

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS
ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LUIZA MARIANO LEME

DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES EM ALHO (*Allium sativum*, L.) UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA E QUIMIOMETRIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Campo Mourão
2015

LUIZA MARIANO LEME

DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES EM ALHO (*Allium sativum*, L.) UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA E QUIMIOMETRIA

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Engenharia de Alimentos do Departamento de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Engenheira.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Março

CAMPO MOURÃO

2015



TERMO DE APROVAÇÃO

DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES EM ALHO (*Allium sativum*, L.)
UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA E QUIMIOMETRIA

POR

LUIZA MARIANO LEME

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado em 27 de Novembro de 2015 às 9 horas como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos. A candidata foi argüida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Prof. Dr. Paulo Henrique Março
Orientador

Prof. Dr. Augusto Tanamati
Membro da banca

Prof. Dr. Nelson Consolin Filho.
Membro da banca

Nota: O documento original e assinado pela Banca Examinadora encontra-se na Coordenação do Curso de Engenharia de Alimentos da UTFPR *Campus* Campo Mourão.

Às memórias de Antonio de Oliveira Leme e Dimas Mariano, avôs que
deixaram saudades e exemplos a serem seguidos.

À Waldívia e Nadir, avós que são minhas mães duas vezes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, Eliane Mariano, por ter me ensinado a importância do estudo, por me amparar nos momentos de dificuldade e por sempre aplaudir minhas conquistas. O desafio da graduação não teria sido cumprido sem seu apoio.

Ao meu pai, Eduardo de Oliveira Leme, que sempre diz que o conhecimento é o único bem que não nos podem roubar. Obrigada pelos conselhos, pelo incentivo e por sempre me cobrar uma postura íntegra.

Às minhas irmãs, Beatriz e Agnes, que são meu vínculo com o passado e melhores amigas.

Ao meu namorado, Jhonny Barbieri, por todo carinho, compreensão e por ser meu porto seguro dentre as adversidades.

Aos meus amigos de sempre Ana Paula, Isabella, Thiago (Vô) Maikon, Mariana e Bárbara por dividirem os momentos de felicidade e amenizarem os de tristeza, vocês fizeram com que esta jornada tenha sido inesquecível.

Às amigas recém conquistadas que foram essenciais na reta final da minha graduação: Sara Castro, Kézia Piccoli, Tatiane Vieira, Keila Cristina e Carina Theodoro.

À Juliana Marques, pela amizade construída durante as horas de laboratório e as dificuldades no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Março pela orientação durante meus anos de iniciação científica, pelo conhecimento compartilhado, pelo incentivo, por acreditar no meu potencial e por todas as portas que me abriu.

Aos Prof. Dr. Augusto Tanamati e Prof. Dr. Nelson Consolin, por terem aceito fazer parte da banca examinadora deste trabalho e pelas sugestões ao pré-projeto.

Aos técnicos Marcos, Vanessa, Adriele e Michel por toda a ajuda durante a rotina laboratorial.

À todos os professores que passaram pela minha graduação. Minha gratidão será eterna por terem me ensinado muito mais do que suas disciplinas contemplavam, vocês foram essenciais não só na minha formação acadêmica como também no meu desenvolvimento pessoal ao me instigarem a sempre buscar os porquês.

Aos colaboradores vinculados à Universidade Tecnológica Federal do Paraná *campus* Campo Mourão que são essenciais ao funcionamento desta instituição e que, mesmo indiretamente, atuam em nossa formação.

Por fim, agradeço aos que não foram aqui citados mas que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão da minha graduação.

RESUMO

LEME, Luiza M. Determinação de Antioxidantes em Alho (*Allium sativum*, L.) Utilizando Espectroscopia e Quimiometria. 2015. 33 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Engenharia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2015.

O alho (*Allium sativum*, L.) é um vegetal rico em espécies antioxidantes que, por sua vez, são compostos que apresentam a capacidade de inibir ou retardar a ação de espécies radicalares através da doação de elétrons, inibindo assim reações que podem levar ao envelhecimento precoce e doenças como arterosclerose e câncer. A determinação da atividade antioxidante de compostos pode ser feita através de diversas metodologias sendo o método de sequestro do radical DPPH um dos mais aplicados. Cada autor sugere equações e parâmetros diferentes para a interpretação dos dados obtidos através desta metodologia e, por não ser padronizada, pode gerar respostas dúbias quanto a funcionalidade desta metodologia. Além disso, o reagente apresenta um custo significativo e necessita da utilização de um espectrofotômetro. No entanto, hoje em dia já é possível a utilização de métodos espectroscópicos aliados à quimiometria para o isolamento matemático de sinais dos compostos de interesse, o que, a priori, forneceria respostas mais reais. Assim, este trabalho propõe o uso da metodologia MCR-ALS em dados provenientes de espectroscopia UV-Vis e NIR para o monitoramento da atividade antioxidante de alho através da inibição do radical DPPH.

Palavras Chave: Alho. Atividade antioxidante. DPPH. UV-Vis. NIRS. MCR.

ABSTRACT

LEME, Luiza M. Antioxidant Determination in Garlic (*Allium sativum*, L.) Using Spectroscopy and Chemometrics. 2015. 33 p. Research for Course Conclusion – Food Engineering, Federal Technological University of the Paraná State, Campo Mourão, 2015.

Garlic (*Allium sativum* L.) is a vegetable which is rich in antioxidants, defined as compounds which have the ability to inhibit or retard the action of radical species by donating electrons, thereby inhibiting reactions which can lead species to premature aging and diseases such as atherosclerosis and cancer. Determination of antioxidant activity of compounds can be made using different methodologies, being the most used one known as the DPPH radical inhibition method. Each author suggests different equations and different parameters for the interpretation of the data obtained through this methodology, implying in a lack of standardization, driving the results to be dubious besides missing confidence about this method functionality. Additionally, the reagent provides a significant cost and requires the use of a spectrophotometer. However, nowadays, by using a spectrophotometer it is possible to use combine spectroscopy with chemometric methods for isolating the mathematical signs of the compounds of interest, which, in principle, provide more realistic responses. This work proposes the use of MCR-ALS methodology on data from UV-Vis and NIR spectroscopy to monitor the antioxidant activity of garlic through inhibition of DPPH radical.

Keywords: Garlic. Antioxidant activity. DPPH. UV-Vis. NIRS. MCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de ação de espécies reativas (Fonte: SOLOMONS & FRYHLE, 2012)	13
Figura 2 - Mecanismo de ação de agentes antioxidantes.	14
Figura 3 - Radical DPPH (1) e Hidrazina (2) (Fonte: ALVES et al, 2010.).....	15
Figura 4 - Regiões espectroscópicas (Fonte: Skoog, 2006)	17
Figura 5 - Espectro da solução controle (DPPH e etanol absoluto) obtido na região UV-Vis.	21
Figura 6 - Espectros das soluções das amostras de extrato de alho adicionadas a solução etanólica de DPPH obtidos nas regiões ultravioleta e visível.....	22
Figura 7 - Resultados da aplicação de MCR-ALS nos dados obtidos nas regiões ultravioleta e visível dos dos extratos de alho com DPPH submetidos a diferentes diluições. A) Espectros e B) respectivas concentrações relativas.	23
Figura 8 - Correlação entre as concentrações relativas recuperadas por MCR-ALS e as concentrações reais em miligramas de ácido gálico para cada 100mL.	23
Figura 9 - Correlação entre as concentrações relativas recuperadas por MCR-ALS e as concentrações reais em miligramas de ácido gálico para cada 100mL.	24
Figura 10 - Espectros pré processados das soluções das amostras de extrato de alho adicionadas a solução etanólica de DPPH obtidos na região infravermelha.....	25
Figura 11 - Resultados da aplicação de MCR-ALS nos dados obtidos na região infravermelha próxima dos extratos de alho com DPPH submetidos a diferentes diluições. A) Espectros e B) respectivas concentrações relativas.....	26

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
2	OBJETIVOS.....	10
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1	ALHO (<i>Allium sativum</i> , L.)	11
3.2	ESPÉCIES RADICAIS E REAÇÕES RADICALARES	11
3.3	AGENTES ANTIOXIDANTES.....	12
3.4	MECANISMO DE AÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS E AGENTES ANTIOXIDANTES	13
3.5	DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	14
3.5.1	METODOLOGIA DO SEQUESTRO DO RADICAL DPPH.....	14
3.6	MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS.....	16
3.7	QUIMIOMETRIA.....	17
3.7.1	RESOLUÇÃO MULTIVARIADA DE CURVAS COM MÍNIMOS QUADRADOS ALTERNADOS (MCR-ALS; <i>Multivariate Curve Resolution Alternating Least Squares</i>).....	18
4	MATERIAIS E MÉTODOS	20
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
6	CONCLUSÃO	28
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a determinação de antioxidantes em alimentos é realizada através do método de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), principalmente pelas formas descritas por Brand-Williams *et al.* (1995) e aquela modificada por Mensor *et al.* (2001). Estas se fundamentam na captura do radical DPPH por antioxidantes presentes na amostra avaliada. Assim, como o DPPH confere cor à solução, um máximo de absorbância em 518 nm, medido em espectroscopia, é observado e conforme as espécies radicais são consumidas, verifica-se um decréscimo da absorbância nesta região. Na equação sugerida por estes autores (Brand-Williams *et al.*, 1995; Mensor *et al.*, 2001), emprega-se como controle a solução de DPPH sem a amostra, e as absorbâncias obtidas são convertidas em porcentagem de sequestro do radical DPPH.

A priori, a lógica e a eficiência da metodologia são plausíveis e, por isso, a mesma vem sendo utilizada há tempos pela maioria dos pesquisadores quando se objetiva determinar a atividade antioxidante de uma amostra. Porém, os reagentes empregados são de alto custo relativo, além de serem instáveis, consumirem a amostra analisada, promoverem a geração de resíduos e demandarem tempo considerável para a reação de sequestro dos radicais. Desta forma, algumas alternativas devem ser estudadas no intuito de se aprimorar estas determinações, considerando-se principalmente a possibilidade de aplicação de métodos que permitam um monitoramento online, de forma não destrutiva, de baixo custo relativo e que apresente resultados confiáveis.

Dentre as possibilidades, uma alternativa importante pode ser verificada na aplicação de métodos espectroscópicos, tais como a espectroscopia na região Ultravioleta-Visível (UV-Vis) (MORAIS *et al.*, 2015) e a região do infravermelho próximo (NIR) (PEREIRA *et al.*, 2015). Os métodos espectroscópicos podem ser utilizados como métodos alternativos desde que calibrados com métodos clássicos, possibilitando uma diminuição significativa do tempo de análise além da redução na quantidade de reagentes utilizados (MORAIS *et al.*, 2015).

A calibração para este tipo de situação deve ser feita utilizando todos os pontos do espectro contra a medida do método padrão, como, por exemplo, o

método de sequestro do radical DPPH (MORAIS *et al.*, 2015). Estes métodos são chamados de métodos de calibração multivariados, os quais correlacionam conjuntos de variáveis de cada amostra com as medidas padrão, de forma a oferecer um modelo matemático para possibilitar a aplicação de um outro método no lugar daquele de referência (MORAIS *et al.*, 2015).

Assim, a proposta deste trabalho foi correlacionar as análises hoje realizadas por métodos clássicos com as análises obtidas por espectroscopia nas regiões ultravioleta e visível do espectro eletromagnético, com a finalidade de agilizar as análises e diminuir a quantidade de etapas necessárias para se quantificar o teor antioxidante de alimentos naturais. O método que se propõe empregar para este fim é denominado de Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Parciais (MCR-ALS, do inglês *Multivariate Curve Resolution with Alternating Least Squares*) (MARÇO *apud*, 2011; MARÇO *et al.*, 2014), o qual faz parte de um conjunto de métodos matemáticos e estatísticos empregados na extração de informações químicas, denominados métodos quimiométricos. Os resultados alcançados neste estudo foram suficientes para se concluir sobre a necessidade de adequações da metodologia de sequestro do radical DPPH para análises cotidianas, principalmente no que diz respeito ao intervalo linear de resposta desta metodologia, além de evidenciar as diversas equações e parâmetros propostos para se avaliar o efeito do DPPH.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal a proposição de uma metodologia alternativa para a determinação do teor antioxidante de alimentos utilizando-se espectroscopia na região UV-Vis e métodos quimiométricos em lugar da metodologia do sequestro do radical DPPH. Mais especificamente, os estudos sugeridos nesta pesquisa buscaram oferecer uma metodologia que traga vantagens tais como custo relativamente baixo, mínimo preparo de amostra, mínima utilização de reagentes químicos e, principalmente, técnicas que além de apresentarem caráter não destrutivo da amostra sejam suficientemente rápidas para serem implementadas na linha de produção industrial.

Para a realização deste trabalho, será necessário realizar a medição padrão do teor antioxidante utilizando o método padrão de sequestro do radical DPPH para construção do modelo de calibração; adquirir espectros na região Ultravioleta e Visível (UV-Vis) e Infravermelho Próximo (NIR) das amostras avaliadas; construir um modelo de calibração utilizando-se quimiometria (MCR-ALS) para ser aplicado frente ao método padrão de sequestro do radical DPPH; avaliar os parâmetros de qualidade dos modelos de calibração multivariada obtidos no estudo; colaborar para o desenvolvimento de metodologias analíticas rápidas, de baixo custo, minimamente dependente de preparo/processamento e ainda não destrutivas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ALHO (*Allium sativum*, L.)

Segundo Bolliger (2014), a produção brasileira de alho sofreu uma queda de 8,1% desde 2013 devido a entrada do alho importado da Argentina, China e Egito que apresentam preços mais baixos e qualidade superior quando comparados ao produto nacional.

Vegetais do gênero *Allium*, como alho e cebola, são amplamente empregados na cozinha brasileira e apresentam como característica marcante seu odor singular e sabor pungente, decorrentes dos compostos organossulfurados presentes em sua composição. Os diversos benefícios ligados ao consumo de alho têm sido associados à sua ação microbiana, antitrombótica, anticancerígena, antiaterosclerótica, antioxidante, fortalecedora do Sistema imunológico, hipolipidêmica, hipoglicêmica e hipotensora (MARIUTTI & BRAGAGNOLO, 2009). A atividade antioxidantes destes vegetais é atribuída, principalmente, saponinas, flavonoides, fenóis e compostos organossulfurados (WANG *et al*, 2015)

3.2 ESPÉCIES RADICAIS E REAÇÕES RADICALARES

Espécies com elétrons desemparelhados são chamados de radicais e estão envolvidos em reações químicas de combustão, envelhecimento, doenças, síntese de produtos e destruição da camada de ozônio. O óxido nítrico que serve como agente sinalizador em alguns processos biológicos e até mesmo o oxigênio que respiramos são moléculas com elétrons desemparelhados (SOLOMONS, 2012).

Quando espécies radicais colidem com outras moléculas, reagem de forma a emparelhar seu elétron desemparelhado. Este emparelhamento pode ocorrer através da abstração de um átomo de outra molécula como, por exemplo, um átomo de halogênio abstraindo um átomo de hidrogênio de um alcano.

Alimentos como mirtilo e cenoura são ricos em compostos altamente coloridos, conhecidos como antioxidantes, que reagem com as moléculas com elétrons desemparelhados, impedindo reações radicalares indesejáveis (SOLOMONS, 2012).

3.3 AGENTES ANTIOXIDANTES

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados por espécies reativas do metabolismo do oxigênio, atuando através de diferentes mecanismos de defesa: inibindo a formação de espécies reativas, principalmente através da inibição de reações em cadeia com ferro e cobre; interceptando espécies reativas, impedindo ou reduzindo sua ação deletéria (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

A ação do sistema de defesa antioxidante pode ocorrer tanto por via enzimática, quanto por via não-enzimática. O sistema enzimático é constituído por enzimas como Superóxido Dismutase, Catalase e Glutathione Peroxidase que agem impedindo e/ou controlando a formação de radicais, como OH^\bullet , que além de causar alteração de funções biológicas das membranas celulares (por ser o principal iniciador do processo de peroxidação lipídica), é capaz de agir sobre proteínas alterando sua estrutura e/ou função biológica. A atividade do sistema enzimático depende, muitas vezes, da participação de cofatores enzimáticos como cobre, zinco, manganês e selênio. O sistema não-enzimático engloba, especialmente, compostos antioxidantes de origem dietética como vitaminas, minerais e compostos fenólicos (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

A aplicação de compostos antioxidantes na formulação de cosméticos, fármacos, bebidas e alimentos vem sendo amplamente utilizada como um mecanismo de defesa contra espécies reativas (BIANCHI & ANTUNES, 1999). As reações oxidativas em alimentos podem causar efeitos indesejáveis como a degradação de lipídeos, vitaminas e pigmentos, contribuindo para a redução do valor nutricional e desenvolvimento de características indesejáveis. Para impedir tais reações, costuma-se empregar técnicas de processamento e embalagens que impeçam o contato entre o alimento e o oxigênio ou a adição de agentes químicos apropriados, como tocoferóis, ácido ascórbico, tióis e fenólicos sendo

estes os mais comumente empregados na indústria alimentícia (FENNEMA *et al*, 2010).

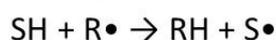
3.4 MECANISMO DE AÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS E AGENTES ANTIOXIDANTES

O mecanismo de ação de espécies reativas pode ser dividido em quatro etapas: Iniciação, Propagação 1, Propagação 2 e Terminação, como mostra a Figura 1.

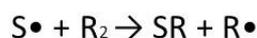
Iniciação



Propagação 1: Abstração à molécula de hidrogênio



Propagação 2: Ataque à molécula iniciadora



Terminação



Figura 1 - Mecanismo de ação de espécies reativas (Fonte: SOLOMONS & FRYHLE, 2012)

Na etapa de Iniciação, a molécula R_2 que, sob influência de algum fator externo, se dissocia formando duas moléculas radiculares altamente reativas. Estas espécies reativas, durante Propagação 1 abstrai uma molécula de hidrogênio de um substrato molecular (SH) como, por exemplo, um lipídeo, e forma uma molécula radicalar orgânica, que na etapa de Propagação 2 ataca a molécula iniciadora (R_2), formando novamente uma espécie radicalar. A Terminação da reação se dá pela combinação dos radicais, formando produtos não reativos (SOLOMONS & FRYHLE, 2012).

Mesmo em quantidades mínimas, agentes antioxidantes primários (AH) podem retardar ou inibir as etapas de Propagação reagindo com as moléculas radicalares. Antioxidantes secundários ou preventivos são compostos que atuam no retardo da taxa oxidativa através de diferentes maneiras como, por exemplo, removendo o substrato da reação (PISOSCHI & NEGULESCU, 2011). O mecanismo de ação de agentes antioxidantes pode ser visualizado na Figura 2.

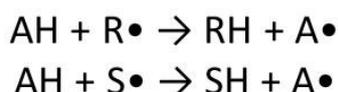


Figura 2- Mecanismo de ação de agentes antioxidantes.

3.5 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Segundo Pisoschi & Negulescu (2011), a avaliação da atividade antioxidante de determinado composto pode ser realizada através de diversas metodologias analíticas, usualmente divididas em:

- Técnicas eletroquímicas como voltametria cíclica, amperometria e biamperometria
- Técnicas cromatográficas como cromatográfica gasosa e cromatografia líquida de alta performance.
- Técnicas espectrofotométricas como DPPH, ABTS, FRAP, PFRAP, CUPRAC, ORAC, HORAC, TRAP e Fluorimetria.

3.5.1 METODOLOGIA DO SEQUESTRO DO RADICAL DPPH

O uso do radical DPPH para avaliar a atividade antioxidante de compostos vem sendo desenvolvida desde a década de 1980 com o trabalho de Kurechi *et al* (1980) onde o radical foi avaliado quanto sua capacidade de ligar-se a antioxidantes.

A molécula DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é considerada um radical livre estável devido a delocalização do elétron desemparelhado ao longo de toda

a molécula, devido a isto, este radical não sofre dimerização, ou seja, não há reação entre duas moléculas de DPPH formando um produto não reativo como na etapa de Terminação comum às demais espécies reativas. Em virtude a esta deslocalização, o DPPH em solução alcoólica apresenta intensa coloração violeta com absorção em torno de 518 nm (PISOSCHI & NEGULESCU, 2011).

Esta metodologia baseia-se na capacidade em que o agente antioxidante de um determinado composto apresenta em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o a sua forma não radical denominada hidrazina, observada na Figura 3. Esta redução do radical é obtida simultaneamente a alteração da coloração violeta da solução a amarelo pálido (ALVES *et al*, 2010).

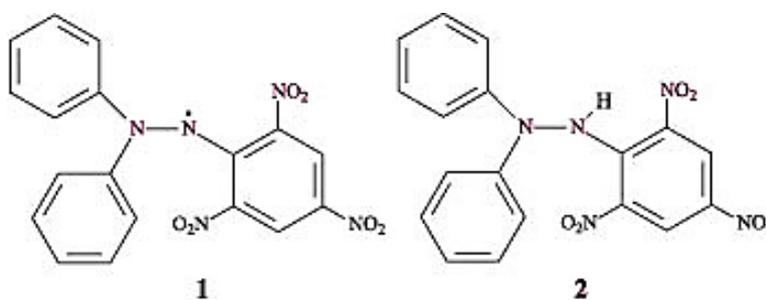


Figura 3 - Radical DPPH (1) e Hidrazina (2) (Fonte: ALVES *et al*, 2010.)

Brand-Williams *et al* (1995) avaliaram a atividade antioxidante de compostos como o ácido ascórbico e estabeleceram que a interação entre a atividade antioxidante de um composto com o radical DPPH depende da conformação estrutural e a quantidade de grupos hidroxílicos disponíveis. Entretanto, o mecanismo para as demais substâncias testadas apresenta-se mais complexo, sendo necessárias avaliações posteriores.

Mensor *et al* (2001) avaliaram a atividade antioxidante de extratos vegetais através da determinação do parâmetro EC_{50} , que representa a concentração da matriz em solução necessária para se obter 50% da máxima atividade antioxidante do composto. Em estudos posteriores Carmona-Jiménez *et al* (2014) observaram que a linearidade entre a porcentagem de inibição do DPPH e a concentração da solução varia consideravelmente com o tipo de amostra e que, portanto, a não-linearidade destes dados indica que a determinação do parâmetro EC_{50} pode estar associado a diversos erros. Dentre as concentrações analisadas observaram que a faixa de linearidade está

comumente situada até 40%, impossibilitando os resultados de serem expressos em EC_{50} , e analogamente propuseram que a atividade antioxidante seja expressa em EC_{20} , a quantidade de amostra necessária para que a concentração inicial de DPPH decaia a 20%, trabalhando desta forma dentro da zona de linearidade assegurando melhores ajustes dos dados e reduzindo a quantidade de diluições necessárias para se obter a curva de calibração excluindo erros significantes.

Scherer & Godoy (2009) propõe o emprego do Índice de Atividade Antioxidante (AAI), que demonstra a capacidade da amostra, em uma concentração fixa, de reduzir ou não os radicais DPPH. Deng *et al* (2011) sugerem o cálculo da Unidade de Atividade Antioxidante (AAU), parâmetro que segundo os autores pode avaliar de forma mais precisa a habilidade antioxidante dos compostos da amostra. Existem diversos outros estudos sobre a avaliação da capacidade antioxidante de compostos através do radical DPPH, entretanto, não há uma metodologia padrão comum aos autores, que por sua vez utilizam diferentes equações e parâmetros para este tipo de avaliação.

3.6 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

Métodos espectroscópicos de análise são baseados na medida da quantidade de radiação produzida ou absorvida pelas moléculas ou espécies atômicas de interesse. Quando submetido a um estímulo como calor, energia elétrica, luz, partículas ou reação química, o analito passa de seu estado fundamental ao seu estado excitado uma vez que algumas de suas espécies sofrem transição para um estado de maior energia. Obtêm-se informações sobre o analito medindo-se a radiação eletromagnética emitida quando este retorna ao seu estado menos energético ou a quantidade de radiação absorvida decorrente de sua excitação. Usualmente, as regiões espectrais têm sido divididas em raio γ , raio X, ultravioleta, visível, infravermelha, micro-ondas e radiofrequência, ilustradas na Figura 4. Por meio da análise espectroscópica da luz absorvida ou emitida é possível identificar e determinar a concentração de diferentes espécies químicas. Para análises químicas, a espectroscopia óptica é a mais utilizada,

abrangendo, portanto, as regiões ultravioleta, visível e infravermelha (SKOOG *et al*, 2006).

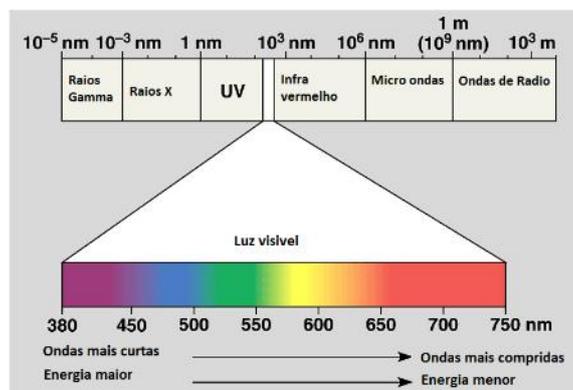


Figura 4 - Regiões espectroscópicas (Fonte: Skoog, 2006)

A aplicação de espectroscopia nas regiões infravermelha, ultravioleta e visível aliada à calibração multivariada vem se tornando cada vez mais popular para quantificação de espécies de interesse. A calibração multivariada permite que tipos diferentes de amostras possam ser medidas em um mesmo modelo matemático visando a determinação de um mesmo analito de interesse. Esta forma de calibração apresenta como vantagens modelos robustos e abrangentes, e que podem ser utilizados para a previsão de mais de um tipo de analito para as amostras, utilizando apenas uma forma de análise (BERZAGHI *et al*, 2000).

3.7 QUIMIOMETRIA

A quimiometria é definida como a aplicação de métodos matemáticos e estatísticos para a extração de informações químicas não-triviais com um grande conjunto complexo de dados, que incluem conceitos de pré-processamento de dados, planejamento experimental, estatística e análise multivariada (ROBINSON, 2001; LAJOLO & NUTTI, 2003). Ultimamente tem sido implementada como uma disciplina para a área da Química Analítica e inserida na grade curricular de diversos cursos de graduação e pós-graduação em universidades brasileiras, pois envolve a aplicação de métodos matemáticos,

estatísticos e computacionais para investigar, interpretar, classificar e fazer previsão de conjuntos de dados de interesse químico (BARROS *et al*, 2006).

A quimiometria possui aplicações variadas, com métodos que incluem análises exploratórias, métodos de classificação e calibração multivariada (FERREIRA *et al*, 1999). Este método possui como vantagens possibilidade de utilização de amostras sem necessidade de preparo prévio, não geração de resíduos tóxicos e não utilização de reagentes e solventes químicos. Sendo assim, a aplicação de métodos espectroscópicos associados a métodos quimiométricos podem proporcionar a geração de métodos para medidas rápidas e de menor custo em relação às metodologias convencionais utilizadas atualmente (VALDERRAMA *et al.*, 2014).

3.7.1 RESOLUÇÃO MULTIVARIADA DE CURVAS COM MÍNIMOS QUADRADOS ALTERNADOS (MCR-ALS; *Multivariate Curve Resolution Alternating Least Squares*)

Os métodos de Resolução Multivariada de Curvas (MCR, do inglês *Multivariate Curve Resolution*) são métodos de processamento de sinais analíticos que têm o intuito de resolver misturas de sinais (DE JUAN *et al*, 2006; PARASTAR & TAULER, 2014).

Dessa forma, o MCR-ALS recupera informações misturadas não seletivas provenientes de uma matriz de dados (D) em contribuições reais dos componentes puros no sistema (representados pelos perfis de concentração em C e perfis espectrais em ST), por meio de um processo iterativo de mínimos quadrados alternantes (ALS, do inglês *Alternating Least Squares*) (JAUMOT *et al*, 2005).

O modelo geral do MCR pode ser verificado na Equação 1 (TAULER, 1995; PARASTAR & TAULER, 2014).

$$\mathbf{D} = \mathbf{CS}^T + \mathbf{E} \quad (1)$$

Onde **D** é a matriz de resposta instrumental, **C** é a matriz de concentração relativa e **S** é uma matriz de espectros puros e **E** a matriz de resíduos.

O ALS é um método iterativo utilizado para resolução de problema, devido à sua flexibilidade e capacidade de lidar com diferentes estruturas e tipos de problemas químicos. O problema matemático a ser resolvido é encontrar o número de espécies que causam a variação dos dados, encontrar os perfis de concentração de cada uma e recuperar os espectros das espécies puras. Para resolver o problema assume-se que o posto da matriz original é igual ao número de espécies ativas espectroscopicamente e que todo o sinal instrumental é advindo das espécies (TAYLOR E FANCIS, 2006; GARRIDO *et al*, 2008)

As estimativas iniciais dos perfis de concentração e espectral podem ser obtidos utilizando técnicas baseadas na detecção de variáveis mais puras ou pela técnica de Análise de Fatores Evolucionários (EFA) (KOWALSKI, 1995). Uma das grandes vantagens deste método é que nenhuma hipótese a priori sobre a contribuição dos diferentes fatores na resposta global é necessária e isso torna o método bastante atrativo no estudo de problemas químicos complexos (DE JUAN *et al*, 2004). Para que o método MCR-ALS possa ser aplicado torna-se necessário: estimar o posto (rank) da matriz de dados instrumentais; realizar estimativas iniciais para C ou S; aplicar restrições objetivando reduzir ambiguidades nos resultados; e a otimização via mínimos quadrados alternantes (MARÇO *et al*, 2014).

O MCR é um modelo-flexível (*soft-modeling*) cujo foco está na descrição da evolução das medidas experimentais multicomponentes a partir das contribuições dos seus componentes puros. Estes modelos têm como base uma família de métodos computacionais e estatísticos para o isolamento de fontes de variação em conjuntos de dados experimentais (PARASTAR & TAULER, 2014; ESTEBAN, 2000).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A determinação de atividade antioxidante foi baseada na metodologia descrita por Mensor *et al* (2001), com alterações. Foram preparados extratos de alho (*Allium sativum* L.) em diferentes concentrações onde a solução extratora constitui-se de uma mistura de 50% etanol absoluto e 50% água ultra pura (mili-Q) e solução 0,3 mM de DPPH. Para as medidas de inibição do radical DPPH, 1,0 mL da solução de DPPH foi adicionado a 2,5 mL de extrato para cada diluição, sendo estas 10%, 6,6%, 4,4%, 2,9% e 1,95%. Em seguida, 1,0 mL de solução extratora foi adicionada a 2,5 mL de extrato para serem utilizados como “branco”. O controle negativo foi produzido utilizando-se 1,0 mL de solução de DPPH adicionado a 2,5 mL de solução extratora. Estas soluções permaneceram ao abrigo da luz por 30 minutos e, em seguida, foram realizadas as leituras de absorbância em 518 nm.

A porcentagem de inibição de DPPH de cada concentração da amostra avaliada foi determinada através da Equação 2, descrita por Carmona-Jiménez *et al* (2014) devido a não linearidade dos dados.

$$I_{\%} = \left(\frac{Abs_{branco} - Abs_{amostra}}{Abs_{branco}} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

Simultaneamente foram adquiridos os espectros das amostras e dos extratos puros nas regiões ultravioleta, visível e infravermelha. Os dados obtidos foram processados com o auxílio do software Matlab e as ferramentas do pacote computacional PLS-Toolbox® e MCR-ALS. Para aplicação da metodologia proposta o método quimiométrico utilizado foi a Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Alternantes (MCR-ALS – do inglês Multivariate Curve Resolution - Alternating Least Squares), que é uma metodologia de resolução de curvas ou separação de sinais. Este método permite a separação dos sinais de um determinado componente da amostra sem a necessidade de separações físicas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O espectro da solução contendo DPPH e etanol (denominada solução controle) está apresentado na Figura 5. Soluções alcoólicas de DPPH apresentam coloração púrpura, com uma banda de absorção em 518 nm que desaparece com a presença do neutralizador de radical no sistema reativo quando o elétron desemparelhado do nitrogênio se emparelha com o elétron proveniente do DPPH (CHI *et al*, 2003).

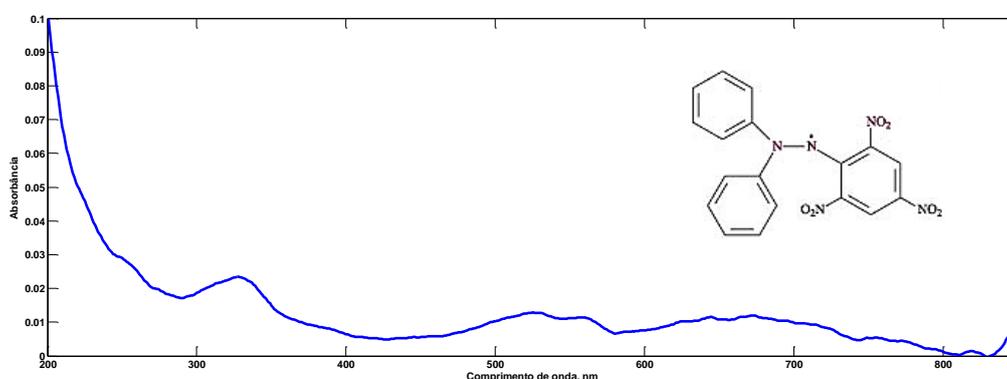


Figura 5 - Espectro da solução controle (DPPH e etanol absoluto) obtido na região UV-Vis.

A Figura 6 apresenta os espectros das soluções contendo extratos de alho em diferentes concentrações (diluídas para 10,0%; 6,6%; 4,4%; 2,9%; 1,9% e 1,3%) adicionadas a solução etanólica de DPPH.

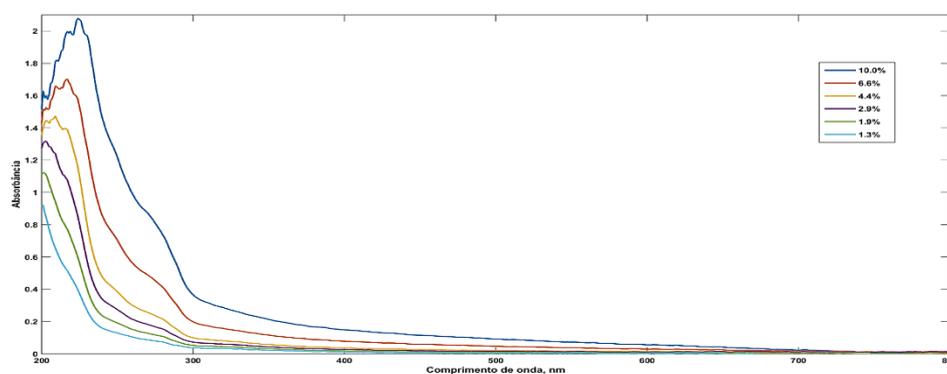


Figura 6 - Espectros das soluções das amostras de extrato de alho adicionadas a solução etanólica de DPPH obtidos nas regiões ultravioleta e visível.

A coloração da solução contendo DPPH se torna levemente amarelada e a absorvidade molar do DPPH é reduzida de 9660 para 1640 quando os elétrons se emparelham (KOZLOWSKI *et al*, 2007; NENADIS & SIGALAS, 2008). Assim, é possível medir a capacidade de sequestro de radicais que a solução apresenta. Na Figura 6 fica evidenciado que as amostras de extrato de alho foram capazes de sequestrar eficientemente os radicais da solução, uma vez que na região de 518 nm observa-se que a absorbância foi sensivelmente reduzida.

O método de Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Alternantes (MCR-ALS) foi utilizado para recuperar os perfis das espécies espectrofotometricamente ativas presentes na solução. Para isso, considerou-se que a matriz exibiu posto igual a 2, ou seja, existiam 2 sinais espectrais diferentes a serem considerados. Os resultados da aplicação de MCR-ALS apresentaram desvio padrão de 0,011%, erro para ajuste de PCA de 0,53% e 99,87% de variância explicada para o ajuste dos dados (R^2), e estão apresentados na Figura 7.

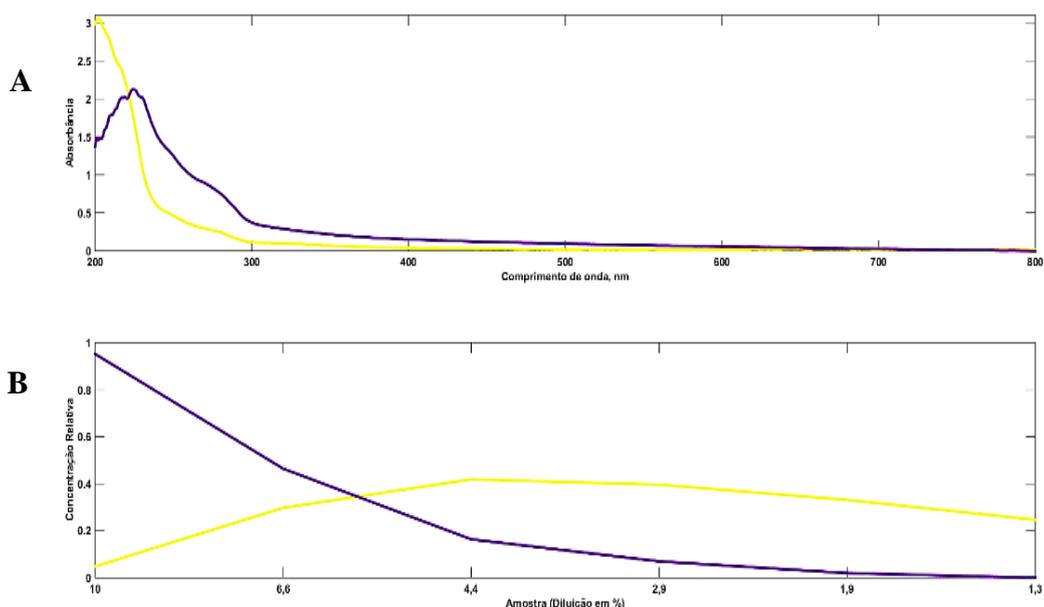


Figura 7 - Resultados da aplicação de MCR-ALS nos dados obtidos nas regiões ultravioleta e visível dos dos extratos de alho com DPPH submetidos a diferentes diluições. **A)** Espectros e **B)** respectivas concentrações relativas.

Com o aumento da massa da amostra, aumenta-se proporcionalmente a quantidade de espécies com potencial antioxidante, tais como flavonoides, carotenoides, taninos, alcaloides (OTUNOLA *et al*, 2010), compostos sulfurados, compostos fenólicos (MNAYER *et al*, 2014) e principalmente o ácido ascórbico (BERNAERT *et al*, 2012). Desta forma, pode-se sugerir que o espectro representado pela cor amarela refere-se às espécies espectrofotometricamente ativas produzidas pela adição do reagente DPPH, uma vez que estas aumentam de concentração. Portanto, este perfil foi utilizado para se encontrar a relação entre as concentrações recuperadas por MCR-ALS e as concentrações reais das amostras. Os resultados estão apresentados no gráfico da Figura 8.

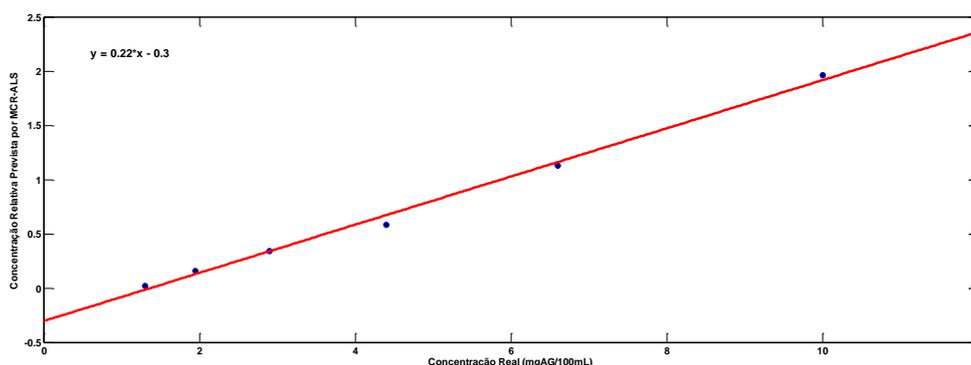


Figura 8 - Correlação entre as concentrações relativas recuperadas por MCR-ALS e as concentrações reais em miligramas de ácido gálico para cada 100mL.

A partir deste gráfico é possível estimar o modelo de calibração pseudo-univariado para previsão das concentrações das amostras. No entanto, como o objetivo do trabalho foi determinar a atividade antioxidante, os valores de concentração relativa estimados por MCR-ALS foram correlacionados com os valores estimados para porcentagem de inibição de radical via DPPH. Os valores de porcentagem de inibição via DPPH estão apresentados na Figura 9.

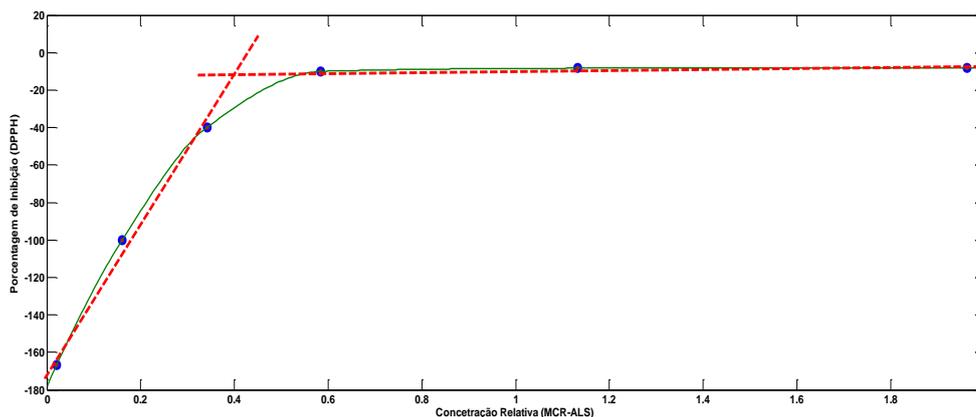


Figura 9 - Correlação entre as concentrações relativas recuperadas por MCR-ALS e as concentrações reais em miligramas de ácido gálico para cada 100mL.

Através da Figura 9 é possível observar que a relação entre a concentração das amostras e a porcentagem de inibição do radical DPPH não é linear, como descrito por Carmona-Jiménez *et al.* (2014). Sugeriu-se que essa não linearidade fosse decorrente de algum efeito nesta reação que reduzisse a quantidade de espécies radicalares sem formar os produtos esperados, que por sua vez apresentassem sinal na região UV-Vis.

Com o objetivo de verificar a formação de produtos que não apresentassem sinal na região UV-Vis, foram adquiridos espectros na região do infravermelho próximo, uma vez que esta independe da coloração dos compostos. Porém, esta região traz apenas informações com respeito aos sobretons das vibrações moleculares através de sinais extremamente parecidos e, aparentemente, pouco informativos já que não é possível atribuir bandas para grupos funcionais específicos. Desta forma faz-se necessária a aplicação de metodologias quimiométricas para extrair informação destes dados. Neste caso, é recomendável utilizar-se como pré-processamento a estratégia de “primeira derivada” dos espectros, pois esta possibilita agrupar todas as inflexões (curvaturas que tem um máximo) como zero, ajustando assim a linha de base. Fez-se também uma suavização dos espectros utilizando-se do algoritmo de Savitzky-Golay, presente no PLS-toolbox®. A Figura 10 apresenta os espectros pré-processados (primeira derivada e Savitzky-Golay) para a região do infravermelho próximo das mesmas amostras de alho, previamente descritas para a região UV-Vis. Nesta figura ficam evidenciadas as regiões que sofrem

maior influência da concentração (diluição) as amostras, a destacarem-se principalmente as regiões de 1200 – 1250 nm e 1300 – 1400 nm.

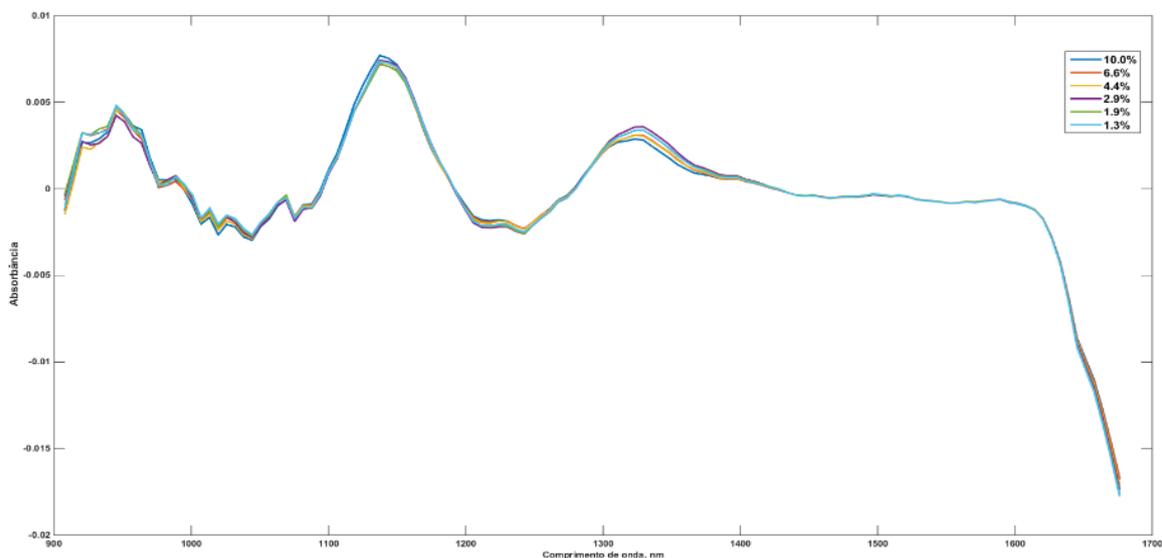


Figura 10 - Espectros pré processados das soluções das amostras de extrato de alho adicionadas a solução etanólica de DPPH obtidos na região infravermelha.

Da mesma forma que para os dados obtidos via espectroscopia UV-Vis, o MCR-ALS foi utilizado para recuperar os perfis das espécies espectrofotometricamente ativas, agora para a região do infravermelho próximo, presentes na solução. Assim, igualmente foram considerados 2 sinais espectrais diferentes. Neste caso, foi utilizada a restrição de não-negatividade apenas para as concentrações e, com isso, os resultados da aplicação de MCR-ALS apresentaram desvio padrão de $5,2 \times 10^{-5}$, erro para ajuste de PCA de 0,23% e variância explicada para o ajuste dos dados (R^2) de 99,99%. Os perfis de espectros puros e respectivas concentrações relativas estão apresentados na Figura 11.

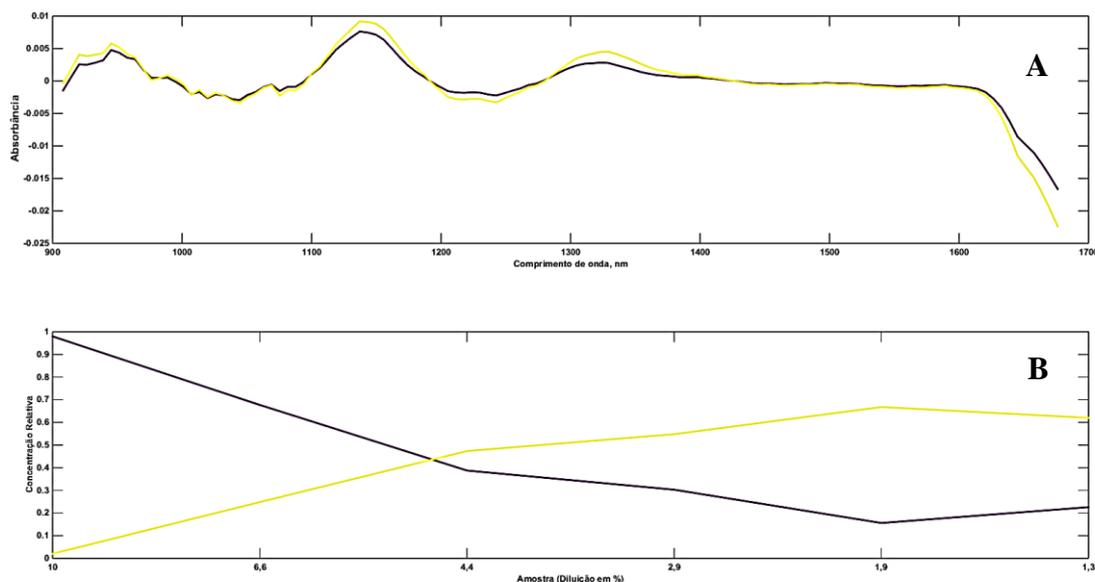


Figura 11 - Resultados da aplicação de MCR-ALS nos dados obtidos na região infravermelha próxima dos extratos de alho com DPPH submetidos a diferentes diluições. A) Espectros e B) respectivas concentrações relativas.

Assim como para a Figura 7, os perfis de espectros apresentados na Figura 11 (A) podem ser interpretados considerando-se que o espectro representado pela cor violeta é o espectro a ser reduzido, ou seja, aquele que será transformado no espectro representado pelo perfil em amarelo. O gráfico que se refere as concentrações relativas sugeridas pela aplicação de MCR-ALS (Figura 11 – B) reforça a teoria proposta por Carmona-Jiménez *et al* (2014), pois ao se monitorar a reação via espectroscopia no infravermelho, nota-se que a linearidade é mais evidente até 40% de inibição. Como é sabido, a espectroscopia na região do infravermelho não depende da cor. Isso sugere que algum outro efeito possa ocorrer neste tipo de reação, tal como a recombinação dos radicais que ocorre na etapa de terminação das reações radicalares. Este efeito reduz a quantidade de radicais no meio, porém, não leva a formação dos produtos esperados.

A ferramenta quimiométrica utilizada neste trabalho, MCR-ALS, permite monitorar quantitativa e qualitativamente as espécies a priori presentes na solução. Logo, pode-se matematicamente isolar o(s) perfil(is) de interesse. Portanto, a aplicação de MCR-ALS como forma de monitorar a atividade

antioxidante apresenta-se como uma ferramenta promissora para a avaliação da atividade antioxidante em alimentos.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos foram compatíveis com os alcançados por Carmona-Jiménez *et al* (2014), os quais relatam deficiências na metodologia via DPPH ao evidenciarem que não há uma relação linear entre inibição de radicais e a concentração das amostras. De acordo com estes, que mediram a atividade antioxidante utilizando DPPH e amostras de vinho, existe uma relação linear apenas abaixo de 40% de percentagem de inibição de DPPH e a concentração da amostra. No caso, Carmona-Jiménez *et al* sugerem que se utilize um outro parâmetro, denominado EC_{20} , que se refere a quantidade de amostra necessária para reduzir a atividade para o equivalente a 20% da concentração inicial. Esta região se relaciona com a região ainda linear entre porcentagem de inibição do radical DPPH e a concentração da amostra. As dificuldades encontradas em se aplicar esta metodologia e as incertezas dos resultados obtidos motivam estudos posteriores mais aprofundados à cerca da determinação de antioxidantes utilizando DPPH.

Os resultados sugerem que a metodologia de MCR-ALS pode ser aplicada para o monitoramento de parâmetros importantes de alimentos por permitir o isolamento matemático de sinais dos constituintes da matriz alimentar que se interessa estudar, fornecendo assim uma explicação mais próxima da realidade dos fenômenos observados. No entanto, para que se possa sugerir resultados mais precisos, mais estudos envolvendo outras matrizes alimentares são necessários.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVEZ, C.Q. DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, 2010.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Química Nova**, 29, 1401, 2006.

BERNAERT, N.; PAEPE, DE D.; BOUTEN, C.; CLERCQ, H. DE; STEWART, D.; BOCKSTAELE, V. E.; LOOSE, M. DE; DROOGENBROECK, B. V. Antioxidant capacity, total phenolic and ascorbate content as a function of the genetic diversity of leek (*Allium ampeloprasum* var. *Porrum*). **Food Chemistry**, v. 134, p. 669-677, 2012.

BERZAGHI, P.; SHENK, J. S.; WESTERHAUS, M.O. Local prediction with nearinfrared multi-product databases. **Jornal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 8, p. 1-9, 2000.

BIANCHI, M. de L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais Livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, p. 123-130, 1999.

BOLLIGER, F.P. Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. **Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, v. 28, p. 1-88, 2014.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidante activiy. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

CARMONA-JIMÉNEZ, Y; GARCÍA-MORENO, M.V.; IGARTURUBU, J.M.; BARROSO, C.G. Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidante activity of wine and by-products. **Food Chemistry**, v. 165, p. 198-204, 2014.

CHI, M.; ZHANG, C.; ZHENG, G.; MEI, X. Determination of radical scavenger in Chinese drug by spectrophotometry. **Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy**, v. 18, p. 567-568, 2003.

DE JUAN, A. ; NAVEA, S.; DIEWOK, J.; TAULER, R. Local rank exploratory analysis of evolving rank deficient systems. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 70, p. 11, 2004.

DE JUAN, A.; TAULER, R. Multivariate Curve Resolution (MCR) from 2000: progress in concepts and applications. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 36, p. 163-176, 2006.

DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1430-1435, 2011.

ESTEBAN, M.; ARIÑO, C.; DÍAZ-CRUZ, J. M.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; TAULER, R. Multivariate Curve resolution with alternating least squares optimization: a soft modelling approach to metal complexation studies by voltammetric techniques. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, p. 49-61, 2000.

FENNEMA, O.R.; PARKIN, K.L.; DAMODARAN, S. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª ed. Ed. Artmed, 2010.

FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S.; VOLPE, P.L.O. Quimiometria I: Calibração Multivariada, Um Tutorial. **Química Nova**, v. 22, p. 724-731, 1999.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, p. 61-68, 1997.

GARRIDO, M.; RIUS, F. X.; LARRECHI, M. S. Multivariate curve resolution alternating least squares (MCR-ALS) applied to spectroscopic data from

monitoring chemical reactions processes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, p. 2059-66, 2008

JAUMOT, J.; GARGALLO, R.; DE JUAN, A.; TAULER, R. An user friendly interface for MCR-ALS : a new tool for Multivariate Curve Resolution in MATLAB. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 79, p. 101, 2005.

KOWALSKI, B. Selectivity, Local Rank, Three-Way Data Analysis and Ambiguity in Multivariate Curve Resolution. **Jornal of Chemometrics**, v. 9, p. 31-58, 1995.

KOZLOWSKI, D.; TROUILLAS, P.; CALLISTE, C.; MARSAL, P.; LAZZARONI, R.; DUROUX, J. L. Density functional theory study of the conformational, electronic, and antioxidante properties of natural chalcones. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 111 (6), p. 1138-1145, 2007.

KURECHI, T.; KIKUGAWA, K.; KATO, T. Studies on the antioxidants. XIII Hydrogen donation capability of antioxidants to 2,2-Diphenil-1-picylhidrazyl. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 2089-2093, 1980.

LAJOLO, F. M.; NUTTI, M. R. Transgênicos: bases científicas da sua segurança, **Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, São Paulo, 2003.

MARÇO, P.H.; POPPI, R.J.; SCARMINIO, I.S.; TAULER, R. Investigation of the pH effect and UV radiation on kinetic degradation of anthocyanin mixtures extracted from *Hibiscus acetosella*. **Food Chemistry**, v. 125 (3), p. 1020-1027, 2011.

MARÇO, P.H.; VALDERRAMA, P.; ALEXANDRINO, G.L.; POPPI, R.J.; TAULER, R. Multivariate curve resolution with alternating least squares: description, operation and applications. **Química Nova**, v. 37, p. 1525-1532, 2014.

MARIUTTI, L.R.B.; BRAGAGNOLO, N. A oxidação lipídica em carne de frango e o impacto da adição de sálvia (*Salvia officinalis*, L.) e de alho (*Allium sativum*, L.) como antioxidantes naturais. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.68, p.1-11, 2009

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.dos; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidante activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

MNAYER, D.; FABIANO-TIXIER, A. S.; PETITCOLAS, E.; HAMIEH, T.; NEHME, N.; FERRANT, C.; FERNANDEZ, X.; CHEMAT, F. Chemical composition, antibacterial and antioxidante activities of six Essentials oils from the Alliaceae family. **Molecules**, v. 19, p. 20034-20053, 2014.

MORAIS, C. da S.; LEME, L.M.; VALDERRAMA, P.; MARÇO, PH. Aplicação de calibração multivariada em dados de espectroscopia UV-Visível para previsão da acidez total em vinhos. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 6, p. 70–79, 2014.

NENADIS, N., SIGALAS, M. P. A DFT study on the radical scavenging activity of maritimetin and related aurones. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 112, p. 12196-12202, 2008.

OTUNOLA, G. A.; OLOYEDE, O. B.; OLADIJI, A. T.; AFOLAYAN, A. J. Comparative analysis of the chemical composition of three spices – *Allium sativum* L. *Zingiber officinale* Rosc. And *Capsicum frutescens* L. commonly consumed in Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v. 9(41), p. 6927-6931, 2010.

PARASTAR, H.; TAULER, R. Multivariate Curve Resolution of Hyphenated and Multidimensional Chromatographic Measurements: A New Insight to Address Current Chromatographic Challenges. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 286-297, 2014.

PEREIRA, J.; LEME, L.M.; PERDONCINI, M.R.F.G.; VALDERRAMA, P.; MARÇO, P.H.. Determination of *Salmonella* sp in Whole Milk by NIR and Chemometrics. 17TH **International Conference On Near Infrared**

Spectroscopy, Book of Abstracts, paper nº 34376. Disponível em: <<https://proceedings.galoa.com.br/nir-abstracts/papers>>. Acesso em: 2015.

PISOSCHI, A.M.; NEGULESCU, G.P. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. **Biochemistry and Analytical Biochemistry**, v. 1, 2011.

ROBINSON, C. Genetic modification technology and food. **International Life Science Institute**, Brussels, Europe, 2001.

SCHERER, R.; GODOY, H.T. Antioxidant Activity Index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl Method. **Food Chemistry**, v. 112, p. 654-658, 2009.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J. **Fundamentos de Química Analítica**, 8ª ed., Thomson Learning Ltda, 2006.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Química Orgânica**. 10ª Ed., John Wiley & Sons Inc., 2012.

TAULER, R. Multivariate curve resolution applied to second order data. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 30, p. 133-146, 1995.

TAYLOR & FRANCIS GROUP. **Practical Guide to Chemometrics**, CRC Press, 2006.

VALDERRAMA, L.; GONÇALVES, R.P.; MARÇO, P.H.; VALDERRAMA, P. UV-Vis spectrum fingerprinting and chemometric method in the evaluation of extra virgin olive oil adulteration and fraud. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 5, n. 2, p. 32-40, 2014.

WANG, X.; LIU, R.; YANG, Y.; ZHANG, M. Isolation, purification and identification of antioxidants in an aqueous aged garlic extract. **Food Chemistry**, v.187, p. 37-43. 2015