



Métodos Eletroquímicos usados para Avaliação da Atividade Antioxidante de Produtos Naturais

Nathasha S. REIS¹, Sílvia H.P. SERRANO², Ricardo MENEGHATTI¹ & Eric de S. GIL^{1*}

¹ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás,
Av. Universitária com 1ª Avenida s/n, CEP: 74605-220 Goiânia, GO, Brasil

² Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brasil.

RESUMO. O presente artigo apresenta uma revisão sobre as aplicações dos métodos eletroquímicos na identificação e quantificação da atividade antioxidante. Trabalhos descrevendo o uso de técnicas voltamétricas (cíclica e de pulso diferencial), coulometria e sistemas de separação com detecção eletroquímica, utilizando diferentes tipos de eletrodos (ex. Pt, carbono vítreo, pasta de carbono), assim como técnicas combinadas (CRAC, biossensor de DNA) foram compilados. Uma breve leitura sobre grande quantidade de trabalhos descritos demonstra que é necessário estabelecer critérios de medida bem definidos que permitam comparações entre diferentes resultados. Sobre este aspecto, a padronização dos procedimentos de medida é ainda necessária.

SUMMARY. "Electrochemical Methods Used for Evaluation of Antioxidant Activity of Natural Products". This article presents a review about the application of electrochemical methods in the identification and quantification of antioxidant activity. Reports describing the utilization of voltammetry (cyclic and differential pulse), coulometry and amperometric detection systems, using the most different types of electrodes such as Pt, glassy carbon, pyrolytic graphite, carbon paste, chemical modified electrodes and biosensors, as well combined techniques (CRAC, DNA biosensor) were compiled. A brief reading over the enormous quantity of the reported data makes possible to conclude that it is necessary to get a measure criterion which allows the comparison between different results. Under this aspect, the standardization of the measurement procedures still is necessary.

INTRODUÇÃO

Várias evidências epidemiológicas sugerem que o consumo de antioxidantes de produtos naturais (PN), incluindo determinados tipos de frutas, chás, legumes e grãos reduz significativamente a incidência de doenças crônicas, como câncer, doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral e outras patologias relacionadas ao envelhecimento. Estes benefícios estão associados à presença de ativos de reconhecida capacidade antioxidante^{1,2}. O estudo do poder antioxidante e a determinação destes ativos³⁻⁶ são úteis para avaliação da eficácia e controle de qualidade destes compostos ou produtos, requerendo diferentes métodos analíticos, *i.e.* métodos colorimétricos⁷⁻¹¹, biológicos^{3,8,12} e ele-

troquímicos¹³⁻¹⁷, entre outros métodos instrumentais^{10,11}. As técnicas eletroquímicas apresentam grande potencial para caracterização detalhada de fitoantioxidantes, pois fornecem parâmetros físico-químicos capazes de mostrar não apenas o potencial redox, mas também números de elétrons envolvidos na etapa de transferência de carga (n), mecanismos de transferência de carga e influência de prótons, constantes de reação, etc.¹³⁻¹⁷. Entre as técnicas mais difundidas destacam-se a voltametria cíclica e de pulso diferencial¹³⁻²⁰, coulometria²¹, bem como técnicas indiretas^{22,23}.

As técnicas eletroquímicas se aplicam ao estudo de espécies eletroativas, entre as quais se incluem os compostos antioxidantes. No que diz

PALAVRAS-CHAVE: Atividade antioxidante, Voltametria, Métodos eletroanalíticos.

KEY WORDS: Antioxidant activity, Voltammetry, Electroanalytical methods.

* Autor a quem correspondência deve ser enviada: E-mail: ericsgil@gmail.com

respeito à atividade antioxidante se aplicam tanto a substâncias isoladas, quanto a extratos vegetais, fitoterápicos ou outros produtos compostos comumente empregados como antioxidantes.

No caso de extratos vegetais, assim como outros produtos de composição heterogênea, as inerentes variedades de interações químicas aumentam expressivamente a complexidade destes sistemas. A determinação da atividade antioxidante de extratos vegetais brutos ou parcialmente purificados, é geralmente expressa pela composição de polifenóis totais^{15,16}.

Em estudos mais consistentes, as determinações da atividade antioxidante de extratos brutos, normalmente envolvem diferentes técnicas, as quais se complementam e fornecem resultados mais precisos, quanto à atividade antioxidante total e a capacidade de varredura antiradicaral²³⁻²⁷.

A utilização de métodos hidrodinâmicos ou ainda, métodos acoplados a técnicas de separação é também uma boa alternativa, principalmente quando se pretende melhorar a correlação entre concentração de fenóis totais e atividade antioxidante²⁵.

A simples análise comparativa entre perfis de voltamogramas obtidos para extratos vegetais e respectivos marcadores, *i.e.* ácido ascórbico, ácido caféico, catequina, ácido *p*-cumárico, etc., bem como de demais parâmetros eletroquímicos, permite estimar a contribuição de cada composto sobre o poder antioxidante do extrato^{5,6,18}. Em estudos feitos para extratos de folhas verdes e vermelhas de *Elastena rugosa*, se observou que os potenciais de oxidação obtidos eram mais próximos ao dos padrões de cianidina, petunidina e ácido caféico, podendo-se admiti-los como principais contribuintes para este sinal, fato confirmado por outras técnicas analíticas⁶.

Já a análise de substâncias isoladas permite não somente a possibilidade da caracterização eletroquímica, como também de correlações entre aspectos estruturais e mecanismo de atividade antioxidante²⁸⁻³¹. Vários fitoantioxidantes comumente presentes em quantidades consideráveis em várias plantas têm sido investigados por técnicas eletroquímicas. Ácido ascórbico, ácido elágico, resveratrol, flavonóides, hesperidina, taninos, antocianinas e derivados do ácido benzoico e cinâmico são alguns exemplos de moléculas amplamente distribuídas em plantas que exibem considerável atividade antioxidante^{20,27}. No caso de compostos isolados, vários aspectos

podem ser bem avaliados eletroquimicamente no que diz respeito aos mecanismos de oxido-redução: a) avaliação do efeito de substituintes e conjugação de duplas no deslocamento de potenciais redox²⁸⁻³⁰; b) efeito da participação do próton ou dependência do pH (Fig. 1)^{19,21,22}; c) efeito de solvente³¹; d) número de elétrons ou etapas envolvidas^{17-21,29}.

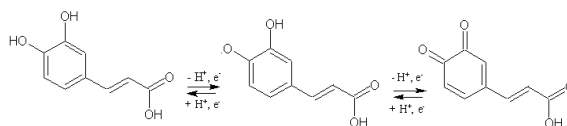


Figura 1. Mecanismo de oxidação do ácido caféico.

Considerando a importância do efeito quelante para proteção de processos oxidativos, a interação de metais como zinco e cobre, com três flavonóides abundantes, rutina, quercetina e catequina, foi também investigada por técnicas eletroquímicas. Um, dois e três átomos de metal foram consumidos durante os processos de quelção envolvendo a catequina, quercetina e rutina, respectivamente. Em todos os casos, a força de ligação mostrou-se dependente tanto do tipo de metal, quanto dos ligantes presentes³².

TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS

As técnicas voltamétricas correlacionam potenciais de oxidação, intensidade de corrente e/ou outros parâmetros eletroquímicos com a capacidade antioxidante, e se mostram mais seletivas e sensíveis que demais métodos espectrométricos para a avaliação da atividade antioxidante, bem como mais reprodutíveis que as análises biológicas⁵.

Entre as técnicas mais difundidas destacam-se a voltametria cíclica (VC) e a voltametria de pulso diferencial (VPD). As informações mais importantes fornecidas pela voltametria cíclica são $I_{p,a}$, $I_{p,c}$, $E_{p,a}$ e $E_{p,c}$, respectivamente, correntes de picos anódico e catódico e potenciais de pico anódico (relativo ao processo de oxidação) e catódico (relativo ao processo de redução), respectivamente^{19,33}. Quanto maior o valor de $E_{p,a}$, menor é o poder doador de elétron da espécie em estudo e portanto, teoricamente, menor seu poder antioxidante¹⁸.

O perfil voltamétrico permite avaliar se este processo é reversível como, por exemplo, no sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, se os produtos formados sofrem reações químicas subsequentes ou não, determinar suas respectivas constantes de equilíbrio, etc.³⁴.

Em sistemas eletroquimicamente reversíveis, o potencial formal pode ser considerado como a mediana entre $E_{p,a}$ e $E_{p,c}$. Se a velocidade de transferência eletrônica é suficientemente rápida, os níveis de corrente podem ser correlacionados com a concentração da espécie eletroativa por meio da equação de Randles-Sevičk³³ [1].

$$I = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot v^{1/2} \cdot C \quad [1]$$

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

A determinação de picos de oxidação de compostos polifenólicos como revesratrol, ácido caféico e quercetina, por VC, tem sido efetuada em diferentes eletrodos e eletrólitos¹⁷⁻²⁹.

A composição do eletrólito suporte pode alterar a superfície do eletrodo utilizada e influenciar os potenciais de oxidação e redução observados. Um exemplo é a oxidação de fenol em superfícies de Pt na presença de tampão fosfato/metanol: o processo é facilitado devido a formação de um filme de óxido/hidróxido de Pt, sobre o qual o fenol e seus produtos de oxidação eletroquímica são posteriormente oxidados¹³. A intensidade de corrente do pico anódico, registrado em 600 mV *vs* Ag/AgCl, aumentou sucessivamente durante os primeiros 50 ciclos contrariando o efeito que se observa em soluções aquosas, em que há supressão em geral imediata após primeiro ciclo.

Por outro lado, devido a possibilidade de ocorrência de reações químicas acopladas a processos eletroquímicos, a correlação entre atividade antioxidante e potencial de oxidação e/ou intensidade de corrente nem sempre é simples e direta. Assim, catecóis que se oxidam a radicais fenóxil, podem sob determinadas condições, produzir outras espécies eletroativas e/ou filmes com propriedades catalíticas, resultando em aumento dos níveis de corrente esperados¹² ou ainda produzir filmes poliméricos com propriedades isolantes que conduzam à passivação da superfície³⁵.

TÉCNICAS COLUMÉTRICAS

As técnicas coulométricas baseiam-se na medida da quantidade de eletricidade ou carga requerida para oxidar ou reduzir um analito alvo. Baseiam-se no princípio da proporcionalidade

entre número de elétrons (n) que flui pelo eletrodo e quantidade em moles de substância eletroativa envolvida na reação eletroquímica (1ª Lei de Faraday), logo um requisito importante é que a reação eletrolítica se dê com máxima eficiência. Através do uso da eletrólise em fluxo contínuo, observaram-se boas correlações entre intensidade de corrente (I) e atividade antioxidante de diversas espécies eletroativas (ex. catequina, ácido elágico e curcumina). Ademais, a aplicação destas técnicas a compostos polifenólicos permite ainda relacionar os valores de n (número de elétrons) ou de I (corrente) aos números de hidroxilas¹⁴.

Os resultados obtidos para a atividade antioxidante de 34 produtos naturais através de técnicas diversas demonstraram que a correlação entre métodos eletroquímicos e capacidade anti-radicalar, *i.e.* ensaio DPPH é maior quando comparada ao número de elétrons (eletrólise em fluxo contínuo) e ao potencial de oxidação (voltametria cíclica)¹⁷.

TÉCNICAS ACOPLADAS OU INDIRETAS

Além do uso de detectores eletroquímicos e sistemas de separação, HPLC³⁶, eletroforese capilar³⁷ ou sistemas de injeção em fluxo³⁸, bem como o desenvolvimento de sensores e biossensores^{23,37,39-41}, várias outras técnicas baseadas em métodos eletroquímicos vem sendo propostas, entre estas destacam-se os métodos baseados na proteção a oxidação de bases de DNA e aqueles baseados na capacidade de redução do Fe^{3+} e Ce^{4+} .

Biossensores de DNA

Um procedimento simples para a detecção voltamétrica da atividade antioxidante de extratos de plantas ou de substâncias isoladas foi aquele baseado na proteção contra danos no DNA. Neste método, um eletrodo cuja superfície foi previamente modificada com DNA é submetido a voltametria cíclica, em diferentes soluções contendo os extratos vegetais ou fitoantioxidantes, cuja atividade antioxidante se pretende determinar. Em princípio os ensaios efetuados em soluções eletrolíticas com maior poder antioxidante, requerem maiores potenciais para oxidação das bases de DNA (ex. adenina, guanina)⁴⁰⁻⁴². Os resultados para atividade antioxidante obtidos pelo método proposto para compostos fenólicos, tais como ácidos caféico e rosmarínico, bem como para alguns extratos vegetais, apresentou boa correlação com métodos colorimétricos tradicionais como o método de DPPH²³.

Método CRAC

Testes para determinação da capacidade antioxidante diferem entre si, basicamente quanto ao tipo de radical ou espécie oxidante gerado que reage a molécula-alvo (antioxidantes) para produzir um sinal analítico mensurável (ex. mudança de cor). Já o mecanismo de ação antioxidante ocorre basicamente, por dois processos: Transferência de Hidrogênio (hydrogen atom transfer - HAT) ou transferência de um elétron (“single electron transfer”-SET), os quais, dependendo de aspectos estruturais e físico-químicos orgânicos podem ocorrer de forma isolada ou em paralelo.

Neste contexto, vários métodos indiretos têm sido propostos, entre este o método colorimétrico FRAC (“Ferric Reducing/Antioxidant Capacity”) ⁴³ e seu derivado eletroanalítico CRAC (“Ceric Reducing/Antioxidant Capacity”).

O método CRAC emprega a cronoamperometria como técnica de detecção e utiliza uma solução ácida de sulfato de Cério (IV) como oxidante. O método em questão baseia-se no poder de redução das amostras sobre Ce^{+4} e apresentou boa correlação com outros métodos ⁴⁴. Outros sim, em trabalhos recentes o método apresentou também boa correlação com estudos de “Quantitative Structure Activity Relations-

hip”(QSAR) ⁴⁵. Uma desvantagem do método reside no fato de que $Ce(IV)$ é um forte agente oxidante, de modo que em amostras mais complexas pode-se perder seletividade, porém por outro lado inúmeras vantagens podem ser citadas, dentre elas, a maior facilidade no pré-tratamento da amostra, a utilização de equipamentos mais baratos e maior simplicidade analítica, além do inerente poder oxidante do Ce^{4+} (potencial redox de 1,29 V *versus* Ag/AgCl) que reage praticamente com todos os antioxidantes presentes na dieta humana.

CONCLUSÕES

Considerando-se os diferentes mecanismos pelo qual a ação antioxidante de um composto pode se manifestar, como poder redutor, quelação e/ou capacidade de estabilizar radicais livres, tanto a seletividade, quanto a exatidão de métodos convencionais (ex. métodos bioquímicos e colorimétricos) pode ser comprometida, fazendo-se necessário o emprego de ensaios combinados ou do uso de métodos alternativos. Neste contexto, os métodos eletroquímicos surgem como excelente alternativa, tanto para determinação da atividade antioxidante, quanto para elucidação de mecanismos redox de produtos naturais e extratos vegetais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cleland, R.E. & S.C. Grace (1999) *FEBS Lett.* **457**: 348-52.
- Collins, A.R. & M. Aisch (2007) *Acta Hort.* **753**: 825-36.
- Koleckar, V., O. Lubomir, E. Brojerova, Z. Rehakova, F. Cervenka, K. Kubikova, K. Kuca, D. Jun, M. Polasek, J. Kunes & L. Jahodar (2008) *Enzym. Inhib. Med. Chem.* **23**: 218-24.
- Tawaha, K., F. Q. Alali, M. Gharaibeh, M. Mohammad & T. El-Elimat (2007) *Food Chem.* **104**: 1372-8.
- Bara, M.T.F., S.H.P. Serrano, E.R. Asquieri, T.C. Lúcio & E.S. Gil (2008) *Lat. Am. J. Pharm.* **27**: 89-92.
- Neill, S.O., K.S. Gould, P.A. Kilmartin, K.A. Mitchell & K.R. Markham (2002) *Plant Cell Environ.* **25**: 539-47.
- Butera, D., L. Tesoriere, F. Di Gaudio, A. Bongiorno, M. Allegra, A.M. Pintaudi, R. Kohen & M.A. Livrea (2002) *J. Agr. Food Chem.* **50**: 6895-901.
- Russo, G. L. (2007) *Biochem. Pharmacol.* **74**: 533-44.
- Yoo, K. S., L. Pike, B.S. Patil, D. Leskovar, K. Crosby & S. King (2007) *Acta Hort.* **744**: 101-6.
- Welch, C.R., Q. Wu & J.E. Simon (2008) *Curr. Anal. Chem.* **4**: 75-101.
- Harnafi, H. & S. Amrani (2008) *Phcog. Rev.* **2**: 20-2.
- Hotta, H., H. Sakamoto, S. Nagano, T. Osakai & Y. Tsujino (2002) *BBA-Gen. Subjects* **1572**: 123-32.
- Andreescu, S., D. Andreescu & O.A. Sadik (2003) *Eletrochem. Commun.* **5**: 6818.
- Kang, J., X. Lu, H. Zeng, H. Liu & B. Lu (2002) *Anal. Lett.* **35**: 677-86.
- Blasco, A.J., M.C. Gonzales & A. Escarpa (2004) *Anal. Chim. Acta* **511**: 71-81.
- Blasco, A.J., M.C. Gonzales & A. Escarpa (2005) *Anal. Chim. Acta* **539**: 237-44.
- Hotta, H., M. Ueda, S. Nagano, Y. Tsujino, J. Koyama & T. Osakai (2002) *Anal. Biochem.* **303**: 66-72.
- Papanikos, A., J. Eklund, W.R. Jackson, V.B. Kenche, E.M. Campi, A.D. Robertson, B. Jarrott, P.M. Beart, F.E. Munro & J.K. Callaway (2002) *Aust. J. Chem.* **55**: 205-12.
- Chevion, S., M.A. Roberts & M. Chevion (2000) *Free Rad. Biol. Med.* **28**: 860-70.
- Brett, A.M.O & M.E. Ghica (2003) *Electroanal.* **15**: 1745-50.

21. Hotta, H., S. Nagano, M. Ueda, Y. Tsujino, J. Koyama & T. Osakai (2002) *Biochim. Biophys. Acta.* **1572**: 123-32.
22. Haluk, J.P. & M. Metche (1970) *Chim. Anal.* **52**: 1245-55.
23. Labuda, J., M. Buckova, L. Heilerova, A. Caniova-Ziakova, E. Brandsteterova, J. Mattusch, R. & Wennrich (2002) *Sensors* **2**: 1-10.
24. El-Shaer, S.N. & M.O.A.R Amin (2003) *Bull. Fac. Pharm.(Cairo University)* **41**: 301-9.
25. De Andrade, C.A., C.K. Costa, K. Bora, M.D. Miguel, O.G. Miguel & V.A. Kerber (2007) *Rev. Bras. Farmacogn.* **17**: 231-5.
26. Agbor, G.A., J.E. Oben & J.Y. Ngogang (2007) *Afric. J. Trad. Complem. Med.* **4**: 495-500.
27. Roginsky, V., T. Barsukova, C.F. Hsu & P.A. Kilmartin (2003) *J. Agric. Food Chem.* **51**: 5798-802.
28. Zare, H.R., M. Namazian & N. Nasirizade (2005) *J. Electroanal. Chem.* **584**: 77-83.
29. Janeiro, P. & A.M.O. Brett (2004) *Anal. Chim. Acta* **518**: 109-15.
30. Hendrickson, H.P., A.D. Kaufman & C.E. Lunte (1994) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **12**: 325-34.
31. Kosina, P., V. Kren, R. Gebhardt, F. Grambal, J. Ulrichova & D. Walterova (2002) *Phytoter. Res.* **16**: S33-9.
32. Esparza, I., I. Salinas, C. Santamaria, J.M.Garcia-Mina & J.M. Fernandez (2005) *Anal. Chim. Acta* **543(1-2)**: 267-74.
33. Brett, C.M.A. & A.M.O. Brett (1993) *Electrochemistry: principles, methods, and applications*. Oxford University Press, Oxford.
34. Julião, M.S., E.I. Ferreira, N.G. Ferreira & S.H.P. Serrano (2006) *Electrochim. Acta* **51**: 5080-6.
35. Kang, S. & K.H. Shiu (2004) *J. Electroanal. Chem.* **574**: 63-70.
36. Robards, K. (2003) *J. Chromat. A.* **1000**: 657-91.
37. Riber, J., C. De La Fuente, M.D. Vazquez, M.L. Tascón & P.S. Batanero (2000) *Talanta* **52**: 241-52.
38. Chen, G., H. Zhang & J. Ye (2000) *Anal. Chim. Acta* **423**: 69-76.
39. Lima, A.W.O., V.B. Nascimento, J.J. Pedrotti & L. Angnes (1997) *Anal. Chim. Acta* **354**: 325-31.
40. Brett A.M.O. & V.C. Diculescu (2004) *Bioelectrochem.* **64**: 143-50.
41. Zhu, Z., C. Li & N.Q. Li (2002) *Microchem. J.* **71**: 57-63.
42. Gil E.S., Serrano S.H.P., Ferreira E.I. & L.T. Kubota (2002) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **29**: 579-84.
43. Benzie I.F. & J.J. Strain (1996) *Anal. Biochem.* **239**: 70-6.
44. Ferreira, R.Q. & LA. Avaca (2008) *Quim. Nova* **31**: 2169-73.
45. Ferreira, R.Q. & LA. Avaca (2009) *SIBEE*, Fortaleza-Brasil 19-22 de Abril de 2009.