Nitroprusside During Prolonged Infusion in Pediatric Patients. **Pediatric. Critical Care Medicine**, San Francisco, v. 16, n. 5, p. 397-403, 2015. Disponível em: <https://www.academia.edu/29947764/Safety_and_Efficacy_of_Sodium_Nitroprusside_During_Prolonged_Infusion_in_Pediatric_Patients> Acesso em: 06 de nov. de 2022.

JAKUBCZYK, K. *et al.*, Antioxidant potential of curcumin—A meta-analysis of randomized clinical trials. **Antioxidants**, Szczecin, v. 9, n. 11, p. 1092, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/antiox9111092>> Acesso em: 21 de nov. de 2022.

JASKI, M.; LOTÉRIO, N.; SILVA, D. **A ação de alguns antioxidantes no processo de envelhecimento cutâneo**. Curso de Cosmetologia e Estética da Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI. Balneário Camboriú, 2014. Disponível em: <<http://siaibib01.univali.br/pdf/Michele%20Jaski,%20Naiara%20Loterio.pdf>> Acesso em: 15 de out. de 2022

KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 48, n. 4, p. 412-422, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3551182/> Acesso em: 21 de nov. de 2022.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (Caryocar brasiliense, Camb.)**. 2008. Tese (Doutorado em Farmácia). Universidade de São Paulo, São Paulo. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-30009010/publico/Tese.pdf>> Acesso em: 10 de nov. de 2022.

LIMA, E. O. A. **Curcuma longa L.: uma revisão sobre composição química e atividades biológicas in vitro**. 2020. 28f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2020. Disponível em:

<<https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/35791>> Acesso em: 26 de novembro de 2022.

LIN, D.; ZHAO, Y. Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.6, n.3, p.60-75, 2007. Disponível em: <<https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1541-4337.2007.00018.x>> Acesso em: 12 de nov. de 2022

MAIA, R. *et al.* Avaliação do sequestro do óxido nítrico pelo extrato metanólico da alga *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) Howe. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo v.4, n.20, p. 489 – 493. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbfar/a/s3HCWvq9vq67Vh75WNzMS/?format=pdf&lang=pt>> Acesso em: 06 de nov. de 2022.

MAGALHÃES, L. M. *et al.* Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, Porto, v. 613, n. 1, p. 1-19, 2008. Disponível em: <https://qa.ff.up.pt/gabai/publications/492.pdf> Acesso em: 20 de nov. de 2022

MARCUCCI, M. C. *et al.* Metodologias acessíveis para a quantificação de flavonoides e fenóis totais em própolis. **Revista Virtual de Química**, São José dos Campos, v. 13, n. 1, p. 61-73, 2021. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Antonioavonoids_and_Total_Phenols_in_Propolis/links/6086d3242fb9097c0c0f8940/Accessible-Methodologies-for-Quantification-of-Flavonoids-and-Total-Phenols-in-Propolis.pdf> Acesso em: 18 de nov. de 2022.

MARTINS, J. F. N. **Síntese, caracterização e estudo de complexos de neodímio utilizando curcuminóides como ligantes**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/17368/1/d.pdf>> Acesso em: 31 de out.de 2022.

NASCIMENTO, J. C. *et al.* Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Farmácia**, Belo Horizonte, MG, v. 92, n. 4, p. 327- 332, 2011.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 36-44, 2015. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbpm/a/5Wrr5LFLJDN5yYQnFGyWd/?format=pdf&lang=pt>> Acesso em: 20 de nov. de 2022.

OLIVEIRA, M. C. C.; BARBOSA, R. C. F.; FLORES, D. C. Atividade antioxidante de frutas cítricas: adaptação do Método do DPPH para experimentação em sala de aula. **Química Nova Escola**, São Paulo, v. 10,n.4, p.401-405, 2021. Disponível em:

http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc43_4/10-EEQ-45-20.pdf Acesso em: 20 de nov. de 2022.

OLIVEIRA, A. C. *et al.* Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n.3, p. 689-702, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/D7W5ZmntbhMyt5G9FNwvpLr/?lang=pt> Acesso em: 29 de nov. de 2022.

PANAHI, Y. *et al.* A. Curcumin as a potential candidate for treating hyperlipidemia: A review of cellular and metabolic mechanisms. *Journal of Cellular Physiology*, v. 233, n. 1, p. 141-152, jan. 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jcp.25756> Acesso em: 31 de outubro de 2022.

PAPASTERGIADIS, A. *et al.* Malondialdehyde measurement in oxidized foods: evaluation of the spectrophotometric thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) test in various foods. **J Agr Food Chem**. v. 60 p. 9589-9594, Setembro de 2012.

PELEGRINO, M. T. **Nanopartículas poliméricas doadoras de óxido nítrico para aplicações tópicas**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Unifesp, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2017. Disponível em: https://repositorio.unifesp.br/bitstream/handle/11600/49914/Disserta%c3%a7%a3o_Milena%20Pelegrino%20%28FINAL%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y Acesso em: 06 de nov. de 2022

PELUFFO, G. R. Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. **Cardiovascular Research**, Oxford, v. 75, n.2, p. 291-302, 2007. Disponível em: <https://academic.oup.com/cardiovasces/article/75/2/291/298332> Acesso em: 06 de nov. de 2022.

PIRES, J. *et al.* Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo**, São Paulo, p. 1-5, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/PriscilaTorres/publication/324452676_Ensaio_em_microplaca_de_substancias_redutoras_pelo_metodo_do_FolinCiocalteu_para_extratos_de_algas/links/5ace3990aca2723a3341d6fb/Ensaio-em-microplaca-de-substancias-redutoras-pelo-metodo-do-Folin-Ciocalteu-para-extratos-de-algas.pdf Acesso em: 11 de nov. de 2022.

REZENDE, L. C. Avaliação da atividade antioxidante e composição química de seis frutas tropicais consumidas na Bahia. Tese (Doutorado Química) – UFBA, Salvador, 2010. Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/handle/ri/10639> Acesso em 29 de nov. de 2022

RODRIGUES, P. H. E. *et al.* Apple (*Malus domestica*) phenolic compounds in the prevention of oxidative stress in physical activity: literature review. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 15, p. e45101522348, 2021. DOI:

10.33448/rsd-v10i15.22348. Disponível em:
<<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/22348>>. Acesso em: 15 de dezembro de 2022.

SANTOS, M. P.; DE OLIVEIRA, N. R. F. Ação das vitaminas antioxidantes na prevenção do envelhecimento cutâneo. **Disciplinarum Scientia| Saúde**. Santa Maria, v. 15, n. 1, p. 75-89, 2014. Disponível em: <https://periodicos.ufn.edu.br/index.php/disciplinarumS/article/view/1067> Acesso em: 14 de dezembro de 2022

SANTOS, J. A. S. *et al.* Estudo do potencial antioxidante da *Anacardium occidentale* L. e determinação de seus compostos fenólicos. **Diversitas Journal**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 455–474, 2018. DOI: 10.17648/diversitas-journal-v3i2.637.. Disponível em:
<https://diversitasjournal.com.br/diversitas_journal/article/view/637. Acesso em: 30 de out. de 2022.

SILVA, V. L. **Aproveitamento sustentável do bagaço de cana de açúcar para obtenção do acetato de celulose**. 2014. 90f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014. Disponível em:
<https://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/19598/1/ValdicLuizDaSilva_DISSERT.pdf> Acesso em: 06 de novembro de 2022

SUCUPIRA, Natália Rocha *et al.* Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 4, 2012. Disponível em: <https://journalhealthscience.pgsskroton.com.br/article/view/885> Acesso em: 10 de nov. de 2022.

SUETH-SANTIAGO, V. *et al.* Curcumina, o pós dourado do açafraão da terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, Soropédica, v.38, n.4, p.538-552, 2015. Disponível em:
<<https://www.scielo.br/j/qn/a/Jhxxv6nsPXb37fh7bgZ3t/?format=pdf&lang=pt> > Acesso em: 31 de out. de 2022.

TEIXEIRA, M. G. D. *et al.* As propriedades biológicas da curcumina: uma revisão de literatura. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v.3, n.3 p. 1-12, 2022. Disponível em: <<https://editoraime.com.br/revistas/index.php/remS/article/view/3519>> Acesso em: 18 de nov. de 2022.

VERRUCK, S.; PRUDENCIO, E. S.; SILVEIRA, S. M. Compostos bioativos com capacidade antioxidante e antimicrobiana em frutas. In: **Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos**. [S. l.], v. 4, n. 1, p. 111-124, 2018. Disponível em: <<https://www.revistas.udesc.br/index.php/revistacsbea/article/view/13312/9628>> Acesso em: 15 de dezembro de 2022.

VIANA, M. V.; ARENARI, V. S. Antioxidantes sintéticos utilizados em indústrias alimentícias e a possível substituição por antioxidantes naturais. **Revista de trabalhos acadêmicos-universo campos dos goytacazes**, Campos, v. 1, n. 12, 2019.. Disponível em:

<<http://revista.universo.edu.br/index.php?journal=1CAMPOSDOSGOYTACAZES2&page=article&op=viewFile&path%5B%5D=7608&path%5B%5D=3855>> Acesso em: 26 de out. de 2022.

YUAN, Zhilan *et al.* P38MAPK and ERK promote nitric oxide production in cultured human retinal pigmented epithelial cells induced by high concentration glucose. **Nitric oxide**, Nanjing, v. 20, n. 1, p. 9-15, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.niox.2008.09.001> Acesso em: 06 de nov. de 2022.

WOLPE, S. L. A.; GRANZOTI, R. O.; PORSCH, L. Estresse oxidativo e o seu impacto no envelhecimento: uma revisão bibliográfica. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. página 80, 2019. DOI: 10.31415/bjns.v2i2.53. Disponível em: <<https://bjns.com.br/index.php/BJNS/article/view/53> > Acesso em: 15 de dezembro de 2022.



**Presidência da República
Casa Civil
Subchefia para Assuntos Jurídicos**

LEI Nº 9.610, DE 19 DE FEVEREIRO DE 1998¹.

Altera, atualiza e consolida a legislação sobre direitos autorais e dá outras providências.

O PRESIDENTE DA REPÚBLICA Faço saber que o Congresso Nacional decreta e eu sanciono a seguinte Lei:

Título I - Disposições Preliminares

Art. 1º Esta Lei regula os direitos autorais, entendendo-se sob esta denominação os direitos de autor e os que lhes são conexos.

Art. 2º Os estrangeiros domiciliados no exterior gozarão da proteção assegurada nos acordos, convenções e tratados em vigor no Brasil.

Parágrafo único. Aplica-se o disposto nesta Lei aos nacionais ou pessoas domiciliadas em país que assegure aos brasileiros ou pessoas domiciliadas no Brasil a reciprocidade na proteção aos direitos autorais ou equivalentes.

Art. 3º Os direitos autorais reputam-se, para os efeitos legais, bens móveis.

Art. 4º Interpretam-se restritivamente os negócios jurídicos sobre os direitos autorais.

Art. 5º Para os efeitos desta Lei, considera-se:

I - publicação - o oferecimento de obra literária, artística ou científica ao conhecimento do público, com o consentimento do autor, ou de qualquer outro titular de direito de autor, por qualquer forma ou processo;

II - transmissão ou emissão - a difusão de sons ou de sons e imagens, por meio de ondas radioelétricas; sinais de satélite; fio, cabo ou outro condutor; meios óticos ou qualquer outro processo eletromagnético;

III - retransmissão - a emissão simultânea da transmissão de uma empresa por outra;

IV - distribuição - a colocação à disposição do público do original ou cópia de obras literárias, artísticas ou científicas, interpretações ou execuções fixadas e fonogramas, mediante a venda, locação ou qualquer outra forma de transferência de propriedade ou posse;

V - comunicação ao público - ato mediante o qual a obra é colocada ao alcance do público, por qualquer meio ou procedimento e que não consista na distribuição de exemplares;

VI - reprodução - a cópia de um ou vários exemplares de uma obra literária, artística ou científica ou de um fonograma, de qualquer forma tangível, incluindo qualquer armazenamento permanente ou temporário por meios eletrônicos ou qualquer outro meio de fixação que venha a ser desenvolvido;

VII - contrafação - a reprodução não autorizada;

VIII - obra:

a) em co-autoria - quando é criada em comum, por dois ou mais autores;

b) anônima - quando não se indica o nome do autor, por sua vontade ou por ser desconhecido;

c) pseudônima - quando o autor se oculta sob nome suposto;

d) inédita - a que não haja sido objeto de publicação;

e) póstuma - a que se publique após a morte do autor;

f) originária - a criação primígena;

g) derivada - a que, constituindo criação intelectual nova, resulta da transformação de obra originária;

h) coletiva - a criada por iniciativa, organização e responsabilidade de uma pessoa física ou jurídica, que a publica sob seu nome ou marca e que é constituída pela participação de diferentes autores, cujas contribuições se fundem numa criação autônoma;

i) audiovisual - a que resulta da fixação de imagens com ou sem som, que tenha a finalidade de criar, por meio de sua reprodução, a impressão de movimento, independentemente dos processos de sua captação, do suporte usado inicial ou posteriormente para fixá-lo, bem como dos meios utilizados para sua veiculação;

IX - fonograma - toda fixação de sons de uma execução ou interpretação ou de outros sons, ou de uma representação de sons que não seja uma fixação incluída em uma obra audiovisual;

X - editor - a pessoa física ou jurídica à qual se atribui o direito exclusivo de reprodução da obra e o dever de divulgá-la, nos limites previstos no contrato de edição;

XI - produtor - a pessoa física ou jurídica que toma a iniciativa e tem a responsabilidade econômica da primeira fixação do fonograma ou da obra audiovisual, qualquer que seja a natureza do suporte utilizado;

XII - radiodifusão - a transmissão sem fio, inclusive por satélites, de sons ou imagens e sons ou das representações desses, para recepção ao público e a transmissão de sinais codificados, quando os meios de decodificação sejam oferecidos ao público pelo organismo de radiodifusão ou com seu consentimento;

XIII - artistas intérpretes ou executantes - todos os atores, cantores, músicos, bailarinos ou outras pessoas que representem um papel, cantem, recitem, declamem, interpretem ou executem em qualquer forma obras literárias ou artísticas ou expressões do folclore.

Art. 6º Não serão de domínio da União, dos Estados, do Distrito Federal ou dos Municípios as obras por eles simplesmente subvencionadas.

¹ Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19610.htm.