



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
MATERIAIS

FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA APLICADA AO DESENVOLVIMENTO DE
ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Anallyne Nayara Carvalho Oliveira Cambrussi
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Alessandra Braga Ribeiro

Teresina - Piauí

2018

ANALLYNE NAYARA CARVALHO OLIVEIRA CAMBRUSSI

**FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA APLICADA AO DESENVOLVIMENTO DE
ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Piauí – UFPI, como requisito complementar à obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia dos Materiais.

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Alessandra Braga Ribeiro

Teresina-Piauí

2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Divisão de Processos Técnicos

C178f Cambrussi, Anallyne Nayara Carvalho Oliveira.
Fotocatálise heterogênea aplicada ao desenvolvimento de ensaios
para avaliação de atividade antioxidante / Anallyne Nayara Carvalho
Oliveira Cambrussi. -- 2018.
156 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de
Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais,
Teresina, 2018.

“Orientação: Prof.^a Dr.^a Alessandra Braga Ribeiro.”

1. Fotocatálise. 2. Espécies reativas de oxigênio. 3. Ensaios de
antioxidantes. 4. TiO₂. I. Título.

CDD 660.284 43

ANALLYNE NAYARA CARVALHO OLIVEIRA CAMBRUSSI

**“FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA APLICADA AO DESENVOLVIMENTO
DE ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE”**

Dissertação submetida à coordenação do curso de Pós-graduação em Ciência e Engenharia dos Materiais da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Engenharia dos Materiais.

Aprovada em: 05/12/2018

Banca Examinadora:

Alessandra B. Ribeiro

Profa. Dra. Alessandra Braga Ribeiro
Universidade Federal do Piauí
Orientadora

Josy Anteyeli Osajima

Profa. Dra. Josy Anteyeli Osajima
Universidade Federal do Piauí
Examinadora Interno

Mariana de Moraes Sousa

Profa. Dra. Mariana de Moraes Sousa
Instituto Federal do Piauí
Examinadora Externo

DEDICATÓRIA

*Ao homem que idealizou, apoiou e permitiu que esse sonho tornasse realidade, **Yuri Cambrussi da Silva**, sem você nenhuma conquista valeria a pena.*

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, em quem estão escondidos todos os tesouros da sabedoria e da ciência, quem me deu a vida e a paixão por vencer desafios e ultrapassar obstáculos.

Ao meu amado esposo, **Yuri Cambrussi da Silva**, quem incentivou, apoiou, idealizou e possibilitou a realização desse sonho, obrigada **marido**, não apenas por me dar o suporte necessário, mas também por se dispor a estudar comigo, a me aconselhar nos meus momentos de dúvidas, a me tranquilizar nos momentos de ansiedade, sem seu apoio nada disso seria possível.

À **Ana Lúcia Carvalho dos Santos Oliveira**, minha **mãe**, responsável pela formação do meu caráter, obrigada mãe por plantar e semear em mim o amor pelos estudos, a mania de sonhar grande e o desejo de crescer sempre.

Ao **Josivaldo dos Santos Oliveira**, meu **pai**, o homem mais honesto e de caráter puro, nunca duvidou da minha capacidade, acreditou em mim mesmo quando nem eu mesma tinha tanta certeza, obrigada pai, pelo amor, carinho e toda dedicação.

À minha orientadora **Prof.^a Dr.^a Alessandra Braga Ribeiro**, que representa o exemplo de profissionalismo e competência, foi a inspiração para construir minha carreira acadêmica. Obrigada pela orientação, confiança, oportunidade, amizade, difusão de conhecimento, compartilhamento de ideias e apoio necessário para o meu amadurecimento científico e pessoal.

Ao meu amigo **Alan Ícaro**, pela grande amizade, por ter me mostrado cada pedaço do LIMAV e me ensinado a manusear cada equipamento. Obrigada pelas conversas animadas, pelos ensinamentos, aventuras e companheirismo nos fins de semana e feriados quando eu sentia medo de ir sozinha para o laboratório.

Às minhas companheiras de capuccino **Fran, Conceição e Ana Larisse**, pela grande amizade, pelas tardes de lanche compartilhadas, por me socorrer nas análises que eu ainda não dominava e pelos momentos de *brainstorming* para transformar esse projeto em uma pesquisa excelente.

Ao meu amigo **Marcel Leiner de Sá**, que com seu grande conhecimento e grande coração me orientou na jornada de trabalhar com óxidos, me forneceu material e *know-how* necessário sempre que eu precisei.

Ao meu amigo **Alex de Meireles Neri**, com quem iniciei uma amizade ainda na graduação, na disciplina de física 1 pela qual passamos com muito esforço e muitas horas de

estudos. Hoje, 10 anos depois, ele ainda continua me ajudando com sua experiência e inteligência inigualáveis, além da sua paz de espírito contagiante.

Ao **Kelson Fernandes Silva**, por todo suporte nas disciplinas e necessidades do laboratório, por sua amizade, conselhos, caronas, ajuda e companheirismo.

E por fim, a todas as pessoas que estiveram ao meu lado, e contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento e êxito deste trabalho.

"Penso 99 vezes e nada descobro; deixo de pensar, mergulho no silêncio, e a verdade me é revelada (...). Precisamos tomar cuidado para não fazer do nosso intelecto o nosso Deus. Ele tem músculos poderosos, mas não tem nenhuma personalidade (...). Realidade é meramente uma ilusão, embora bastante persistente (...). A imaginação é mais importante que o conhecimento (...). Uma pessoa só começa a viver quando consegue viver fora de si mesmo"

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
1 INTRODUÇÃO.....	28
2 ESPÉCIES REATIVAS E ESTRESSE OXIDATIVO	30
3 ANTIOXIDANTES.....	34
3.1 MECANISMO DE AÇÃO DOS ANTIOXIDANTES.....	35
4 METODOLOGIAS <i>in vitro</i> PARA AVALIAR A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	37
4.1 ATIVIDADE DE ELIMINAÇÃO DO DPPH*	38
4.2 ENSAIO ABTS ^{•+}	39
4.3 REDUÇÃO DE ÍONS METÁLICOS (ENSAIO FRAP E CUPRAC).....	40
4.4 ENSAIO ORAC.....	42
5 GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO A PARTIR DA FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA	43
5.1 FOTOCATALISADOR DIÓXIDO DE TITÂNIO (TiO ₂)	44
5.2 PROCESSO DE GERAÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO (O ₂ ^{•-}).....	45
5.3 PROCESSO DE GERAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H ₂ O ₂).....	46
5.4 PROCESSO DE GERAÇÃO DO OXIGÊNIO SINGLETE (¹ O ₂).....	47
5.5 PROCESSO DE GERAÇÃO DO RADICAL HIDROXILA (•OH).....	47
6 GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO A PARTIR DA FOTOCATÁLISE APLICADA A ENSAIOS ANTIOXIDANTES.....	48
7 CONCLUSÃO.....	51
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
CAPÍTULO 2: ESTUDO DA FOTODEGRADAÇÃO DE CORANTES EM SUSPENSÃO DE TIO ₂ E ZNO UTILIZANDO ENSAIOS MINIATURIZADOS.....	62
1 INTRODUÇÃO.....	66

2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	69
2.1 MATERIAIS.....	69
2.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES	70
2.3 CURVAS DE CALIBRAÇÃO.....	70
2.4 EXPERIMENTOS DE DEGRADAÇÃO FOTOCATALÍTICA	71
2.5 ANÁLISE UV-VIS.....	73
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
3.1 CURVAS DE CALIBRAÇÃO.....	73
3.2 CINÉTICA DA FOTODEGRADAÇÃO	74
3.3 EFEITO DA FONTE DE RADIAÇÃO E DO FOTOCATALISADOR.....	78
4 CONCLUSÕES	82
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
CAPÍTULO 3: SÍNTESE DO CATALISADOR TiO ₂ /PAL COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA DESENVOLVIMENTO DE ENSAIOS ANTIOXIDANTES BASEADO EM GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	
1 INTRODUÇÃO.....	93
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	96
2.1 REAGENTES E SOLUÇÕES	96
2.2 SÍNTESE DO COMPÓSITO TIO ₂ SUPORTADO NA PLYGORSKITA.....	97
2.3 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AGNPS).....	98
2.4 CATALISADOR COMPOSTO DE PLYGORSKITA-TIO ₂ , INCORPORADO COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs/TiO ₂ -PAL)	98
2.5 CARACTERIZAÇÃO DO CATALISADOR AgNPs/TiO ₂ -PAL.....	98
2.6 ENSAIOS DE CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	99
2.7 PAPEL DAS ROS NA EFICIÊNCIA FOTOCATALÍTICA	101
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	102
3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AGNPS.....	102

3.2 CARACTERIZAÇÃO DO CATALISADOR AGNPS/TIO ₂ -PAL.....	102
3.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA RECONHECIMENTO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	105
3.4 ESPECTROS UV-VIS DO AA73	109
3.5 EFEITO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO ROS	110
4 CONCLUSÕES	115
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
CAPÍTULO 4: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA COLORIMÉTRICA PARA RECONHECIMENTO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE BASEADA EM GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	127
1 INTRODUÇÃO.....	130
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	132
2.1 MATERIAIS.....	132
2.2 DETECÇÃO DO CORANTE AMARELO ÁCIDO 73 (AA73)	132
2.3 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA)	132
2.4 PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO	134
2.4.1 ESPECIFICIDADE	135
2.4.2 LINEARIDADE	135
2.4.3 REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA	136
2.4.4 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO.....	136
2.4.5 ESTABILIDADE	137
2.4.6 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DO MÉTODO	137
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	137
3.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO	137
3.2 ESPECIFICIDADE	138
3.3 LINEARIDADE	140
3.4 REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA	141

3.5 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	142
3.6 ESTABILIDADE	143
3.7 ESPECTROSCOPIA UV-VIS	144
4 CONCLUSÃO.....	147
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148
CONSIDERAÇÕES FINAIS	154
PERSPECTIVAS FUTURAS	155

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS NA FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA APLICADA AO DESENVOLVIMENTO DE ENSAIOS ANTIOXIDANTES

Figura 1 - Representação esquemática do estresse oxidativo.....	34
Figura 2 - Mecanismos de ação dos antioxidantes	35
Figura 3 - Estrutura química do DPPH [•]	38
Figura 4 - Estabilização do radical ABTS ^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio	39
Figura 5 - Redução do complexo Fe(TPTZ) ₂ ³⁺ a Fe(TPTZ) ₂ ²⁺	40
Figura 6 - Redução do complexo Cu ²⁺ (Nc) a Cu ⁺ (Nc)	41
Figura 7 - Estrutura cristalina do TiO ₂ (a) anatase (b) rutilo.....	44
Figura 8 - Espécies reativas de oxigênio geradas nas etapas de redução fotocatalítica e oxidação de oxigênio e água.....	45

CAPÍTULO 2: ESTUDO DA FOTODEGRADAÇÃO DE CORANTES EM SUSPENSÃO DE TiO₂ E ZnO UTILIZANDO ENSAIOS MINIATURIZADOS

Resumo Gráfico	64
Figura 1 - (a) Sistema irradiado por lâmpada mista na região do UV-vis (b) sistema irradiado por luz UV	72
Figura 2 - Curvas de calibração dos corantes (a) amarelo básico 2 (b) amarelo ácido 73 (c) eosina amarela	74
Figura 3 - (a) Processo para a degradação de corantes com radiação na região UV. (b) cinética de degradação de corantes	75

Figura 4 - (a) Processo de degradação dos corantes com radiação na região UV-vis. (b) Cinética da descoloração dos corantes	77
Figura 5 - Efeito da fonte de radiação na eficiência da fotodegradação (a) radiação UV (b) radiação UV-vis.....	79
CAPÍTULO 3: SÍNTESE DO CATALISADOR TiO₂/PAL COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA DESENVOLVIMENTO DE ENSAIOS ANTIOXIDANTES BASEADO EM GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	
Resumo Gráfico	91
Figura 1 - Estrutura química: (a) corante amarelo ácido 73; (b) antioxidante ácido gálico	96
Figura 2 - Ensaios de determinação da capacidade antioxidante	100
Figura 3 - Difratoograma do catalisador AgNPs/TiO ₂ -PAL	103
Figura 4 - Gráfico EDS do catalisador AgNPs/TiO ₂ -PAL.....	103
Figura 5 - Imagens MEV do catalisador AgNPs/TiO ₂ -PAL	104
Figura 6 - Curvas analíticas do ácido gálico.....	107
Figura 7 - Espectro UV-vis da reação fotocatalítica do AA73: (a) AgNPs/TiO ₂ -PAL na ausência de antioxidante; (b) TiO ₂ P25 na ausência de antioxidante; (c) AgNPs/TiO ₂ -PAL na presença de antioxidante (d) TiO ₂ P25 na presença de antioxidante.....	110
Figura 8 - Descoloração fotocatalítica do AA73 nos ensaios de capacidade antioxidante, adicionando os supressores.....	111
Figura 9 - Etapas de obtenção do catalisador AgNPs/TiO ₂ -PAL e mecanismo de geração das espécies reativas de oxigênio.....	113
Figura 10 - Descoloração fotocatalítica de AA73 nos ensaios de capacidade antioxidante, adicionando os supressores e antioxidantes.....	114

CAPÍTULO 4: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA COLORIMÉTRICA PARA RECONHECIMENTO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE BASEADA EM GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Figura 1 – Esquema do ensaio de determinação de atividade antioxidante	133
Figura 2 - Mecanismo de descoloração do corante AA73.....	138
Figura 3 - Espectros UV-vis dos antioxidantes e do corante utilizados para o desenvolvimento do método, com o objetivo de avaliar a especificidade do método.....	139
Figura 4 - Curva de calibração de (a) ácido gálico, (b) quercetina, (c) rutina e (d) trolox a 492 nm.....	140
Figura 5 - Espectro UV-vis do corante AA73 em solução aquosa (1×10^{-5} mol. L ⁻¹).....	145
Figura 6 - Espectro de absorção UV-vis do sistema AA73 e (a) ácido gálico, (b) quercetina, (c) rutina e (d) trolox, antes e após exposição a luz UV.....	146

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS NA FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA APLICADA AO DESENVOLVIMENTO DE ENSAIOS ANTIOXIDANTES

Tabela 1 – Produção e importância para o corpo humano das principais espécies reativas (radicalares e não radicalares). 32

CAPÍTULO 2: ESTUDO DA FOTODEGRADAÇÃO DE CORANTES EM SUSPENSÃO DE TiO₂ E ZnO UTILIZANDO ENSAIOS MINIATURIZADOS

Tabela 1 – Sistemas de fotodegradação de corantes (amarelo básico 2, amarelo ácido 73 e eosina amarela) por catalisadores (TiO₂ e ZnO)..... 73

Tabela 2 – Constantes obtidas no processo de degradação dos corantes sob radiação na região UV 77

Tabela 3 – Constantes obtidas no processo de degradação dos corantes sob radiação na região UV-vis. 78

CAPÍTULO 4: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA COLORIMÉTRICA PARA RECONHECIMENTO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE BASEADA EM GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Tabela 1 – Equações das retas, coeficientes de correlação e desvio padrão dos antioxidantes ácido gálico, quercetina, rutina e trolox 141

Tabela 2 – Valores de AA₅₀ em µg.mL⁻¹ e resultados do teste de repetibilidade para cada antioxidante 142

Tabela 3 – Resultados dos limites de quantificação e de detecção do método para reconhecimento de atividade antioxidante 142

Tabela 4 – Valores de descoloração do AA73 causado pelas espécies reativas geradas por meio do catalisador AgNPs/TiO₂-PAL nos ensaios de estabilidade 144

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

TiO₂ = dióxido de titânio

AgNPs/TiO₂-PAL = dióxido de titânio, incorporado com nanopartículas de prata e suportado na argila palygorskita

PAL = Palygorskita

EROs = espécies reativas de oxigênio

ERNs = espécies reativas de nitrogênio

EREs = espécies reativas de enxofre

HO• = radical hidroxila

ROO• = radical peroxila

O₂^{•-} = ânion superóxido

¹O₂ = oxigênio singlete

H₂O₂ = peróxido de hidrogênio

O₃ = ozônio

HOCl = ácido hipocloroso

ATP = Trifosfato de adenosina

DNA = Ácido desoxirribonucleico

RNA = Ácido ribonucleico

ABTS^{•+} = 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

DPPH• = 2,2-Difenil-1-picrilhidrazila

ORAC = Oxygen Radical Absorbance Capacity - capacidade de absorção dos radicais oxigenados

FRAP = Ferric Reducing Antioxidant Power - Potencial Antioxidante Redutor Férrico

CUPRAC = Cupric ion-Antioxidant Capacity - Capacidade antioxidante-iônica cúprica

Eg = band gap

MeNPs = nanopartículas metálicas

H₂O = água

CO₂ = dióxido de carbono

SOD = superóxido dismutase

O₂ = oxigênio

NO• = óxido nítrico

NO₂• = dióxido de nitrogênio

NO₂Cl = cloreto de nitrila

ONOO⁻ = peroxinitrito

RS• = radical tiila

Fe = ferro

Cu =cobre

Mn = manganês

AH = antioxidante

FR• = radical livre

TE = transferência de elétron

HAT = transferência de um átomo de hidrogênio

DRX = Difração de Raio-X

MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura

pH = potencial de hidrogênio

UV = ultravioleta

EA = Eosina Amarela

AA73 = amarelo ácido 73

AB2 = amarelo básico 2

ZnO = óxido de zinco

$h\nu$ = fóton de energia

$^{\circ}\text{C}$ = grau celsius

$^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ = grau celcius por minuto

min = minutos

$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ = mol por litro

μg = micrograma

eV = elétron-volt

rpm = rotação por minuto

RESUMO

O papel e os efeitos benéficos dos antioxidantes contra vários distúrbios e doenças induzidas pelo estresse oxidativo receberam muita atenção nos últimos anos. Os sistemas de defesa antioxidante fisiológicos eliminam e minimizam a formação das espécies reativas, porém, não são totalmente eficientes para eliminação ou neutralização quando estas espécies são geradas em excesso pelo organismo. Assim, surgiu recentemente um grande interesse em fontes adicionais de antioxidantes, levando ao desenvolvimento de numerosos métodos para avaliar a capacidade antioxidante de novos materiais. Nesse contexto, buscou-se sintetizar um gerador de espécies reativas de oxigênio, HO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, $^1\text{O}_2$, constituído de dióxido de titânio (TiO_2), incorporado com nanopartículas de prata e suportado na argila palygorskita ($\text{AgNPs}/\text{TiO}_2\text{-PAL}$) para aplicação ao desenvolvimento de uma metodologia para reconhecimento de atividade antioxidante. Primeiramente foi investigado a fotocatalise heterogênea dos corantes eosina amarela, verde de bromocresol, amarelo ácido 73 e amarelo básico 2 na presença do catalisador TiO_2 Degussa P25 comercial, sob radiação na região visível e na região do ultravioleta, propondo um estudo miniaturizado para realização dos testes laboratoriais de fotocatalise, com intuito de definir qual corante é mais sensível ao sistema de geração das espécies reativas. Os resultados mostraram que o sistema composto pelo corante amarelo ácido 73 e radiação ultravioleta apresentou maior eficiência, sendo assim, esse sistema foi utilizado para aplicação em ensaios de atividades antioxidantes, cujo desenvolvimento e validação da metodologia estão descritos nesse trabalho. O método apresentou uma resposta rápida e precisa para a detecção da atividade antioxidante dos compostos ácido gálico, quercetina, rutina e trolox, sendo considerado linear, reprodutível, de baixo custo e de fácil execução.

Palavras-chave: fotocatalise, espécies reativas de oxigênio, ensaios de antioxidantes, TiO_2 .

ABSTRACT

The role and beneficial effects of antioxidants against various disorders and diseases induced by oxidative stress have received much attention in recent years. Physiological antioxidant defense systems eliminate and minimize the formation of reactive species, but are not efficient for elimination or neutralization when these species are generated in excess. Thus, recently a great interest has arisen in additional sources of antioxidants, leading to the development of numerous methods to evaluate the antioxidant capacity of new materials. In this context, a generator of reactive oxygen species, HO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, $^1\text{O}_2$, composed of titanium dioxide (TiO_2), incorporated with silver nanoparticles and supported on palygorskite clay (AgNPs/ TiO_2 -PAL) for application to the development of a methodology for recognition of antioxidant activity. First, the heterogeneous photocatalysis of yellow eosin, bromocresol green, acid yellow 73 and basic yellow 2 dyes was investigated in the presence of the commercial TiO_2 P25 Degussa catalyst, under irradiation in the visible region and in the ultraviolet region, proposing a miniaturized study to perform the tests in order to define which dye is more sensitive to the generation system of the reactive species. The results showed that the system composed of acid yellow 73 dye and ultraviolet radiation presented higher efficiency, so that this system was used for antioxidant activities, whose development and validation of the methodology are described in this work. The method presented a rapid and accurate response for the detection of the antioxidant activity of gallic acid, quercetin, rutin and trolox, being considered linear, reproducible, low cost and easy to perform.

Keywords: photocatalysis, reactive oxygen species, antioxidant assays, TiO_2 .

1. INTRODUÇÃO

As evidências que comprovam o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese de vários distúrbios tem atraído muita atenção dos cientistas e do público em geral, principalmente para o papel dos antioxidantes na manutenção da saúde humana, na prevenção e tratamento de doenças, bem como, na preservação e aumento da vida útil dos alimentos (Niki, 2010; Pisoschi & Pop, 2015; Cömert & Gökmen, 2017).

O estresse oxidativo é causado pela geração exagerada de radicais livres e espécies reativas, que são constantemente geradas *in vivo* (Pisoschi & Pop, 2015). Radicais livres são átomos, moléculas ou íons com elétrons não emparelhados, que reagem rapidamente e sem seletividade com outras moléculas. Estes radicais fazem parte dos grupos de moléculas chamados espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e espécies reativas de enxofre (EREs) (Almeida et al., 2008; Kumar et al., 2017; Grzesik et al., 2018).

As espécies reativas de oxigênio incluem os radicais livres, hidroxila (HO^\bullet), peróxilo (ROO^\bullet), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e outras espécies não radicalares como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ozônio (O_3) e ácido hipocloroso (HOCl) (Almeida et al., 2008; Pisoschi & Pop, 2015; Grzesik et al., 2018). Em condições normais e em concentrações picomolares, os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio são produzidas como intermediários necessários e envolvem-se como mensageiros secundários nas reações bioquímicas, como por exemplo, possibilitam a geração de ATP (energia), por meio da cadeia transportadora de elétrons, atuam nas reações de fertilização do óvulo, ativação de genes e participam de mecanismos de defesa durante o processo de infecção (Pisoschi & Pop, 2015; Rajan and Muraleedharan, 2016; Sarangarajan et al., 2017). No entanto, a produção excessiva desses grupos de espécies reativas causam efeitos prejudiciais

aos sistemas biológicos, reagindo principalmente com moléculas como DNA, proteínas e lipídeos (Alam, Bristi & Rafiquzzaman, 2013; Pisoschi & Pop, 2015; Sarangarajan et al., 2017).

Nesse contexto, uma busca por fontes externas de antioxidantes, presentes em alimentos, farmacêuticos, cosméticos e suplementos vem crescendo nos últimos anos. Essa necessidade de fontes exógenas de antioxidantes gerou um interesse nos pesquisadores pelo desenvolvimento de novos métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante desses compostos, incluindo fotometria, fluorimetria, colorimetria, cromatografia e métodos eletroquímicos (Roginsky & Lissi, 2005; Ge et al., 2018). No entanto, cada metodologia apresenta um conjunto de vantagens e desvantagens, as quais devem ser criteriosamente consideradas no momento de seleção da técnica mais adequada para a medida da capacidade antioxidante de um determinado sistema.

As desvantagens dos ensaios mais frequentemente utilizados relatadas na literatura incluem: desconsideração do estudo cinético no ensaio; uso de radicais estericamente impedidos (ABTS^{•+} ou DPPH[•]) como alvos, ao invés de pequenos radicais de fácil acesso, mas de curta duração, tais como radicais hidroxila (HO[•]), e ânion superóxido (O₂^{•-}), os quais são encontrados nos organismos vivos; falta de padronização, causando uma adaptação do método em cada laboratório para trabalhar com instrumentação e capacidades disponíveis, tempos de reações elevadas, alto custo de reagentes, entre outros (Erel, 2004; Badarinath et al., 2010; Niki, 2010; Schaich, Tian, & Xie, 2015).

Entre os métodos *in vitro* utilizados na literatura, os ensaios DPPH[•], ORAC e ABTS^{•+} são os mais frequentemente empregados (Floegel et al., 2011). O método de neutralização do radical DPPH[•] é considerado o mais clássico, por ser método rápido, simples e barato em comparação com outros modelos de teste (Alam, Bristi & Rafiquzzaman, 2013; Apak et al., 2013; Schaich, Tian, & Xie, 2015). No entanto, esse método tem sido criticado,

principalmente porque o radical DPPH[•] não está presente em situações reais, como no organismo humano e nem em sistemas nos quais a atuação de espécies reativas seja importante, como na oxidação de alimentos, gerando deterioração do produto (Roginsky & Lissi, 2005; Schaich, Tian, & Xie, 2015), além disso, o DPPH[•] é um radical hidrofóbico, e sendo assim, suas reações devem ser aplicadas apenas em solventes orgânicos (López-Alarcón and Denicola, 2013; Shahidi & Zhong, 2015).

O teste ORAC, que é o ensaio mais utilizado na indústria e nas instituições acadêmicas, oferece vantagens como: uso de espécies reativas de oxigênio presentes *in vivo* (radicais peróxil - ROO[•]), fornece geração contínua de radicais em uma escala de tempo realista (semelhante a reações reais *in situ*) (Floegel et al., 2011). Contudo, a reação ORAC é muito complexa, apresentando desvantagens como por exemplo o controle da temperatura, do oxigênio dissolvido e da quantidade dos reagentes, quando um ou mais desses itens não são atingidos, as reações são lentas e incompletas, gerando resultados inconsistentes (Pinchuk et al., 2012; Schaich, Tian & Xie, 2015; Shahidi & Zhong, 2015).

E por fim, o ensaio ABTS^{•+}, é usado para determinar atividade antioxidante em uma ampla gama de materiais, sua principal vantagem consiste em poder ser empregado para ensaios com substâncias lipofílicas e hidrofílicas, entretanto, assim como o radical DPPH[•], o ABTS^{•+} também é um radical grande, não biológico e estericamente impedido, dificultando o acesso dos antioxidantes ao centro do radical, causando reações lentas que não condiz com a rapidez das reações que ocorrem *in vivo* (Apak et al., 2013; López-Alarcón and Denicola, 2013).

Biologicamente, os radicais HO[•] são gerados quando o H₂O₂ reage com Fe (II) (reação do tipo Fenton). No entanto, o uso de reações de Fenton no desenvolvimento de ensaios antioxidantes apresenta desvantagens, uma vez que muitos antioxidantes também são quelantes de metais que alteram a atividade do Fe (II) após a quelação (Rui-Jie et al., 2016).

Diante disso, a fotocatalise heterogênea de água por nanopartículas de óxido de titânio (TiO₂) surge como alternativa para geração de espécies reativas de oxigênio presentes nos sistemas biológicos, podendo assim ser aplicada ao desenvolvimento de ensaios antioxidantes (Chen et al., 2014).

Um processo geral de fotocatalise inicia a partir da fotoexcitação do TiO₂ com uma energia maior que o *bandgap* (E_g) de 3,2 eV (Muruganandham e Swaminathan, 2006; Wei et al., 2017), resultando na formação de pares ativos de elétrons-lacunas (e⁻/h⁺) (Guo et al., 2015). Na fotólise do TiO₂ em água, as nanopartículas solvatantes das moléculas de água e o O₂ dissolvido podem reagir com ambos, a lacuna e o elétron, respectivamente, para gerar HO[•] (Xiang, Yu, Wong, 2011; Rauf et al., 2009; Rui-Jie et al., 2016; Nagarajan et al., 2017). No entanto, o TiO₂ apresenta algumas desvantagens como baixo rendimento quântico e dificuldade para remoção deste catalisador da água, devido a aglomeração das suas nanopartículas em partículas maiores, resultando em um efeito adverso no desempenho do catalisador (Chen et al., 2014).

Uma alternativa para melhorar o perfil de absorção aumentando o rendimento quântico é a incorporação de nanopartículas metálicas (MeNPs) à sua estrutura (Lee & Chen, 2014), as MeNPs depositadas no TiO₂ atuam como captadoras de elétrons, diminuindo a taxa de recombinação do par elétrons-lacunas (e⁻/h⁺), melhorando, conseqüentemente, a atividade fotocatalítica (Chen et al., 2008; Hidalgo et al., 2010). Para resolver o problema da aglomeração das nanopartículas do TiO₂, sugere-se a utilização de materiais porosos para suportar o catalisador, nomeadamente argilas tais como palygorskyta (PAL), que poderiam aumentar a área de contato superficial e conseqüentemente facilitar a remoção do material (Xavier et al., 2012; Verma et al., 2014).

PAL é uma espécie de silicato de alumínio e magnésio hidratado com morfologia microfibrilar alongada, possuindo grupos reativos em sua superfície. A estrutura

microscópica da PAL é em formato de agulha ou bastonete com 20–70 nm de diâmetro e cerca de 1 µm de comprimento (Ma et al., 2017). Devido à sua estrutura única e alta área de superfície, a PAL aparece como um suporte atraente para a imobilização de catalisadores (Chen et al., 2014).

Portanto, combinando a a adição do metal nobre à sua superfície com o suporte do argilomineral PAL, este trabalho apresenta o desenvolvimento de um catalisador composto de TiO₂ e nanopartículas de prata, suportado na palygorskyta (AgNPs/TiO₂-PAL), com o objetivo de desenvolver um método colorimétrico, simples, automatizado em microplacas, para a determinação da atividade antioxidante, baseado na geração de espécies reativas de oxigênio (HO[•], O₂^{•-}, ¹O₂), presentes biologicamente nos sistemas *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alam, M. N., Bristi, N. J. and Rafiquzzaman, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21, 143–152, 2013.

Almeida, I.F.; Fernandes, E.; Lima, J.L.F.C.; Costa, P.C. ; Bahia, M.F. Hydrogels containing rutin intended for cutaneous administration: efficacy in wound healing in rats. *Drug Dev. Ind. Pharm.* v. 38, n. 7, p. 792–799, 2008. <https://doi.org/10.3109/03639045.2011.628676>.

Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M., & Güçlü, K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, v. 85, p. 957–998, 2013.

Badarinath, A.V., Rao, K.M., Chetty, C.M.S., Ramkanth, V., Rajan, T.V.S., Gnanaprakash, K. A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *Int. J. PharmTech Res.* v. 2, n. 2, p. 1276–1285, 2010.

Chen, D.; Du, Y.; Zhu, H.; Deng, Y. Synthesis and characterization of a micro fibrous TiO₂–CdS/palygorskite nanostructured material with enhanced visible light photocatalytic activity. *Applied Clay Science*, 87, 285-291, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2013.11.031>.

Chen, H.; Chen, S.; Quan, X.; Yu, H.; Zhao, H.; Zhang, Y. Fabrication of TiO₂–Pt coaxial nanotube array Schottky structures for enhanced photocatalytic degradation of phenol in aqueous solution. *J. Phys. Chem*, V. 112 p. 9285–9290, 2008. Doi:10.1021/jp8011393.

Cömert, E. D., Gökmen, V. Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. *Food Research International*, 105, 76-93, 2017. doi:10.1016/j.foodres.2017.10.056.

Erel, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, v. 37, p. 277–285, 2004.

Floegel, A.; Kim, D.O.; Chung, S.J.; Koo, S.I.; Chun, O.K. Comparison of ABTS/DPPH• assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 24, p. 1043–1048, 2011.

Ge, Q.; Ge, P.; Jiang, D.; Du, N.; Chen, J.; Yuan, L.; Yu, H.; Xu, X.; Wu, M.; Zhang, W.; Zhou, G. A novel and simple cell-based electrochemical biosensor for evaluating the antioxidant capacity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese dry-cured ham. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 99, p. 555-563, 2018.

Grzesik, M., Naparło, K., Bartosz, G., Sadowska-Bartosz, I. Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. *Food Chemistry*, v. 241, p. 480-492, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.117>.

Guo, X.; Li, Q.; Zhang, M.; Long, M.; Kong, L.; Zhou, Q.; Shao, H.; Hu, W.; Wei, T. Enhanced photocatalytic performance of N-nitrosodimethylamine on TiO₂ nanotube based on the role of singlet oxygen. *Chemosphere*, v. 120, p. 521–526, 2015. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.09.002>.

Hidalgo, M.C.; Maicu, M.; Navio, J.A; Colon, G. Effect of sulfate pretreatment on gold-modified TiO₂ for photocatalytic applications. *J. Phys. Chem.* v. 113 p. 12840–12847, 2010. Doi: 10.1021/jp903432p.

Kumar, S., Sharma, S. & Vasudeva, N. Chin. Review on antioxidants and evaluation procedures. *J. Integr. Med.* p. 1-12, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11655-017-2414-z>.

Lee, D. S.; Chen, Y. W. Nano Ag/TiO₂ catalyst prepared by chemical deposition and its photocatalytic activity. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 42, n. 2, p. 705-712, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2013.07.007>.

López-Alarcón, C. and Denicola, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, v. 763, p. 1-10, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051>.

Ma, J., Zhu, C., Xu, Y., Lu, Lu, J., Huang, L., e Yang, Z. Photocatalytic degradation of gaseous benzene with H₃PW₁₂O₄₀/TiO₂/palygorskite composite catalyst. *Journal of Saudi Chemical Society*, 21 (2), 132-142, 2017. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2015.02.001>.

Muruganandham, M.; Swaminathan, M. TiO₂-UV photocatalytic oxidation of Reactive Yellow 14: Effect of operational parameters. *Journal of Hazardous Materials*, v. 135, n. 1, p. 78-86, 2006. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.11.022>.

Nagarajan, S.; Skillena, N.C.; Fina, F.; Zhang, G.; Randorn, C.; Lawton, L.A.; Irvine, J.T.S.; Robertson, P.K.J. Comparative assessment of visible light and UV active photocatalysts by hydroxyl radical quantification. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 334, p. 13-19, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2016.10.034>.

Niki, E. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 49, p. 503-515, 2010. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016.

Pinchuk, I.; Shoal, H.; Dotan, Y.; Lichtenberg, D. Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 165, n. 6, p. 638-647, 2012.

Pisoschi, A.M. and Pop, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a Review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 97, p. 55-74, 2015. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040.

Rajan, V. K.; Muraleedharan, K. A computational investigation on the structure, global parameters and antioxidant capacity of a polyphenol: gallic acid. *Food Chemistry*, v. 220, p. 93-99, 2016. doi: [http:// dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.178](http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.178).

Rauf, M. A.; Ashraf, S. S. Fundamental principles and application of heterogeneous photocatalytic degradation of dyes in solution. *Chemical Engineering Journal*, v. 151, p. 10-18, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.02.026>.

Roginsky, V. and Lissi, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* v. 92, p. 235–254, 2005.

Rui-Jie, J.; Qiang, Z.; Ji-Feng, L.; Mohamad Hojeij; Girault, H.H. Antioxidant Assay Based on Quenching of Photocatalytically Generated Reactive Oxygen Species. *Chin J Anal Chem*, v. 44, n. 8, p. 1257–1262, 2016. doi: [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(16\)60950-7](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(16)60950-7).

SARANGARAJAN, R., Meera, S., Rukkumani, R., Sankar, P., Anuradha, G. Antioxidants: Friend or foe?. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 10, n. 12, p. 1111-1116, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.10.017>.

Schaich, K.M.; Tian, X.; Xie, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH•, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*. v. 14, p. 111-125, 2015.

Shahidi, F. and Zhong, Y. Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, v. 18, p. 757-781, 2015.

Verma, A., Prakash., N.T., Toor, A.P. An efficient TiO₂ coated immobilized system for the degradation studies of herbicide isoproturon: Durability studies. *Chemosphere*, v.109, p. 7–13, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.051>.

Wei, M.; Peng, X.L.; Liu, Q.S; Li, F.; Yao, M.M. Nanocrystalline TiO₂ Composite Films for the Photodegradation of Formaldehyde and Oxytetracycline under Visible Light Irradiation. *Molecules*, v. 22, n. 6, p. 950, 2017. doi:10.3390/molecules22060950.

Xavier, K. C. M., Filho, E. C. S., Santos, M. S. F., Luz, A. B. Caracterização mineralógica, morfológica e de superfície da atapulgita de Guadalupe-PI. *Holos*, v. 5, p. 60-70, 2012.

Xiang, Q.; Yu, J.; Wong, P. K. Quantitative characterization of hydroxyl radicals produced by various photocatalysts. *Journal of Colloid and Interface Science* v. 357, p. 163–167, 2011. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.01.093>.

CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS NA FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA APLICADA AO DESENVOLVIMENTO DE ENSAIOS ANTIOXIDANTES

GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS NA FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA PARA APLICAÇÃO AO DESENVOLVIMENTO DE ENSAIOS ANTIOXIDANTES

*Anallyne Nayara Carvalho Oliveira Cambrussi¹, Talissa Brenda de Castro Lopes¹, Maria Crisnanda Almeida Marques¹, Josy ANteveli Osajima¹, Edson Cavalcanti da Silva Filho¹,
Alessandra Braga Ribeiro¹*

¹*Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados - LIMAV, UFPI, 64049-550 Teresina,
PI, Brazil.*

RESUMO: As evidências que comprovam o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese de vários distúrbios e doenças revelou o importante papel das substâncias antioxidantes na manutenção da saúde humana, na prevenção e tratamento de doenças, bem como, na preservação e aumento da vida útil dos alimentos. Devido a isso, o interesse por fontes externas de antioxidantes tornou-se uma área de pesquisa ativa, levando ao desenvolvimento recente de numerosos métodos para avaliar a capacidade antioxidante. No entanto, a grande maioria dos métodos desenvolvidos apresentam desvantagens que incluem elevado custo dos reagentes, alta complexidade das reações, uso de equipamentos caros, entre outros. Sendo assim, nesse trabalho de revisão, os conceitos, mecanismos e importância dos antioxidantes para manutenção da saúde dos sistemas *in vivo* são brevemente descritos, em seguida, o desenvolvimento de métodos *in vitro* para determinação de atividade antioxidante são abordados, destacando suas vantagens e desvantagens, e por fim, discute-se o uso da fotocatalise heterogênea como tecnologia de geração de espécies reativas de oxigênio para desenvolver métodos de avaliação de atividade antioxidante.

Palavras-chave: fotocatalise heterogênea; geração de espécies reativas; ensaios antioxidantes.

ABSTRACT

Evidence supporting the involvement of oxidative stress in the pathogenesis of various disorders and diseases has revealed the important role of antioxidant substances in maintaining human health, preventing and treating diseases, preserving and increasing the shelf life of foods. Because of this, interest in external sources of antioxidants has become an area of active research, leading to the recent development of numerous methods for assessing antioxidant capacity. However, the great majority of the developed methods present disadvantages that include high cost of the reagents, high complexity of the reactions, use of expensive equipment, among others. Thus, in this review work, the concepts, mechanisms and importance of antioxidants to maintain the health of *in vivo* systems are briefly described, and the development of *in vitro* methods for antioxidant activity determination are addressed, highlighting their advantages and disadvantages, and finally, we discuss the use of heterogeneous photocatalysis as a technology for the generation of reactive oxygen species to develop methods for evaluating antioxidant activity.

Keywords: heterogeneous photocatalysis; generation of reactive species; antioxidant trials.

1. INTRODUÇÃO

Os produtos advindos do metabolismo oxidativo, tais como as espécies reativas de oxigênio, de nitrogênio e de enxofre, entre outras, quando em excesso no organismo, causam vários tipos de danos celulares que podem comprometer a manutenção da saúde dos sistemas biológicos. Nos seres humanos, esses danos estão sendo cada vez mais relacionados ao desenvolvimento de diversos distúrbios patológicos como câncer, depressão, Parkinson e Doença de Alzheimer (Badarinath et al., 2010; Cömert & Gökmen, 2017; Bao et al., 2017; Omar et al., 2017; Barroso et al., 2018).

O corpo humano possui um sistema complexo de defesas naturais, composto por antioxidantes endógenos que trabalham em equilíbrio com a geração de espécies reativas (Pisoschi & Pop, 2015; Rajan & Muraleedharan, 2016; Bao et al., 2017; Carochi et al., 2018). No entanto, essa rede de antioxidantes não consegue manter o equilíbrio adequado quando a produção de espécies reativas ocorre de forma descontrolada, devido a estímulos externos como, exposição ao tabagismo, ingestão de álcool, exposição à radiação e a poluição ambiental (Chand et al., 2017; Canabady-Rochelle et al., 2017; Farhat et al., 2018). A proteção contra esses danos pode ser intensificada por meio do consumo de fontes exógenas de antioxidantes, presentes em alimentos, suplementos, cosméticos e produtos farmacêuticos (Alam, Bristi & Rafiquzzaman, 2013; Pisoschi & Pop, 2015).

O grande interesse por fontes exógenas de compostos antioxidantes veio acompanhado pelo desenvolvimento de novos métodos analíticos *in vitro* para determinação do potencial dessas fontes (Roginsky & Lissi, 2005; Ge et al., 2018).

Entre os métodos de eliminação de radicais livres, os ensaios ABTS^{•+}, DPPH[•] e ORAC são os mais citados na literatura (Floegel et al., 2011; Schaich, Tian & Xie, 2015). No entanto, os ensaios apresentam desvantagens que vem sendo contestadas pela literatura, como o fato

de utilizar radicais não biológicos e estericamente impedido, dificultando o acesso dos antioxidantes ao centro do radical, o que causam reações lentas e que podem não condizer com a rapidez das reações que ocorrem in vivo (Apak et al., 2013; López-Alarcón & Denicola, 2013).

Nesse contexto, muitas pesquisas no campo de desenvolvimento de novas metodologias in vitro têm sido realizadas nos últimos anos. Os pesquisadores buscam um método que seja simples, de baixo custo, confiável e reproduzível nos sistemas in vivo.

Dessa forma, métodos baseados na geração de radicais OH^\bullet a partir da reação entre peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e Fe (II) (reação do tipo Fenton) ganharam destaque. No entanto, o uso de reações de Fenton no desenvolvimento de ensaios antioxidantes apresenta desvantagens, uma vez que muitos antioxidantes também são quelantes de metais que alteram a atividade do Fe (II) após a quelação (Rui-Jie et al., 2016). A fotocatalise heterogênea utilizando catalisadores como óxido de zinco (ZnO) ou óxido de titânio (TiO_2), surgem como alternativa de geração de espécies reativas para aplicação a ensaios de atividade antioxidante (Chen et al., 2014).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas pela oxidação fotocatalítica da água utilizando TiO_2 são radical hidroxilo (HO^\bullet), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (Xiang, Yu, Wong, 2011; Rauf et al., 2009; Rui-Jie et al., 2016; Nagarajan et al., 2017). Estas espécies estão biologicamente presentes in vivo e desempenham ações essenciais em inúmeras reações bioquímicas fisiológicas.

Em um sistema composto por TiO_2 e solução aquosa de corante para determinar a atividade antioxidante de um composto, as espécies reativas de oxigênio reagem com as moléculas do corante e degradam sua cor, transformando-o em H_2O e CO_2 . A redução da cor é seguida opticamente, e quando há a presença de composto com atividade de neutralização de espécies reativas, ocorre diminuição da perda de cor ou mesmo a ausência total da

atividade das EROs sobre o corante. Os ensaios podem ser realizados com amostras únicas em cubetas, ou podem ser miniaturizados em sistema de microplacas, com economia de reagentes utilizando os princípios da química verde.

Sendo assim, este trabalho de revisão tem como objetivo apresentar brevemente os conceitos, mecanismos e importância dos antioxidantes para manutenção da saúde dos sistemas *in vivo*, os métodos *in vitro* para determinação de atividade antioxidante também são abordados, destacando suas vantagens e desvantagens. Discute-se posteriormente o uso da fotocatalise heterogênea por meio de catalisadores como o TiO_2 , a qual é utilizada para geração de espécies reativas de oxigênio no desenvolvimento de métodos analíticos para avaliação de atividade antioxidante.

2. ESPÉCIES REATIVAS E ESTRESSE OXIDATIVO

Em 1954, Gerschman et al. propuseram que os efeitos nocivos do O_2 , poderiam ser atribuídos à formação de radicais de oxigênio. Esta hipótese foi popularizada e convertida na "teoria do superóxido" em consequência da descoberta de enzimas de superóxido dismutase (SOD) por McCord e Fridovich em 1978. Esta teoria afirma que a toxicidade do oxigênio é devida ao excesso de formação de radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Sartori et al., 2014), o qual é convertido rapidamente em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) de forma espontânea ou por meio da enzima superóxido dismutase. O H_2O_2 , por sua vez, pode ser transformado em radicais hidroxílicos (HO^{\cdot}) e radicais peróxilo (ROO^{\cdot}) por meio das interações de H_2O_2 com metais de transição (Gomes et al., 2006; Chisté et al., 2012).

As espécies reativas mais comuns em sistemas biológicos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Produção e importância para o corpo humano das principais espécies reativas (radicalares e não radicalares).

Nome	Fórmula	Observações	Referência Bibliográfica
Ânion superóxido	$O_2^{\cdot-}$	Gerado continuamente por diversos processos celulares (cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, no microsomo, utilizando enzimas como xantina oxidase e NADPH oxidase), ou pela redução monoelétrica de O_2 . Meia-vida 10^{-6} segundos.	Sartori et al., (2014); Kelly et al., (2002); Luo et al., (2004); López-Alarcón & Denicola, (2013); Carochio et al., (2018)
Peróxido de hidrogênio	H_2O_2	Intermediário formado pela reação de dismutação de $O_2^{\cdot-}$ catalisada pela enzima SOD, pela redução de 2 elétrons na molécula de O_2 e pela ação de diversas enzimas oxidases <i>in vivo</i> , localizadas nos peroxissomas. É um fraco agente oxidante e um fraco agente redutor, reage lentamente com tióis, com sais de ferro e cobre reduzidos, com proteínas heme e peroxidases para iniciar reações radicalares e peroxidações lipídicas. Em presença de metal de transição gera OH^{\cdot} , através da reação de Fenton.	Mozafari et al., (2006); Gomes et al., (2006); Chisté et al., (2012).
Radical hidroxilo	HO^{\cdot}	É o radical mais reativo e mais lesivo. Uma vez formado, o organismo humano não dispõe de mecanismo de defesa, reage com uma série de endobióticos, causa modificação no DNA (com modificação das bases e quebras das fitas), danos nas proteínas e inativação enzimática, peroxidação lipídica. Âmbito limitado de ação (poucos diâmetros moleculares).	Mozafari et al., (2006); Gomes et al., (2006); Chisté et al., (2012)
Radicais peroxila e alcoxila	ROO^{\cdot} RO^{\cdot}	Formados durante a decomposição de peróxidos orgânicos e reações de carbono radicalar com oxigênio, como na peroxidação lipídica.	Mozafari et al., (2006); Gomes et al., (2006); Chisté et al., (2012)

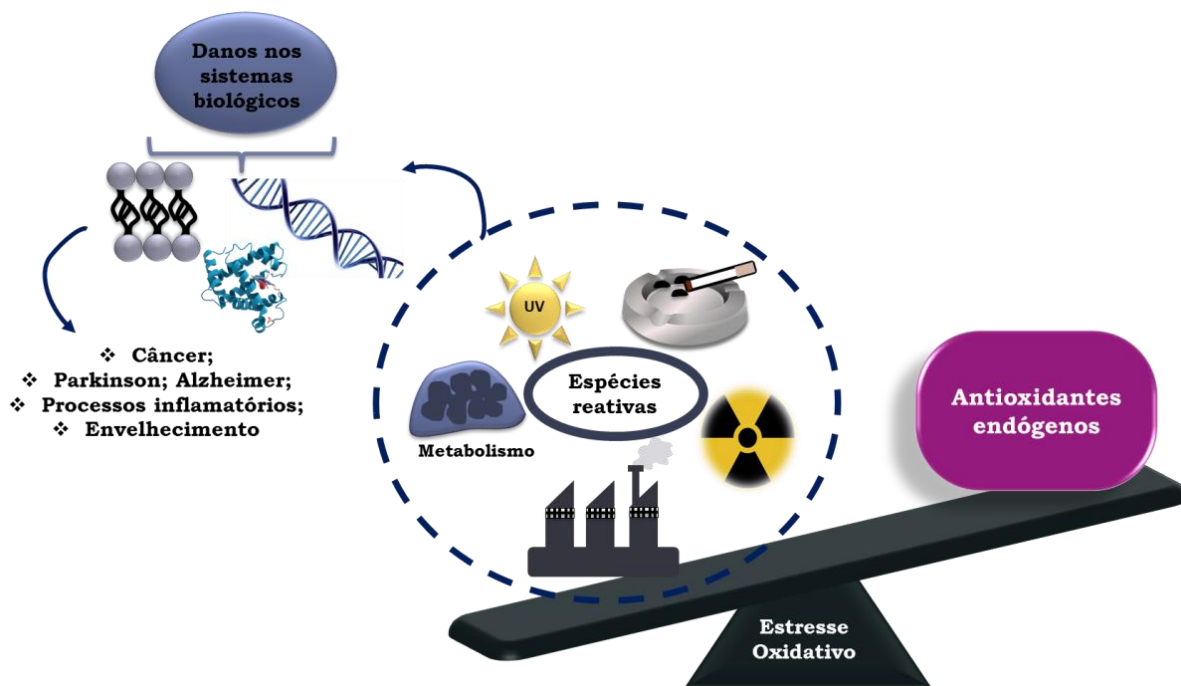
Oxigênio singlete	$^1\text{O}_2$	Estado eletronicamente excitado do oxigênio, produzido por reações fotoquímicas ou por outras radiações; reage com um grande número de moléculas biológicas, incluindo lipídeos da membrana, iniciando processos de peroxidação.	Mozafari et al., (2006); Costa et al., (2007); Prior (2015)
Ácido hipocloroso	HOCl	Espécie não radicalar, membrana-permeável, oxida um grande número de compostos biológicos, como tióis e tioéteres, aminas, fenóis e ligações insaturadas, mais seletivo que o radical hidroxila, oxida ferro e proteínas. É produzido no miocárdio, como resultado de invasão de células inflamatórias.	Mozafari et al., (2006);
Óxido nítrico ou monóxido de nitrogênio	NO•	Sintetizado nos organismos vivos pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que converte o aminoácido L-arginina a NO• + L-citrulina (outro aminoácido). É um radical abundante que age em uma variedade de processos biológicos, incluindo relaxação muscular, neurotransmissão e regulação imune. Difunde-se rapidamente entre e dentro das células. Quando exposto ao ar, reage com oxigênio para formar dióxido de nitrogênio	Kelly et al., (2002); Luo et al., (2004); Carocho et al., (2018)
Dióxido de nitrogênio	NO ₂ •	Formado a partir da exposição de NO• ao ar ou da protonação de peroxinitrito. Potente iniciador da peroxidação lipídica em fluidos biológicos.	Mozafari et al., (2006);
Cloreto de nitrila	NO ₂ Cl	Formado a partir de misturas de NO ₂ ⁻ e HOCl. Oxidante, agente de cloração e de nitração.	Mozafari et al., (2006);
Peroxinitrito	ONOO ⁻	Instável, tempo de vida curto, oxidante potente, propriedades semelhantes ao radical hidroxila, causa danos a muitas moléculas biológicas, inclusive a grupos S-H das proteínas, provoca hidroxilação e nitração de compostos aromáticos. Forma OH• independente da presença de metal de transição	Kelly et al., (2002); Luo et al., (2004); Carocho et al., (2018)

Cloraminas		Oxidantes mais suaves e de vida mais longa que HOCl, reagem com tióis, tioéteres e centros metálicos de ferro. Toxicidade variável, dependendo da polaridade e da permeabilidade da membrana. Cloraminas de α -aminoácidos sofrem degradação para aldeídos potencialmente tóxicos	Mozafari et al., (2006);
Radical tíla	RS•	Denominação genérica para um grupo de radicais com o elétron desemparelhado residindo no enxofre. Formado quando um grupo tiol (RSH) reage com uma espécie radicalar.	Lü et al., (2010); Carocho et al., (2018)
Metais	Fe, Cu, Mn, etc	Catalisam reações de radicais livres.	Mozafari et al., (2006);

Em baixas concentrações a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e espécies reativas de enxofre (EREs), é necessária para o funcionamento do metabolismo humano (Barroso et al., 2018). A concentração vital dos radicais livres e espécies reativas é mantida pelos antioxidantes enzimáticos produzidos naturalmente pelos organismos vivos, tais como glutathione peroxidase, superóxido dismutase, glutathione reductase, catalase e antioxidantes não enzimáticos, como alfa-tocoferol e ácido ascórbico (Pisoschi & Pop, 2015; Chand et al., 2017; Sarangarajan et al., 2017). No entanto, esses antioxidantes endógenos não conseguem manter o equilíbrio adequado quando a produção de espécies reativas ocorre de forma descontrolada, devido a estímulos externos como, exposição ao tabagismo, ingestão de álcool, exposição a radiação e a poluição ambiental, entre outros (Chand et al., 2017; Canabady-Rochelle et al., 2017; Farhat et al., 2018). Essa produção descontrolada perturba o equilíbrio entre oxidação e antioxidação (Figura 1) resultando em danos que estão sendo correlacionados a doenças crônicas e degenerativas, como por exemplo, aterosclerose, câncer, diabetes tipo 2, doenças

cardiovasculares, inflamação crônica, acidente vascular cerebral, entre outras (Cömert & Gökmen, 2017; Barroso et al., 2018).

Figura 1 - Representação esquemática do estresse oxidativo.



3. ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em comparação as do substrato oxidável, atrasam ou inibem significativamente a oxidação desse substrato, agindo de acordo com a reação 1: (Niki, 2010; López-Alarcón & Denicola, 2013; Kumar et al. 2017; Carocho et al., 2018; Barroso et al., 2018)



Onde AH e FR• representam um antioxidante e um radical livre, respectivamente.

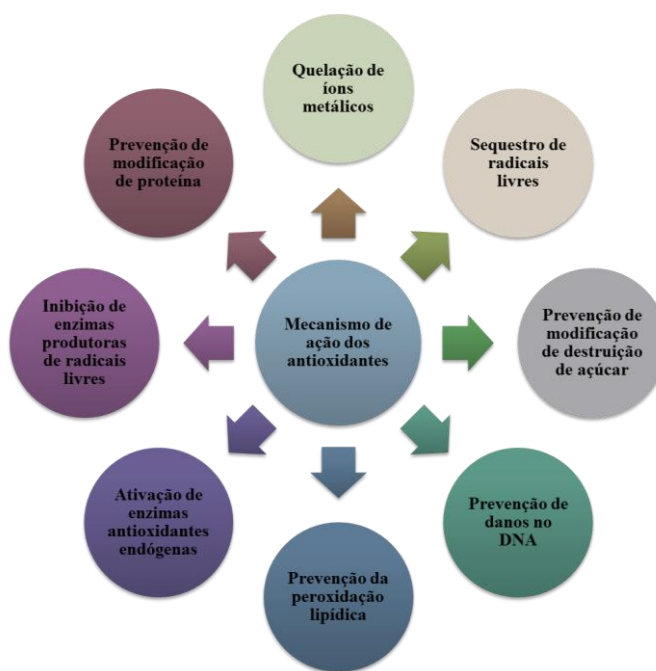
A reação 1 é considerada a base da mecânica clássica da ação de antioxidantes e pode explicar a inibição (ou atraso) de muitos processos prejudiciais induzidos por FR• em lipídios, proteínas ou DNA (Lü et al., 2010; López-Alarcón & Denicola, 2013; Ataie et al., 2016).

3.1. MECANISMO DE AÇÃO DOS ANTIOXIDANTES

A química dos antioxidante e radicais livres é baseada em um equilíbrio entre ambos. Os radicais livres são compostos reativos que tendem a capturar elétrons de moléculas biológicas estáveis para se estabilizarem. Em condições patológicas, há uma superprodução de radicais livres devido à fatores externos como tabagismo, excesso de atividade física, estresse, entre outros (Carocho et al., 2018).

Todos os antioxidantes seguem um dos sete mecanismos de ação detalhados na Figura 2 (Kumar & Pandey, 2013; López-Alarcón & Denicola, 2013; Zou et al., 2016; Cömert & Gökmen, 2017).

Figura 2 - Mecanismos de ação dos antioxidantes.



No sequestro de radical livre, os antioxidantes atuam principalmente em relação aos radicais HO[•] e O₂^{•-}. O mecanismo ocorre pela transferência de um elétron (TE) ou de um átomo de hidrogênio (HAT) de seus grupos hidroxilos, estabilizando o radical. O ácido ascórbico (vitamina C) e os polifenóis são exemplos de antioxidantes que agem por esse mecanismo (Trembl & Smejkal, 2016; Carrocho et al., 2018).

O mecanismo de quelação dos metais, como Fe²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺ e Cu⁺ é crítico para o corpo humano, dado que estes metais reagem com H₂O₂ que é previamente produzido pela enzima superóxido dismutase, levando à produção dos radicais HO[•] e O₂^{•-}, os quais são altamente reativos. Além disso, os íons ferrosos (Fe²⁺) podem catalisar a formação de HO[•] pela reação de Haber-Weiss, a qual ocorre na presença de ânion superóxido. Estas espécies reativas, por sua vez, podem reagir com biomoléculas adjacentes e serem responsáveis por sérios danos no tecido biológico (Lü et al., 2010; Canabady-Rochelle et al., 2017).

Em relação às enzimas antioxidantes, três das mais importantes são superóxido dismutase, glutatona peroxidase e catalase (Mozafari et al., 2006), que trabalham em conjunto para equilibrar a produção e neutralização de espécies reativas. A superóxido dismutase catalisa a dismutação do radical superóxido em oxigênio molecular e H₂O₂, a catalase decompõe H₂O₂ em oxigênio e hidrogênio (Farhat et al., 2018).

A peroxidação lipídica consiste na destruição das duplas ligações de lipídios insaturados das membranas celulares por meio da captura de elétrons pelas espécies reativas (Bikkad et al., 2014; Barroso et al., 2018). Esse mecanismo pode ser interrompido pela ação dos antioxidantes, como por exemplo a vitamina E, a qual apresenta uma relação sinérgica com a vitamina C (ácido ascórbico), sendo regenerada sucessivamente, protegendo os lipídios da ação oxidante das espécies reativas (Carrocho et al., 2018). Muitas doenças no corpo humano estão relacionadas à peroxidação lipídica, como a aterosclerose, câncer e distúrbios cardiovasculares (Cömert & Gökmen, 2017).

O DNA e o RNA também são propensos a serem danificados por espécies reativas, como por exemplo, NO^\bullet e $\text{O}_2^{\bullet-}$, que reagem com o DNA do plasmídeo, dividindo a dupla hélice e podendo gerar câncer e doenças neurodegenerativas, além de, anormalidades cromossômicas (Carocho et al., 2018; Farhat et al., 2018).

Adicionalmente, os açúcares também são alvos dos espécies reativas, os quais podem ser danificados durante primeiras etapas da glicosilação não enzimática. A fragmentação de açúcares produz espécies de pequenas cadeias que pode levar à formação de α e β -dicarbonilos, os quais são considerados compostos mutagênicos (Carocho et al., 2018).

4. METODOLOGIAS *in vitro* PARA AVALIAR A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Levando em consideração a complexidade envolvida na ação *in vivo* dos antioxidantes, diferentes metodologias *in vitro* têm sido desenvolvidas para avaliar inicialmente, de forma simples e experimental, a capacidade de potenciais antioxidantes em interagir com radicais livres e espécies reativas (López-Alarcón & Denicola, 2013).

Tentativas recentes de padronizar ensaios levantaram algumas questões sobre a confiabilidade e aplicações apropriadas dos ensaios com antioxidantes, como as explanadas por Apak et al. (2013) e Schaich, Tian & Xie (2015):

1. Os ensaios refletem com precisão a cinética química das reações que ocorrem *in vivo*?
2. A diversidade química dos antioxidantes naturais permite separar, detectar e quantificar antioxidantes individuais a partir de uma matriz biológica/alimentar complexa?
3. Como os ensaios podem ser usados para prever a eficácia ou otimizar o uso de antioxidantes naturais nos alimentos?

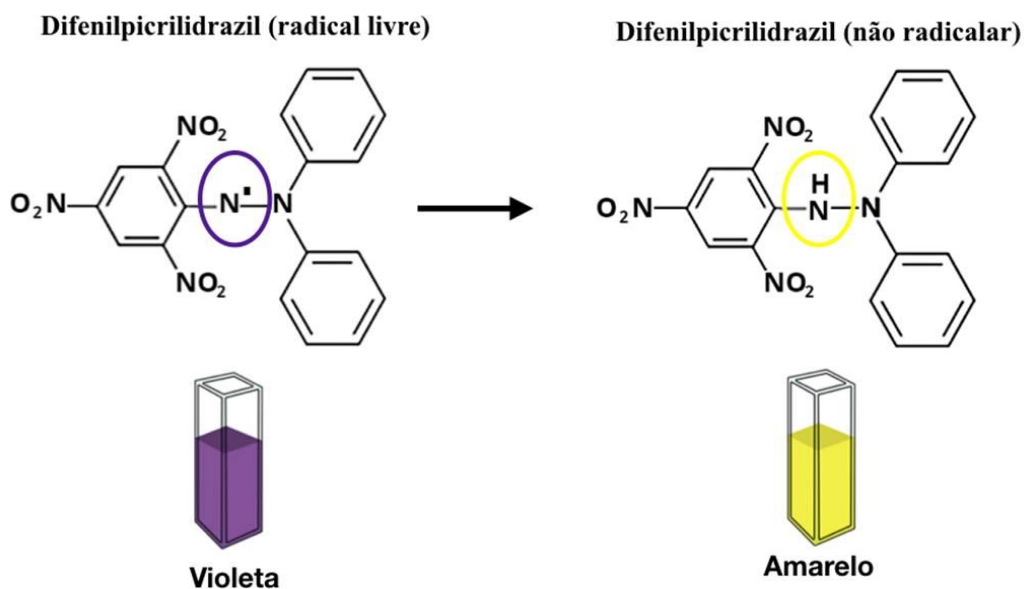
A seguir são discutidas as questões 1 e 2, com ênfase nos ensaios de sequestro de DPPH^\bullet , $\text{ABTS}^{\bullet+}$, FRAP, CUPRAC e ORAC.

4.1. ATIVIDADE DE ELIMINAÇÃO DO DPPH[•]

A molécula 2,2-Difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) é caracterizada como um radical livre estável, solúvel em solventes orgânicos e apresenta uma banda de absorção típica a 515 nm corresponde a cor violeta (Figura 3) (Floegel et al., 2011; Apak et al. 2013; Schaich, Tian & Xie, 2015).

Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R[•]), o DPPH[•] é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante. (Alam, Bristi & Rafiquzzaman, 2013; López-Alarcón & Denicola, 2013; Schaich, Tian & Xie, 2015; Shahidi & Zhong, 2015).

Figura 3 - Estrutura química do DPPH[•].



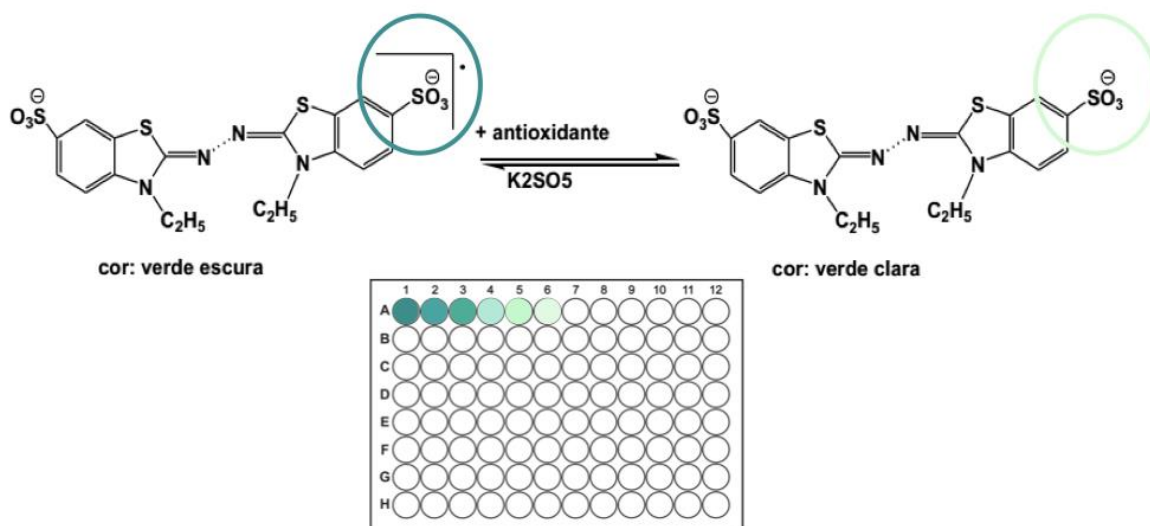
As vantagens desse método incluem, simplicidade, rapidez (30 minutos), podendo também ser usado para avaliar a atividade antioxidante de compostos sintéticos. No entanto, suas desvantagens incluem o fato do DPPH[•] ser um radical estável, estericamente impedido e hidrofóbico, portanto suas reações devem ser executadas em solventes orgânicos (Schaich,

Tian & Xie, 2015). Consequentemente, apenas reagentes redutores fortes são capazes de reagir com este radical em um modo estequiométrico. Além disso, o DPPH[•] apresenta uma fraca correlação entre a sua estrutura química com a estrutura das espécies reativas produzidas nos sistemas biológicos (López-Alarcón & Denicola, 2013).

4.2. ENSAIO ABTS^{•+}

Um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante é por meio da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}), que pode ser gerado por reação química, eletroquímica ou enzimática (Figura 4) (Niki, 2010; Schaich, Tian & Xie, 2015).

Figura 4 - Estabilização do radical ABTS^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.



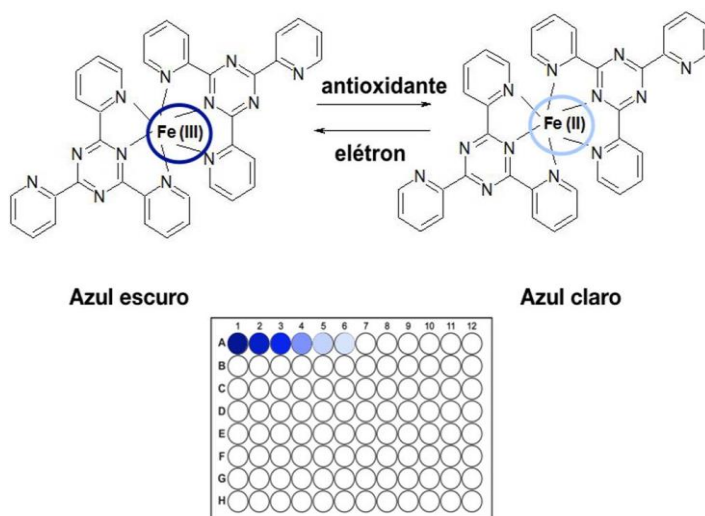
A vantagem do teste ABTS^{•+} consiste na sua relativa simplicidade que permite a aplicação na rotina de qualquer laboratório. Além disso, com essa metodologia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (Niki, 2010; Schaich, Tian & Xie, 2015).

Contudo, assim como o DPPH[•], o ABTS^{•+} é um radical grande, estável, estericamente impedido e não é encontrado no corpo humano. Além disso, o resultado do ensaio é dependente do tempo de incubação, assim como da taxa da amostra quantificada, e esta dependência somada a pouca seletividade do ABTS^{•+} na reação com átomos doadores de hidrogênio, constituem em importantes limitações deste método (Niki, 2010; Alam, Bristi & Rafiquzzaman, 2013; López-Alarcón & Denicola, 2013; Schaich, Tian & Xie, 2015).

4.3. REDUÇÃO DE ÍONS METÁLICOS (ENSAIOS FRAP E CUPRAC)

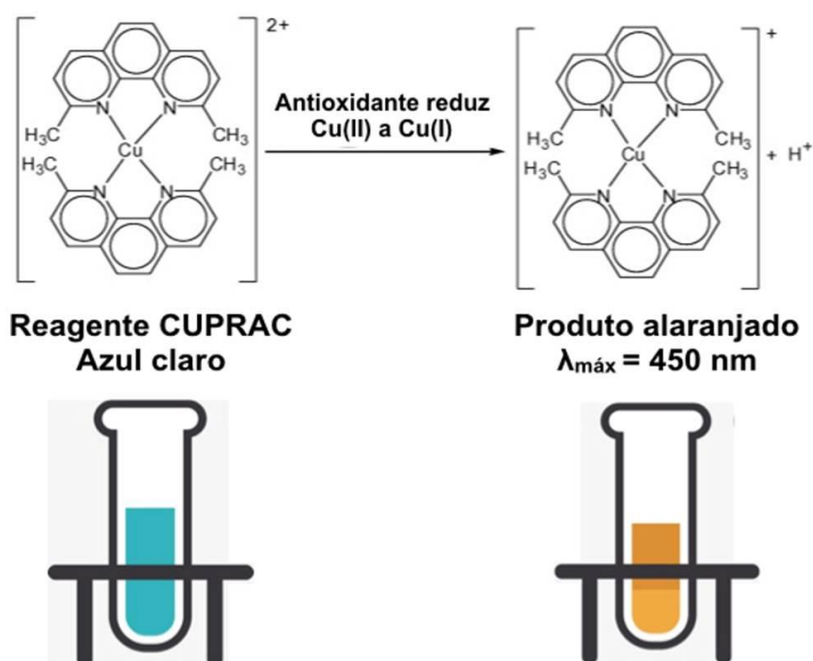
Esses métodos avaliam a capacidade da amostra em reduzir os íons férricos ou cúpricos em meio aquoso. O ensaio FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power - Potencial Antioxidante Redutor Férrico), utiliza a reação do complexo 2,3,5-trifenil-1,3,4-triaza-2-azoniaciclopenta-1,4-cloreto de dieno (TPTZ) com antioxidantes (Figura 5), enquanto o CUPRAC (Cupric ion-Antioxidant Capacity - Capacidade antioxidante-iônica cúprica) determina a habilidade de uma amostra em reduzir o complexo cobre-neocuproína (CuII-Nc) (Figura 6) (Alam, Bristi & Rafiquzzaman, 2013; López-Alarcón & Denicola, 2013).

Figura 5 - Redução do complexo $Fe(TPTZ)_2^{3+}$ a $Fe(TPTZ)_2^{2+}$.



A base de ambas as metodologias é que os complexos de TPTZ ou Nc com a forma reduzida dos metais apresentam bandas de absorção visíveis características com intensidade máxima a 593 e 450 nm para o ensaio FRAP e CUPRAC, respectivamente. Assim, esta redução é monitorada medindo a alteração na absorção utilizando um espectrofotômetro de matriz de diodo (Alam, Bristi & Rafiquzzaman, 2013; López-Alarcón & Denicola, 2013)..

Figura 6 - Redução do complexo $\text{Cu}^{2+}(\text{Nc})$ a $\text{Cu}^+(\text{Nc})$.



A principal vantagem destes métodos é a simplicidade das condições experimentais. No entanto, o ensaio FRAP requer um pH ácido (3,6), que não se assemelha ao pH fisiológico. Em contraste, o ensaio CUPRAC, realizado em pH 7,0, simula adequadamente o pH fisiológico (Alam, Bristi & Rafiquzzaman, 2013; López-Alarcón & Denicola, 2013).

4.4. ENSAIO ORAC

O ensaio ORAC é uma das metodologias mais reconhecidas dos ensaios antioxidantes *in vitro*, a reação é simples em conceito, porém, sua execução experimental é complexa (Schaich, Tian & Xie, 2015).

Este ensaio baseia-se na geração de radicais livres aquecendo um composto de azida, AAPH (dicloridrato de 2,2-azobis 2-amidopropano), esta se decompõe, eliminando o gás nitrogênio e gerando dois radicais de carbono (R^{\bullet}). Na presença de oxigênio, os R^{\bullet} gerados são convertidos em radicais peroxil (ROO^{\bullet}), que podem reagir com moléculas alvos ou com antioxidantes (Alam, Bristi & Rafiquzzaman, 2013; Schaich, Tian & Xie, 2015).

Sendo assim, o ensaio baseia-se na competição entre as reações das moléculas alvos e dos antioxidantes com o ROO^{\bullet} . A fluoresceína, o alvo mais comum em uso atual, quando atacada por ROO^{\bullet} , perde sua fluorescência. Adicionando um antioxidante a esse sistema, a perda da fluorescência é minimizada, neutralizando os radicais ROO^{\bullet} (Niki, 2010; Schaich, Tian & Xie, 2015). A reação é seguida pela medição da fluorescência ao longo do tempo, sendo os resultados calculados como a área total sob as curvas de reação (AUC) para cada amostra antioxidante, subtraída a área de reação sem antioxidante. Os resultados são reportados como equivalentes de Trolox (um análogo solúvel em água de vitamina E), o valor ORAC é então calculado a partir do Trolox Equivalente e expresso como unidades ORAC. Quanto maior o valor de ORAC, maior será o "poder antioxidante" (Alam, Bristi & Rafiquzzaman, 2013).

As vantagens desse método incluem o fato de ser um método simples e padronizado, utiliza radicais peroxil que são melhores modelos de reações antioxidantes com lipídios oxidantes e espécies reativas de oxigênio nos sistemas biológicos *in vivo*, e fornece geração contínua de radicais em uma escala de tempo realista. Além disso, o ensaio pode ser adaptado

para detectar antioxidantes hidrofílicos e hidrofóbicos, apenas alterando a fonte de radicais, solventes e moléculas alvo, e tem sido rotineiramente automatizado (Niki, 2010; Alam, Bristi & Rafiquzzaman, 2013; Schaich, Tian & Xie, 2015).

A complexidade da reação ORAC, no entanto, significa que há muitos pontos problemáticos, os quais podem causar dificuldades aos que utilizam este ensaio. O método exige rigoroso controle de temperatura, de oxigênio e das concentrações dos reagentes envolvidos no ensaio, quando tais exigências não são atendidas, as reações são lentas e incompletas, e os resultados são fracamente reprodutíveis (López-Alarcón & Denicola, 2013; Schaich, Tian & Xie, 2015).

Considerando a diversidade de mecanismos que os antioxidantes podem exercer *in vivo*, ainda não é possível encontrar um único método analítico para avaliar sua capacidade antioxidante (López-Alarcón & Denicola, 2013). É necessário, portanto, aplicar mais de um ensaio químico *in vitro* que avalie diferentes aspectos da reatividade dos compostos para EROs/ERNs (López-Alarcón & Denicola, 2013; Schaich, Tian & Xie, 2015).

5. GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO A PARTIR DA FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA

Biologicamente, os radicais HO[•] são gerados quando o H₂O₂ reage com Fe (II) (reação do tipo Fenton). No entanto, o uso de reações de Fenton no desenvolvimento de ensaios antioxidantes apresenta desvantagens, uma vez que muitos antioxidantes também são quelantes de metais que alteram a atividade do Fe (II) após a quelação (Rui-Jie et al., 2016).

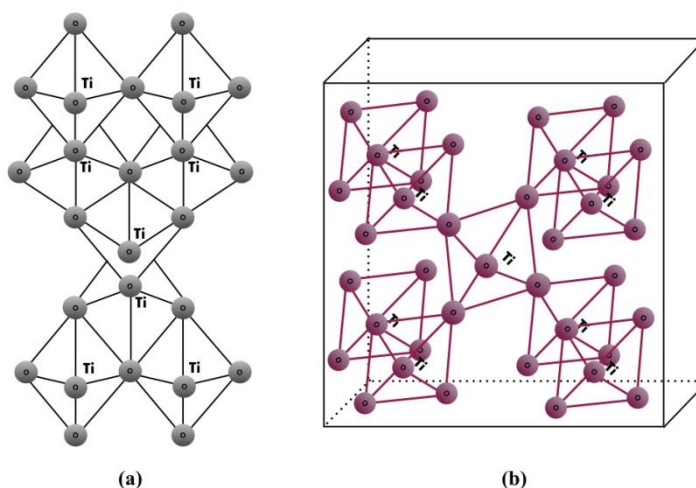
Nesse contexto, a fotocatalise heterogênea que tem sido aplicada a inúmeros processos de mineralização de compostos orgânicos por meio de geração de espécies reativas de oxigênio, surge como uma alternativa ao uso das reações de Fenton para aplicação a

metodologias de reconhecimento de atividade antioxidante (Chen et al., 2014). De acordo com pesquisas anteriores, o dióxido de titânio (TiO_2) tem sido considerado o fotocatalisador mais eficiente e econômico devido à sua capacidade de mineralizar completamente a matéria orgânica, por ser de baixo custo, não-tóxico, além da elevada capacidade oxidativa, por meio da geração de espécies reativas como radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). (Xiang, Yu, Wong, 2011; Rauf et al., 2009; Rui-Jie et al., 2016; Nagarajan et al., 2017; Chen et al., 2017; Ali et al., 2018; Sulaiman et al., 2018).

5.1. FOTOCATALISADOR DIÓXIDO DE TITÂNIO (TiO_2)

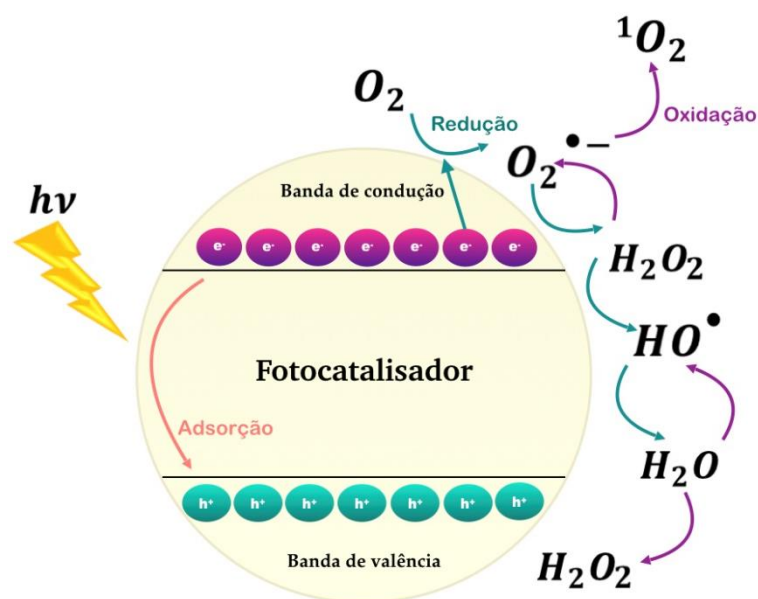
O TiO_2 pode ser encontrado em três formas cristalinas: anatase, rutilo e bruquita. Em todas as três formas, os átomos de titânio (Ti_4^+) são coordenados a seis átomos de oxigênio (O_2^-), formando octaedros de TiO_6 . Estas formas de TiO_2 podem ser minerais naturais ou sintéticas. No entanto, somente as fases anatase e rutilo são produzidas comercialmente (Figura 7). A forma anatase é a forma que possui maior eficiência fotocatalítica e, é composta de octaedros de canto (vértices), resultando em uma estrutura tetragonal (Ali et al., 2018; Sulaiman et al., 2018).

Figura 7 - Estrutura cristalina do TiO_2 (a) anatase (b) rutilo.



Os efeitos fotocatalíticos são exercidos pelas reações redox causadas por elétrons fotoinduzidos (e^-) e lacunas (h^+) gerados nas superfícies sólidas heterogêneas dos fotocatalisadores (Guo et al., 2015). Várias espécies reativas são geradas por meio das reações com as lacunas e elétrons, os quais são considerados envolvidos nas reais reações oxidativas e redutivas da fotocatalise. Na fotocatalise da água ocorre a geração de espécies reativas de oxigênio, compreendendo o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), oxigênio singlete (1O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$), além do não radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Figura 8) (Xiang, Yu, Wong, 2011; Rauf et al., 2009; Rui-Jie et al., 2016; Nagarajan et al., 2017; Nosaka & Nosaka, 2017).

Figura 8 - Espécies reativas de oxigênio geradas nas etapas de redução fotocatalítica e oxidação de oxigênio e água.



5.2. PROCESSO DE GERAÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO ($O_2^{\cdot-}$)

A quantidade de $O_2^{\cdot-}$ gerada em suspensão aquosa durante a fotocatalise heterogênea é linearmente correlacionada com a dos elétrons aprisionados. A evidência experimental sugere

que a redução do O_2 por meio dos elétrons da banda de condução gera $O_2^{\bullet-}$ de acordo com a equação 2 (Hao et al., 2016; Hayyan, Hashim & AlNashef, 2016; Chen et al., 2017).



Yamakata, Vequizo and Matsunaga (2015), estudaram a diferença no comportamento de elétrons e lacunas fotogerados na superfície do TiO_2 anatase e TiO_2 rutilo, por meio de espectroscopia de absorção de tempo visível. Os autores mostram o rápido decaimento dos elétrons na banda de condução para o TiO_2 rutilo enquanto para o TiO_2 anatase os elétrons têm uma vida mais longa. Na presença de O_2 a quantidade de elétrons na banda de condução diminuiu significativamente, esse decaimento fornece evidência direta do mecanismo proposto pela equação 2.

Outro mecanismo de geração do $O_2^{\bullet-}$ é por meio da oxidação de H_2O_2 com uma lacuna fotogerada da banda de valência (h^+), em solução aquosa, como na equação 3. O H_2O_2 é produzido pela oxidação em duas etapas da água ou pela redução de dois elétrons do O_2 como mostrado na Figura 8 (Nosaka & Nosaka, 2017).

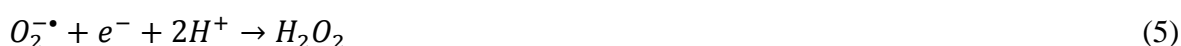


Quanto aos fotocatalisadores, além do TiO_2 , o sulfeto de cádmio (CdS) e o sulfeto de zinco (ZnS) geram $O_2^{\bullet-}$ (Rajendran et al., 2010; He et al., 2014)

5.3. PROCESSO DE GERAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H_2O_2)

Duas vias fotocatalíticas geram o H_2O_2 , como mostrado na Figura 8. Essas são a redução de dois elétrons de O_2 e a oxidação da água por meio de dois h^+ . Por causa da baixa reatividade do $O_2^{\bullet-}$, a rota de redução parece dominante no processo de geração do H_2O_2 . Para

a geração de H_2O_2 a partir de $O_2^{\bullet-}$, existem dois caminhos de redução. Uma é a reação na qual o $O_2^{\bullet-}$ é simultaneamente oxidado e reduzido, como dito na equação 4. A outra é a redução do $O_2^{\bullet-}$ por elétrons fotoinduzidos da banda de condução, equação 5 (Li & Selloni, 2013; Nosaka & Nosaka, 2017).



5.4. PROCESSO DE GERAÇÃO DO OXIGÊNIO SINGLETE (1O_2)

Estudos experimentais utilizando o catalisador TiO_2 , sugerem que o $O_2^{\bullet-}$ é provavelmente oxidado por lacunas da banda de valência, para gerar 1O_2 como dito na equação 6 (Daimon et al., 2008; He et al., 2014; Hayyan, Hashim & AlNashef, 2016; Nosaka & Nosaka, 2017).



Nos quais, pós mais finos proporcionam um maior rendimento de $O_2^{\bullet-}$ gerando uma quantidade maior de 1O_2 . Para os fotocatalisadores CdS e ZnS, a transferência de elétrons de $O_2^{\bullet-}$ para furos de banda de valência também é sugerida como mecanismo de geração de 1O_2 (He et al., 2014).

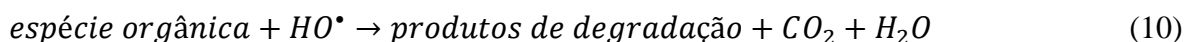
5.5. PROCESSO DE GERAÇÃO DO RADICAL HIDROXILA ($\bullet OH$)

Na fotocatalise, quando a energia da radiação é maior que a energia de *bandgap* do semicondutor, um elétron da banda de valência é excitado para a banda de condução (Figura 8). No caso do TiO_2 anatase, o intervalo de *bandgap* é de 3,2 eV, portanto, para gerar

excitação de elétrons, se faz necessário o uso de luz UV (≤ 387 nm) (Xiang, Yu, Wong, 2011; Rauf et al., 2009; Rui-Jie et al., 2016; Nagarajan et al., 2017; Chen et al., 2017).



Lacunas positivas podem oxidar a água na superfície do catalisador para produzir radicais HO \cdot (Eq. 8 e 9), que são oxidantes extremamente poderosos. Os radicais hidroxila podem posteriormente oxidar espécies orgânicas produzindo, CO $_2$ e H $_2$ O (eq. 10) (Houas et al., 2001; Xiang, Yu, Wong, 2011; Rauf et al., 2009; Rui-Jie et al., 2016; Nagarajan et al., 2017).



6. GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO A PARTIR DA FOTOCATÁLISE APLICADA A ENSAIOS ANTIOXIDANTES

Diante do que foi exposto, percebe-se que a grande vantagem do método ORAC em relação aos outros ensaios mais utilizados, consiste no fato deste ensaio utilizar radicais peroxil, que estão presentes em sistemas biológicos, como fonte de espécies reativas. As espécies reativas de oxigênio incluem os radicais livres, hidroxila (HO \cdot), peróxilo (ROO \cdot), ânion superóxido (O $_2^{\cdot-}$) e outras espécies não radicalares como oxigênio singlete (1O_2), peróxido de hidrogênio (H $_2$ O $_2$), ozônio (O $_3$) e ácido hipocloroso (HOCl) (Almeida et al., 2012; Pisoschi & Pop, 2015; Grzesik et al., 2018). Estas espécies, são geradas constantemente nos sistemas *in vivo*, e sendo assim, se faz necessário o desenvolvimento de metodologias

analíticas *in vitro* para avaliação da capacidade antioxidante que utilizem estas espécies reativas.

Portanto, o uso da fotocatalise heterogênea como tecnologia de geração *in vitro* das principais espécies reativas de oxigênio ($\bullet\text{OH}$, $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2), presentes nos organismos vivos, surge como uma alternativa simples, barata e confiável para aplicação ao desenvolvimento de novos métodos para avaliação da capacidade antioxidante.

Liu et al. (2005) desenvolveram eletrodos modificados com dióxido de titânio suportado em eletrodo de vidro (TiO_2/ITO) para quantificar fotooxidativamente o ds-DNA adsorvido e estudar o efeito de antioxidantes como agentes de proteção ds-DNA. Os filmes de TiO_2 foram utilizados para imobilizar ds-DNA, e conseqüentemente ocasionar a oxidação deste por meio de radicais hidroxila fotogerados. Danos ocorridos após a oxidação do ds-DNA são detectados pelo monitoramento da corrente de redução eletroquímica do azul de metileno. O método foi aplicado eficientemente na avaliação das propriedades antioxidantes da glutathiona e do ácido gálico.

Ma et al. (2013) sintetizaram um novo sensor de avaliação de capacidade antioxidante eletroquímica, a partir de um catalisador composto por grafeno e dióxido de titânio (GO- TiO_2) como gerador de radicais $\text{HO}\bullet$ e DNA como sonda molecular. A capacidade antioxidante foi mensurada utilizando a supressão do declínio da corrente de redução do azul de metileno utilizado. O método foi aplicado na avaliação da capacidade antioxidante do ácido gálico e apresentou valor de detecção de $0,85 \text{ mg.L}^{-1}$. O método também foi aplicado, com sucesso, a avaliação da capacidade antioxidante de chás.

Rui-Jie et al. (2016) desenvolveram um método baseado na fotogeração de radicais $\text{HO}\bullet$ em água a partir de nanopartículas de TiO_2 para estudar a cinética de oxidação de moléculas orgânicas usadas como antioxidantes biológicos. A cinética de oxidação do ácido tereftálico como sonda de referência foi monitorizada por medições de fluorescência da

concentração da sua forma oxidada. A cinética de oxidação de outras moléculas antioxidantes foram comparadas com base neste modelo cinético. Os resultados mostraram a seguinte ordem de potencial antioxidante das substâncias avaliadas: ácido lipóico, ácido gálico, glutatona, ácido úrico, vitamina C, vitamina E, trolox e bilirrubina.

Sonane, Moin and Satish (2017) utilizaram a fotocatalise heterogênea para determinar o efeito protetor dos antioxidantes curcumina e vitamina C contra a exposição às espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas por meio de nanopartículas de TiO₂ e ZnO em *Caenorhabditis elegans*. A partir desse método os autores concluíram que ambos os antioxidantes eficientemente neutralizam as EROs induzidas por nanopartículas de TiO₂ e ZnO.

Comparando os métodos de ensaio antioxidante baseado em geração de espécies reativas de oxigênio a partir da fotocatalise heterogênea com outros métodos relatados anteriormente, a geração de EROs a partir da fotocatalise heterogênea apresenta três vantagens: (a) utiliza-se radicais •OH, que proporcionam melhor biocompatibilidade à destruição oxidativa do que os radicais sintéticos nos organismos; (b) em contraste com a reação de Fenton, não há confusão se os antioxidantes estão neutralizando EROs ou quelando o ferro; (c) a fotocatalise heterogênea simula as reações em cascata de EROs que ocorre nos sistemas biológicos a partir da geração simultânea e constante de •OH, ¹O₂ e O₂^{•-}.

Sendo assim, a utilização da fotocatalise como fonte de geração EROs apresenta relevância biológica importante para desenvolvimento de novas metodologias simples, fáceis, rápidas e baratas, com aplicações na indústria alimentícia, médica e cosmética.

7. CONCLUSÃO

Devido ao crescente interesse por fontes externas de antioxidantes, o desenvolvimento de métodos para avaliar a capacidade antioxidante tornou-se uma área de pesquisa ativa. Inúmeros ensaios vem sendo desenvolvidos, no entanto, a grande maioria apresenta desvantagens que incluem elevado custo dos reagentes, alta complexidade das reações, uso de equipamentos caros, entre outros. Sendo assim, nesse trabalho de revisão, foram elucidados a importância dos antioxidantes para manutenção da saúde nos sistemas biológicos, em seguida, o desenvolvimento de métodos *in vitro* para determinação de atividade antioxidante são abordados, destacando suas vantagens e desvantagens, e por fim, foi discutido o uso da fotocatalise heterogênea para desenvolver métodos de avaliação de atividade antioxidante.

Diante do panorama exposto, conclui-se que a grande desvantagem dos métodos mais utilizados na literatura, consistem no fato de utilizar radicais grandes, estericamente impedidos e inexistentes nos sistemas *in vivo*. Já o método ORAC possui a grande vantagem de usar radicais gerados fisiologicamente, no entanto, este método utiliza reagentes caros e sua metodologia apesar de ser simples na execução, possui problemas no controle de temperatura, oxigênio e reagentes, podendo apresentar resultados não condizentes com a realidade.

Portanto, a geração *in vitro* das principais espécies reativas de oxigênio ($\bullet\text{OH}$, $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2), presentes nos organismos vivos, por meio da fotocatalise heterogênea, surge como uma alternativa simples, barata e confiável para aplicação ao desenvolvimento de ensaios antioxidantes. Sendo assim, essa revisão teve como objetivo esclarecer os mecanismos que envolvem a geração de espécies reativas por meio da fotocatalise para que futuras pesquisas possam aplicar esta tecnologia ao desenvolvimento de métodos *in vitro*, que sejam confiáveis e que reproduzam as reações das espécies reativas que ocorrem nos sistemas biológicos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alam, M. N., Bristi, N. J. and Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 21, p. 143–152. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>.

Almeida, J.S.; Benvegnú, D.M.; Bouffleur, N.; Reckziegel, P.; Barcelos, R.C.S.; Coradini, K.; de Carvalho, L.M.; Bürger, M.E.; Beck, R.C.R. (2012). Hydrogels containing rutin intended for cutaneous administration: efficacy in wound healing in rats. *Drug Dev. Ind. Pharm.* v. 38, n. 7, p. 792–799. <https://doi.org/10.3109/03639045.2011.628676>.

Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M., and Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, v. 85, p. 957–998. Doi: <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-12-07-15>.

Ataie, A., Shadifar, M., Ataee, R. (2016). Polyphenolic antioxidants and neuronal regeneration. *Basic and Clinical Neuroscience*, v. 7, n. 2, p. 81-90. <http://dx.doi.org/10.15412/J.BCN.03070201>.

Badarinath, A.V., Rao, K.M., Chetty, C.M.S., Ramkanth, V., Rajan, T.V.S., Gnanaprakash, K. (2010) A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *Int. J. PharmTech Res.* v. 2, n. 2, p. 1276–1285.

Bao, D.; Wang, J.; Pang, X.; Liu, H., (2017). Protective Effect of Quercetin against Oxidative Stress-Induced Cytotoxicity in Rat Pheochromocytoma (PC-12) Cells. *Molecules*, v. 22, n. 7, p. 1122. Doi: [10.3390/molecules22071122](https://doi.org/10.3390/molecules22071122).

Barroso, M. F.; Luna, M.A; Moyano, F.; Delerue-Matos, C.; Correa, N.M.; Molina, P.G. (2018). Study of lipid peroxidation and ascorbic acid protective role in large unilamellar vesicles from a new electrochemical performance. *Bioelectrochemistry*, v. 120, p. 120–126, <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.12.003>.

Bikkad, M. D., Ghuge, S. H., Somwanshi, S. D., and Ingle, S. B. (2014). Evaluation of Lipid Peroxide and Antioxidants in Smokers. *International Journal of Basic and Applied Medical Sciences*, v. 4, n. 1, p. 1-6.

Canabady-Rochelle, L.L.S.; Selmeczi, K.; Collin, S.; Pasc, A.; Muhr, L.; Bosch-Muller, S. (2017). SPR Screening of Metal chelating Peptides in a Hydrolysate for their Antioxidant Properties. *Food Chemistry*, v. 239, p. 478-485. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.116>.

Canabady-Rochelle, L.L.S.; Selmeczi, K.; Collin, S.; Pasc, A.; Muhr, L.; Bosch-Muller, S. (2017). SPR Screening of Metal chelating Peptides in a Hydrolysate for their Antioxidant Properties. *Food Chemistry*, v. 239, p. 478-485.

Carocho, M.; Morales, P.; Ferreira, I.C.F.R., (2018). Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends in Food Science and Technology*, v. 71, p. 107-120. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.008>.

Chand, K., Hiremathad, A., Singh, M., Santos, M. A., and Keri, R. S. (2017). A review on antioxidant potential of bioactive heterocycle benzofuran: Natural and synthetic derivatives. *Pharmacological Reports*, v. 69, n. 2, p. 281-295. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.11.007>.

Chen, D.; Du, Y.; Zhu, H.; Deng, Y. (2014). Synthesis and characterization of a micro fibrous TiO₂-CdS/palygorskite nanostructured material with enhanced visible light photocatalytic

activity. *Applied Clay Science*, v. 87, p. 285-291. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2013.11.031>.

Chen, P., Wang, F., Chen, Z. F., Zhang, Q., Su, Y., Shen, L and Liu, G. (2017). Study on the photocatalytic mechanism and detoxicity of gemfibrozil by a sunlight-driven TiO₂/carbon dots photocatalyst: The significant roles of reactive oxygen species. *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 204, p. 250-259. Doi: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.apcatb.2016.11.040>.

Chisté, R. C.; Freitas, M.; Mercadante, A.Z.; Fernandes, E. (2012). The potential of extracts of *Caryocar villosum* pulp to scavenge reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry*, v. 135, p. 1740–1749. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.027>.

Cömert, E. D., Gökmen, V. (2017). Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. *Food Research International*, v. 105, p. 76-93. doi:10.1016/j.foodres.2017.10.056.

Cos, P.; Ying, L.; Calomme, M.; Hu, J.P.; Cimanga, K.; Poel, B.V.; Pieters, L.; Vlietinck, A.J.; Berghe, D.G. (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*. 61 (1), 71-76, doi: 10.1021/np970237h.

Costa, D.; Fernandes, E.; Santos, J.L.M.; Pinto, D.C.G.A.; Silva, A.M.S.; Lima, J.L.F.C. (2007). New noncellular fluorescence microplate screening assay for scavenging activity against singlet oxygen. *Anal Bioanal Chem*, 387:2071-2081. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0998-9>.

Daimon, T., Hirakawa, T., Kitazawa, M., Suetake, J., and Nosaka, Y. (2008). Formation of singlet molecular oxygen associated with the formation of superoxide radicals in aqueous

suspensions of TiO₂ photocatalysts. *Applied Catalysis A: General*, v. 340, n. 2, p. 169-175.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2008.02.012>.

Farhat, Z.; Browne, R.W.; Bonner, R.M.; Tian, L.; Deng, F.; Swanson, M.; Mu, L. (2018).

How do glutathione antioxidant enzymes and total antioxidant status respond to air pollution exposure?. *Environment International*, v. 112, p. 287-293. Doi:

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.12.033>.

Floegel, A.; Kim, D.O.; Chung, S.J.; Koo, S.I.; Chun, O.K. (2011). Comparison of

ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods.

Journal of Food Composition and Analysis, v. 24, p. 1043–1048. Doi:

<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008>.

Ge, Q.; Ge, P.; Jiang, D.; Du, N.; Chen, J.; Yuan, L.; Yu, H.; Xu, X.; Wu, M.; Zhang, W.;

Zhou, G. (2018). A novel and simple cell-based electrochemical biosensor for evaluating the antioxidant capacity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese dry-cured ham.

Biosensors and Bioelectronics, v. 99, p. 555-563. Doi:

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.037>.

Gerschman, R.; Gilbert, D.L.; Nye, S.W.; Nadig, P.W.; Fenn, W.O. (1954). Role of

adrenalectomy and adrenal-cortical hormones in oxygen poisoning. *American Journal of Physiology*, v. 178, p. 346-350.

Gomes, A.; Costa, D.; Lima, J.L.F.C; Fernandes, E. (2006). Antioxidant activity of b-

blockers: An effect mediated by scavenging reactive oxygen and nitrogen species? *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 14, p. 4568–4577. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.02.023>.

Grzesik, M., Naparło, K., Bartosz, G., Sadowska-Bartos, I. Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. *Food Chemistry*, v. 241, p. 480-492, 2018.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.117>.

Guo, X.; Li, Q.; Zhang, M.; Long, M.; Kong, L.; Zhou, Q.; Shao, H.; Hu, W.; Wei, T. Enhanced photocatalytic performance of N-nitrosodimethylamine on TiO₂ nanotube based on the role of singlet oxygen. *Chemosphere*, v. 120, p. 521–526, 2015. Doi:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.09.002>.

Hao, R., Wang, G., Tang, H., Sun, L., Xu, C., and Han, D. (2016). Template-free preparation of macro/mesoporous g-C₃N₄/TiO₂ heterojunction photocatalysts with enhanced visible light photocatalytic activity. *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 187, p. 47-58. Doi:

<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.apcatb.2016.01.026>.

Hayyan, M., Hashim, M. A., and AlNashef, I. M. (2016). Superoxide ion: generation and chemical implications. *Chemical reviews*, v. 116, n. 5, p. 3029-3085.

He, W., Jia, H., Wamer, W. G., Zheng, Z., Li, P., Callahan, J. H., and Yin, J. J. (2014). Predicting and identifying reactive oxygen species and electrons for photocatalytic metal sulfide micro–nano structures. *Journal of Catalysis*, v. 320, p. 97-105. Doi:

<https://doi.org/10.1016/j.jcat.2014.10.004>.

Houas, A., Lachheb, H., Ksibi, M., Elaloui, E., Guillard, C., and Herrmann, J. M. (2001). Photocatalytic degradation pathway of methylene blue in water. *Applied Catalysis B: Environmental*, n. 31, v. 2, p. 145-157. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0926-3373\(00\)00276-9](https://doi.org/10.1016/S0926-3373(00)00276-9).

Kelly E. H., Anthony R. T., and Dennis J. B. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 13, n. 10, p. 572–584. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5).

Kumar, S., Sharma, S. and Vasudeva, N. Chin. (2017). Review on antioxidants and evaluation procedures. *J. Integr. Med.* p. 1-12. <https://doi.org/10.1007/s11655-017-2414-z>.

Kumar, S.; Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview, *The Scientific World Journal*, vol. 2013, Article ID 162750, 16 pages, doi:10.1155/2013/162750.

Li, Y. F., and Selloni, A. (2013). Theoretical study of interfacial electron transfer from reduced anatase TiO₂ (101) to adsorbed O₂. *Journal of the American Chemical Society*, v. 135, n. 24, p. 9195-9199. doi: 10.1021/ja404044t.

Liu, J., Roussel, C., Lagger, G., Tacchini, P., & Girault, H. H. (2005). Antioxidant sensors based on DNA-modified electrodes. *Analytical chemistry*, 77(23), 7687-7694.

López-Alarcón, C. and Denicola, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, v. 763, p. 1-10, 2013. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051>.

Lü, J.M.; Lin, P.H.; Yao, Q.; Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(4): 840-860. Doi:<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x>

Luo, L.; Sun, Q.; Mao, Y.Y.; Lu, Y.H.; Tan, R.X. (2004). Inhibitory effects of flavonoids from *Hypericum perforatum* on nitric oxide synthase. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 93, p. 221-225. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.03.042>.

Ma, W., Han, D., Zhang, N., Li, F., Wu, T., Dong, X., & Niu, L. (2013). Bionic radical generation and antioxidant capacity sensing with photocatalytic graphene oxide–titanium dioxide composites under visible light. *Analyst*, 138(8), 2335-2342. Doi: 10.1039/C3AN00108C

McCord, J. M., Fridovich, I. The Biology and Pathology of Oxygen Radicals. *Ann Intern Med.* v. 89, p. 122-127, 1978. doi: 10.7326/0003-4819-89-1-122.

Mozafari, M. R., Flanagan, J.; Martia-Merino, L.; Awati, A.; Omri, A.; Suntres, Z. E.; Singh, H. (2006). Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 86, n. 13, p. 2038–2045. DOI: 10.1002/jsfa.2576.

Nagarajan, S.; Skillena, N.C.; Fina, F.; Zhang, G.; Randorn, C.; Lawton, L.A.; Irvine, J.T.S.; Robertson, P.K.J. (2017). Comparative assessment of visible light and UV active photocatalysts by hydroxyl radical quantification. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 334:13–19. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2016.10.034>.

Niki, E. (2010). Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 503–515. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016>.

Nosaka, Y., and Nosaka, A. Y. (2017). Generation and detection of reactive oxygen species in photocatalysis. *Chemical reviews*, v. 117, n. 17, p. 11302-11336. Doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00161.

Omar, S.H.; Kerr, P.G.; Scott, C.J.; Hamlin, A.S.; Obiede, H.K., (2017). Olive (*Olea europaea* L.) Biophenols: A Nutraceutical against Oxidative Stress in SH-SY5Y Cells. *Molecules*, 22(11), 1858. Doi: 10.3390/molecules22111858.

Pisoschi, A.M. and Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a Review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 97, p. 55-74. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>.

- Prior, R.L. (2015). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *Journal of Functional Foods*, 18:797-810. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.018>.
- Rajan, V. K.; Muraleedharan, K. (2016). A computational investigation on the structure, global parameters and antioxidant capacity of a polyphenol: gallic acid. *Food Chemistry*, v. 220, p. 93-99. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.178>.
- Rajendran, V., König, A., Rabe, K. S., and Niemeyer, C. M. (2010). Photocatalytic Activity of Protein-Conjugated CdS Nanoparticles. *Small*, v. 6, n. 18, p. 2035-2040. doi: <https://doi.org/10.1002/sml.201000690>.
- Rauf, M. A.; Ashraf, S. S., (2009) Fundamental principles and application of heterogeneous photocatalytic degradation of dyes in solution. *Chemical Engineering Journal*, 151, 10-18. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.02.026>.
- Roginsky, V. and Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, v. 92, p. 235–254. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.004>.
- Rui-Jie, J.; Qiang, Z.; Ji-Feng, L.; Mohamad Hojeij; Girault, H.H., (2016). Antioxidant Assay Based on Quenching of Photocatalytically Generated Reactive Oxygen Species. *Chin. J. Anal Chem*, v. 44, n. 8, p. 1257–1262. doi: [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(16\)60950-7](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(16)60950-7).
- Sarangarajan, R., Meera, S., Rukkumani, R., Sankar, P., Anuradha, G. (2017). Antioxidants: Friend or foe?. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 10, n. 12, p. 1111-1116. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.10.017>.

Sartori, G. V.; Costa, C. N. Da; Ribeiro, A. B. Conteúdo Fenólico e Atividade Antioxidante de Polpas de Frutas Congeladas. *Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos*, v. 5, n. 3, p. 23-29, 2014. doi: 10.14685/rebrapa.v5i3.143.

Schaich, K.M.; Tian, X.; Xie, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH•, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*. v. 14, p. 111-125, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.043>.

Shahidi, F. and Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, v. 18, p. 757-781. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>.

Sonane, M., Moin, N., & Satish, A. (2017). The role of antioxidants in attenuation of *Caenorhabditis elegans* lethality on exposure to TiO₂ and ZnO nanoparticles. *Chemosphere*, 187, 240-247. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.080>

Sulaiman, S. N. A., Noh, M. Z., Adnan, N. N., Bidin, N., and Ab Razak, S. N. (2018). Effects of photocatalytic activity of metal and non-metal doped TiO₂ for Hydrogen production enhancement-A Review. In *Journal of Physics: Conference Series*, v. 1027, No. 1, p. 012006. IOP Publishing.

Treml, J.; Smejkal, K. (2016). Flavonoids as Potent Scavengers of Hydroxyl Radicals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 15, p. 720-738. DOI: 10.1111/1541-4337.12204.

Xiang, Q.; Yu, J.; Wong, P. K. (2011). Quantitative characterization of hydroxyl radicals produced by various photocatalysts. *Journal of Colloid and Interface Science* 357, 163–167. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.01.093>.

Yamakata, A.; Vequizo, J. J. M.; Matsunaga, H. (2015). Distinctive behavior of photogenerated electrons and holes in anatase and rutile TiO₂ powders. *Journal Phys. Chem. C*, v. 119, n. 43, p. 24538–24545. Doi: 10.1021/acs.jpcc.5b09236.

Zou, Z., Xi, W., Hu, Y., Nie, C., Zhou, Z. (2016). Antioxidant activity of Citrus fruits. *Food chemistry*, v. 196, p. 885-896. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.072>.

CAPÍTULO 2

ESTUDO DA DESCOLORAÇÃO DE CORANTES EM SUSPENSÃO DE TiO_2 E ZnO UTILIZANDO ENSAIOS MINIATURIZADOS

ESTUDO DA DESCOLORAÇÃO DE CORANTES EM SUSPENSÃO DE TiO₂ E ZnO UTILIZANDO ENSAIOS MINIATURIZADOS

Anallyne Nayara Carvalho Oliveira Cambrussi¹, Alan Ícaro de Sousa Morais¹,
Alex de Meireles Neris², Josy Antevéli Osajima¹; Edson Cavalcanti da Silva Filho¹ and
Alessandra Braga Ribeiro¹

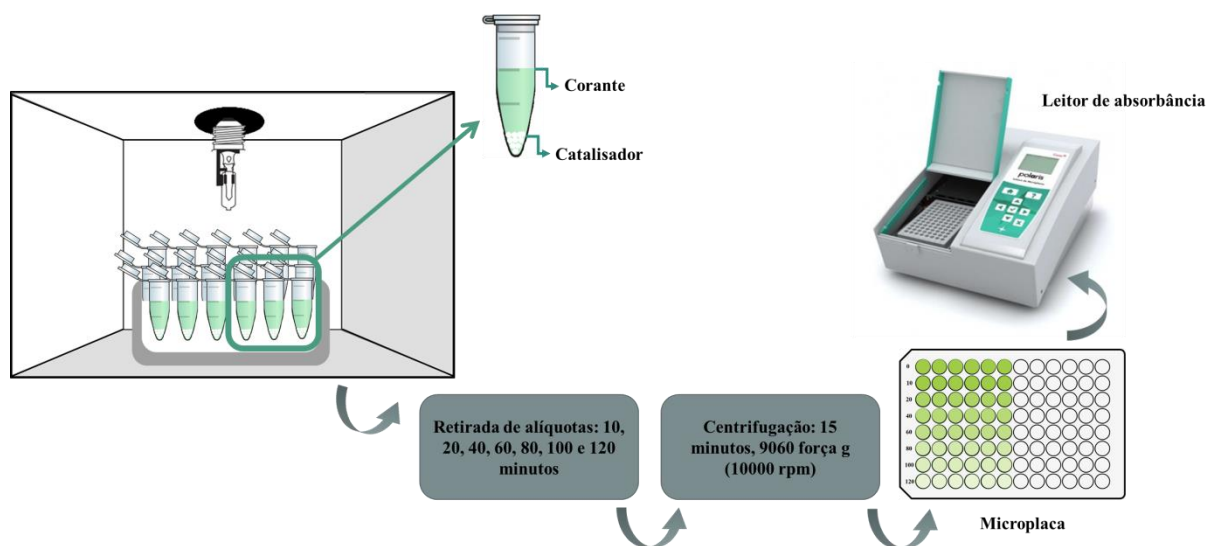
¹*Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais, Laboratório Interdisciplinar de
Materiais Avançados – LIMAV, Centro de Tecnologia - CT, Universidade Federal do
Piauí-UFPI, Teresina-PI, CEP 64049-550.*

²*Centro de Pesquisa e Extensão: Laboratório de Combustíveis e Materiais - LACOM,
Universidade Federal da Paraíba-UFPB, João Pessoa, PB, CEP 58033-455.*

RESUMO: A miniaturização tem sido uma tendência na instrumentação de análises químicas. O interesse pela miniaturização advém dos benefícios percebidos de análises mais rápidas, mais fáceis, menos dispendiosas e que produzem o mínimo de resíduos. Assim, este trabalho propõe uma miniaturização e automação de testes fotocatalíticos utilizando um leitor de microplacas para a análise de diversos resultados simultaneamente, utilizando apenas microlitros de solução. O presente trabalho investiga a fotocatalise heterogênea dos corantes eosina amarela, amarelo ácido 73 e amarelo básico 2, na presença dos catalisadores óxido de zinco (ZnO) e dióxido de titânio (TiO₂), sob irradiação na luz visível e na luz ultravioleta. A descoloração do corante foi avaliada usando um leitor de microplacas (Elisa Polaris®), um dispositivo fotométrico que realiza leituras colorimétricas na faixa de absorvância 0-3 (ABS) em comprimentos de onda de 405, 450, 492 e 630 nm. O estudo cinético foi realizado utilizando a lei Langmuir-Hinshelwood. Verificou-se que as taxas de descoloração foram superiores a 90% em um período de 120 minutos para todos os sistemas estudados,

especialmente o sistema composto de corante ácido amarelo 73 e o catalisador ZnO, que atingiu uma descoloração de 96,23% em 120 minutos.

Resumo gráfico:



Palavras-chave: fotocatalise heterogenea, estudo cinetico, ensaios miniaturizados.

ABSTRACT

Miniaturization has been a trend in the instrumentation of chemical analyzes. The interest in miniaturization stems from the perceived benefits of faster, easier, less expensive and less wasteful analyzes. Thus, this work proposes a miniaturization and automation of photocatalytic tests using a microplate reader for the analysis of several results, using only microliters of solution. The present work investigates the heterogeneous photocatalysis of the eosin yellow, acid yellow 73 and basic yellow 2 dyes, in the presence of zinc oxide (ZnO) and titanium dioxide (TiO₂) catalysts, under irradiation in the visible light and ultraviolet light. Dye degradation was evaluated using a microplate reader (Elisa Polaris®), a photometric device that performs colorimetric readings in the 0-3 absorbance (ABS) range at wavelengths of 405, 450, 492 and 630 nm. The kinetic study was performed using the Langmuir-Hinshelwood law. It was verified that the degradation rates were higher than 90% over a period of 120 minutes for all the studied systems, especially the system composed of acid yellow dye 73 and the ZnO catalyst, which reached a degradation of 96.23% in 120 minutes.

Keywords: heterogeneous photocatalysis, kinetic study, miniaturized assays.

1. INTRODUÇÃO

As moléculas dos corantes são classificadas de acordo com suas estruturas químicas ou de acordo com suas aplicações, bem como, podem ser classificadas em relação à sua solubilidade na água (Öztürk & Malkoc, 2014). Os corantes aniônicos, por exemplo, são pigmentos amplamente utilizados em indústrias de detergente, sabão, têxtil, impressão e cosméticos, são conhecidos comercialmente como corantes ácidos (Rehman et al., 2012). Os corantes amarelo ácido 73 (AA73) e eosina amarela (EA) são exemplos dessa classe, também comercializados como corantes fluorescentes.

Por outro lado, os corantes catiônicos, são pigmentos sintéticos, comercialmente conhecidos como corantes básicos e são amplamente utilizados na indústria têxtil, em vários processos, como tingimento de acrílico, nylon, seda e lã (Pimol et al., 2008; Öztürk & Malkoc, 2014). Um exemplo dessa classe de corantes é o corante 4,4-dimetilaminobenzofenonimida, comercialmente conhecido como corante amarelo básico 2 (AB2), utilizado na indústria têxtil e na indústria de couro (Pimol et al., 2008; Salari et al., 2009).

Os efluentes, industriais e laboratoriais a base de corantes, são considerados poluentes ambientais significativos, principalmente pela baixa biodegradabilidade (Hadjltaief et al., 2016; Pimol et al., 2008; Fassi et al., 2012). Anualmente, toneladas de corantes são despejados como águas residuais através de efluentes têxteis (Bakar et al., 2017). Esses resíduos são ricos em matéria orgânica e são descartados nos recursos hídricos, causando poluição e afetando seriamente o ecossistema aquático ao impedir a penetração da luz na água impossibilitando a realização da fotossíntese (Lei et al., 2016; Radhika & Thomas, 2017).

Para resolver as questões relacionadas com a poluição da água, foram realizados estudos para otimização de métodos para remoção de resíduos de corantes, os quais incluem

tratamentos como precipitação seguida por filtração (Rehman et al., 2012), coagulação (Gümüş & Akbal, 2011), adsorção em carbono ativado (Dotto et al., 2011), permuta iônica (Gümüş & Akbal, 2011), ozonização (Stets et al., 2017), degradação microbiana aeróbica e anaeróbica (Lei et al., 2016), entre outros. A maioria desses métodos consiste em realizar a transferência de poluente de uma fase para outra, exigindo um tratamento secundário de águas residuais, tornando-se ineficaz quanto a descontaminação dos efluentes (Gümüş & Akbal, 2011; Fassi et al., 2012; Li et al., 2012).

Portanto, um método sustentável e ambientalmente correto, tem sido utilizado para tratar a poluição da água, que consiste no uso de Processos Oxidativos Avançados (POAs) (Gümüş & Akbal, 2011; Li et al., 2012; Hadjltaief et al., 2016). Os POAs são baseados na produção *in situ* de radicais hidroxila (HO^\bullet), espécies reativas de alto potencial padrão de redução (2,72 V) geradas a partir de radiação visível ou na região do ultravioleta (Xue, *et al.* 2016), as quais, por sua alta capacidade oxidativa, são capaz de causar a mineralização de diversas moléculas orgânicas (Nogueira et al., 2007; Frade & Gomes, 2012). Tais espécies reativas reagem rapidamente e sem especificidade com a maioria dos compostos orgânicos levando ao processo de mineralização com formação de CO_2 e H_2O (Fassi et al., 2012).

Estes processos oxidativos dividem-se em dois grandes grupos, de acordo com o número de fases presente no sistema: processos homogêneos e processos heterogêneos (Costa et al., 2013). Nos sistemas homogêneos o catalisador encontra-se dissolvido na solução formando uma única fase. O ozônio, óxido de metais de transição e sistemas foto-Fenton são exemplos de catalisadores dos sistemas homogêneos (Yáñez et al., 2016). Nos sistemas heterogêneos, o catalisador encontra-se no estado sólido; geralmente são utilizados semicondutores inorgânicos como, por exemplo, os óxidos metálicos dióxido de titânio (TiO_2) e óxido de zinco (ZnO) (Teixeira et al., 2016). Estes são os mais utilizados, devido principalmente à sua não toxicidade, alta atividade fotoquímica, baixo custo, estabilidade em

sistemas aquosos e estabilidade química em uma ampla faixa de pH (Li et al., 2012; Chang et al., 2016, Kou et al., 2017).

Neste âmbito, a fotocatalise heterogênea é considerada uma forma eficiente e versátil de controle da poluição aquosa, modificando, degradando ou mineralizando compostos orgânicos por meio de processos onde o único reagente envolvido é o elétron (Qu et al., 2013; Fassi et al., 2012).

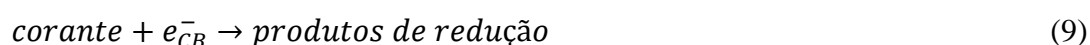
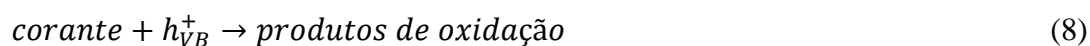
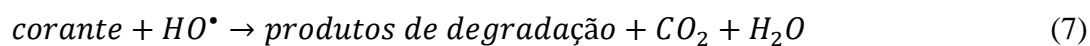
O princípio da fotocatalise heterogênea envolve a ativação de um semicondutor por luz natural ou artificial. Um semicondutor é caracterizado por bandas de valência e bandas de condução, a região entre a banda de valência e a banda de condução é denominada de *band gap* (Nezamzadeh-Ejhih & Moazzeni, 2013). Quando um semicondutor é irradiado com uma energia maior que a energia de *band gap*, geram-se elétrons (e_{CB}^-) na banda de condução e, lacunas (h_{VB}^+) na banda de valência (Yáñez et al., 2016). Os elétrons fotogerados podem reagir tanto com o corante, quanto com elétrons aceptores, como moléculas de oxigênio adsorvidas na superfície do semicondutor ou dissolvidas na água, gerando ânions superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Lee et al., 2015). As lacunas fotogeradas podem oxidar a molécula orgânica formando radicais R^+ , ou reagir com OH^- ou H_2O oxidando estas espécies a HO^{\bullet} (Kou et al., 2017; Stets et al., 2017). Outras espécies altamente oxidantes, como os radicais de água oxigenada, são responsáveis pela fotodecomposição heterogênea com semicondutores nos substratos orgânicos, tais como corantes.

As reações relevantes que ocorrem na superfície do semicondutor que formam a espécie reativa HO^{\bullet} são (Gümüş & Akbal, 2011; Saikia et al., 2015; Lee et al., 2015; Yáñez et al., 2016):





De forma simplificada, os mecanismos da degradação fotocatalítica de corantes podem ser representados pelas equações 7 – 9 (Konstantinou & Albanis, 2004; Saikia et al., 2015; Lee et al., 2015):



Diante do contexto apresentado, esse estudo propõe a miniaturização dos testes fotocatalíticos para avaliar e comparar a eficiência da descoloração utilizando quantidades minimizadas de corantes (amarelo básico 2, amarelo ácido 73 e eosina amarela), com os catalisadores ZnO e TiO₂, ambos em suspensão e irradiados com luz na região do visível e do ultravioleta.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

Os catalisadores utilizados nos ensaios de descoloração foram dióxido de titânio (TiO₂), adquirido da Sigma Aldrich, e o catalisador óxido de zinco (ZnO), adquirido da Impex Comércio e Representações Ltda, ambos catalisadores com alto grau de pureza (99,99%). Os corantes amarelo básico 2 (AB2) e amarelo ácido 73 (AA73) foram fornecidos pela Danny

Color Corantes, o corante eosina amarela (EA) foi adquirido da Dinâmica Química Contemporânea LTDA.

As soluções de AB2, AA73 e EA utilizadas nos ensaios foram de $5,25 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $1,23 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e $5,25 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, respectivamente. Uma curva de calibração foi realizada para cada corante avaliado, as concentrações iniciais de cada corante foram escolhidas a partir das curvas de calibração, de modo que não apresentasse absorvância maior que 1, respeitando assim a lei de Lambert-Beer (Tian, *et al.* 2012).

2.2. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

Em eppendorfs (1,50 mL), 0,50 mL de solução aquosa de corante foi adicionado às concentrações $1,05 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, $2,46 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e $1,05 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ para o AB2, AA73 e EA, respectivamente. Em seguida, foram adicionados 0,50 mL de água destilada, obtendo-se assim as concentrações desejadas de $5,25 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $1,05 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e $5,25 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ para o AB2, AA73 e EA, respectivamente. A esta solução adicionou-se $0,001 \text{ g.mL}^{-1}$ de TiO_2 ou ZnO .

2.3. CURVAS DE CALIBRAÇÃO

A quase totalidade dos estudos de descoloração utiliza espectrofotômetro de cubeta para análise da absorvância das soluções geradas pelo processo catalítico. No entanto, este estudo propõe o uso de ensaios miniaturizados para analisar tais soluções, ou seja, sugere-se realizar o estudo fotocatalítico dos corantes por meio do uso de um leitor de microplacas para ler as absorvâncias, dessa forma é possível realizar até 96 leituras de forma simultânea, com uso mínimo de reagentes.

A necessidade da realização da curva de calibração deve-se à conversão do resultado obtido pelo espectrofotômetro em um valor físico. Assim, por meio da lei de Lambert-Beer, para soluções diluídas, existe uma dependência linear entre a absorvância e a concentração das substâncias presentes na amostra, conforme equação 10 (Tian, *et al.* 2012):

$$A = \epsilon bc \quad (10)$$

Onde, **A** é absorvância, ϵ é a absorvância molar, **b** o caminho óptico, e **c** a concentração.

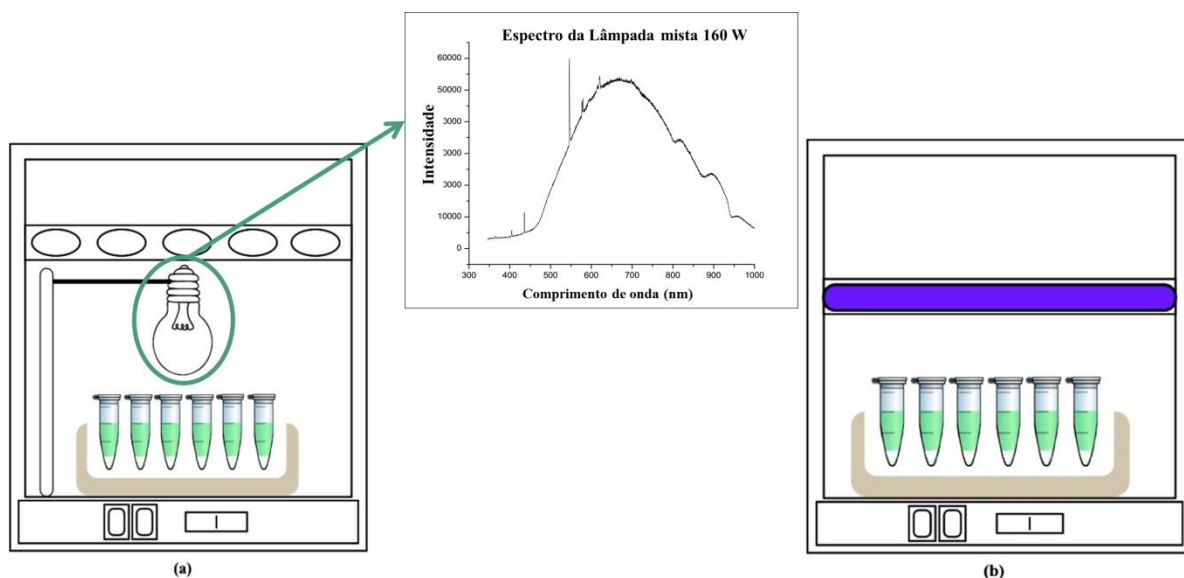
Uma solução para cada corante (BY2, AY73 e EY) em uma concentração de $5,25 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹, $1,05 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ e $5,25 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹, respectivamente, foi preparada; estas soluções foram consideradas as soluções padrão. Assim, todas as soluções analisadas pelo espectrofotômetro Polaris, equivalentes aos pontos da curva de calibração, foram originadas a partir dessas soluções iniciais. A curva de calibração foi obtida através de uma série de diluições, $1,44 \times 10^{-1}$ g.L⁻¹ a $3,20 \times 10^{-3}$ g.L⁻¹, para AB2, $8,00 \times 10^{-3}$ g.L⁻¹ a $8,00 \times 10^{-5}$ g.L⁻¹, para AA73 e $1,73 \times 10^{-2}$ g.L⁻¹ a $2,31 \times 10^{-3}$ g.L⁻¹, para EA. As absorvâncias medidas nos comprimentos de onda 405 nm para o AB2, 492 nm para o AA73 e 492 nm para EA (Salari *et al.*, 2009; Baqar, *et al.* 2015; Borah, *et al.* 2015).

2.4. ATIVIDADE CATALÍTICA

Os experimentos fotocatalíticos foram realizados em tubos cônicos (1,50 mL) contendo $0,001$ g.mL⁻¹ de catalisador e 1 mL de solução aquosa de corante. A mistura foi iluminada em uma capela quando irradiada com uma lâmpada mista de 160W emitindo radiação na região do espectro UV-vis (365-1000 nm), Figura 1 (a), e em uma bancada de fluxo laminar Pachane Pa50 quando irradiado pela lâmpada UV 15W ($k_{max} = 365$ nm),

Figura 1 (b). A temperatura do sistema foi mantida a aproximadamente 30 °C pelo uso de um fluxo de recirculação de ar de 0,45 ms⁻¹.

Figura - 1 (a) Sistema irradiado por lâmpada mista na região do UV-vis (b) sistema irradiado por luz UV.



Alíquotas da suspensão aquosa foram retiradas nos tempos 0, 10, 20, 40, 60, 80 e 120 minutos, a partir dos tubos cônicos e em seguida centrifugadas para remover o catalisador em suspensão. As absorvâncias das soluções foram medidas usando um leitor de microplacas Polaris® nos comprimentos de onda de 405 nm para o AB2, 492 nm para o AA73 e EA, para o cálculo da concentração de corantes em função do tempo de irradiação.

A eficiência da reação de descoloração foi determinada utilizando a equação 11 (Saikia et al., 2015; Zheng, *et al.* 2015; Macha, *et al.* 2016):

$$Descoloração(\%) = \frac{A_0 - A_t}{A_0} * 100 = \frac{C_0 - C_t}{C_0} * 100 \quad (11)$$

Onde, A_0 é a absorvância inicial da solução de corantes e A_t a absorvância no tempo t , que se relacionam respectivamente com as concentrações iniciais (C_0) e no tempo t (C_t) de acordo com a lei de Lambert-Beer.

Foram estudados sistemas compostos por quatro corantes: amarelo básico 2, amarelo ácido 73, eosina amarela e verde bromocresol; dois catalisadores: óxido de zinco e óxido de titânio; e 2 tipos de irradiação: na região UV e na região UV-vis. A Tabela 1 resume os sistemas estudados nesse trabalho.

Tabela 1. Sistemas de descoloração de corantes (amarelo básico 2, amarelo ácido 73 e eosina amarela) por catalisadores (TiO₂ e ZnO).

Corante	Irradiação UV	Irradiação UV-Vis	TiO ₂	ZnO
Amarelo Básico 2 (AB2)	X	X	X	X
Amarelo Ácido 73 (AA73)	X	X	X	X
Eosina Amarela (EA)	X		X	

2.5. ANÁLISE UV-VIS

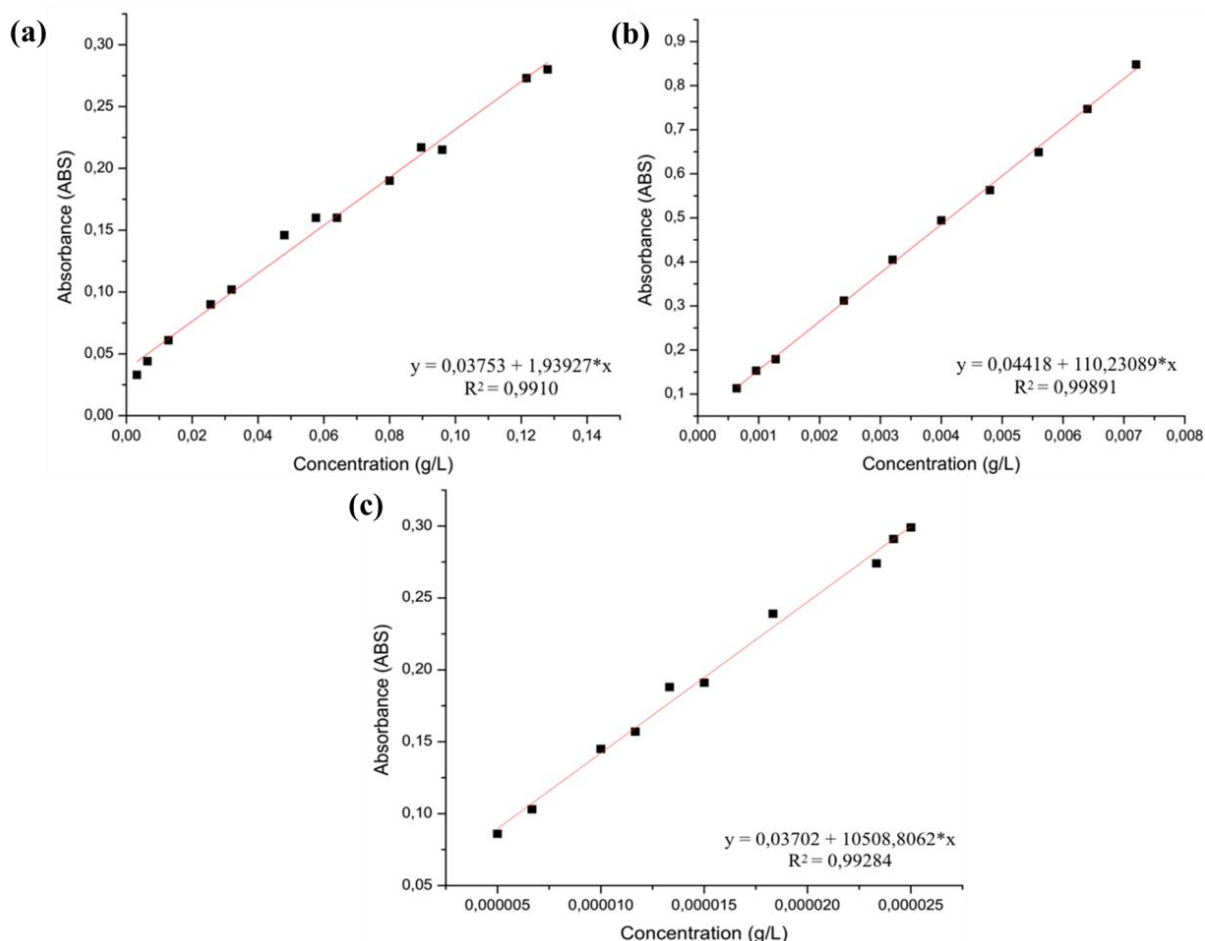
As varreduras dos corantes foram realizadas através de espectrometria na região UV-vis, utilizando o espectrofotômetro Agilent Technologies, Cary 60 UV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. CURVAS DE CALIBRAÇÃO

As curvas de calibração, ilustradas na Figura 2, demonstram que o corante amarelo ácido apresentou maior linearidade, seguido do amarelo básico 2 e eosina amarela. Foram obtidos R² superiores a 0,99 para todas as curvas de calibração, confirmando que o sistema desenvolvido para as análises de absorvância das soluções geradas pela reação de fotocatalise está validado.

Figura 2 - Curvas de calibração dos corantes (a) amarelo básico 2 (b) amarelo ácido 73 (c) eosina amarela.



3.2.CINÉTICA DA FOTOCATÁLISE

Inicialmente, foi realizado o estudo da fotólise. Este estudo consistiu em analisar o efeito da radiação UV na solução corante sem a presença dos fotocatalisadores durante 120 minutos. De acordo com os dados obtidos verificou-se uma eficiência de descoloração desprezível, abaixo de 10% para os corantes amarelo básico 2, eosina amarela e de 19% para o corante amarelo ácido 73, indicando que somente a radiação ultravioleta ou visível é insuficiente para a descoloração dos corantes.

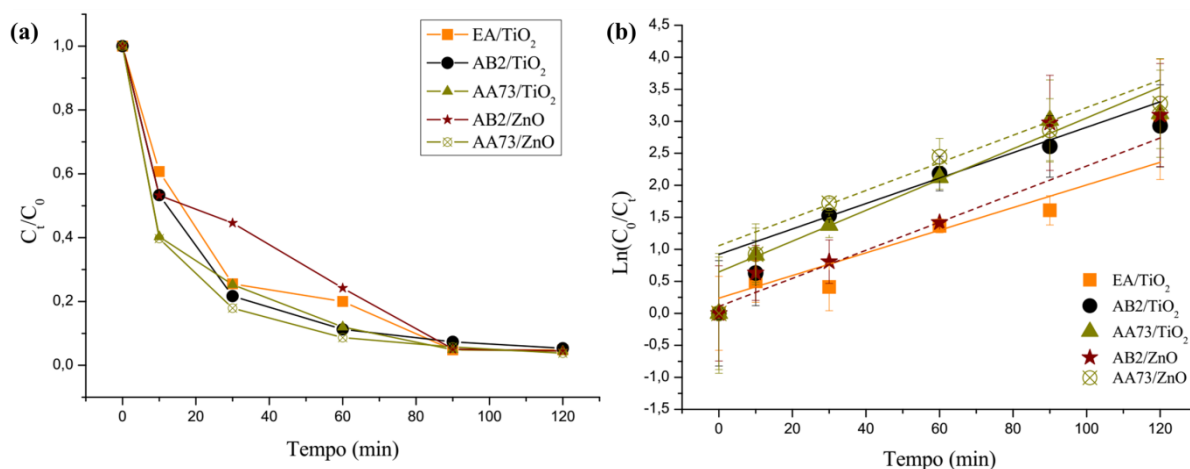
Em seguida, o estudo de fotocatalise foi realizado utilizando TiO_2 ou ZnO como catalisadores. O estudo cinético mostra que os sistemas irradiados pela luz na região UV-visível atingiram uma eficiência de descoloração acima de 90% com ambos os catalisadores em 90 minutos.

No entanto, para sistemas irradiados por luz UV, a eficiência de descoloração acima de 90% com ambos os catalisadores foi alcançada em até 60 minutos para todos os corantes, Figura 3.

Os resultados da descoloração dos corantes eosina amarela, amarela ácida 73 e amarela básica 2, em função do tempo de exposição à luz UV na presença dos catalisadores ZnO e TiO_2 são mostrados na Figura 3 (a). Durante os experimentos, a concentração dos catalisadores, pH e temperatura das soluções foram mantidas constantes.

A linearidade obtida no gráfico $\ln(C_0/C_t)$ versus t , observado na Figura 6 (b), confirma a aplicabilidade da equação de Langmuir-Hinshelwood para a descoloração fotocatalítica de corantes sob radiação UV.

Figura 3 - (a) Processo para a descoloração de corantes com radiação na região UV. (b) cinética de descoloração de corantes.



Todos os sistemas apresentaram descoloração superior a 90% com 120 minutos de reação, sendo a taxa de descoloração dos corantes na solução aquosa descrita pelo modelo cinético Langmuir-Hinshelwood de pseudo-primeira ordem (Hadjltaief et al., 2016; Teixeira et al. 2016):

$$r = -\frac{dC}{dt} = \frac{CKk_r}{1+KC} \quad (12)$$

Onde r representa a taxa de descoloração, K representa a constante de equilíbrio para a adsorção do corante na superfície do catalisador e k_r é a constante cinética para a reação de descoloração.

Integrando a equação (12), obtém-se o tempo de irradiação t , para concentração C_t do corante:

$$t = \left(\frac{1}{Kk_r}\right) \ln\left(\frac{C_0}{C_t}\right) + \frac{C_0 - C_t}{k_r} \quad (13)$$

Onde C_0 representa a concentração inicial do corante. Assim sendo, em baixa concentração para C_0 o segundo termo da equação (13) torna-se insignificante e pode ser desprezado:

$$\ln\left(\frac{C_0}{C_t}\right) = k_r K t = k_{app} t \quad (14)$$

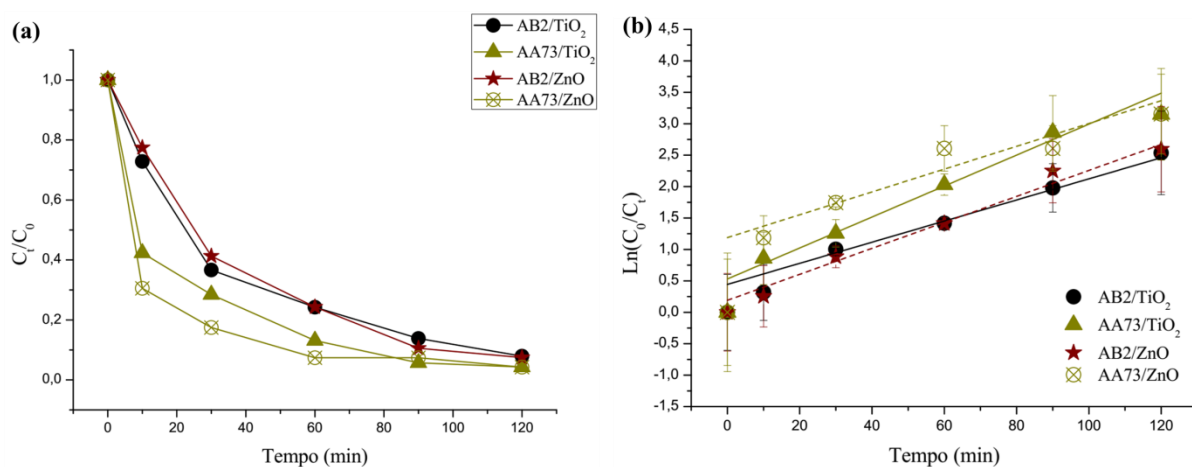
Onde k_{app} é a taxa de descoloração aparente da reação fotocatalítica. Os resultados das constantes de velocidade estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Constantes obtidas no processo de descoloração dos corantes sob radiação na região UV.

Corante	Catalisador	%Descoloração	k_{app} , 10^{-2} (constante de velocidade min^{-1})
Eosina Amarela (EA)	TiO ₂	95,2%	2,52
Amarelo Básico 2 (AB2)	TiO ₂	94,7%	2,44
Amarelo Ácido 73 (AA73)	TiO ₂	95,6%	2,60
Amarelo Básico 2 (AB2)	ZnO	95,5%	2,58
Amarelo Ácido 73 (AA73)	ZnO	96,2%	2,73

A Figura 4 (a) apresenta os resultados obtidos da descoloração dos corantes amarelo ácido 73 e amarelo básico 2, nas concentrações de 1×10^{-5} , 5×10^{-5} respectivamente, em função do tempo de exposição à luz na região UV-vis na presença dos catalisadores ZnO e TiO₂. Durante os experimentos, foram mantidos constantes a concentração dos catalisadores, pH e temperatura das soluções.

Figura 4 - (a) Processo de descoloração dos corantes com radiação na região UV-vis. (b) Cinética da descoloração dos corantes.



A proximidade da linearidade obtida através do gráfico $\ln(C_0/C_t)$ versus t , observada na Figura 4 (b), comprova a aplicabilidade da equação de Langmuir–Hinshelwood para a descoloração fotocatalítica dos corantes sob radiação UV-vis. Os resultados das constantes de velocidade estão descritos na Tabela 3.

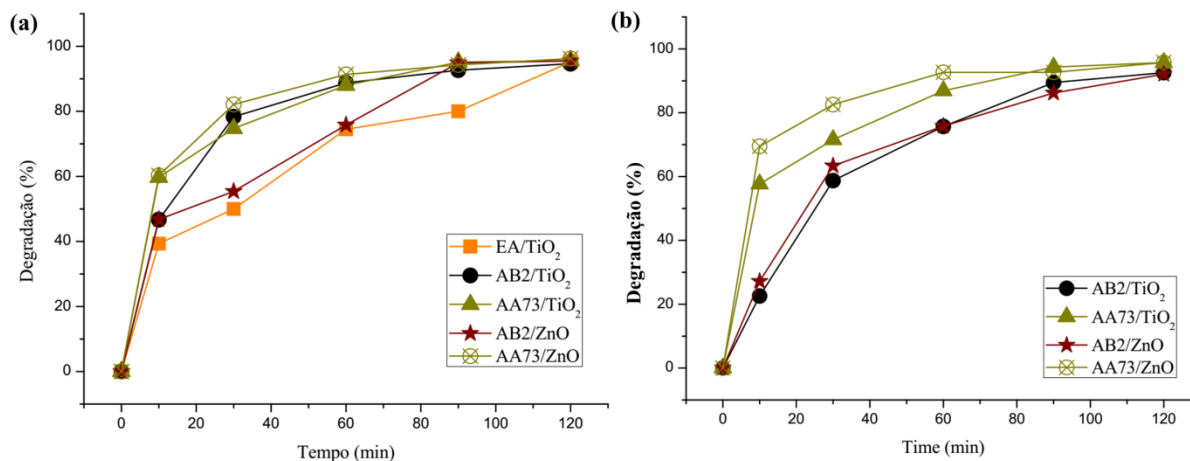
Tabela 3. Constantes obtidas no processo de descoloração dos corantes sob radiação na região UV-vis.

Corante	Catalisador	%Descoloração	k_{app} , 10^{-2} (constante de velocidade min^{-1})
Amarelo Básico 2 (AB2)	TiO ₂	92,5%	2,16
Amarelo Ácido 73 (AA73)	TiO ₂	95,7%	2,62
Amarelo Básico 2 (AB2)	ZnO	92,1%	2,11
Amarelo Ácido 73 (AA73)	ZnO	95,7%	2,63

3.3.EFEITO DA FONTE DE RADIAÇÃO E DO FOTOCATALISADOR

A Figura 5 ilustra o efeito da fonte de radiação e do fotocatalisador na descoloração das soluções de corantes. Observa-se que todos os corantes alcançaram cerca de 95% de remoção de cor com ambas irradiações e ambos catalisadores.

Figura 5 - Efeito da fonte de radiação na eficiência da descoloração (a) radiação UV (b) radiação UV-vis.



Lv *et al.* (2015), estudaram a atividade fotocatalítica do ZnO na descoloração do corante rodamina B sob radiação na região do UV-vis (luz solar) e sob radiação UV. A taxa de descoloração da rodamina B foi aproximadamente 100%, em 40 minutos de reação, sob radiação na região do UV-vis. Sob radiação UV (36 W), o ZnO também mostrou atividade fotocatalítica eficiente, com valores próximos a 90% de descoloração do corante rodamina B.

Macha *et al.* (2016) investigaram a fotocatalise heterogênea de poluentes orgânicos em águas residuais municipais utilizando fotocatalisadores do tipo TiO₂ e TiO₂ dopado com metais (Ag, Cu e Fe), sob radiação ultravioleta e radiação solar. Os resultados demonstram que os fotocatalisadores foram efetivos sob ambas irradiações, UV e UV-vis, apresentando níveis de descoloração superiores a 95%, superando assim a limitação de que o catalisador TiO₂ é eficaz apenas sob radiação ultravioleta.

Comparando as constantes de velocidade das tabelas 2 e 3, nota-se que todas estão na mesma ordem de grandeza, confirmando a eficiência de ambos semicondutores na fotocatalise heterogênea dos corantes abordados nesse estudo. No entanto, é possível notar uma eficiência maior com o uso do catalisador ZnO na descoloração do corante amarelo ácido 73.

Muitos estudos mostram que o ZnO pode ser tão eficiente quanto o TiO₂ na descoloração fotocatalítica de algumas substâncias orgânicas e mesmo em alguns casos o ZnO possui maior atividade fotocatalítica do que o TiO₂ (ZHENG, *et al.* 2015). Polious *et al.* (2000) investigaram a descoloração fotocatalítica do corante amarelo básico 2, também conhecido como Auramina O, em soluções aquosas heterogêneas contendo óxidos semicondutores como fotocatalisadores. Sob as condições experimentais aplicadas no estudo, obteve-se uma descoloração de 95% da concentração inicial do corante após 60 min de exposição à luz UV, utilizando o catalisador TiO₂ P-25, enquanto na presença de ZnO a descoloração da solução no final de 60 min atingiu aproximadamente 100%.

A eficiência superior do ZnO em relação ao TiO₂ também foi comprovada no trabalho de Muruganandham *et al.* (2006), o qual estudou a descoloração fotocatalítica do corante reativo amarelo 14 em solução aquosa, utilizando os catalisadores TiO₂-P25 (Degussa), ZnO, TiO₂ (anatase), CdS, Fe₂O₃ e SnO₂ sob radiação da luz solar. O estudo revelou a seguinte ordem de reatividade: ZnO > TiO₂-P25 > TiO₂ (anatase). Os catalisadores CdS, Fe₂O₃ e SnO₂ apresentaram atividade desprezível na descoloração e degradação do corante estudado.

Tian *et al.* (2012) estudou a eficiência dos semicondutores ZnO preparado utilizando-se calcinação do acetato de zinco diidratado (Zn(Ac)₂·2H₂O) e TiO₂-P25 (Degussa) na fotodegradação do corante alaranjado de metila, concluindo que a taxa de descoloração utilizando o catalisador ZnO foi quatro vezes maior quando comparada ao uso do catalisador TiO₂ P25 (Degussa).

Kansal *et al.* (2007) estudaram a descoloração dos corantes alaranjado de metila e rodamina 6G, empregando o processo fotocatalítico heterogêneo. Foi investigada a atividade fotocatalítica dos semicondutores dióxido de titânio (TiO₂), óxido de zinco (ZnO), óxido estânico (SnO₂), sulfureto de zinco (ZnS) e sulfato de cádmio (CdS), sob radiação UV e radiação solar. Os resultados experimentais indicaram que a descoloração máxima (superior a

90%) dos corantes ocorreu com o uso do catalisador ZnO e pH básico, o corante rodamina 6G obteve a maior eficiência de descoloração com menor dose de catalisador (0,5 g/L) do que o alaranjado de metila (1 g/L) em condições semelhantes. o desempenho do sistema fotocatalítico empregando ZnO/luz solar foi observado como sendo mais eficiente que o sistema ZnO/UV.

Sendo assim, ao apresentar valores entre 92 a 97% de descoloração dos corantes amarelo básico 2, amarelo ácido 73 e eosina amarela utilizando TiO₂ e ZnO em suspensão como catalisadores na fotocatalise heterogênea de corantes, o presente trabalho apresenta-se em concordância em relação aos resultados apresentados em diferentes estudos, os quais discorrem sobre a a melhor eficiência do ZnO quando comparado ao TiO₂, mesmo ambos apresentando *band gaps* semelhantes (Saikia et al., 2015). Uma hipótese que pode explicar maior eficiência do ZnO está relacionada a capacidade que o ZnO possui em absorver uma ampla gama de espectro solar a mais do que alguns óxidos metálicos semicondutores (Lee et al., 2015).

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir que a fotocatalise heterogênea dos corantes amarelo básico 2, amarelo ácido 73 e eosina amarela, utilizando as fontes de radiação na região UV e na região UV-vis é satisfatória em todos os sistemas analisados.

Observa-se que ambos semicondutores, TiO_2 e ZnO , foram eficientes como fotocatalisadores, no processo fotocatalítico heterogêneo, para redução de cor dos corantes amarelo básico 2, amarelo ácido 73 e eosina amarela verificando-se que o ZnO apresenta um resultado ligeiramente maior que o TiO_2 , no entanto os resultados utilizando o TiO_2 apresenta maior linearidade an cinética de descoloração.

Por fim, conclui-se que a utilização de ensaios miniaturizados para estudo da fotocatalise heterogênea foi adequada, minimizando os resíduos nos efluente laboratoriais, reduzindo custos de reagentes, tempo de leitura das absorbâncias devido à possibilidade de realização de múltiplos ensaios simultaneamente, além de reduzir os erros sistemáticos ocasionados no uso de cubetas em espectrofotômetros.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bakar, N. A., Jamil, N. I. F., Tan, W. L., Sabri, N. A., Tan, T. W., & Bakar, M. A. (2018). Environmental friendly natural rubber-blend-poly-vinylpyrrolidone/silver (NR-b-PVP/Ag) films for improved solar driven degradation of organic pollutants at neutral pH. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 352, 9-18. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2017.10.056>.

Baqar, M., Sarwar, A., e Shahwar, D., Nazir, R., Shahid, S., Shaikh, I. A & Machado, S. (2015). Adsorption of Acid Yellow-73 and Direct Violet-51 Dyes from Textile Wastewater by Using Iron Doped Corncob Charcoal. *Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry*, v. 16, n. 1, p. 8.

Borah, L., Goswami, M., & Phukan, P. (2015). Adsorption of methylene blue and eosin yellow using porous carbon prepared from tea waste: adsorption equilibrium, kinetics and thermodynamics study. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3 (2), 1018-1028. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2015.02.013>.

Chang, X., Li, Z., Zhai, X., Sun, S., Gu, D., Dong, L., ... & Zhu, Y. (2016). Efficient synthesis of sunlight-driven ZnO-based heterogeneous photocatalysts. *Materials & Design*, v. 98, p. 324-332. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2016.03.027>.

Costa, M. P. D.; Pancotto, J. V. S.; Alcântara, M. A. K.; Cavalcanti, A. S.; Guimarães, O. L. C.; Izário Filho, H. J. (2013). Combinação de processos oxidativos fotoirradiados por luz solar para tratamento de percolato de aterro sanitário: catálise heterogênea (TiO₂) versus

catálise homogênea (H₂O₂). *Ambi-Agua*, Taubaté, v. 8, n. 1, p. 290-306. doi: <http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.1063>.

Dotto, G. L., Vieira, M. L. G., Gonçalves, J. O., & Pinto, L. A. D. A. (2011). Removal of acid blue 9, food yellow 3 and FD&C yellow n° 5 dyes from aqueous solutions using activated carbon, activated earth, diatomaceous earth, chitin and chitosan: equilibrium studies and thermodynamic. *Química Nova*, v. 34, n. 7, p. 1193-1199.

Fassi, S., Bousnoubra, I., Sehili, T., & Djebbar, K. (2012). Degradation of ‘Bromocresol Green’ by direct UV photolysis, Acetone/UV and advanced oxidation processes (AOP’s) in homogeneous solution (H₂O₂/UV, S₂O₈²⁻/UV). Comparative study. *Journal Materials. Environmental Science*, v. 3, n. 4, p. 732-743.

Frade, T., Gomes, A., da Silva Pereira, M. I., Lopes, A., & Ciríaco, L. (2012). Fotoeletrodegradação Do Corante Ao7 Utilizando Filmes De Nanocompósitos De ZnO-TiO₂. *Quim. Nova*, v. 35, n. 1, p. 30-34.

Gümüş, D., & Akbal, F. (2011). Photocatalytic degradation of textile dye and wastewater. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 216(1-4), p. 117-124. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0520-z>.

Hadjltaief, H. B., Zina, M. B., Galvez, M. E., & Da Costa, P. (2016). Photocatalytic degradation of methyl green dye in aqueous solution over natural clay-supported ZnO-TiO₂ catalysts. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 315, p. 25-33.. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2015.09.008>.

Kansal, S. K., Singh, M., & Sud, D. (2007). Studies on photodegradation of two commercial dyes in aqueous phase using different photocatalysts. *Journal of hazardous materials*, v. 141, n. 3, p. 581-590. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.07.035>.

Konstantinou, I. K., & Albanis, T. A. (2004). TiO₂-assisted photocatalytic degradation of azo dyes in aqueous solution: kinetic and mechanistic investigations: a review. *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 49, n. 1, p. 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2003.11.010>.

Lee, K.M., Lai, C.W., Ngai, K.S., Juan, J.C. (2015). Recent Developments of Zinc Oxide Based Photocatalyst in Water Treatment Technology: A Review, *Water Research*. doi: 10.1016/j.watres.2015.09.045. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.045>.

Lei, C., Pi, M., Jiang, C., Cheng, B., & Yu, J. (2017). Synthesis of hierarchical porous zinc oxide (ZnO) microspheres with highly efficient adsorption of Congo red. *Journal of colloid and interface science*, v. 490, p. 242-251. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.11.049>.

Lv, Y., Yu, L., Li, C., & Yang, L. (2016). ZnO nanopowders and their excellent solar light/UV photocatalytic activity on degradation of dye in wastewater. *Science China Chemistry*, v. 59, n. 1, p. 142-149. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11426-015-5438-2>.

Mecha, A. C., Onyango, M. S., Ochieng, A., Jamil, T. S., Fourie, C. J., & Momba, M. N. (2016). UV and solar light photocatalytic removal of organic contaminants in municipal wastewater. *Separation Science and Technology*, v. 51, n. 10, p. 1765-1778. DOI: 10.1080/01496395.2016.1178290.

Muruganandham, M.; Swaminathan, M. (2006). TiO₂-UV photocatalytic oxidation of Reactive Yellow 14: Effect of operational parameters. *Journal of Hazardous Materials*, v. 135, n. 1, p. 78-86. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.11.022>.

Nezamzadeh-Ejehieh, Alireza; Moazzeni, Neda. (2013). Sunlight photodecolorization of a mixture of Methyl Orange and Bromocresol Green by CuS incorporated in a clinoptilolite zeolite as a heterogeneous catalyst. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 19, n. 5, p. 1433-1442. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2013.01.006>.

Nogueira, R. F. P., Trovó, A. G., Silva, M. R. A. D., Villa, R. D., & Oliveira, M. C. D. (2007). Fundamentals and environmental applications of Fenton and photo-Fenton processes. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 400-408. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200030>.

Öztürk, A., & Malkoc, E. (2014). Adsorptive potential of cationic Basic Yellow 2 (BY2) dye onto natural untreated clay (NUC) from aqueous phase: mass transfer analysis, kinetic and equilibrium profile. *Applied Surface Science*, v. 299, p. 105-115. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.01.193>.

Pimol, P.; Khanidtha, M.; Prasert, P. (2008). Influence of particle size and salinity on adsorption of basic dyes by agricultural waste: dried Seagrass (*Caulerpa lentillifera*), *J. Environ. Sci.* v. 20, p. 760-768.

Qu, Xiaolei; Alvarez, Pedro J.J.; Li, Qilin. (2013). Applications of nanotechnology in water and wastewater treatment. *Water research*, v. 47, p. 3931-3946. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.058>.

Radhika, S.; Thomas, J. (2017). Solar light driven photocatalytic degradation of organic pollutants using ZnO nanorods coupled with photosensitive molecules. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 5, n. 5, p. 4239-4250. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2017.08.013>.

Rehman, R.; Mahmud, T.; Anwar, J.; Waheed-Uz-Zaman, Moeen, M.; Zafar, J. (2012). Biosorptive Treatment of Acid Yellow-73 Dye Solution with Chemically Modified Eugenia jambolana Seeds. *J.Chem.Soc.Pak*, v. 34, n. 5, p. 1120-1126.

Saikia, L., Bhuyan, D., Saikia, M., Malakar, B., Dutta, D. K., & Sengupta, P. (2015). Photocatalytic performance of ZnO nanomaterials for self sensitized degradation of malachite green dye under solar light. *Applied Catalysis A: General*, v. 490, p. 42-49. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2014.10.053>.

Salari, D., Niaei, A., Aber, S., & Rasoulifard, M. H. (2009). The photooxidative destruction of CI Basic Yellow 2 using UV/S₂O₈²⁻ process in a rectangular continuous photoreactor. *Journal of hazardous materials*, v. 166, n. 1, p. 61-66. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.11.039>.

Stets, S., do Amaral, B., Schneider, J. T., de Barros, I. R., de Liz, M. V., Ribeiro, R. R., ... & Peralta-Zamora, P. (2018). Antituberculosis drugs degradation by UV-based advanced oxidation processes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 353, p. 26-33. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2017.11.006>.

Teixeira, S., Martins, P. M., Lanceros-Méndez, S., Kühn, K., & Cuniberti, G. (2016). Reusability of photocatalytic TiO₂ and ZnO nanoparticles immobilized in poly (vinylidene

difluoride)-co-trifluoroethylene. *Applied Surface Science*, v. 384, p. 497-504. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.05.073>.

Tian, C., Zhang, Q., Wu, A., Jiang, M., Liang, Z., Jiang, B., Fu, H. (2012) . Cost-effective large-scale synthesis of ZnO photocatalyst with excellent performance for dye photodegradation, *Chemical Communications*, v. 48, p. 2858-2860. doi: 10.1039/C2CC16434E.

Xue, Y., Dong, W., Wang, X., Bi, W., Zhai, P., Li, H., & Nie, M. (2016). Degradation of sunscreen agent p-aminobenzoic acid using a combination system of UV irradiation, persulphate and iron (II). *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, n. 5, p. 4561-4568. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5631-z>.

Yáñez, E.; Santander, P.; Contreras, D.; Yáñez, J.; Cornejo, L.; Mansilla, H. D. (2016) Homogeneous and heterogeneous degradation of caffeic acid using photocatalysis driven by UVA and solar light. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, v. 51, n. 1, p. 78-85, Doi: 10.1080/10934529.2015.1086211.

CAPÍTULO 3

SÍNTESE DO CATALISADOR TiO_2/PAL COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA DESENVOLVIMENTO DE ENSAIOS ANTIOXIDANTES BASEADO EM GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

**SÍNTESE DO CATALISADOR TiO₂/PAL COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA
PARA DESENVOLVIMENTO DE ENSAIOS ANTIOXIDANTES BASEADO EM
GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO**

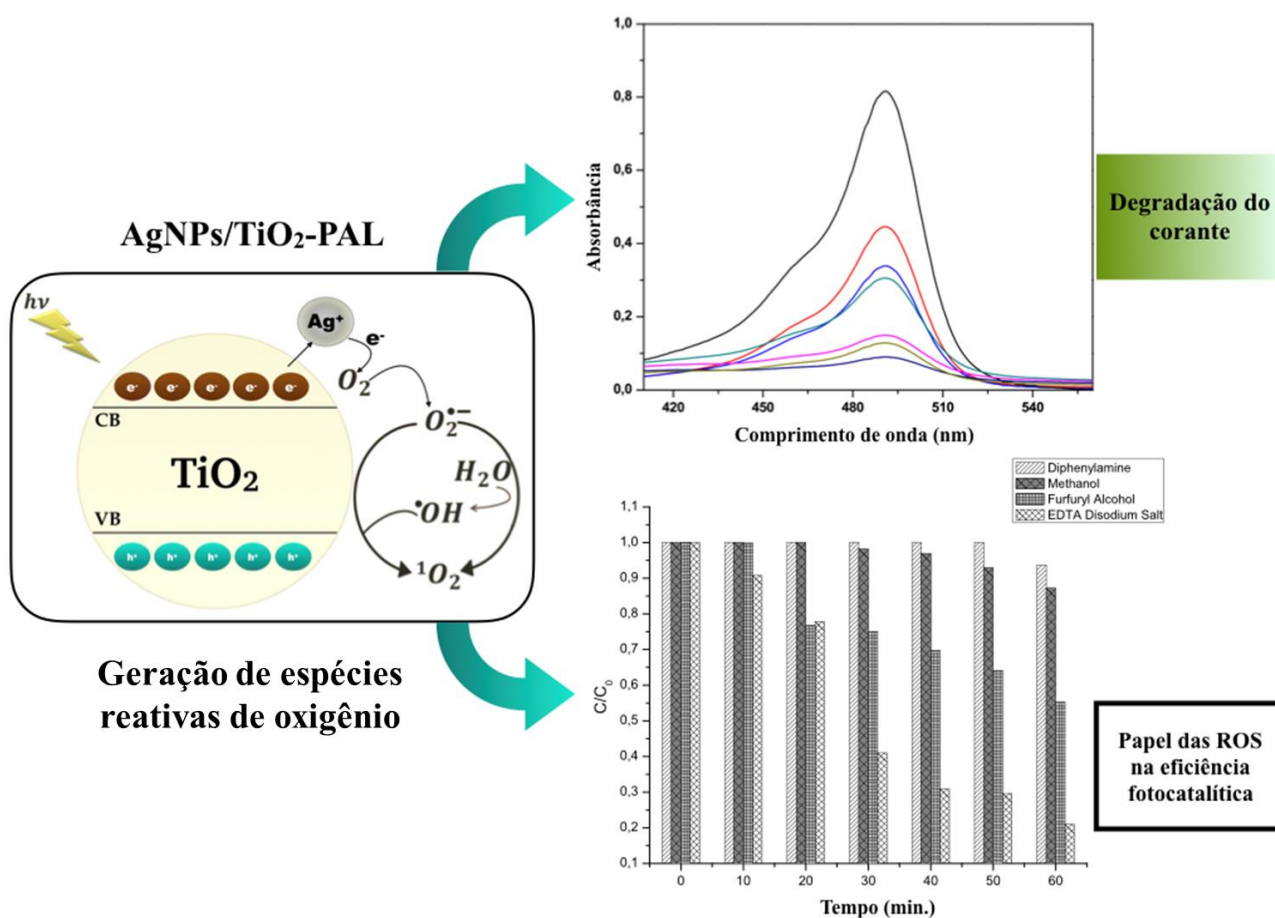
Anallyne Nayara Carvalho Oliveira Cambrussi¹; Joziel Alves De Oliveira¹; Marcel Leiner de Sá¹, Luis Rodrigues de Sena Neto¹; Carla Eiras¹, Josy Antevéli Osajima¹ e Alessandra Braga Ribeiro^{1*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais, Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados – LIMAV, Centro de Tecnologia - CT, Universidade Federal do Piauí-UFPI, Teresina-PI, CEP 64049-550.

RESUMO: Um método baseado na fotogeração de espécies reativas de oxigênio em água a partir do catalisador composto por TiO₂ suportado no argilomineral palygorskyta, incorporado com nanopartículas de prata (AgNPs/TiO₂-PAL) foi desenvolvido e aplicado a ensaios de ação antioxidante. As nanopartículas de prata foram sintetizadas utilizando solução de nitrato de prata, agente redutor de boro-hidreto de sódio e goma Caraia como agente estabilizante. A incorporação de AgNPs no TiO₂-PAL previamente sintetizado foi realizada. O catalisador AgNPs/TiO₂-PAL foi caracterizado por espectroscopia UV-vis, difratometria de raios X (XRD), microscopia eletrônica de varredura (MEV), potencial Zeta e espalhamento dinâmico de luz (DLS). O catalisador AgNPs/TiO₂-PAL foi utilizado para desenvolver um método de atividade antioxidante que consistiu no monitoramento da coloração do corante amarelo ácido 73 (AA73) na presença do antioxidante ácido gálico em diferentes concentrações (10 a 100 µg.mL⁻¹) comparando com a descoloração do corante na ausência do antioxidante. Um leitor de microplacas (Elisa Polaris) foi usado para medir a descoloração das soluções aquosas de AA73, irradiadas por luz UV por 60 minutos. O efeito das espécies reativas de oxigênio

(EROs) geradas pelo catalisador AgNPs/TiO₂-PAL baseado na cinética fotocatalítica do corante AA73 foi investigado. A oxidação do corante AA73 foi realizada principalmente pela participação das espécies O₂^{•-}, HO[•] e ¹O₂, nesta ordem de importância. Os resultados mostraram que a síntese do catalisador AgNPs/TiO₂-PAL foi realizada com sucesso e a aplicação deste material no desenvolvimento de uma metodologia inovadora para a determinação da atividade antioxidante foi extremamente promissora.

Resumo gráfico:



Palavras - chaves: palygorskyta, nanopartículas de prata, TiO₂, EROs, atividade antioxidante.

ABSTRACT

The method based on photogeneration of reactive oxygen species in water from catalyst composed of palygorskyta-TiO₂ and silver nanoparticles (AgNPs/TiO₂-PAL) was developed and applied to antioxidant assays. Silver nanoparticles were synthesized using silver nitrate solution, sodium borohydride reducing agent and Caraia gum as stabilizing agent. Incorporation of AgNPs into the previously synthesized TiO₂-PAL was performed. The catalyst AgNPs/TiO₂-PAL were characterized by UV-vis spectroscopy, X-ray diffractometry (XRD), Scanning Electron Microscopy (SEM), Zeta potential and Dynamic Light Scattering (DLS). The catalyst AgNPs/TiO₂-PAL were used to perform an antioxidant activity method which consisted in monitoring the dye discoloration e, acid yellow 73 (AA73) in the presence of gallic acid antioxidant in different concentrations (10 to 100 µg.mL⁻¹) comparing to the dye discoloration in the absence of the antioxidant. A microplate reader (Elisa Polaris) was used to measure the discoloration of the aqueous solutions of AA73, irradiated by UV light for 60 minutes. The effect of reactive oxygen species (ROS) generated by AgNPs/TiO₂-PAL based in photocatalytic kinetics of AA73 dye was investigated. The oxidation of AA73 dye by photocatalysis in the system with AgNPs/TiO₂-PAL catalysts was carried out mainly by the participation of O₂^{•-}, HO[•] and ¹O₂ species, in this order of importance. The results showed that the synthesis of the AgNPs/TiO₂-PAL catalyst was successfully carried out and the application of this material in the development of an innovative methodology for the determination of antioxidant activity was extremely promising.

Keywords: palygorskite; silver nanoparticles; TiO₂; ROS; antioxidant activity.

1. INTRODUÇÃO

Metabolismos oxidativos são os principais fornecedores de energia em sistemas biológicos e são essenciais para a sobrevivência das células (Rui-Jie et al., 2016). Entretanto, durante esses processos metabólicos, espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas, e quando o excesso de EROs supera a produção de antioxidantes endógenos (superóxido dismutase, catalase, peroxidase, glutathione, vitamina C e vitamina E), ocorre dano aos sistemas biológicos e oxidação de compostos em produtos diversos, gerando conseqüentemente potencial deterioração (Badarinath et al., 2010, Prior, 2015, Rajan & Muraleedharan, 2016, Kumar et al. 2017). Portanto, os compostos antioxidantes alcançaram destaque nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica devido ao potencial de neutralizar espécies reativas, controlando os efeitos da deterioração ou até desequilíbrio fisiológico no corpo humano (Rajan & Muraleedharan, 2016, Kumar et al. 2017).

O grande interesse por compostos/materiais que apresentem capacidade antioxidantes despertou a necessidade de métodos analíticos que fossem efetivamente capazes de determinar o potencial antioxidante dessas fontes (Roginsky & Lissi, 2005; Ge et al., 2018). No entanto, ainda não existe um método totalmente efetivo quanto a avaliação da capacidade antioxidante, sendo frequentemente relatadas desvantagens na maioria dos ensaios como elevado custo, consumo extensivo de reagentes, uso de instrumentos sofisticados, complexidade, tempo de reação elevado, uso de fluorômetros, que podem não estar rotineiramente disponíveis em laboratórios analíticos (Erel, 2004; Badarinath et al., 2010, Niki, 2010). É importante destacar o fato de que os métodos mais comumente utilizados (ABTS^{•+} e DPPH) são baseados em um grande radical não biológico e estericamente impedido, dificultando o acesso dos antioxidantes ao centro do radical, o que causa reações

lentas que não refletem a rapidez das reações que ocorrem *in vivo* (Apak et al. 2013; López-Alarcón & Denicola, 2013; Schaich, Tian & Xie, 2015; Shahidi & Zhong, 2015).

Biologicamente, os radicais HO[•] são gerados quando o H₂O₂ reage com Fe (II) (reação do tipo Fenton). No entanto, o uso de reações de Fenton no desenvolvimento de ensaios antioxidantes apresenta desvantagens, uma vez que muitos antioxidantes também são quelantes de metais que alteram a atividade do Fe (II) após a quelação (Rui-Jie et al., 2016). Neste contexto, a fotocatalise heterogênea da água por meio de nanopartículas de óxido de titânio (TiO₂) surge como alternativa para geração de espécies reativas de oxigênio e consequente aplicação a desenvolvimento de ensaios antioxidantes (Chen et al., 2014).

Um processo geral de fotocatalise inicia a partir da fotoexcitação do TiO₂ com uma energia maior que o *bandgap* (E_g) de 3,2 eV (Muruganandham & Swaminathan, 2006; Wei, et al. 2017), resultando na formação de pares ativos de elétrons-lacunas (e⁻/h⁺) (Guo et al., 2015). Na presença de doadores de elétrons e aceptadores em solução, a reação de recombinação entre o elétron e lacuna pode ser evitada por reações redox. Na fotólise do TiO₂ em água, as nanopartículas solvatantes das moléculas de água e o O₂ dissolvido podem reagir com ambos, a lacuna e o elétron, respectivamente, para gerar HO[•] (Xiang, Yu, Wong, 2011; Rauf et al., 2009; Rui-Jie et al., 2016; Nagarajan et al., 2017). No entanto, o TiO₂ absorve em uma região do espectro, inferior a 380 nm, apresentando baixo rendimento quântico (Chen et al., 2014). Uma alternativa para melhorar o perfil de absorção e otimizar o processo de fotodegradação é a incorporação de nanopartículas metálicas (MeNPs) à sua estrutura (Lee & Chen, 2014), uma vez que as MeNPs depositadas no TiO₂ atuam como captadoras de elétrons, diminuindo a taxa de recombinação de par elétrons-lacunas (e⁻/h⁺), melhorando, conseqüentemente, a atividade fotocatalítica do TiO₂ (Chen et al., 2008; Hidalgo, et al. 2010).

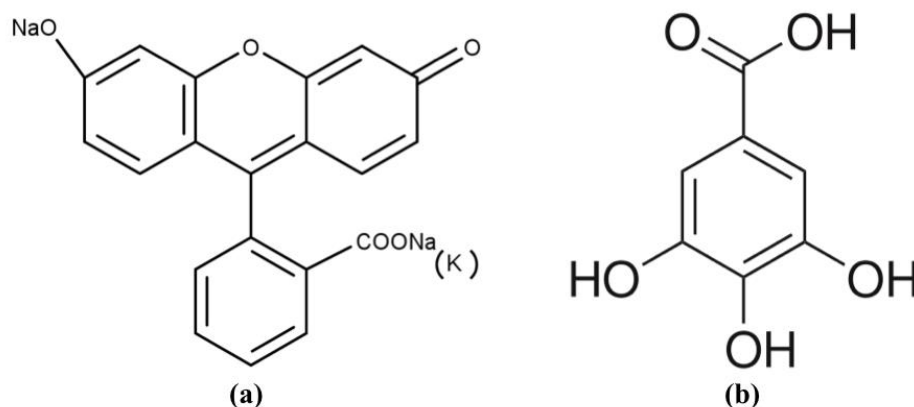
No entanto, apesar da otimização, ainda existem problemas em relação à remoção deste catalisador da água. Os pós de TiO_2 possuem grandes áreas superficiais, que conferem boas atividades catalíticas a este composto. No entanto, os pós prontamente se aglomeram em partículas maiores, resultando em um efeito adverso no desempenho do catalisador. Além disso, é muito difícil recuperar pós de TiO_2 puros quando eles são usados em sistemas aquosos (Chen et al., 2014). Para resolver este problema, sugere-se a utilização de materiais porosos para suportar o catalisador, nomeadamente argilas tais como palygorskyta (PAL), que poderiam aumentar a área de contato superficial e conseqüentemente facilitar a remoção do material catalisador (Xavier, *et al.* 2012; Verma, *et al.* 2014). A palygorskyta (PAL) é uma espécie amplamente utilizada de silicato de alumínio e magnésio hidratado com morfologia microfibrilosa alongada, possuindo grupos reativos em sua superfície. A estrutura microscópica da PAL é em forma de agulha ou bastonete com 20–70 nm de diâmetro e cerca de 1 μm de comprimento (Ma, *et al.* 2017). Devido à sua estrutura única e alta área de superfície, a PAL aparece como um suporte atraente para a imobilização de catalisadores na remoção de poluentes (Chen et al., 2014).

Sendo assim, combinando o suporte do catalisador por meio da palygorskyta com a adição de um metal nobre a superfície do catalisador, este trabalho preparou um catalisador composto de TiO_2 suportado no argilomineral palygorskyta, incorporado com nanopartículas de prata (AgNPs/ TiO_2 -PAL), com o objetivo de desenvolver um método colorimétrico, automatizado em microplacas, para a determinação da atividade antioxidante, baseado na geração de espécies reativas de oxigênio (HO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, $^1\text{O}_2$), presentes biologicamente nos sistemas *in vivo*, utilizando um sistema de fotocatalise heterogênea.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

O catalisador dióxido de titânio P25 Degussa (TiO_2) com alto grau de pureza (99,99%) foi utilizado como parâmetro de comparação com os resultados do catalisador AgNPs/ TiO_2 -PAL, foi adquirido na Sigma Aldrich. Goma Caraia, nitrato de prata (AgNO_3), água ultrapura (sistema MilliQ®), boro-hidreto de sódio (NaBH_4), metanol, difenilamina (> 99%) e álcool furfurílico (98%) foram adquiridos na Sigma Aldrich. O sal dissódico EDTA (P.A) foi adquirido da Dynamics Química Contemporânea LTDA. O corante ácido amarelo 73 (AA73), Figura 1 (a), foi fornecido por Danny Color Dyes e foi utilizado sem purificação prévia. O ácido gálico anidro puro (99,53%) foi adquirido na Scientific Exodus, Figura 1 (b).
Figura 1 - Estrutura química: (a) corante amarelo ácido 73; (b) antioxidante ácido gálico.



A Palygorskyta (PAL) foi adquirida no município de Guadalupe (Companhia Coimbra), centro-oeste do Estado do Piauí, Brasil ($06^\circ 47' 13''$ S; $43^\circ 34' 08''$ O). Os reagentes utilizados para a síntese do TiO_2 suportado na palygorskyta foram, isopropóxido de titânio IV ($\text{C}_{12}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{Ti}$) de grau analítico 97%, peróxido de hidrogênio 130 vol. (35% - H_2O_2 , anidro), álcool etílico, adquiridos na Sigma Aldrich.

2.2 SÍNTESE DO COMPÓSITO TiO₂ SUPORTADO NA PLYGORSKYTA

Inicialmente, a PAL foi macerada e peneirada em malha de 200 mesh (74 µm), para se obter um pó fino e desaglomerado (Zhang, et al. 2009; Saleiro, et al. 2010; Zhang, et al. 2011). Para a remoção da matéria orgânica, a argila foi lavada com água destilada e, em seguida, tratada com peróxido de hidrogênio à temperatura ambiente (25 °C) por um período de 24 horas. O excesso de peróxido na PAL foi removido por meio de sucessivas lavagens com água destilada, seguida de centrifugação. O precipitado obtido foi seco a 80 °C por 12 horas (Elert & Rodriguez-Navarro, 2015; Soberanis-Monforte, Gordillo-Rubio & González-Chi, 2015).

Para a síntese do compósito TiO₂-PAL, misturou-se a argila com etanol em uma proporção de 1:4 (m/v), para obter uma suspensão coloidal. A mistura foi mantida sob agitação contínua durante 30 minutos. Simultaneamente, em outro béquer, a suspensão de TiO₂ foi adquirida adicionando-se, lentamente, o precursor tetraisopropóxido de titânio em álcool etílico com proporção de 1:1,67 (p/v), sob agitação contínua. Após 30 minutos, adicionou-se água destilada lentamente à mistura, com proporção de 1:1 em relação ao precursor, permanecendo em agitação por mais 30 minutos. Posteriormente a suspensão de TiO₂ foi adicionada à suspensão de argila e mantida em agitação por 30 min. A proporção molar utilizada foi de 4 mmol de Ti/g de argila. Após homogeneização completa da mistura, a mesma foi colocada em repouso por 24 horas. O precipitado foi seco em estufa, sob temperatura de 75 C° por 12 horas. O tratamento térmico foi conduzido a 400 °C, com patamar de 120 min e taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ (Zhang, et al.2009; Saleiro, et al. 2010; Zhang, et al. 2011; Ma, et al. 2015).

2.3 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs)

Uma solução de goma Caraia (1 g.L^{-1}), solução de AgNO_3 (1 mmol.L^{-1}) e uma solução do agente redutor NaBH_4 a 1 mol.L^{-1} foram preparadas. Após a preparação das soluções, uma mistura de 20 ml da solução de AgNO_3 e 20 ml da solução estabilizadora foi agitada por 1 h, em seguida 200 μl da solução de NaBH_4 foram adicionados, o sistema foi deixado sob agitação por mais 30 min.

As nanopartículas obtidas foram caracterizadas utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd), com laser He-Ne de comprimento de onda 633 nm a uma temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e ângulo de espalhamento de 90° nas análises de Dispersão Dinâmica de Luz (DLS) e Potencial Zeta (PZ).

2.4 CATALISADOR COMPOSTO DE PLYGORSKITA- TiO_2 , INCORPORADO COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs/ TiO_2 -PAL)

Uma massa de TiO_2 -PAL (1,5 g) foi adicionada em 20 mL de solução de AgNPs e o sistema foi mantido em agitação por 72 h, após o sistema ser centrifugado, o precipitado foi separado e seco em estufa por 24 h a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, seguido de maceração até obter um pó, obtendo o catalisador AgNPs/ TiO_2 -PAL.

2.5 CARACTERIZAÇÃO DO CATALISADOR AgNPs/ TiO_2 -PAL

O catalisador AgNPs/ TiO_2 -PAL foi caracterizado por Difração de Raios X (DRX) no equipamento Shimadzu Labx-XRD 600, com radiação $\text{Cu-K}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), 2θ no intervalo entre 5° a 75° , com um taxa de varrimento de $2^\circ/\text{min}$.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com canhão de emissão por campo no equipamento FEI, modelo Quanta FEG 250, com tensão de aceleração de 1 a 30 kV, equipado com EDS de SDD (silicon drift detectors), marca Ametek, modelo HX-1001, Apollo Detector X-SDD. Para realizar as micrografias, a amostra foi dispersa em álcool isopropílico, levada ao banho de ultra-som por 5 minutos e gotejada para o topo revestido com papel alumínio. O tempo de secagem foi em torno de 2 horas. A amostra foi coberta com ouro no metalizador, marca Quorum, modelo Q150R, com tempo de 20 segundos e corrente de 15 mA, e plasma gerado em atmosfera de argônio.

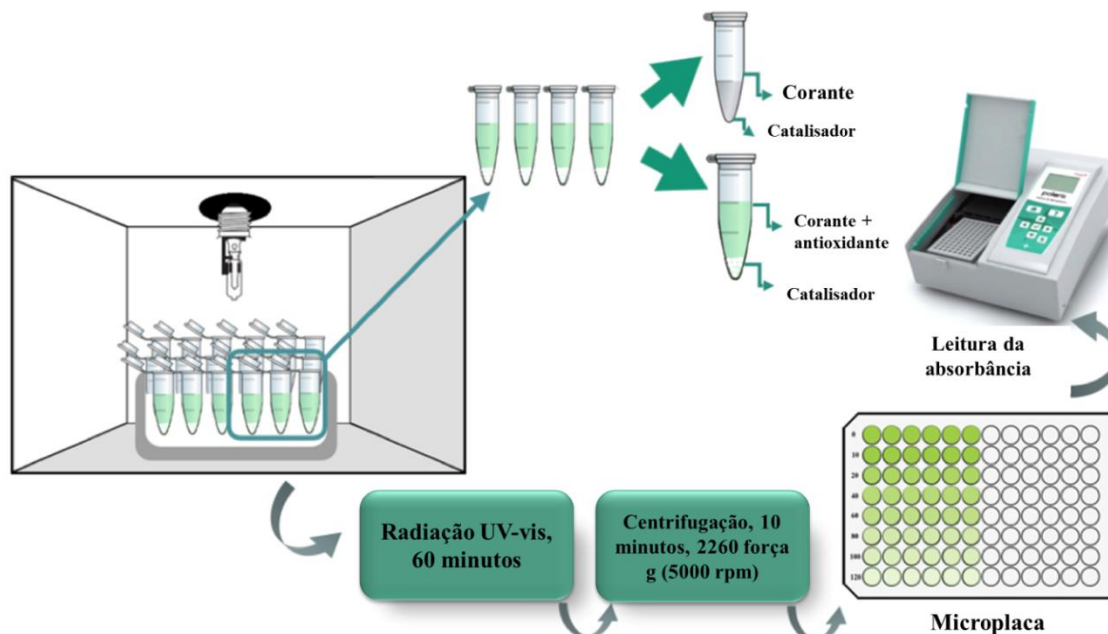
O diâmetro médio das nanopartículas esféricas do catalisador foi avaliado a partir de um histograma composto pela medição de 100 pontos usando o programa ImageJ.

Para realizar o experimento EDS, a amostra foi fixada em fita adesiva dupla-condutora de carbono e depois também revestida com ouro. Perfis de raios-X foram obtidos a 30 kV e tamanho do ponto 4,5. A presença de carbono e ouro é devida ao processo de fita condutiva e metalização, respectivamente.

2.6. ENSAIOS DE CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Para os testes de determinação da capacidade antioxidante, foi utilizada uma câmara reacional equipada de uma fonte de radiação UV (lâmpada 125 W sem bulbo), Figura 2.

Figura 2 - Ensaio de determinação da capacidade antioxidante.



Em eppendorfs de 1,5mL foram adicionados 1 mg.mL^{-1} de catalisador, 0,5 mL de solução aquosa do corante amarelo ácido 73 na concentração $2 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e 0,5 mL de solução aquosa de antioxidante ácido gálico em concentrações variadas (10 a $100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$), as amostras foram submetidas a radiação UV por 60 minutos. Após o tempo de radiação, foi realizada centrifugação dos eppendorfs por 10 minutos a 2260 força g (5000 rpm), para remoção do catalisador. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para uma microplaca e a leitura das absorbâncias foram realizadas no leitor de microplacas (Elisa Polaris®) no comprimento de onda de 492 nm e comparadas a leitura das absorbâncias dessas mesmas soluções não irradiadas, para o cálculo da descoloração do corante em função da concentração do antioxidante.

O percentual de descoloração e das soluções foi determinado utilizando a equação 1 (Saikia et al., 2015; Mecha, et al. 2016):

$$\text{Descoloração}(\%) = \frac{A_0 - A_t}{A_0} * 100 = \frac{C_0 - C_t}{C_0} * 100 \quad (1)$$

Onde, A_0 é a absorvância inicial da solução e A_t a absorvância no tempo t , que se relacionam respectivamente com as concentrações iniciais (C_0) e no tempo t (C_t) de acordo com a lei de Lambert-Beer (Tian, et al. 2012). A partir dos valores obtidos foram criadas curvas de reação para definir a capacidade mínima inibitória IC_{50} do antioxidante padrão ácido gálico. A linearidade foi estabelecida pela curva padrão para o ácido gálico, a qual foi obtida em cinco níveis de concentrações diferentes. Cada concentração foi determinada em triplicata ($n = 15$). A linearidade foi avaliada utilizando-se análise de regressão linear, com ajuste dos dados pelo método dos mínimos quadrados.

Os resultados obtidos no método desenvolvido utilizando o catalisador AgNPs/TiO₂-PAL foram comparados com os resultados obtidos utilizando o catalisador comercial TiO₂ P25.

A concentração remanescente de corante AA73 em solução foi analisada por espectrofotometria na região UV-vis, (espectrofotometro Agilent Technologies, Cary 60 UV) no seu comprimento de onda máximo de 490 nm.

2.7 PAPEL DAS EROs NA EFICIÊNCIA FOTOCATALÍTICA

Uma estimativa da contribuição dos radicais hidroxila HO[•], ânion superóxido O₂^{•-}, oxigênio singlete ¹O₂ e lacunas positivas (h⁺) durante os ensaios antioxidantes, é determinada pela adição de diferentes removedores de EROs, como metanol, difenilamina, álcool furfurílico e sal disódico EDTA, removedores de HO[•] (Li & Hu, 2016), O₂^{•-} (Alrobayi et al. 2015), ¹O₂ (Li & Hu, 2016) e h⁺ (Alrobayi et al. 2015), respectivamente. Todos os compostos foram utilizados a 0,5 mmol.L⁻¹ (Alrobayi et al. 2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. CARACTERIZAÇÃO DAS AgNPs

A estabilização eletrostática das AgNPs foi estimada medindo seus valores de potencial zeta. O valor do potencial zeta encontrado foi de -33,5 mV, o alto valor negativo confirma uma repulsão entre as partículas e uma boa estabilidade das nanopartículas de prata. (Dubey, Lahtinen & Sillanpää, 2010; Rao, et al. 2013; Agnihotri, Mukherji & Mukherji, 2014). A análise de DLS mostrou a distribuição de tamanho das partículas com intensidade máxima a 52,12 nm, que são consideradas parâmetros satisfatórios (Abou El-Nour, et al. 2010).

3.2. CARACTERIZAÇÃO DO CATALISADOR AgNPs/TiO₂-PAL

A estrutura do catalisador AgNPs/TiO₂-PAL sintetizado foi analisada por Difração de Raios X (DRX). A Figura 3 mostra os difratogramas do TiO₂ P25 Degussa com a fase cristalográfica anatase, a argila palygorskyta (PAL) e o catalisador AgNPs/TiO₂-PAL. As reflexões características da palygorskyta foram observadas nos padrões de DRX em $2\theta = 8,34^\circ$ e $19,7^\circ$ (Zhang, et al. 2011; Ma, et al. 2017). Os picos de difração do catalisador AgNPs/TiO₂-PAL, $2\theta = 25,3^\circ$, $38,8^\circ$, $48,09^\circ$ correspondem aos do TiO₂ P25 Degussa (Santana & Zaia, 2006) indicando que o TiO₂ foi cristalizado na fase anatase sobre a palygorskyta, a fase anatase é a estrutura cristalográfica do TiO₂ que apresenta maior atividade fotocatalítica (Samya, et al. 2014). A adição de Ag não alterou o perfil do TiO₂, inferindo que a Ag não se dissolveu na estrutura do TiO₂ e, provavelmente, foi depositada na sua superfície (Lee & Chen, 2014). Alguns picos típicos característicos das nanopartículas de

prata estão sobrepostos com os picos correspondentes ao TiO_2 , no entanto, uma análise EDS confirma a presença de prata no catalisador sintetizado, como mostrado na Figura 4.

Figura 3 - Difratograma do catalisador AgNPs/ TiO_2 -PAL.

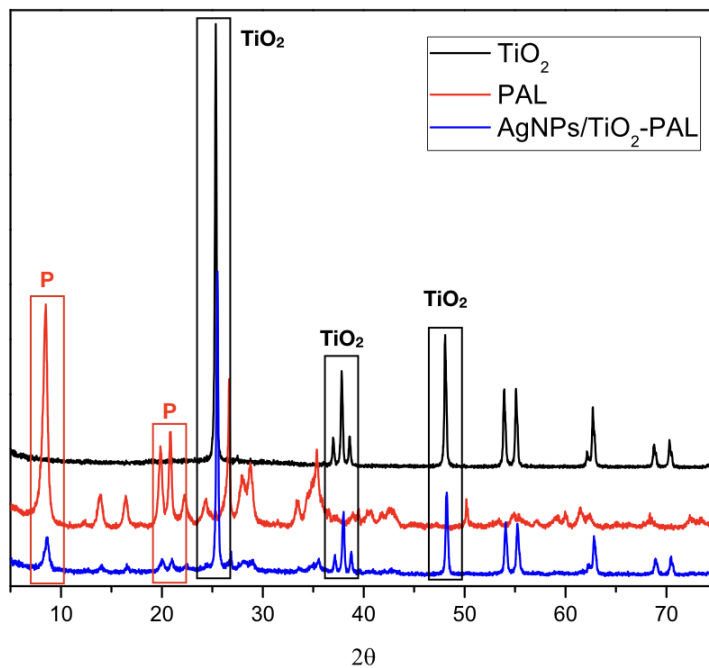
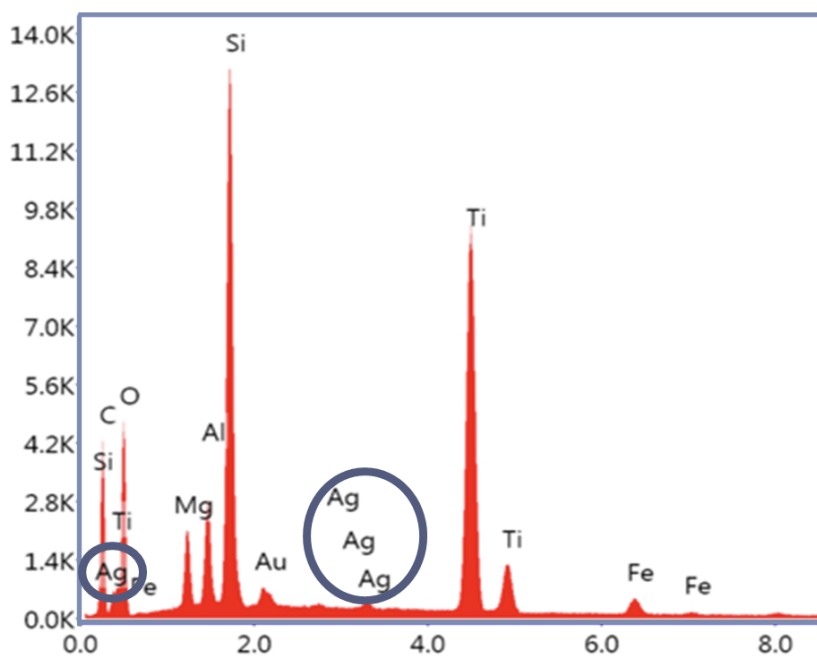
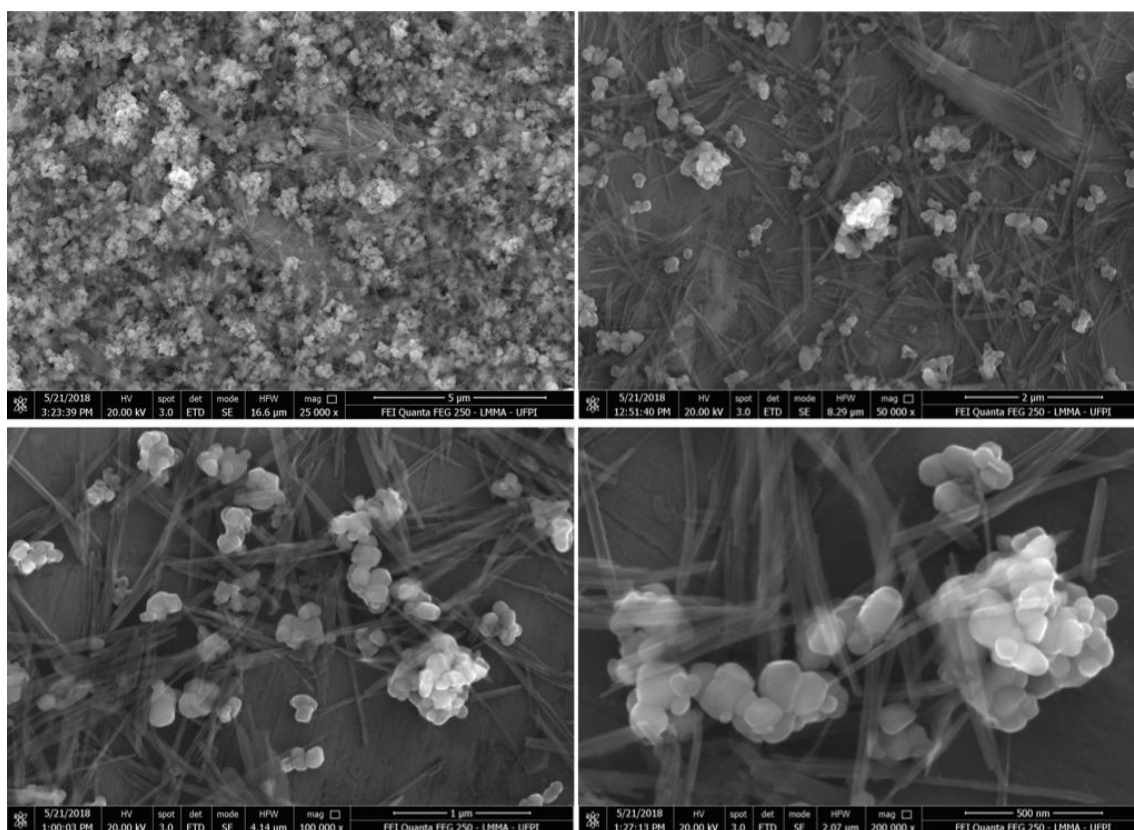


Figura 4 - Gráfico EDS do catalisador AgNPs/ TiO_2 -PAL.



As imagens do MEV (Figura 5) revelaram que estes materiais consistem de nanopartículas esféricas com diâmetro médio em torno de 1 μm , o diâmetro médio das nanopartículas esféricas do catalisador foi avaliado a partir de um histograma com uma medida de 100 pontos, o valor mínimo encontrado foi 0,7818 μm e o valor máximo foi 2,8546 μm , observou-se que as partículas esféricas são formadas pela agregação de partículas menores, pode-se notar fibras em estruturas planas, que é a morfologia típica da palygorskyta (Guo et al., 2014; Han, et al. 2015). Muitas partículas de AgNPs/TiO₂-PAL foram distribuídas na superfície das fibras PAL. O grupo hidroxila na superfície da estrutura cristalina da PAL foi perdido durante o processo de calcinação, ajudando na estabilização do TiO₂ na PAL para formar uma ligação Ti-O-Si estável (Ma, et al.2017). Esta estrutura aumentou as propriedades fotocatalíticas, reduzindo o tamanho de grão de TiO₂ no catalisador.

Figura 5 - Imagens MEV do catalisador AgNPs/TiO₂-PAL.

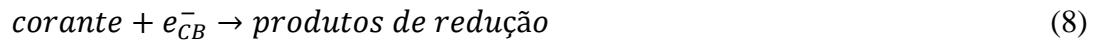
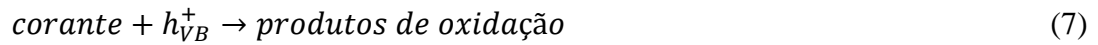
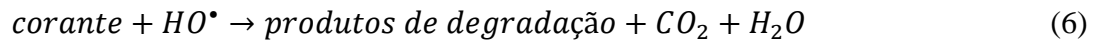
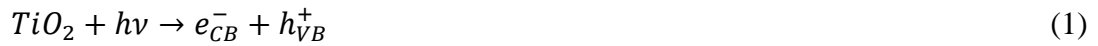


3.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA RECONHECIMENTO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

As espécies reativas de oxigênio geradas pela oxidação fotocatalítica da água utilizando TiO_2 são o radical hidroxilo (HO^\bullet), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (Rauf et al., 2009; Xiang, Yu, Wong, 2011; Rui-Jie et al., 2016; Nagarajan et al., 2017). Estas espécies estão biologicamente presentes *in vivo*, desempenhando papéis importantes em diversas reações bioquímicas. O ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) é gerado continuamente na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, pela ação de enzimas como xantina oxidase e NADPH oxidase, ou pela redução monoelétrica de O_2 . Em relação a outras espécies reativas o $\text{O}_2^{\bullet-}$ tem uma semi-vida relativamente longa, o que permite a difusão dentro da célula, aumentando assim o número de alvos potenciais (Lü et al., 2010; Prior, 2015; Carocho et al., 2018). O radical HO^\bullet é o mais reativo e mais lesivo radical conhecido e para o qual, uma vez formado, o organismo humano não dispõe de mecanismo de defesa, apesar de apresentar meia-vida curta (aproximadamente 10^{-9} s), reage rapidamente e sem seletividade com uma série de endobióticos, causando modificação no DNA, peroxidação lipídica, danos em proteínas e inativação enzimática (Mozafari et al., 2006). O $^1\text{O}_2$ consiste no estado eletronicamente excitado do oxigênio, é produzido por reações fotoquímicas ou por outras radiações, reagindo com um grande número de moléculas biológicas, incluindo DNA, proteínas e lipídios, e embora não seja um radical livre, provoca a formação de outros radicais tóxicos, uma vez que é um dos intermediários mais ativos envolvidos em reações bioquímicas (Mozafari et al., 2006; Costa et al., 2007; Prior, 2015).

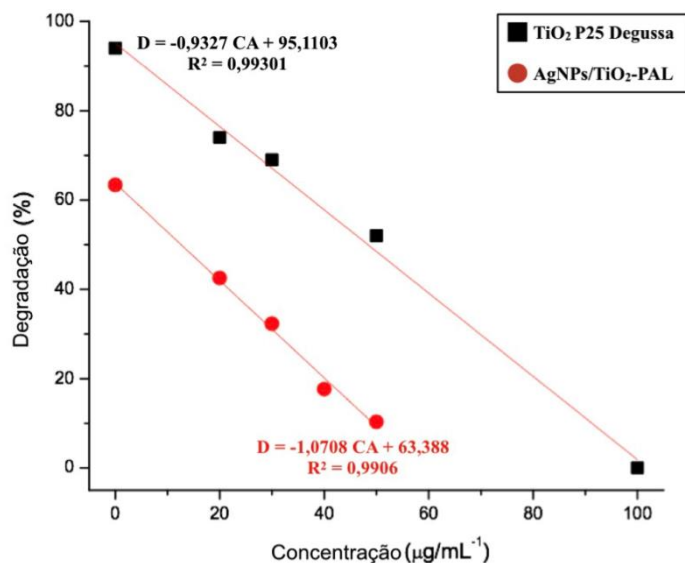
Um processo geral de fotocatalise inicia a partir da fotoexcitação do TiO_2 com uma energia maior que o *bandgap* (E_g) de 3,2 eV (Muruganandham & Swaminathan, 2006; Wei, et al. 2017), resultando na formação de pares ativos de elétrons-lacunas (e^-/h^+) (Guo et al.,

2015). Na presença de doadores de elétrons e aceitadores em solução, a reação de recombinação entre o elétron e lacuna pode ser evitada por reações redox. Na fotólise do TiO₂ em água, as nanopartículas solvatantes das moléculas de água e o O₂ dissolvido podem reagir com ambos, a lacuna e o elétron, respectivamente, para gerar HO[•] (Xiang, Yu, Wong, 2011; Rauf et al., 2009; Rui-Jie et al., 2016; Nagarajan et al., 2017).



A adequada linearidade do método foi verificada pela análise da regressão linear da concentração do antioxidante avaliado *versus* a descoloração do corante para cada concentração (Figura 6) e verificou-se a capacidade antioxidante do ácido gálico no sistema fotocatalítico de maneira dependente da concentração.

Figura 6 - Curvas analíticas do ácido gálico.



Legenda: CA é a concentração do antioxidante avaliado; D é a descoloração do corante.

Com as equações descritas na Figura 6 é possível encontrar a concentração de antioxidante necessária para proteger o corante de 50% da descoloração na presença dos catalisadores e luz UV, denominada de IC₅₀. O valor de IC₅₀ obtido para o ácido gálico utilizando o catalisador AgNPs/TiO₂-PAL foi de $12 \pm 2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto que, utilizando o catalisador TiO₂ P25 Degussa foi de $50 \pm 4,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Masaki *et al.* (1994) avaliou a capacidade de inibição de espécies reativas como ânion superóxido, radicais hidroxílicos e oxigênio singlete para antioxidantes conhecidos como ácido gálico, galato de propilo e ácido ascórbico. O ácido gálico apresentou melhores resultados para a maioria das espécies reativas estudadas, com valores de IC₅₀ $11,86 \pm 0,79 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o oxigênio singlete (¹O₂), $0,187 \pm 0,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o ânion superóxido e $13,33 \pm 1,91 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para radicais hidroxílicos.

Lo Scalzo (2010) avaliou a capacidade antioxidante do ácido gálico em eliminar as espécies reativas O₂^{•-} e HO[•], o estudo foi realizado por ressonância paramagnética eletrônica.

O valor das concentrações mínimas inibitórias de ácido gálico encontradas pelo autor para o $O_2^{\cdot-}$ foi de 3,9 mM, enquanto que para HO^{\cdot} foi de 781,5 mM. Dessa forma, o autor concluiu que o potencial do ácido gálico para inibir as espécies reativas $O_2^{\cdot-}$ e HO^{\cdot} é bem distinto, sendo necessária uma concentração muito baixa de antioxidante para inibir $O_2^{\cdot-}$ em comparação a concentração necessária para inibir HO^{\cdot} .

Chisté *et al.* (2012) encontrou valores de IC_{50} para o ácido gálico de $13 \pm 2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para neutralização de $O_2^{\cdot-}$ e de $1 \pm 0,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o 1O_2 , porém não foi avaliado o IC_{50} para o HO^{\cdot} .

Diante do que foi exposto, é possível notar que a grande maioria dos estudos avaliam a capacidade antioxidante dos compostos/extratos/materiais e de antioxidantes considerados como padrão ouro para espécies reativas isoladas, sendo uma forma interessante de entender o mecanismo de ação dos antioxidantes. No entanto, nos sistemas *in vivo*, as espécies reativas são produzidas em cascata e não reagem de forma isolada. Portanto, no método desenvolvido no presente estudo, foi encontrada IC_{50} de ácido gálico $12 \pm 2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ utilizando o nanocompósito AgNPs/TiO₂-PAL e de $50 \pm 4,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$, utilizando o catalisador TiO₂ P25, para eliminar três espécies reativas $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} e 1O_2 produzidas, onde $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} são produzidas simultaneamente e partir destas forma-se o 1O_2 , que ocorrem naturalmente e constantemente nas reações bioquímicas dos sistemas *in vivo* (Xiang, Yu, Wong, 2011; Rauf et al., 2009; Rui-Jie et al., 2016; Nagarajan et al., 2017).

3.4. ESPECTROS UV-VIS DO AA73

Considera-se que as espécies reativas geradas pelo catalisador de TiO₂ durante a fotocatalise da água são responsáveis pela descoloração do AA73. No entanto, na presença de um composto com potencial antioxidante, como o ácido gálico, a descoloração poderia ser

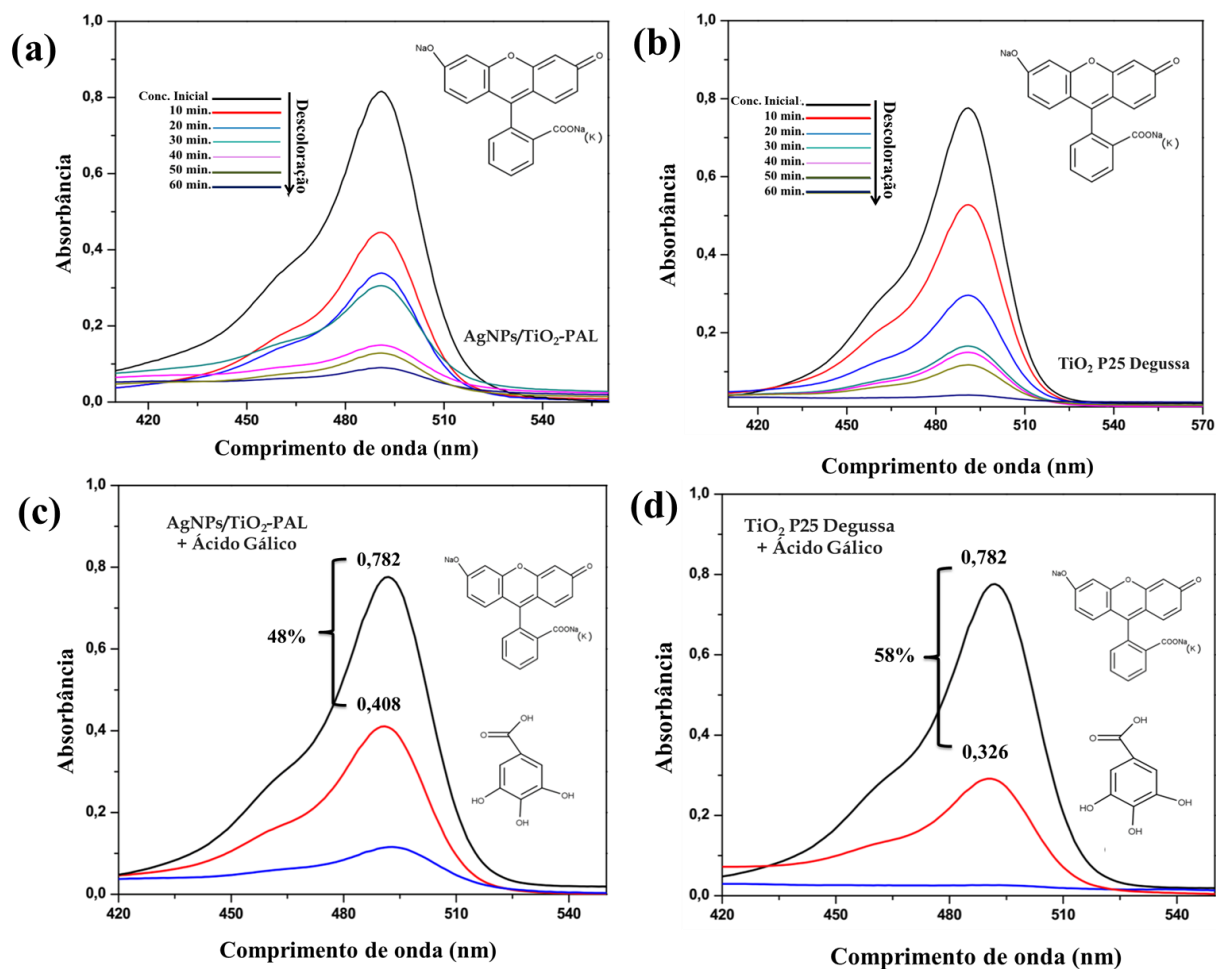
potencialmente minimizada, sugerindo que este sistema poderia ser utilizado para o desenvolvimento de uma metodologia simples, rápida e de baixo custo para determinação quantitativa e qualitativa da capacidade antioxidante de compostos naturais e sintéticos de novos materiais.

Assim, o resíduo do corante AA73 na solução aquosa após os ensaios de atividade antioxidante foram avaliados por espectroscopia UV-vis. O corante amarelo ácido 73 mostrou uma banda de absorção máxima no comprimento de onda de 490 nm, além de bandas menores nos comprimentos de onda 238, 285 e 324 nm.

O espectro do AA73 utilizando o nanocompósito AgNPs/TiO₂-PAL, Figura 7 (a), e o catalisador TiO₂ P25 Degussa, Figura 7 (b), mostra que a intensidade dos picos a 490 nm (λ_{max}) diminui gradualmente durante a irradiação UV, resultando na descoloração das soluções. O quase perfeito desaparecimento da banda a 490 nm revela que o AA73 é eliminado após cerca de 60 minutos nos sistemas constituídos de solução aquosa do corante e catalisador, sem adição de antioxidante. Nenhum novo pico de absorção apareceu nas regiões visíveis ou UV. Após 60 minutos de exposição a luz UV na presença do nanocompósito AgNPs/TiO₂-PAL o corante sofreu uma descoloração de 80% e na presença do catalisador TiO₂ P25 Degussa o corante sofreu uma descoloração de 86%.

Adicionando o antioxidante ácido gálico ao sistema, observa-se no espectro de AA73 usando o catalisador AgNPs/TiO₂-PAL, Figura 7 (c), e o catalisador TiO₂ P25 Degussa, Figura 7 (d), que a intensidade do picos a 490 nm (λ_{max}) sofrem apenas uma redução, o que não resulta na descoloração total das soluções, indicando que este composto com potencial antioxidante reconhecido na literatura elimina as espécies reativas de oxigênio do meio reacional, reduzindo significativamente sua reação com o corante.

Figura 7 - Espectro UV-vis da reação fotocatalítica do AA73: (a) AgNPs/TiO₂-PAL na ausência de antioxidante; (b) TiO₂ P25 na ausência de antioxidante; (c) AgNPs/TiO₂-PAL na presença de antioxidante (d) TiO₂ P25 na presença de antioxidante.

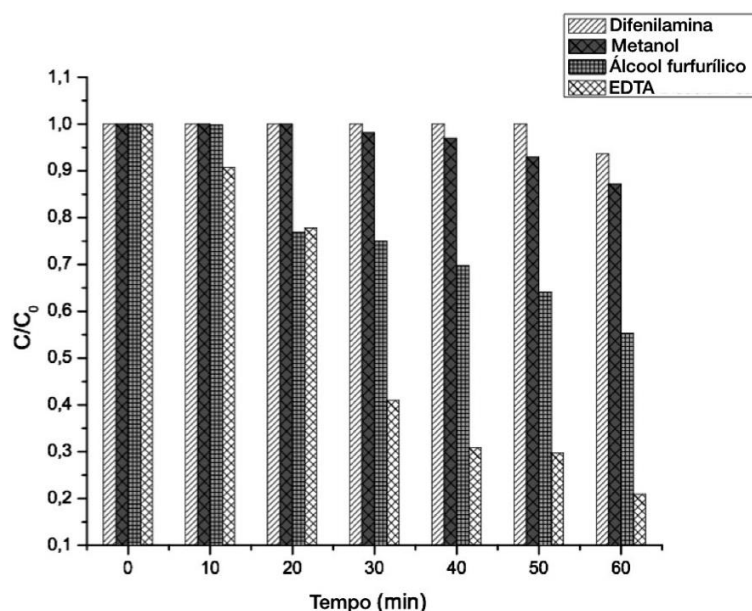


3.5. EFEITO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO ROS

A melhor maneira de entender o papel de cada espécie reativa nos ensaios de capacidade antioxidante é tentar retardar a recombinação de lacunas e elétrons fotogerados na superfície do catalisador, isto é, preencher as lacunas da banda de valência com os elétrons de algum tipo de redutor (Alrobayi et al., 2015).

No presente estudo, foram utilizados sequestrantes, como o metanol para remoção de radicais HO[•] (Li & Hu, 2016), difenilamina como removedor de O₂^{•-} (Alrobayi et al., 2015) e álcool furfurílico para ¹O₂ (Li & Hu, 2016). Os resultados da descoloração fotocatalítica do AA73 nos ensaios de capacidade antioxidante em sistema com supressores podem ser vistos na Figura 8.

Figura 8 - Descoloração fotocatalítica do AA73 nos ensaios de capacidade antioxidante, adicionando os supressores.



Adicionando difenilamina (supressor de O₂^{•-}), metanol (supressor HO[•]), álcool furfurílico (supressor de ¹O₂) e sal dissódico de EDTA (supressor h⁺) ao sistema composto de solução aquosa de corante e catalisador AgNPs/TiO₂-PAL, uma redução significativa na descoloração do AA73 foi alcançada.

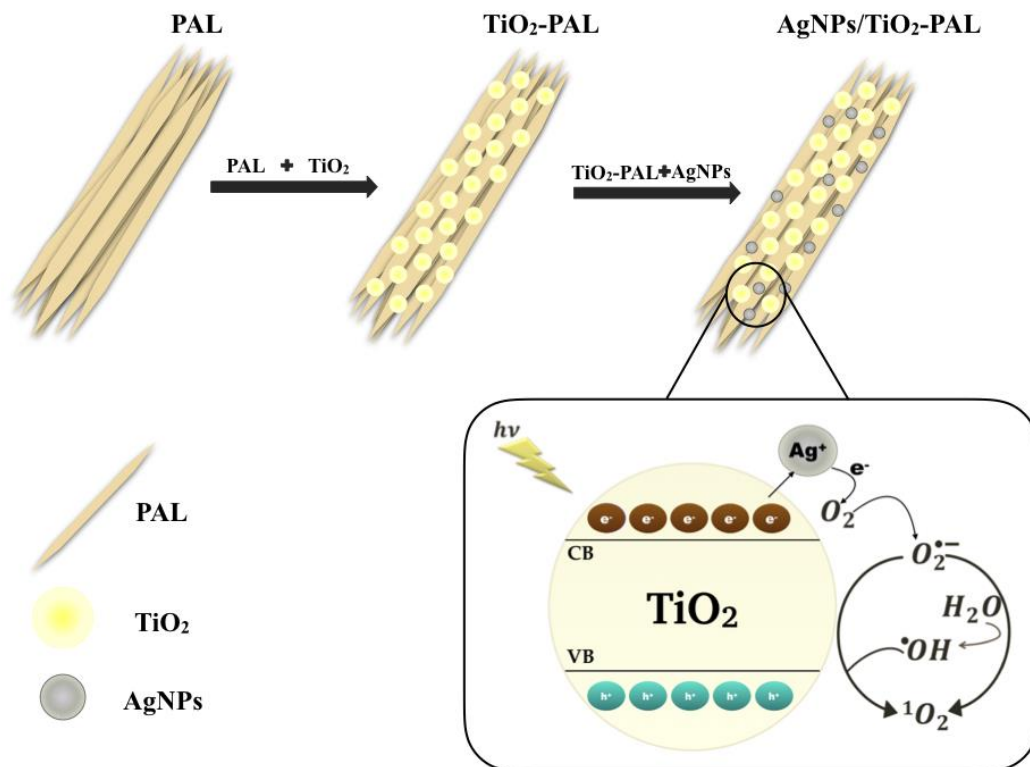
Li *et al.* (2013), obtiveram resultados semelhantes quanto à ordem de importância das espécies reativas na descoloração do corante laranja de metileno, utilizando o catalisador TiO₂ e adicionando AgNO₃ na solução. Os autores descrevem que, combinando o importante papel

dos radicais HO[•] com o papel quase insignificante das lacunas na descoloração do corante, é possível deduzir que existe uma outra fonte de geração de radical HO[•] no sistema além da geração através das lacunas. Ao comparar esta dedução com o fato de que suprimir o O₂^{•-} nas reações deste trabalho causou um grande impacto na descoloração do corante AA73, é possível concluir que o O₂^{•-} pode ser outra fonte de geração de radicais HO[•].

Liu *et al.* (2007), sintetizaram um fotocatalisador composto por TiO₂ e prata, suportado em montmorilonita (Ag-TiO₂/MMT) e aplicado à fotodegradação do corante azul de metileno (MB), entre Ag-TiO₂, MMTNTiO₂, MMTNTiO₂ (P25) e Ag-TiO₂/MMT, o Ag-TiO₂/MMT apresentou a maior atividade de foto-oxidação devido à sua maior superfície específica causada pelo suporte da argila e pela modificação na superfície do TiO₂ por meio da prata para melhorar sua absorção de luz.

Assim, a transferência de elétrons causada pelo depósito metálico na superfície do TiO₂ resulta na carga negativa do metal. Em sistemas com equilíbrio de ar, depósitos de Ag na superfície do TiO₂ aumentam a fotoatividade, acelerando a transferência de elétrons para moléculas de oxigênio dissolvido. Portanto, o radical ânion superóxido é formado como resultado da redução de oxigênio pela transferência de elétrons aprisionados de metal Ag para oxigênio (Behnajady *et al.*, 2007), como pode ser visto na Figura 9.

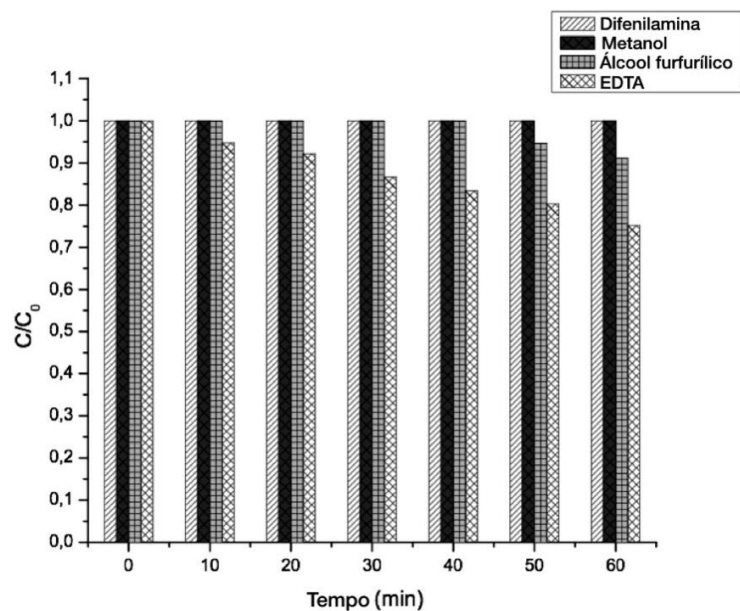
Figura 9 - Etapas de obtenção do catalisador AgNPs/TiO₂-PAL e mecanismo de geração das espécies reativas de oxigênio.



A oxidação do AA73 por fotocatalise no sistema com AgNPs/TiO₂-PAL foi realizada principalmente pela participação das espécies O₂^{•-}, HO[•] e ¹O₂, nesta ordem de importância. Além disso, é possível verificar que a contribuição dos buracos ocorreu em menor escala.

Adicionando o antioxidante ácido gálico a estes sistemas, vê-se que a eficiência de proteção do AA73 aumenta com a adição de todos os supressores, Figura 10.

Figura 10 - Descoloração fotocatalítica de AA73 nos ensaios de capacidade antioxidante, adicionando os supressores e antioxidantes.



Há uma redução significativa, na descoloração AA73 com a adição de álcool furfurílico e EDTA Disodium (supressor de $^1\text{O}_2$ e h^+). Por outro lado, uma proteção de quase 100% da cor do corante é observada em ambos os sistemas com a adição de difenilamina (supressor de radicais $\text{O}_2^{\cdot-}$) e metanol (supressor de HO^{\cdot}).

4. CONCLUSÃO

Um catalisador constituído de nanopartículas de TiO_2 , suportado na palygorskyta e incorporado com nanopartículas de prata ($\text{AgNPs}/\text{TiO}_2\text{-PAL}$) foi sintetizado e aplicado ao desenvolvimento de um método de reconhecimento de capacidade antioxidante. Os resultados mais favoráveis foram observados quando se utilizou o catalisador sintetizado que demonstrou maior sensibilidade ao sistema apresentando menor IC_{50} para proteção do corante que o catalisador comercial. O estudo adicional da contribuição de ROS indica que $\text{O}_2^{\cdot-}$ e HO^{\cdot} são responsáveis pela maior descoloração do AA73 usando o catalisador $\text{AgNPs}/\text{TiO}_2\text{-PAL}$, enquanto $^1\text{O}_2$ e HO^{\cdot} são responsáveis pela maior descoloração do AA73 usando o catalisador TiO_2 P25 Degussa.

Desta forma pode-se verificar que o catalisador foi sintetizado de forma eficiente e demonstrou excelente aplicabilidade ao método desenvolvido, apresentando potencial para ser utilizado em laboratórios industriais e universitários para investigar a atividade antioxidante em compostos naturais/sintéticos e de ovos materiais com aplicações para alimentos, cosméticos e indústrias farmacêuticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abou El-Nour, K. M. M.; Eftaiha, A.; Al-Warthan, A.; Ammar, R. A. A. (2010). Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry*, 3:3, 135-140, doi: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.04.008>.

Agnihotri, S.; Mukherji, S. and Mukherji, S. (2014). Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Advances*, 4, 3974-3983. DOI: 10.1039/C3RA44507K.

Alrobayi, E.M.; Algubili, A. M.; Aljeboree, A. M.; Alkaim, A. F.; Hussein, F. H. (2015). Investigation of photocatalytic removal and photonic efficiency of maxilon blue dye GRL in the presence of TiO₂ nanoparticles. *Particulate Science and Technology*. doi: 10.1080/02726351.2015.1120836.

Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M., & Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 85, 957–998. Doi: <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-12-07-15>.

Badarinath, A.V., Rao, K.M., Chetty, C.M.S., Ramkanth, V., Rajan, T.V.S., Gnanaprakash, K., (2010). A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *Int. J. PharmTech Res.* 2 (2), 1276–1285.

Baqar, M., Sarwar, A., Durr-e-Shahwar, Nazir, R., Shahid, S., Shaikh, I. A., Arslan, M., Machado, S., Ali, A. (2015). Adsorption of Acid Yellow-73 and Direct Violet-51 Dyes from Textile Wastewater by Using Iron Doped Corncob Charcoal. *Pak. J. Anal. Environ. Chem.*,

16(1):31-38.

Available

in:

<<https://search.proquest.com/openview/b015b96b7b0b3674fc356a8ee4ab8d00/1?pq-origsite=gscholar&cbl=1616342>>.

Behnajady, M.A., Modirshahla, N., Shokri, M., Rad, B., (2007). Enhancement of Photocatalytic Activity of TiO₂nanoparticles By Silver Doping: Photo deposition versus Liquid Impregnation Methods.Global Nest Journal, Vol 10, No 1, pp 1-7.

Byrne, C.; Subramanian, G.; Pillai, S.C. (2017). Recent Advances in Photocatalysis for Environmental Applications. Journal of Environmental Chemical Engineering, <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.11.008>.

Carocho, M.; Morales, P.; Ferreira, I.C.F.R., (2018). Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. Trends in Food Science & Technology,71, 107-120. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.008>

Chen, D.; Du, Y.; Zhu, H.; Deng, Y. (2014). Synthesis and characterization of a micro fibrous TiO₂-CdS/palygorskite nanostructured material with enhanced visible light photocatalytic activity. Applied Clay Science, v. 87, p. 285-291. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2013.11.031>.

Chen, H.; Chen, S.; Quan, X.; Yu, H.; Zhao, H.; Zhang, Y. (2008). Fabrication of TiO₂-Pt coaxial nanotube array Schottky structures for enhanced photocatalytic degradation of phenol in aqueous solution. J. Phys. Chem, V. 112 p. 9285-9290. Doi:10.1021/jp8011393.

Chisté, R. C.; Freitas, M.; Mercadante, A.Z.; Fernandes, E. (2012). The potential of extracts of *Caryocar villosum* pulp to scavenge reactive oxygen and nitrogen species. Food Chemistry, 135:1740-1749. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06>..

Costa, D.; Fernandes, E.; Santos, J.L.M.; Pinto, D.C.G.A.; Silva, A.M.S.; Lima, J.L.F.C. (2007). New noncellular fluorescence microplate screening assay for scavenging activity against singlet oxygen. *Anal Bioanal Chem*, 387:2071-2081. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0998-9>.

Daimon, T., Hirakawa, T., Kitazawa, M., Suetake, J., Nosaka, Y., 2008. Formation of singlet molecular oxygen associated with the formation of superoxide radicals in aqueous suspensions of TiO₂ photocatalysts. *Appl. Catal. A* 340, 169–175. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2008.02.012>.

Dubey, S.P.; Lahtinen, M.; Sillanpää, M. (2010). Green synthesis and characterizations of silver and gold nanoparticles using leaf extract of *Rosa rugosa*. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 364, 34–41. doi:10.1016/j.colsurfa.2010.04.023.

Elert, K., Pardo, E. S. and Rodriguez-Navarro, C. (2015). Influence of organic matter on the reactivity of clay minerals in highly alkaline environments. *Applied Clay Science*, 111, 27–36. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2015.03.006>.

Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry* 37:277–285. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015>.

Fujishima, A., Zhang, X., Tryk, D.A., (2008). TiO₂ photocatalysis and related surface phenomena. *Surf. Sci. Rep.* 63, 515–582. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.surfrep.2008.10.001>.

Ge, Q.; Ge, P.; Jiang, D.; Du, N.; Chen, J.; Yuan, L.; Yu, H.; Xu, X.; Wu, M.; Zhang, W.; Zhou, G. (2018). A novel and simple cell-based electrochemical biosensor for evaluating the

antioxidant capacity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese dry-cured ham. *Biosensors and Bioelectronics*, 99:555-563. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.037>.

Guo, X., Qiu, F., Dong, K., Rong, X., He, k., Xu, J., e Yang, D. (2014). Preparation and application of copolymer modified with the palygorskite as inhibitor for calcium carbonate scale. *Applied Clay Science*, 99, 187–193. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2014.06.031>.

Guo, X.; Li, Q.; Zhang, M.; Long, M.; Kong, L.; Zhou, Q.; Shao, H.; Hu, W.; Wei, T. (2015). Enhanced photocatalytic performance of N-nitrosodimethylamine on TiO₂ nanotube based on the role of singlet oxygen. *Chemosphere* 120 (2015) 521–526. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.09.002>.

Han, J., Liang, X., Xu, Y., e Xu, Y. (2015). Removal of Cu²⁺ from aqueous solution by adsorption onto mercapto functionalized palygorskite. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 23, 307–315. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.08.034>.

Hidalgo, M.C.; Maicu, M.; Navio, J.A; Colon, G. (2010). Effect of sulfate pretreatment on gold-modified TiO₂ for photocatalytic applications. *J. Phys. Chem.* 113 p. 12840–12847. Doi: [10.1021/jp903432p](https://doi.org/10.1021/jp903432p).

Kumar, S., Sharma, S. & Vasudeva, N. Chin. (2017). Review on antioxidants and evaluation procedures. *J. Integr. Med.* 1-12. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11655-017-2414-z>.

Lee, D. S.; Chen, Y. W. (2014). Nano Ag/TiO₂ catalyst prepared by chemical deposition and its photocatalytic activity. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 42, n. 2, p. 705-712. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2013.07.007>.

Li, S. and Hu, J. (2016). Photolytic and photocatalytic degradation of tetracycline: Effect of humic acid on degradation kinetics and mechanisms, *Journal of Hazardous Materials*, v.318, p. 134-144. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.05.100>.

Li, W.; Li, D.; Wang, J.; Shao, Y.; You, J.; Teng, F. (2013). Exploration of the active species in the photocatalytic degradation of methyl orange under UV light irradiation. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 380 (2013) 10–17. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcata.2013.09.001>.

Liu, J., Li, X., Zuo, S., Yu, Y., (2007). Preparation and photocatalytic activity of silver and TiO₂nanoparticles/montmorillonite composites. *Applied Clay Science* 37 (2007) 275–280. doi:10.1016/j.clay.2007.01.008.

Lo Scalzo, R. (2010). Measurement of free radical scavenging activity of gallic acid and unusual antioxidants as sugars and hydroxy acids. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural & Food Chemistry*,9(8):1360-1371.

López-Alarcón, C.; Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1-10. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051>.

Lü, J.M.; Lin, P.H.; Yao, Q.; Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(4): 840-860. Doi:<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x>

Ma, J., Zhu, C., Xu, Y., Lu, Lu, J., Huang, L., e Yang, Z. (2017). Photocatalytic degradation of gaseous benzene with $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}/\text{TiO}_2/\text{palygorskite}$ composite catalyst. *Journal of Saudi Chemical Society*. 21(2):132-142. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2015.02.001>.

Marambio-Jones, C. and Hoek, E.M.V. *J Nanopart Res* (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment, *Journal of Nanoparticle Research*, 12: 1531–1551. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9900-y>.

Masaki, H., Atsumi, T., Sakurai, H. (1994). Hamamelitannin as a new potent active oxygen scavenger. *Phytochemistry*, v. 37, n. 2, p. 337-343. doi: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)85057-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)85057-7).

Mecha, A. C., Onyango, M. S., Ochieng, A., Jamil, T. S., Fourie, C. J., Momba, M. N. B., (2016). Uv and Solar Light Photocatalytic Removal of Organic Contaminants in Municipal Wastewater. *Separation Science and Technology*, 51(10):1765-1778. Doi: <https://doi.org/10.1080/01496395.2016.1178290>.

Mozafari, M. R., Flanagan, J.; Martia-Merino, L.; Awati, A.; Omri, A.; Suntres, Z. E.; Singh, H. (2006). Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 86, n. 13, p. 2038–2045. DOI: [10.1002/jsfa.2576](https://doi.org/10.1002/jsfa.2576).

Muruganandham, M.; Swaminathan, M. (2006). TiO_2 –UV photocatalytic oxidation of Reactive Yellow 14: Effect of operational parameters. *Journal of Hazardous Materials*, 135(1):78-86. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.11.022>.

Nagarajan, S.; Skillena, N.C.; Fina, F.; Zhang, G.; Randorn, C.; Lawton, L.A.; Irvine, J.T.S.; Robertson, P.K.J. (2017). Comparative assessment of visible light and UV active photocatalysts by hydroxyl radical quantification. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 334:13–19. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2016.10.034>.

Niki, E. (2010). Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology & Medicine*, 49, 503–515. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016>.

Prior, R.L. (2015). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *Journal of Functional Foods*, 18:797-810. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.018>.

Rajan, V. K.; Muraleedharan, K. (2016). A computational investigation on the structure, global parameters and antioxidant capacity of a polyphenol: gallic acid. *Food Chemistry*, 220, 93-99. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.178>.

Rao, Y. S.; Kotakadi, V. S.; Prasad, T.N.V.K.V.; Reddy, A.V.; Gopal, D.V.R.S. (2013). Green synthesis and spectral characterization of silver nanoparticles from *Lakshmitulasi* (*Ocimum sanctum*) leaf extract. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 103, 156–159. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2012.11.028>.

Rauf, M. A.; Ashraf, S. S., (2009) Fundamental principles and application of heterogeneous photocatalytic degradation of dyes in solution. *Chemical Engineering Journal*, 151, 10-18. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.02.026>.

Ribeiro, A. B.; Chisté, R.C; Freitas, M; da Silva, A.F; Visentainer, J.V; Fernandes, E. (2014). *Psidium cattleianum* fruit extracts are efficient in vitro scavengers of physiologically relevant reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry*, 165, 140-148. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.079>.

Roginsky, V. And Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* 92, 235–254. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.004>.

Rui-Jie, J.; Qiang, Z.; Ji-Feng, L.; Mohamad Hojeij; Girault, H.H., (2016). Antioxidant Assay Based on Quenching of Photocatalytically Generated Reactive Oxygen Species. *Chin J Anal Chem*, 44(8), 1257–1262. doi: [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(16\)60950-7](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(16)60950-7).

Saien, J. and Soleymania, A. R. (2007). Degradation and mineralization of Direct Blue 71 in a circulating upflow reactor by UV/TiO₂ process and employing a new method in kinetic study. *Journal of Hazardous Materials* 144 (1–2):506–12. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.10.065.

Saikia, L., Bhuyan, D., Saikia, M., Malakar, B., Dutta, D. K., Sengupta, P., (2015). Photocatalytic performance of ZnO nanomaterials for self-sensitized degradation of malachite green dye under solar light. *Applied Catalysis A: General*, 490(25):42-49. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2014.10.053>.

Saito, Y.; Wang, J.; Batchelder, D.; Smith D. (2003). Simple chemical method for forming silver surfaces with controlled grain sizes for surface plasmon experiments. *Langmuir* 19:6857–6861. doi:10.1021/la0301240.

Saleiro, G. T., Cardoso, S. L., Toledo, R., e Holanda, J. N. F. (2010). Evaluation of the crystalline phases of supported titanium dioxide in red ceramic. *Cerâmica*, 56, 162-167. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0366-69132010000200011>.

Samya E.; Fatma, M.; Marwa, S.; Osama A. F. (2014). Synthesis, characterization and application of TiO₂nanopowders as special paper coating pigment. *Appl Nanosc*, Vol. 4, p. 305–313. Doi: <https://doi.org/10.1007/s13204-013-0196-y>.

Santana, H.; Zaia, D.A.M. (2006). Preparação e caracterização de substratos SERS ativos: um estudo da adsorção do cristal violeta sobre nanopartículas de prata. *Química Nova*, 29(2), 194-199.

Schaich, K.M.; Tian, X.; Xie, J. (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*. 14:111-125. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.043>.

Shahidi, F. and Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18:757-781. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>.

Singh, T.; Jyoti, K.; Patnaik, A.; Singh, A.; Chauhan, R.; Chandel, S. S. (2017). Biosynthesis, characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles using an endophytic fungal supernatant of *Raphanus sativus*. *Journal go Genetic Engineering and Biotechnology*, 15 (1), 31-39. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.04.005>.

Soberanis-Monforte, G. A., Gordillo-Rubio, J. L. and González-Chi, P. I. (2015). Influence of Chemically Treated Palygorskite Over the Rheological Behavior of Polypropylene

Nanocomposites. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, 16, 491-501. doi: <https://doi.org/10.1016/j.riit.2015.09.002>.

Tian, C., Zhang, Q., Wu, A., Jiang, M., Liang, Z., Jiang, B., Fu, H. (2012). Cost-effective large-scale synthesis of ZnO photocatalyst with excellent performance for dye photodegradation. *Chemical Communications*, 48:2858-2860. Doi: 10.1039/C2CC16434E.

Verma, A., Prakash., N.T., Toor, A.P. (2014). An efficient TiO₂ coated immobilized system for the degradation studies of herbicide isoproturon: Durability studies. *Chemosphere*, v.109, p. 7–13. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.051>.

Wei, M.; Peng, X.L.; Liu, Q.S; Li, F.; Yao, M.M. (2017). Nanocrystalline TiO₂ Composite Films for the Photodegradation of Formaldehyde and Oxytetracycline under Visible Light Irradiation. *Molecules*, 22(6), 950. doi:10.3390/molecules22060950.

Xavier, K. C. M., Filho, E. C. S., Santos, M. S. F., Luz, A. B. (2012). Caracterização mineralógica, morfológica e de superfície da atapulgita de Guadalupe-PI. *Holos*, v. 5, p. 60-70.

Xiang, Q.; Yu, J.; Wong, P. K. (2011). Quantitative characterization of hydroxyl radicals produced by various photocatalysts. *Journal of Colloid and Interface Science* 357, 163–167. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.01.093>.

Zhang, L., Lv, F., Zhang, W., Li, R., Zhong, H., Zhao, Y., Zhang, Y., e Wang, X. (2009). Photo degradation of methyl orange by attapulgite–SnO₂–TiO₂ nanocomposites. *Journal of Hazardous Materials*, 171, 294-300. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.05.140>.

Zhang, Lili, Liu, J., Tang, C., Lv, J., Zhong, H., Zhao, Y., e Wang, X. (2011). Palygorskite and SnO₂-TiO₂ for the photodegradation of phenol. *Applied Clay Science*, 51, 68–73. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2010.11.003>.

Zhu, K.; Jiangyong, D.; Jianhua, T.; Zhongqiang, S. (2015). Synthesis of shuttle-like anatase TiO₂ mesocrystals. *Materials Letters*. Vol.145, p. 201–204. Doi:<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2015.01.115>.

CAPÍTULO 4

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA COLORIMÉTRICA PARA RECONHECIMENTO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE BASEADA EM GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA COLORIMÉTRICA DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE BASEADA EM TiO_2 SUPORTADO EM PALIGORSKITA

Anallyne Nayara Carvalho Oliveira Cambrussi¹; Edson Cavalcanti da Silva Filho¹; Josy Anteveli Osajima¹ e Alessandra Braga Ribeiro^{1*}

¹Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados – LIMAV, Universidade Federal do Piauí-UFPI, Teresina-PI, CEP 64049-550.

RESUMO: O desenvolvimento de métodos simples, rápidos e reprodutíveis, que forneçam informações sobre a atividade antioxidante (AA) de diferentes compostos, é essencial para rastrear e descobrir novos materiais com potencial aplicação nos campos terapêutico, cosmético, toxicológico e alimentar. Este trabalho teve como objetivo validar um método colorimétrico novo e simples, para medir a atividade antioxidante de materiais por meio da proteção do corante amarelo ácido 73 (AA73) da perda de cor, devido à sua oxidação pelas espécies reativas de oxigênio (HO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, $^1\text{O}_2$) geradas pelo catalisador constituído por dióxido de titânio (TiO_2), incorporado com nanopartículas de prata (AgNPs) e suportado no argilomineral palygorskyta (AgNPs/ TiO_2 -PAL). O decaimento na cor amarela do AA73 ($\lambda_{\text{max}} = 490 \text{ nm}$) na presença das espécies reativas de oxigênio ocorreu em 60 minutos de exposição a luz ultravioleta (UV) e foi usado para rastrear a concentração mínima de antioxidante necessária para proteger o corante em 50% da sua cor. Antioxidantes naturais e sintéticos como ácido gálico, quercetina, rutina e trolox, foram usados como controles para validar o método. A atividade antioxidante (AA_{50}) dos padrões avaliados foram $12,78 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $12,56 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $8,17 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $66,99 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para ácido gálico, quercetina, rutina e trolox, respectivamente. O método fornece uma ferramenta útil, rápida, simples e de baixo custo para

determinar a AA *in vitro* de diferentes materiais. O método proposto foi considerado específico, preciso, reprodutível, exato, de baixo custo e fácil execução.

Palavras - chave: atividade antioxidante, validação de método, espécies fisiológicas.

ABSTRACT

The development of simple, rapid and reproducible methods that provide information on the antioxidant activity (AA) of different compounds is essential to trace and discover new materials with potential application in the therapeutic, cosmetic, toxicological and food fields. The objective of this work was to validate a new and simple colorimetric method to measure the antioxidant activity of materials by protecting the acid yellow 73 dye (AA73) from color loss due to its oxidation by the reactive oxygen species (HO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, $^1\text{O}_2$), generated by the catalyst consisting of titanium dioxide (TiO_2), modified with silver nanoparticles (AgNPs) and supported on the paligorsky clay (AgNPs/ TiO_2 -PAL). The AA73 ($\lambda_{\text{max}} = 490 \text{ nm}$) yellow decay in the presence of reactive oxygen species occurred within 60 minutes of exposure to ultraviolet (UV) light and was used to track the minimum antioxidant concentration required to protect the dye in 50% of its color. Natural and synthetic antioxidants such as gallic acid, quercetin, rutin and trolox were used as controls to validate the method. The antioxidant activity (AA_{50}) of the evaluated standards were $12,78 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $12,56 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $8,17 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and $66,99 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for gallic acid, quercetin, rutin and trolox respectively. The method provides a useful, quick, simple and inexpensive tool for determining the in vitro AA of different materials. The proposed method was considered specific, precise, reproducible, accurate, low cost and easy to execute.

Keywords: antioxidant activity, method validation, physiological species.

1. INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo em sistemas biológicos é um processo caracterizado por um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre (EROs, ERNs, EREs, radicais livres) e a capacidade fisiológica de eliminá-las (Badarinath et al., 2010; Prior, 2015; Rajan & Muraleedharan, 2016; Kumar et al., 2017). Uma ampla gama de reações tóxicas e inflamatórias é produzida nos tecidos, mediada principalmente pela presença de EROs (peróxido de hidrogênio - H_2O_2 , radical hidroxila - HO^\bullet , oxigênio singlete - 1O_2 e ânion superóxido - $O_2^{\bullet-}$), entre outros. Diferentes patologias, desde degeneração miocárdica e neurológica até o início do câncer, são comumente associadas ao estresse oxidativo (Badarinath et al., 2010; Omar et al., 2017; Barroso et al., 2018; Noacco et al., 2018).

A proteção contra as espécies reativas pode ser aumentada pelo uso de antioxidantes presentes em alimentos, produtos farmacêuticos, suplementos e cosméticos (Noacco et al., 2018). Devido a crescente busca por novas fontes de antioxidante, vários métodos estão sendo desenvolvidos para investigar a propriedade antioxidante de novos materiais (Rajan & Muraleedharan, 2016; Kumar et al., 2017). Embora muitas técnicas para detectar atividade antioxidante tenham sido relatadas (DPPH, ABTS, ORAC, FRAP, CUPRAC, entre outros), a maioria delas apresentam desvantagens que incluem preços elevados de reagentes, protocolos complexos, uso de radicais não fisiológicos, além disso, a reprodutibilidade da maioria dos métodos tem sido criticada pela literatura (Erel, 2004; Badarinath et al., 2010; Niki, 2010; Ghani et al., 2017).

Constatada a relevância da atividade antioxidante de novos materiais para manutenção da saúde nos sistemas biológicos, tornou-se imprescindível o desenvolvimento de metodologia analítica *in vitro*, que seja rápida, reprodutível e confiável para a sua aplicação em estudos de reconhecimento de atividade antioxidante destas substâncias. Para ser

confiável, inicialmente a metodologia precisa ser desenvolvida com base em geração de radicais fisiológicos, presentes nos sistemas *in vivo* (Schaich, Tian & Xie, 2015; Shahidi & Zhong, 2015).

Além disso, a confiabilidade de um método analítico é avaliada e confirmada através da abordagem da validação do método. A abordagem baseia-se na avaliação de alguns ou de todos os seguintes fatores: precisão (repetibilidade, reprodutibilidade), linearidade das medidas, sensibilidade (limite de detecção e limite de quantificação), especificidade (interferência de matrizes) e teste de robustez (Ellison, Rosslein, & Williams, 2000; Brasil 2003).

O objetivo da validação de um método analítico é demonstrar que o procedimento, quando aplicado corretamente, produz resultados adequados ao objetivo. A validação do método, portanto, é um componente essencial das medidas que um laboratório deve implementar para permitir que ele produza dados analíticos confiáveis (Dresch et al., 2009). Tal processo de validação fornece o requisito básico para a caracterização estatística e confiabilidade do método em questão.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo validar um método analítico colorimétrico, automatizado em microplacas, para a determinação da atividade antioxidante, que utilizou um gerador de espécies reativas de oxigênio (HO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, $^1\text{O}_2$), presentes biologicamente nos sistemas *in vivo*, composto de TiO_2 suportado no argilomineral palygorskyta, incorporado com nanopartículas de prata (AgNPs/ TiO_2 -PAL).

O método desenvolvido foi aplicado a avaliação da capacidade antioxidante dos compostos ácido gálico, quercetina, rutina e trolox, mostrando ser um método simples, rápido, linear, específico e preciso, com potencial de aplicação em laboratórios industriais e universitários.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

Para desenvolver e validar o método proposto foi utilizado o catalisador AgNPs/TiO₂-PAL sintetizado conforme metodologia relatada no capítulo anterior (“Síntese do catalisador TiO₂/PAL com nanopartículas de prata para desenvolvimento de ensaios antioxidantes baseado em geração de espécies reativas de oxigênio”, submetido a Journal of Food Science and Technology). O corante ácido amarelo 73 (AA73) foi fornecido pela Danny Color Dyes e utilizado sem purificação prévia. O ácido gálico anidro puro (99,53%) foi adquirido na Scientific Exodus, rutina (94% de pureza) e quercetina (95% de pureza) foram adquiridas na Sigma Aldrich, e o padrão trolox foi adquirido da empresa Cayman Chemical.

2.2. DETECÇÃO DO CORANTE AMARELO ÁCIDO 73 (AA73)

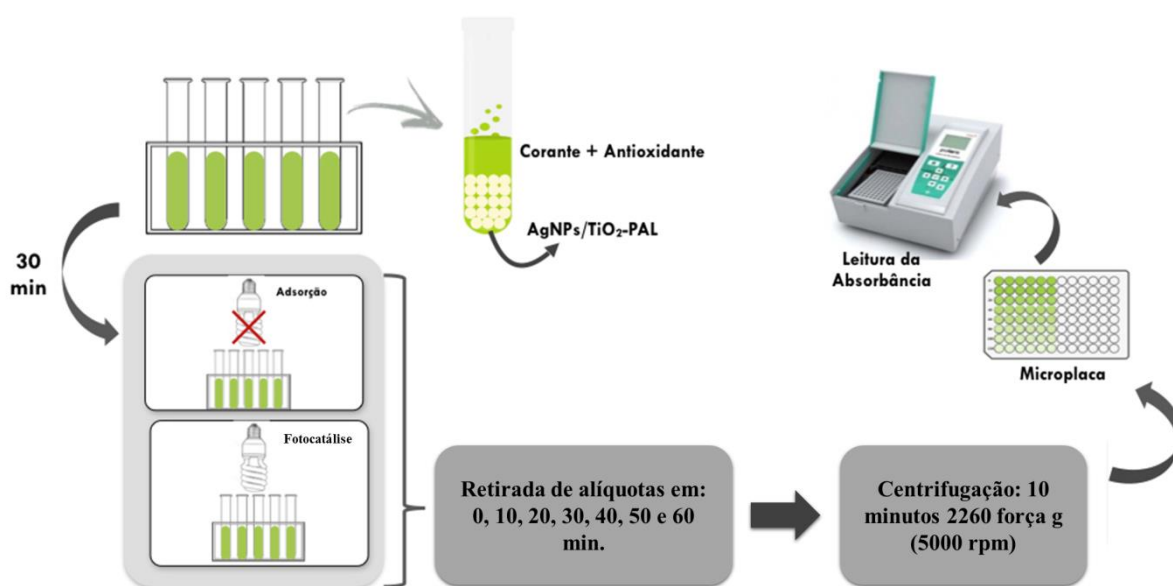
A detecção do AA73 foi realizada por espectrofotometria UV-vis, em comprimento de onda entre 200 a 800 nm para determinar a absorbância máxima sob condições experimentais submetidas nesse trabalho. O comprimento de onda máximo do AA73 foi de $\lambda_{\text{max}} = 490$ nm. A absorbância do AA73 foi correlacionada linearmente com a concentração de 1×10^{-5} mol. L⁻¹. A solução do AA73 é amarelo-esverdeado e torna-se amarelo claro, ou até mesmo incolor após a oxidação, dependente do tempo de radiação.

2.3. ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA)

A atividade antioxidante das moléculas foi observada por sua capacidade de prevenir ou minimizar a oxidação do corante diante das espécies reativas HO[•], O₂^{-•} e ¹O₂. Inicialmente, uma solução estoque AA73 (1×10^{-5} mol. L⁻¹) foi preparada em solução aquosa. Em tubos

cônicos de 1,5 mL foram adicionados 1 mg. mL⁻¹ de catalisador, 0,5 mL de solução aquosa do corante AA73 na concentração 2x10⁻⁵ mol. L⁻¹ e 0,5 mL de solução aquosa de antioxidante, ácido gálico, quercetina, rutina, trolox foram usados como moléculas de controle com propriedades antioxidantes conhecidas, em concentrações variadas (10 a 100 µg.mL⁻¹), sendo este sistema submetido a radiação UV por 60 minutos. Decorrido este período, foi realizada centrifugação dos tubos cônicos por 10 minutos a 2260 força g (5000 rpm), para remoção do catalisador. Finalmente, a concentração remanescente do AA73 foi determinada em leitor de microplacas (Elisa Polaris®) a 492 nm (Figura 1).

Figura 1 – Esquema do ensaio de determinação de atividade antioxidante.



A atividade antioxidante relativa (AA) foi definida a partir da equação 1: (Saikia et al., 2015; Mecha et al., 2016):

$$Descoloração(\%) = \frac{A_0 - A_t}{A_0} * 100 = \frac{C_0 - C_t}{C_0} * 100 \quad (1)$$

Onde, A_0 é a absorvância inicial da solução e A_t a absorvância no tempo t , que se relacionam respectivamente com as concentrações iniciais (C_0) e no tempo t (C_t) de acordo com a lei de Lambert-Beer (Tian et al., 2012). A AA_{50} é definida como a concentração da molécula testada fornecendo 50% de proteção contra a oxidação do AA73. A linearidade foi estabelecida pela curva padrão para cada antioxidante avaliado, as quais foram obtidas em cinco níveis de concentrações diferentes. A linearidade foi avaliada utilizando-se análise de regressão linear, com ajuste dos dados pelo método dos mínimos quadrados.

A concentração remanescente de corante AA73 em solução também foi analisada por espectrofotometria na região UV-vis, (espectrofotômetro Agilent Technologies, Cary 60 UV) no seu comprimento de onda máximo de 490 nm.

2.4. PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

Para que os métodos que vem sendo desenvolvidos tenham utilidade é necessário que os dados gerados, principalmente aqueles obtidos a partir de matrizes biológicas, sejam confiáveis (Noacco et al., 2018). Sendo assim, a metodologia desenvolvida neste trabalho para quantificação de atividade antioxidante *in vitro*, foi validada baseando-se nos guias “GUIA PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS” publicado pela ANVISA através da resolução – RE nº 475, de 19 de março de 2002, e “EURACHEM/CITAC Guide CG 4: QUANTIFYING UNCERTAINTY IN ANALYTICAL MEASUREMENT” publicado pela EURACHEM/CITAC Working Group.

Todos os ensaios de validação foram realizados sob condições espectrofotométricas estabelecidas após o estudo de desenvolvimento da metodologia.

2.4.1. Especificidade

A especificidade do método foi verificada por meio de espectrofotometria na região UV-vis, (espectrofotômetro Agilent Technologies, Cary 60 UV) dos antioxidantes avaliados (ácido gálico, quercetina, rutina e trolox) e do corante AA73 utilizado para o desenvolvimento do método.

Os antioxidantes foram avaliados nas suas concentrações mínimas para inibição de 50% da descoloração do corante, sendo, 12,0 µg/mL para o ácido gálico, 12,0 µg/mL para quercetina, 8,0 µg/mL para rutina e 67,0 µg/mL para o trolox. O corante foi avaliado na concentração 1×10^{-5} mol. L⁻¹ no intervalo de 200 a 800 nm com o intuito de verificar se existe sobreposição de picos no comprimento de onda escolhido para o desenvolvimento do método (490 nm), o qual se constitui como pico de absorção máxima do corante AA73.

2.4.2. Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, a partir de três curvas de calibração autênticas, usando-se cinco concentrações de cada padrão (ácido gálico, rutina, quercetina e trolox). Os resultados foram analisados estatisticamente para definir o coeficiente de determinação (mínimo aceitável $R^2 = 0,99$), a equação de regressão, o ajuste linear e o desvio padrão relativo (Ellison, Rosslein, & Williams, 2000; Brasil, 2003).

A faixa de concentração utilizada para o corante AA73 foi de 8×10^{-3} g. L⁻¹ a 8×10^{-5} g. L⁻¹ e para os antioxidantes foi de 0 a 50 µg. mL⁻¹ para o ácido gálico, 0 a 30 µg.mL⁻¹ para rutina, 0 a 40 µg.mL⁻¹ para quercetina e 0 a 80 µg.mL⁻¹ para o trolox, as quais foram definidas em testes preliminares.

2.4.3. Repetibilidade e Precisão Intermediária

Os ensaios de repetibilidade e precisão intermediária foram determinados utilizando cinco amostras de mesma concentração executados no mesmo dia (intra-corrída) e dois dias consecutivos por analistas diferentes (inter-corrída) (Ellison, Rosslein, & Williams, 2000; Brasil, 2003). Os resultados foram expressos como desvio padrão relativo (Equação 1).

$$DPR(\%) = \frac{DP}{CMD} * 100 \quad (1)$$

Em que o DPR (%) é a precisão; DP é o desvio-padrão; CMD é a concentração média determinada.

2.4.4. Limites de Detecção e de Quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados em $\mu\text{g. mL}^{-1}$, para determinar a sensibilidade do método, considerando o desvio padrão em razão ao coeficiente angular (inclinação da reta) obtidos pela linearidade. LD e LQ são definidos como a menor concentração de analito detectável e a menor concentração de analito determinada com precisão e acuracidade apropriadas, respectivamente. Estes parâmetros foram determinados a partir das equações 2 e 3 (Ellison, Rosslein, & Williams, 2000; Brasil, 2003).

$$LD = DPR * \frac{3}{IC} \quad (2)$$

$$LQ = DPR * \frac{10}{IC} \quad (3)$$

Em que o LD é o limite de detecção; LQ é o limite de quantificação; DPR é o desvio-padrão relativo; IC é a inclinação da curva de calibração.

2.4.5. Estabilidade

A avaliação da estabilidade do catalisador AgNPs/TiO₂-PAL foi realizada avaliando o seu potencial para descolorir o corante AA73 em 60 minutos na presença de luz UV, quinzenalmente durante 6 meses, com o intuito de observar a possível perda de atividade fotocatalítica do catalisador durante o período de armazenamento (temperatura aproximada de 28 °C, ao abrigo da luz).

2.4.6. Avaliação estatística do método

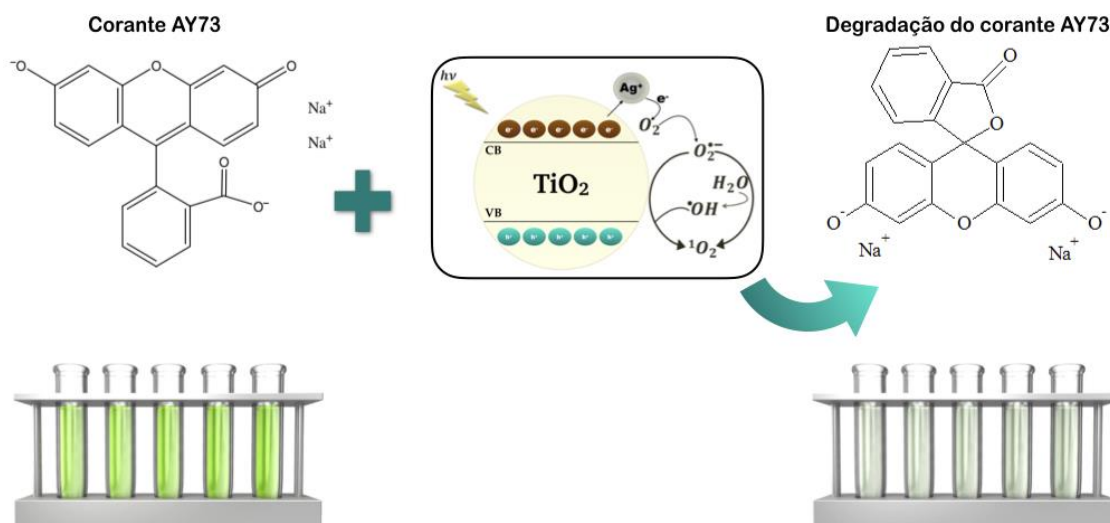
A análise estatística foi realizada utilizando os testes de análise de variância e correlações lineares (ANOVA) utilizando o pacote do software Past 3.14. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Dois equipamentos e dois operadores foram envolvidos na avaliação estatística do método.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO

O AA73 foi usado como molécula marcadora deslocando de amarelo-esverdeado para incolor quando agentes redox foram gerados a partir da radiação do AgNPs/TiO₂-PAL com luz UV, indicando a presença de espécies de corantes oxidados (Figura 2). A cor amarelo-esverdeado ($\lambda_{\text{máx.}} = 490 \text{ nm}$) de AA73 diminuiu pela geração de espécies reativas de oxigênio, e a AA₅₀ foi calculada seguindo a equação 1.

Figura 2 - Mecanismo de descoloração do corante AA73.



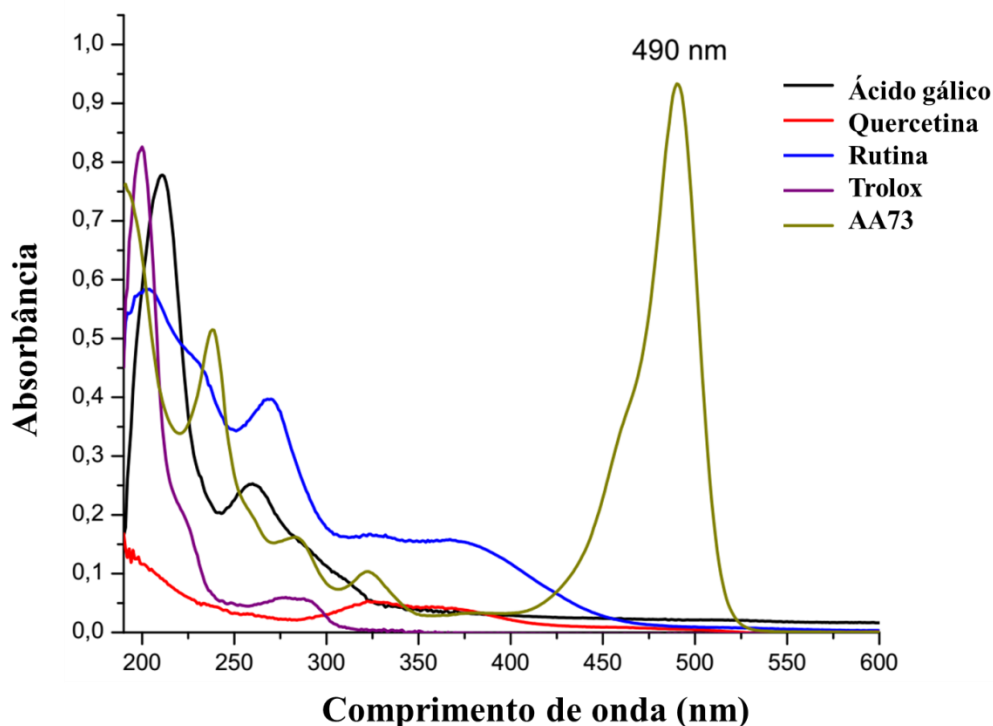
Após 60 minutos de exposição a luz UV na ausência de substâncias antioxidantes o AA73 sofre uma descoloração de aproximadamente 90% e após 120 minutos de reação, visivelmente a cor desaparece, atingindo uma descoloração máxima de 96%.

3.2. ESPECIFICIDADE

A especificidade teve como objetivo avaliar a capacidade do método em identificar e separar os antioxidantes avaliados do corante utilizado no desenvolvimento da metodologia.

Os resultados dos espectros UV-vis obtidos dos antioxidantes ácido gálico, quercetina, rutina e trolox, nas concentrações 12,0 µg/mL, 12,0 µg/mL, 8,0 µg/mL e 67,0 µg/mL respectivamente e do corante AA73 na concentração 1×10^{-5} mol.L⁻¹, demonstram que não existem picos sobrepostos com o pico de absorção máxima do corante em 490 nm (Figura 3).

Figura 3 - Espectros UV-vis dos antioxidantes e do corante utilizados para o desenvolvimento do método, com o objetivo de avaliar a especificidade do método.



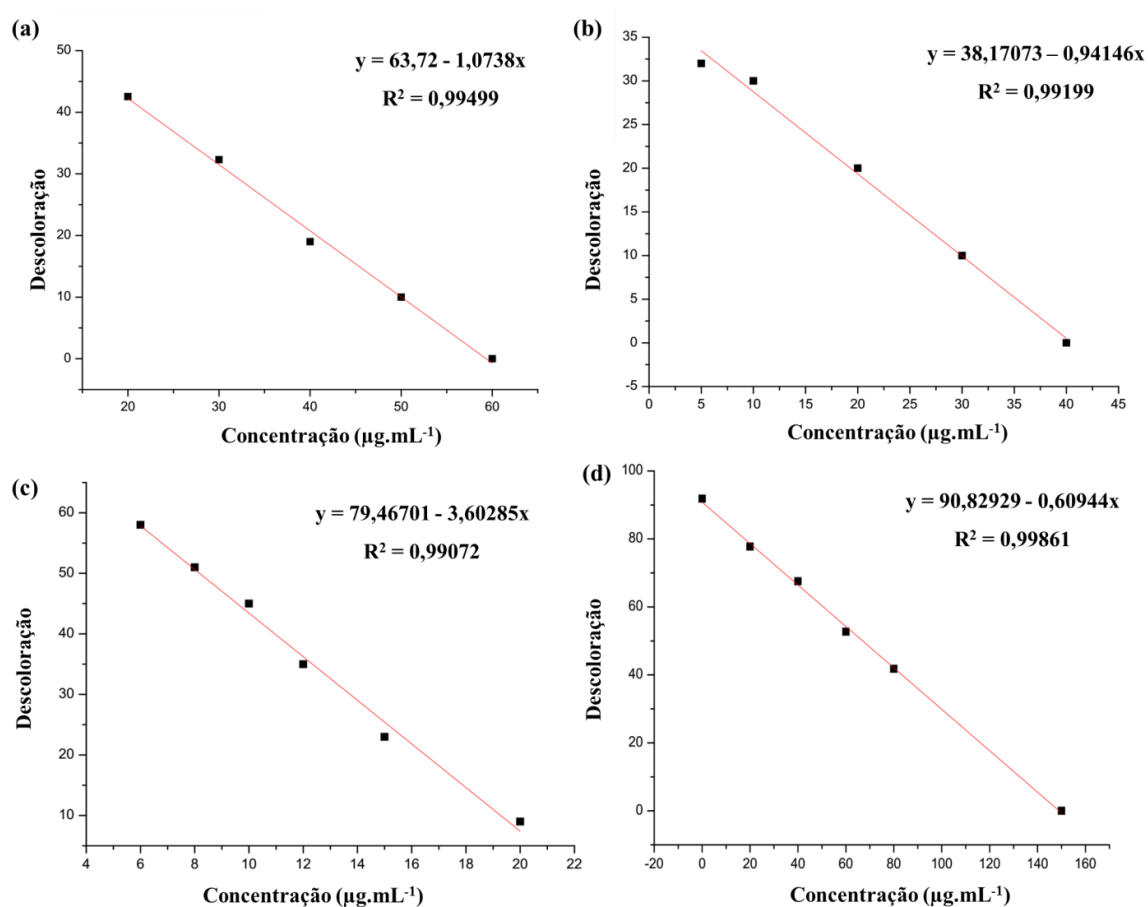
A especificidade é uma característica importante de um ensaio para a determinação da capacidade antioxidante, especialmente quando vários compostos distintos estão envolvidos no processo (Dresch et al., 2009). Sendo assim, a análise espectrofotométrica dos compostos avaliados utilizando essa metodologia se faz necessária para evitar interferências entre o comprimentos de onda do corante utilizado com os comprimentos de onda das substâncias avaliadas.

Os resultados da análise de especificidade comprovam que no comprimento de onda utilizado para o desenvolvimento do método analítico (490 nm), não existem outros compostos químicos que comprometam a leitura das absorbâncias.

3.3. LINEARIDADE

A linearidade de resposta foi estudada estatisticamente para cada antioxidante, com o objetivo de estabelecer uma concentração mínima que proporcione a proteção de 50% do corante contra a oxidação causada pelas espécies reativas de oxigênio geradas pelo catalisador AgNPs/TiO₂-PAL, Figura 4. A avaliação estatística foi realizada utilizando a opção de análise de regressão ANOVA do programa Past 3.14. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Figura 4 - Curva de calibração de (a) ácido gálico, (b) quercetina, (c) rutina e (d) trolox a 492 nm.



Os dados de concentração de antioxidante vs. descoloração foram determinados em triplicata. Uma correlação linear foi encontrada para cada antioxidante em uma dada faixa de descoloração do corante AA73 que é dependente da concentração de antioxidante adicionada a solução. Os coeficientes de correlação, as equações das retas e os desvios padrões são dados na Tabela 1.

Todos os coeficientes de determinação obtidos foram superiores a $R^2 = 0,99$, comprovando a adequação do método no intervalo avaliado (Ellison, Rosslein, & Williams, 2000; Brasil, 2003).

Tabela 1. Equações das retas, coeficientes de correlação e desvio padrão dos antioxidantes ácido gálico, quercetina, rutina e trolox.

Antioxidante	Equação da reta	Coefficiente de correlação	DP
Ácido gálico	$D = -1,0738 CA + 63,72$	0,99499	0,03806
Quercetina	$D = -0,94146 CA + 38,17073$	0,99199	0,04225
Rutina	$D = -3,60285 CA + 79,46701$	0,99072	0,15582
Trolox	$D = -0,60944 CA + 90,82929$	0,99861	0,01018

Legenda: CA: concentração do antioxidante avaliado; D: descoloração do AA73; DP: desvio padrão e DPR: desvio padrão relativo.

3.4. REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

Com as equações descritas na Tabela 1 é possível calcular a concentração mínima de antioxidante (AA_{50}) necessária para proteger o corante de 50% da descoloração por meio das espécies reativas produzidas pelo catalisador AgNPs/TiO₂-PAL na presença de luz UV. Os valores de AA_{50} de cada antioxidante, os dados de repetibilidade e os dados de precisão intermediária (desvio padrão relativo - DPR) estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de AA₅₀ em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e resultados do teste de repetibilidade para cada antioxidante.

Antioxidante	AA ₅₀	C ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) n = 3	DP	DPR (%)
Ácido gálico	12 ± 0,19	12,78	0,18973	1,49
Quercetina	12 ± 0,80	12,56	0,796492	6,34
Rutina	8 + 1,83	8,17	0,444522	5,43
Trolox	67 + 2,71	66,99	2,709243	4,05

C: Concentração média ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de três determinações; DP: Desvio Padrão; DPR (%): Desvio Padrão Relativo (Precisão).

3.5. LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

O limite de detecção de um procedimento analítico é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada como um valor exato, e o limite de quantificação é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão definida sob as condições experimentais declaradas (Dresch et al., 2009).

Os valores dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) estimados pelas equações 2 e 3, estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados dos limites de quantificação e de detecção do método para reconhecimento de atividade antioxidante.

Antioxidante	LD ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Ácido gálico	0,53	1,76
Quercetina	2,53	8,46
Rutina	0,37	1,23
Trolox	13,33	44,48

Os LDs e LQs variam conforme a substância avaliada, ainda assim, alguns métodos de avaliação de atividade antioxidante apresentam valores de LDs e LQs na ordem de grandeza de miligramas/mL ou milimols (Ma et al., 2013; Noacco et al., 2018), esse trabalho no entanto, apresenta LDs e LQs na ordem de grandeza de microgramas. Sendo assim, com esses resultados, é possível verificar que o método possui alta sensibilidade para detectar e quantificar os antioxidantes padrões, sem sofrer alteração de fatores intrínsecos do equipamento.

3.6. ESTABILIDADE

A análise da estabilidade do gerador de espécies reativas de oxigênio foi realizada com o objetivo de avaliar a validade deste composto, com vistas de produzir um kit de avaliação de atividade antioxidante para comercialização, composto pelo gerador de espécies reativas de oxigênio, o corante AA73 na concentração adequada para realização dos ensaios e a microplaca de 96 poços.

O AgNPs/TiO₂-PAL se mostrou estável durante 6 meses de uso nos ensaios, não alterando suas características físico-químicas, bem como não promoveu alteração no valor da descoloração do corante ao longo do tempo conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4. Valores de descoloração do AA73 causado pelas espécies reativas geradas por meio do catalisador AgNPs/TiO₂-PAL nos ensaios de estabilidade.

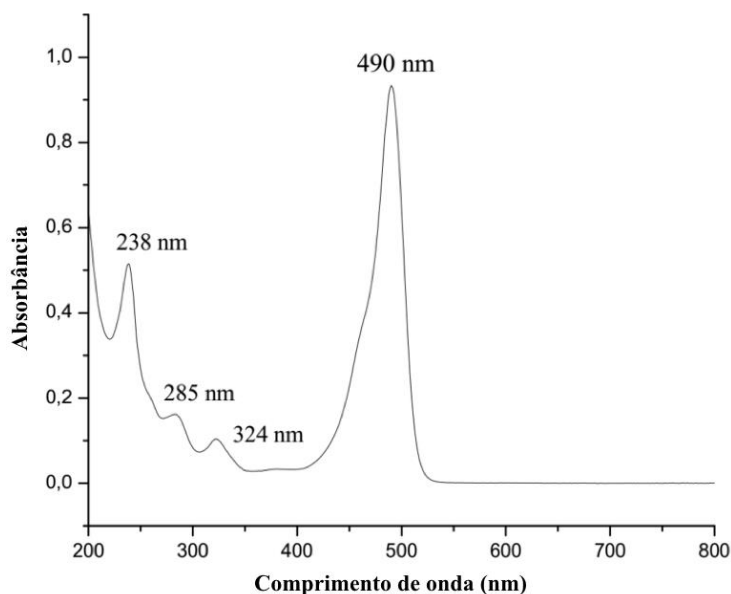
Data	Descoloração (%)
mar/18	88%
abr/18	84%
mai/18	88,60%
jun/18	87%
jul/18	86%
ago/18	86%
Média	87%
Desvio Padrão	0,01505545

3.7. ESPECTROSCOPIA UV-VIS

A partir dos valores de AA₅₀ encontrados por meio das equações descritas na Tabela 1, foram realizados os estudos de espectroscopia UV-Vis com o intuito de monitorar as alterações na absorbância das soluções do AA73 e antioxidantes antes da radiação e após 60 minutos de exposição a luz UV, na concentração mínima de cada antioxidante necessária para proteger 50% da descoloração do corante AA73.

O corante AA73 apresentou banda de absorção máxima no comprimento de onda 490 nm, além de bandas menores nos comprimentos de onda 238, 285 e 324 nm, como ilustrado na Figura 5.

Figura 5 - Espectro UV-vis do corante AA73 em solução aquosa (1×10^{-5} mol. L⁻¹).

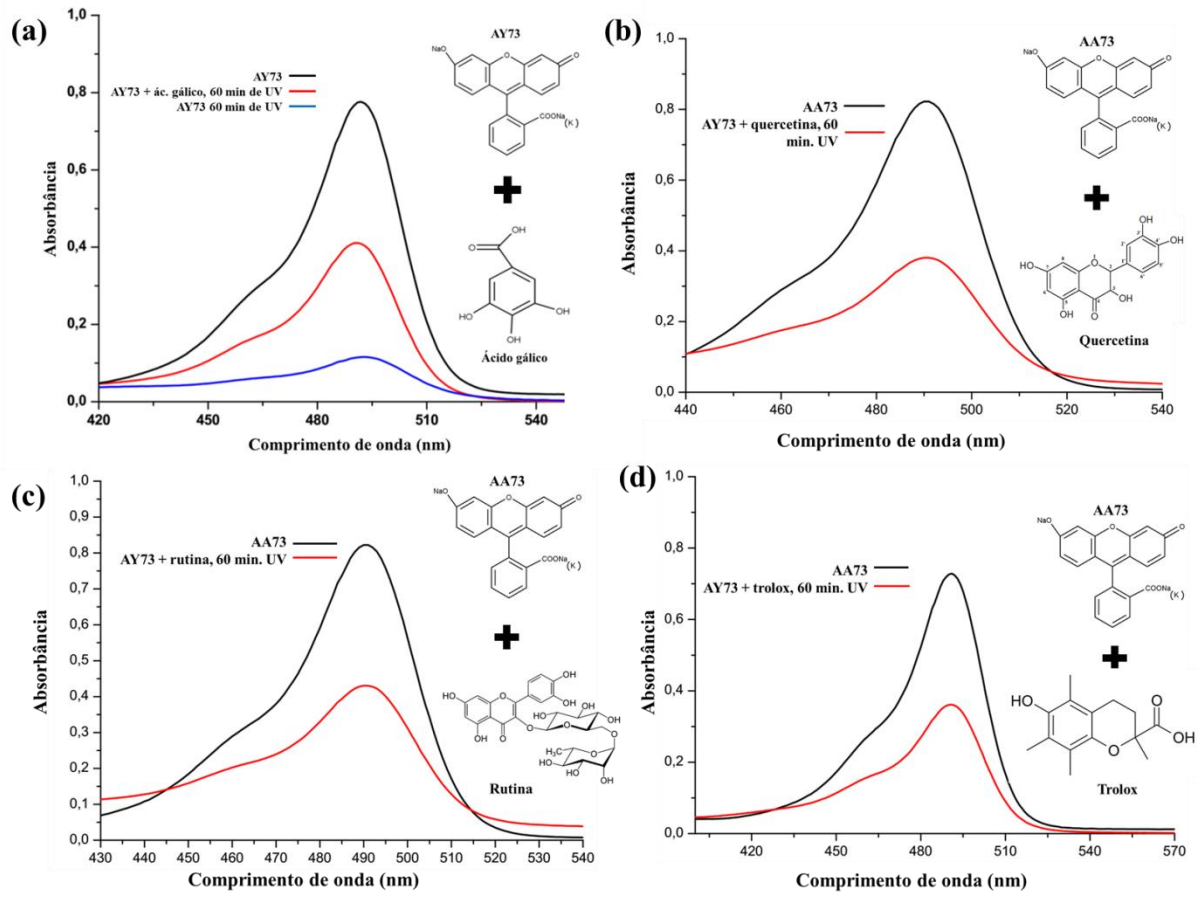


Uma solução aquosa de cada antioxidante foi adicionada a solução aquosa do corante AA73, na concentração mínima necessária para ocasionar uma proteção de 50% da cor do corante diante da oxidação causada pelas espécies reativas de oxigênio. Após 60 minutos de radiação com luz UV cada solução foi analisada espectrofotometricamente para avaliar o decaimento na banda de absorção máxima correspondente ao corante AA73, em 490 nm.

Nas concentrações de $12 \mu\text{g. mL}^{-1}$ do antioxidante ácido gálico, $12 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da quercetina, $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da rutina e $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do trolox, todos esses antioxidantes apresentaram um decaimento exato de 50% na banda de absorção máxima do corante, conforme Figura 6.

Sendo assim, confirma-se que nessas concentrações os antioxidantes ácido gálico, quercetina, rutina e trolox inibem em 50% a descoloração do AA73 através das espécies reativas $\text{O}_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} e $^1\text{O}_2$, geradas por meio do catalisador AgNPs/TiO₂-PAL.

Figura 6 - Espectro de absorção UV-vis do sistema AA73 e (a) ácido gálico, (b) quercetina, (c) rutina e (d) trolox, antes e após exposição a luz UV.



4. CONCLUSÃO

A metodologia para reconhecimento de atividade antioxidante proposta nesse trabalho permite a determinação de um valor de atividade antioxidante *in vitro* de substâncias com potencial antioxidante. O uso da fotocatalise heterogênea para geração de espécies reativas de oxigênio se mostrou uma técnica simples, fácil, barata e eficiente, além de simular as reações em cascata de produção de espécies reativas que ocorrem fisiologicamente nos sistemas *in vivo*. Um requisito importante do método é conhecer previamente o espectro da substância a ser avaliada para evitar interferências com o corante na leitura das absorbâncias. O método foi aplicado de forma eficiente na avaliação da atividade antioxidante dos compostos ácido gálico, quercetina, rutina e trolox, apresentando excelente linearidade, especificidade e precisão. Os limites de detecção e quantificação comprovam que a metodologia é capaz de avaliar compostos que apresentam potencial antioxidante em concentrações na ordem de $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, além de se configurar como de baixo custo e fácil execução. Assim, este método tem potencial para ser utilizado em laboratórios industriais e universitários para investigação de atividade antioxidante em compostos naturais e sintéticos, com aplicações para indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M., & Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, v. 85, p. 957–998. Doi: <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-12-07-15>.

Badarinath, A.V., Rao, K.M., Chetty, C.M.S., Ramkanth, V., Rajan, T.V.S., Gnanaprakash, K. (2010) A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *International Journal of Pharm tech Research*, v. 2, n. 2, p. 1276–1285.

Barroso, M. F.; Luna, M.A; Moyano, F.; Delerue-Matos, C.; Correa, N.M.; Molina, P.G. (2018). Study of lipid peroxidation and ascorbic acid protective role in large unilamellar vesicles from a new electrochemical performance. *Bioelectrochemistry*, v. 120, p. 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.12.003>.

Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). R. E, nº 899 de 29 de maio de 2003 – Guia para validação de métodos qualitativos e bioanalíticos.

Chen, D.; Du, Y.; Zhu, H.; Deng, Y. (2014). Synthesis and characterization of a micro fibrous TiO₂–CdS/palygorskite nanostructured material with enhanced visible light photocatalytic activity. *Applied Clay Science*, v. 87, p. 285-291. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2013.11.031>.

Chen, H.; Chen, S.; Quan, X.; Yu, H.; Zhao, H.; Zhang, Y. (2008). Fabrication of TiO₂–Pt coaxial nanotube array Schottky structures for enhanced photocatalytic degradation of phenol

in aqueous solution. *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 112, n. 25, p. 9285–9290.

Doi:10.1021/jp8011393.

Dresch, M. T. K., Rossato, S. B., Kappel, V. D., Biegelmeyer, R., Hoff, M. L. M., Mayorga, P., ... Moreira, J. C. F. (2009). Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential. *Analytical Biochemistry*, v. 385, n. 1, p. 107–114. doi:10.1016/j.ab.2008.10.036.

Ellison, S. L. R., Rosslein, M., & Williams, A. (2000). Eurachem/Citac Guide CG 4. Quantifying uncertainty in analytical measurement, 2.

Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, v. 37, p. 277–285. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015>.

Ge, Q.; Ge, P.; Jiang, D.; Du, N.; Chen, J.; Yuan, L.; Yu, H.; Xu, X.; Wu, M.; Zhang, W.; Zhou, G. (2018). A novel and simple cell-based electrochemical biosensor for evaluating the antioxidant capacity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese dry-cured ham. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 99, p. 555-563. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.037>.

Ghani, M. A., Barril, C., Bedgood Jr, D. R., & Prenzler, P. D. (2017). Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food chemistry*, v. 230, p. 195-207. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.127>.

Guo, X.; Li, Q.; Zhang, M.; Long, M.; Kong, L.; Zhou, Q.; Shao, H.; Hu, W.; Wei, T. (2015). Enhanced photocatalytic performance of N-nitrosodimethylamine on TiO₂ nanotube based on

the role of singlet oxygen. *Chemosphere*, v. 120, p. 521–526. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.09.002>.

Hidalgo, M.C.; Maicu, M.; Navio, J.A; Colon, G. (2010). Effect of sulfate pretreatment on gold-modified TiO₂ for photocatalytic applications. *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 113 p. 12840–12847. Doi: 10.1021/jp903432p.

Kumar, S., Sharma, S. & Vasudeva, N. Chin. (2017). Review on antioxidants and evaluation procedures. *Chinese journal of integrative medicine*, p. 1-12. <https://doi.org/10.1007/s11655-017-2414-z>.

Lee, K.M., Lai, C.W., Ngai, K.S., Juan, J.C. (2015). Recent Developments of Zinc Oxide Based Photocatalyst in Water Treatment Technology: A Review, *Water Research*. doi: 10.1016/j.watres.2015.09.045. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.045>.

López-Alarcón, C. and Denicola, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, v. 763, p. 1-10, 2013. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051>.

Ma, W., Han, D., Zhang, N., Li, F., Wu, T., Dong, X., & Niu, L. (2013). Bionic radical generation and antioxidant capacity sensing with photocatalytic graphene oxide–titanium dioxide composites under visible light. *Analyst*, 138(8), 2335-2342.

Muruganandham, M.; Swaminathan, M. (2006). TiO₂–UV photocatalytic oxidation of Reactive Yellow 14: Effect of operational parameters. *Journal of Hazardous Materials*, v. 135, n. 1, p. 78-86. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.11.022>.

Nagarajan, S.; Skillena, N.C.; Fina, F.; Zhang, G.; Randorn, C.; Lawton, L.A.; Irvine, J.T.S.; Robertson, P.K.J. (2017). Comparative assessment of visible light and UV active photocatalysts by hydroxyl radical quantification. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 334, p. 13–19. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2016.10.034>.

Niki, E. (2010). Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 49, p. 503–515. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016>.

Noacco, N., Rodenak-Kladniew, B., de Bravo, M. G., Castro, G. R., & Islan, G. A. (2018). Simple colorimetric method to determine the in vitro antioxidant activity of different monoterpenes. *Analytical biochemistry*, v. 555, p. 59-66. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.06.007>.

Omar, S.H.; Kerr, P.G.; Scott, C.J.; Hamlin, A.S.; Obiede, H.K., (2017). Olive (*Olea europaea* L.) Biophenols: A Nutraceutical against Oxidative Stress in SH-SY5Y Cells. *Molecules*, v. 22, n. 11, p. 1858. Doi: [10.3390/molecules22111858](https://doi.org/10.3390/molecules22111858).

Prior, R.L. (2015). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *Journal of Functional Foods*, v. 18, p. 797-810. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.018>.

Rajan, V. K.; Muraleedharan, K. (2016). A computational investigation on the structure, global parameters and antioxidant capacity of a polyphenol: gallic acid. *Food Chemistry*, v. 220, p. 93-99. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.178>.

Rauf, M. A.; Ashraf, S. S., (2009) Fundamental principles and application of heterogeneous photocatalytic degradation of dyes in solution. *Chemical Engineering Journal*, v. 151, p. 10-18. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.02.026>.

Roginsky, V. And Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, v. 92, p. 235–254. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.004>.

Rui-Jie, J.; Qiang, Z.; Ji-Feng, L.; Mohamad Hojeij; Girault, H.H., (2016). Antioxidant Assay Based on Quenching of Photocatalytically Generated Reactive Oxygen Species. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, v. 44, n. 8, p. 1257–1262. doi: [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(16\)60950-7](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(16)60950-7).

Schaich, K.M.; Tian, X.; Xie, J. (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*, v. 14, p. 111-125. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.043>.

Shahidi, F. and Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, v, 18, p. 757-781. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>.

Verma, A., Prakash., N.T., Toor, A.P. (2014). An efficient TiO₂ coated immobilized system for the degradation studies of herbicide isoproturon: Durability studies. *Chemosphere*, v.109, p. 7–13. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.051>.

Wei, M.; Peng, X.L.; Liu, Q.S; Li, F.; Yao, M.M. (2017). Nanocrystalline TiO₂ Composite Films for the Photodegradation of Formaldehyde and Oxytetracycline under Visible Light Irradiation. *Molecules*, v. 22, n. 6, p. 950. doi:10.3390/molecules22060950.

Xavier, K. C. M., Filho, E. C. S., Santos, M. S. F., Luz, A. B. (2012). Caracterização mineralógica, morfológica e de superfície da atapulgita de Guadalupe-PI. *Holos*, v. 5, p. 60-70.

Xiang, Q.; Yu, J.; Wong, P. K. (2011). Quantitative characterization of hydroxyl radicals produced by various photocatalysts. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 357, p. 163–167. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.01.093>.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido ao crescente interesse por fontes externas de antioxidantes, o desenvolvimento de métodos para avaliar a capacidade antioxidante tornou-se uma área de pesquisa ativa. Inúmeros ensaios vem sendo desenvolvidos, no entanto, a grande maioria apresenta desvantagens que incluem elevado custo dos reagentes, alta complexidade das reações, uso de equipamentos caros, e, principalmente o uso de radicais não fisiológicos, dificultando a comparação dos resultados *in vitro* ao efeito que realmente ocorrerá *in vivo*.

Portanto, a geração *in vitro* das principais espécies reativas de oxigênio ($\bullet\text{OH}$, $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2), presentes nos organismos vivos, por meio da fotocatalise heterogênea, surge como uma alternativa simples, barata e confiável para aplicação ao desenvolvimento de ensaios antioxidantes.

Sendo assim, nesse trabalho um catalisador constituído de nanopartículas de TiO_2 , suportado na palygorskyta e incorporado com nanopartículas de prata ($\text{AgNPs}/\text{TiO}_2\text{-PAL}$) foi sintetizado e aplicado ao desenvolvimento de um método de reconhecimento de capacidade antioxidante.

A metodologia para reconhecimento de atividade antioxidante proposta nesse trabalho permite a determinação de um valor de atividade antioxidante *in vitro* de substâncias com potencial antioxidante. O uso da fotocatalise heterogênea para geração de espécies reativas de oxigênio se mostrou uma técnica simples, fácil, barata e eficiente, além de simular as reações em cascata de produção de espécies reativas que ocorrem fisiologicamente nos sistemas *in vivo*. O método foi aplicado de forma eficiente na avaliação da atividade antioxidante dos compostos ácido gálico, quercetina, rutina e trolox, apresentando excelente linearidade, especificidade e precisão. Assim, o método desenvolvido e validado neste trabalho tem potencial para ser utilizado em laboratórios industriais e universitários para investigação de atividade antioxidante em compostos naturais e sintéticos.

PERSPECTIVAS

A limitação dessa metodologia consiste na possível interferência de substratos que possuam comprimento de onda semelhante ao do corante amarelo ácido 73 utilizado nessa metodologia, causando assim interferência nas leituras das absorbâncias. Sendo assim, visando o aperfeiçoamento dessa metodologia, sugere-se para pesquisas futuras o uso de corantes que possuam a banda de absorbância máxima nos mesmos comprimentos de onda disponíveis no leitor de microplacas utilizado na metodologia desenvolvida (405, 450 e 603 nm). Dessa forma, se algum substrato possuir o comprimento de onda semelhante ao corante amarelo ácido 73 este pode ser substituído por outro corante que tenha um dos 3 comprimentos de onda citados anteriormente.