UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“USO VERSÁTIL DE NOVOS COMPLEXOS DE Mg(II): PROTEÇÃO A ERO’S À OXIDAÇÃO LIPÍDICA”

Rafael Cavalieri Marchi*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA INORGÂNICA.

Orientadora: Profa. Dra. Rose Maria Carlos

*** bolsista CNPq**

São Carlos - SP
2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Rafael Cavalieri Marchi, realizada em 30/09/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Rose Maria Carlos (UFSCar)

Profa. Dra. Maria Fatima das Graças Fernandes da Silva (UFSCar)

Prof. Dr. Gustavo Metzker (UNESP)

Profa. Dra. Renata Zachi de Osti (UFMT)

Prof. Dr. José Luiz Silva Sá (UESPI)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.
O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus pais,
Vanderlei (in memoriam) e Solange
Por serem meus maiores incentivadores
E acreditarem no meu potencial.

"A ciência nunca resolve um problema
sem criar pelo menos outros dez".
(George Bernard Shaw)

"A ciência é uma disposição de aceitar os fatos
mesmo quando eles são opostos aos desejos".
(Burrhus Frederic Skinner)

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a Deus, motivo de todas as coisas boas da minha vida, é Ele quem realiza.

Em segundo lugar, agradeço aos meus pais todo amor incondicional e apoio durante toda minha vida, bem como apoio de avós, tias e tios.

Um agradecimento especial à minha orientadora Prof.ª Drª Rose Maria Carlos que sempre me ajudou, pela orientação responsável, dedicação e amizade desde que comecei meus estudos em química.

Agradeço aos meus amigos que deixei para atrás quando mudei para São Carlos, aos amigos feitos durante a graduação e aos amigos feitos durante a pós-graduação. Essas amizades serão levadas por uma vida inteira, obrigado pelo carinho, compreensão e amizade: Anna, Bruno, Gabriel, Gaby, Leili, Leticia, Maíra, Marina e Tais. Meus mais sinceros obrigados

Um grande agradecimento para os membros do LaFIB, os atuais e com todos que conheci nesses anos. Agradeço a amizade, por todas as discussões científicas e momentos de alegria durante esses anos.

Agradeço em especial Isa, Mari e Marco por todos esses anos onde compartilhamos vários momentos de cumplicidade e conselhos.

Agradeço imensamente ao grupo de PackLab da Milan University, onde consegui conhecer novas áreas da ciência e com certeza fortaleceram minha formação cientifica, em especial Sara Limbo, Begüm, Luana e Serena. Não poderia deixar de agradecer a Giovana que abriu as portas de sua casa para me receber.

A todos professores do DQ que desde minha graduação me ajudaram na minha formação como cientista.

Em especial ao professor Tiago Venancio e Flavio Kock que sempre ajudaram nos experimentos de RMN e ao Hugo Cesar pela ajuda com os experimentos de massas.

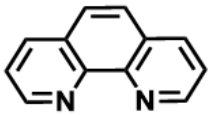
A CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

Lista de abreviaturas e símbolos

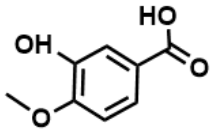
Hidroxianisol butilado	BHA
Hidroxitolueno butilado	BHT
Galato de propila	PG
Radical peroxila	ROO•
Espécies reativas de oxigênio	ERO's
Transferência de átomo de hidrogênio	HAT
Transferência de um elétron seguida por transferência de próton	SET-PT
Perda de um próton seguido por transferência de elétron	SPLET
Energia de dissociação da ligação	BDE
Potencial de ionização	IP
Entalpia de dissociação de próton	PDE
Afinidade do próton	PA
Entalpia da transferência de elétron	ETE
Ressonância paramagnética de elétrons	RPE
α- (4-piridil-1-óxido) -N-terc-butilnitrona	4-POBN
2,2,6,6-tetrametilpiperidina	TEMP
2,2-difenil-1-picril-hidrazil	DPPH•
2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)	$ABTS^{\bullet+}$
2-2'-azobis-(2-amidinopropano)-dihidrocloreto	AAPH
1,10-fenantrolina	Phen
trans-Ácido ferúlico	Fer
Ácido isovanilico	Iso
Espectroscopia de absorção eletrônica na região do Ultravioleta-visível	UV-vis
Infravermelho	IR
Ressonância magnética nuclear	RMN

Oxigênio singleto	$^1O_2$
Riboflavina	Rf
Tampão fosfato salino	PBS
Concentração inibitória de 50% de certa atividade	IC_{50}
Atividade da água	a_w
Enzima acetilcolinesterase	AChE
Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)	DTNB
Acetilcolina	ACh
Ácido 5-mercapto-2-nitrobenzóico	TNB
Teoria do functional de densidade	TD-DFT
Comprimento de onda	λ
Transferência de carga metal para ligante	MLCT
Transferência de carga ligante para metal	LMCT
Orbital molecular ocupado de mais alta energia	HOMO
Orbital molecular vazio de mais baixa energia	LUMO
Força de oscilador	*f*
Taxa de permeabilidade ao oxigênio	TPO_2
3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio)	MTT
Composto ativo	CA
Elétron volt	eV
Teoria do funcional da densidade	DFT

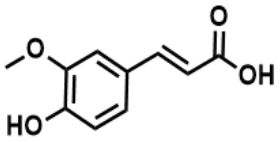
Estruturas químicas dos ligantes e dos complexos



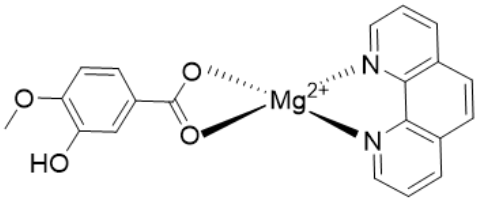
1,10-fenantrolina



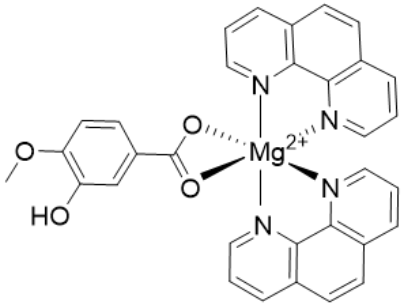
Ácido isovanilico



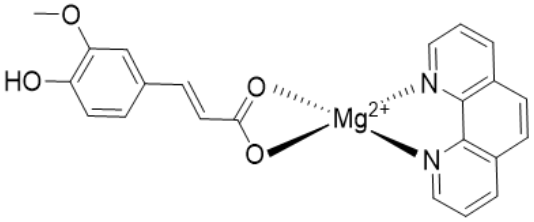
trans- Ácido ferúlico



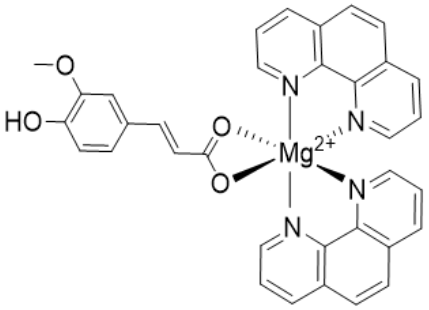
$[Mg(phen)(iso)]^+$



$[Mg(phen)_2(iso)]^+$



$[Mg(phen)(fer)]^+$



$[Mg(phen)_2(fer)]^+$

Lista de Tabelas

TABELA 1. Significado dos termos T1, T2, T3 e T4 para o cálculo de opacidade dos filmes. 26
TABELA 2. Estruturas otimizadas dos complexos $[Mg(phen)_2fer]^+$ e $[Mg(phen)fer]^+$ em fase gasosa, base B3LYP/6-31+G*. 50
TABELA 3.Valores de comprimento de onda, força de oscilador, transições eletrônicas predominantes e atribuições para o complexo Mg-phen-fer (H=HOMO, L=LUMO) 52
TABELA 4. Faixa de pH de carnes e laticínios 53
TABELA 5. Constantes de velocidade de primeira ordem (k_{obs}) para a fotodescoloração da Rf em condição anaeróbico com diferentes concentrações de complexo em tampão fosfato pH 7,4 82
TABELA 6. Valores de opacidade e teste visual de transparência para os filmes de gelatina e de amido produzidos por casting. 89
TABELA 7. Valores de permeabilidade ao oxigênio e coeficiente de oxigênio para os filmes de casting de amido. 94
TABELA 8. Valores de permeabilidade ao oxigênio e coeficiente de oxigênio para os filmes de casting de gelatina. 95
TABELA 9. Atividade bactericida do complexo Mg-phen-fer na faixa de 0,1 mg/mL até 5,0 mg/mL 100

Lista de Esquemas

ESQUEMA 1. Esquema reacional para obtenção dos complexos de Mg(II). 33
ESQUEMA 2. Mecanismo proposto para o processo eletroquímico do complexo Mg-phen-iso. 59
ESQUEMA 3. Mecanismo proposto para o processo eletroquímico do complexo Mg-phen-fer..... 64
ESQUEMA 4. Hidrólise da acetilcolina pela enzima acetilcolinesterase. 103
ESQUEMA 5. Reação entre colina e reagente de Ellman levando a formação do TNB. 103

Lista de Figuras

FIGURA 1. Esquema exemplificando a atuação de um antioxidante. 1
FIGURA 2. Esquema da formação do radical peroxila lipídico (ROO•) a partir do ácido linoleico..... 3
FIGURA 3. Condições da carne nos diferentes estágios de produção. 4
FIGURA 4. Esquema dos processos HAT, SET-PT e SPLET. 5
FIGURA 5. Estruturas química do complexo $[Ru(phen)_2(hesperidina)]^+$ como exemplo de um complexo metálico com antioxidantes naturais na esfera de coordenação.[41,42] 9
FIGURA 6. Representação esquemática dos componentes presentes em biofilmes feitos por casting e coating..... 13
FIGURA 7. Mecanismo de ação de um sistema com liberação controlada de um composto ativo de uma embalagem para um produto. 14
FIGURA 8. Estruturas hexa- e tetra-coordenadas dos complexos obtidos na reação utilizando o ácido isovanilico (superior) e ácido ferúlico (inferior) como ligantes..... 34
FIGURA 9. Espectro de infravermelho do ácido ferúlico (preto) e do complexo Mg-phen-fer (azul). 35
FIGURA 10. Espectros de ^{1}H-RMN de temperatura variável do complexo Mg-phen-iso em MeOD. 36
FIGURA 11. Mapa ^{1}H-DOSY-RMN obtido para o complexo Mg-phen-iso em MeOD a 298 K (painel esquerdo) e 253 K (painel direito). 37
FIGURA 12. Mapas ^{1}H-DOSY-RMN obtidos para o complexo Mg-phen-iso, a 288 K (lado superior esquerdo), a 278 K (lado superior direito), a 268 K (lado inferior esquerdo) e a 258 K (lado inferior direito). 38
FIGURA 13. ^{1}H-RMN do complexo Mg-phen-fer a 298 K em D_2O (azul) comparado com os espectros do ácido ferúlico (verde) e da 1,10-fenantrolina (vermelho). 39

FIGURA 14. Espectros de ^{1}H-RMN de temperatura variável do complexo Mg-phen-fer em D_2O. 40
FIGURA 15. Mapa 1H-DOSY-RMN obtido para o complexo Mg-phen-fer em D_2O a 298 K (painel esquerdo) e 278 K (painel direito). 41
FIGURA 16. Mapas ^{1}H-DOSY-RMN obtidos para o complexo Mg-phen-fer, a 283 K (lado superior esquerdo), a 293 K (lado superior direito), a 303 K (lado inferior esquerdo) e a 313 K (lado inferior direito). 42
FIGURA 17. Espectro ESI(+)-MS de uma solução metanólica recém preparada do complexo Mg-phen-iso..... 43
FIGURA 18. ESI(+)-MS/MS do íon m/z 551,15 (painel superior) e íon m/z 909,21 (painel inferior) em metanol..... 44
FIGURA 19. Espectro ESI(+)-MS de uma solução aquosa recém preparada do complexo Mg-phen-fer..... 45
FIGURA 20. ESI(+)-MS/MS do íon m/z 577,17 (painel inferior) e íon m/z 987,25 (painel superior) em água..... 46
FIGURA 21. Espectro de absorção em água destilada do complexo Mg-phen-fer (vermelho) e ácido ferúlico (preto) com concentração igual a 7,5 µg/mL. 48
FIGURA 22. Espectros de emissão (λ_{exc} = 310 nm) e excitação (λ_{em} = 410 nm) do complexo Mg-phen-fer em água destiladana concentração de 7,5 µg/mL. 49
FIGURA 23. Espectros de absorção eletrônica para o complexo Mg-phen-fer em água obtidos pela simulação do método TD-FT (direita) e experimental (esquerda). 51
FIGURA 24. Determinação colorimétrica do valor de pKa do complexo Mg-phen-fer acompanhando a absorção em λ = 380 nm a uma concentração de 7,5 µg/mL. 54
FIGURA 25. Espectros de absorção do complexo Mg-phen-fer na faixa de pH 3-10. 55

FIGURA 26. Espectros de emissão (λ_{exc}= 310 nm) do complexo Mg-phen-fer na faixa de pH 4-11.....56
FIGURA 27. Voltamogramas cíclicos de ácido isovanilico (esquerda) e ácido ferúlico (direita) em solução tamponada a pH 7,4 com KCl 0,1 M em uma matriz eletroquímica impressa em tela formada por uma cela eletroquímica com eletrodo de trabalho em carbono vítreo (d = 4 mm), contra eletrodo e eletrodo de referência de prata a 25 °C. 57
FIGURA 28. Voltamogramas cíclicos do complexo Mg-phen-iso em solução tamponada pH 4,5, pH 7,4 e pH 10,0 com 0,1M KCl, na faixa de 1,0 V a -1,0 V e v = 100 mV/s. O pico de redução a -0,50 V é atribuído à solução em branco, tampão de fosfato na presença de KCl. 58
FIGURA 29. Voltamogramas cíclicos de ácido ferúlico em soluções tamponadas pH 4,0, pH 7,4 e pH 9,0 com 0,1M KCl, v = 100 mV/s e na faixa de 1,0 V a -1,0 V (lado esquerdo) e de 1,0V a -0,25 V (lado direito). 60
FIGURA 30. Voltamogramas cíclicos do complexo Mg-phen-fer em soluções tamponadas pH 4,0, pH 7,4 e pH 9,0 com 0,1M KCl, v = 100 mV/s e na faixa de 1,0 V a -1,0 V.....61
FIGURA 31. Voltamogramas cíclicos do complexo Mg-phen-fer em soluções tamponadas pH 4,0, pH 7,4 e pH 9,0 com 0,1M KCl, v = 100 mV/s e na faixa de 1,0V a -0,25 V.....62
FIGURA 32. Reação de descoloração do radical DPPH•.....66
FIGURA 33. Obtenção do IC_{50} da inibição do radical DPPH• (conc. de 9 x10^{-5} mol/L) para o complexo Mg-phen-fer (esquerda) e para o BHT (direita) em diferentes concentrações. 67
FIGURA 34. Esquema reacional entre o radical $ABTS^{\bullet+}$ e o antioxidante.69
FIGURA 35. Obtenção do IC_{50} da inibição do radical $ABTS^{\bullet+}$ para o complexo Mg-phen-fer (esquerda) e para o BHT (direita) em diferentes concentrações. 70

FIGURA 36. Formação do radical peroxila e reação com o antioxidante (AO).....72
FIGURA 37. Mecanismo de reação do spin trapping 4-POBN com radical peroxila (na parte superior). Espectro simulado do aduto de spin 4-POBN-OR usando um Hamiltoniano Zeeman efetivo com os seguintes parâmetros: aN= 15,5 G e aH= 2,7 G (na parte inferior).....73
FIGURA 38. Variação da concentração do complexo Mg-phen-fer: 0 µg/mL (preto), 2,4 µg/mL (vermelho), 5,6 µg/mL (azul), 9,6 µg/mL (verde), 12 µg/mL (rosa) e 20 µg/mL (laranja), esquerda. Obtenção do IC_{50} da inibição do radical peroxila para o complexo Mg-phen-fer (direita).....74
FIGURA 39. Orbital molecular do oxigênio singleto gerado a partir do oxigênio tripleto na presença de um fotossensilizador. 74
FIGURA 40. Mecanismo formação do oxigênio singleto através do mecanismo Tipo I de reações de oxidações fotossensibilizadas, utilizando a riboflavina (estrutura no meio do ciclo) como fotossensibilizador. 75
FIGURA 41. Mecanismo de reação do spin TEMP com um oxigênio singleto (na parte superior). Espectro simulado dos aduto de spin TEMPO usando um Hamiltoniano Zeeman efetivo com os seguintes parâmetros: aN = 17,3 G e g = 2,0060.....76
FIGURA 42. Espectros de RPE do TEMPO gerado in situ TEMPO (preto, controle) e inibição do $^1O_2$ após adição do complexo Mg-phen-fer variando entre 0,165 µg/mL a 4,95 µg/mL. 76
FIGURA 43. Irradiação com luz contínua (450 nm) de uma solução de Rf (10 µmol/L) em diferentes atmosferas: ar, O_2 e N_2. Instet: decaimento da absorção na região entre 300 nm e 550 nm. Tempos de irradiação: 0 minutos (preto), 3 min (vermelho), 6 min (azul), 9 min (verde), 12 min (roxo), 15 min (amarelo), 20 min (ciano).....78
FIGURA 44. Tratamento cinético de $\ln[(A_{inf} - A_t)/ (A_{inf} - A_{t0})]$ vs tempo em minuto considerando um processo de primeira ordem em N_2 e ar (parte

superior). Decréscimo da banda em 525 nm referente a emissão singleto excitado da riboflavina e aumento da banda em 460 nm referente a emissão singleto excitado do lumicromo (parte inferior). 79
FIGURA 45. Irradiação com luz contínua (450 nm) de uma solução de Rf (10 µmol/L) e Mg-phen-fer (11 µg/L) em diferentes atmosferas: ar, O_2 e N_2. Instet: decaimento da absorção na região entre 325 nm e 550 nm. Tempos de irradiação: 0 minutos (preto), 3 min (vermelho), 6 min (azul), 9 min (verde), 12 min (roxo) e 15 min (amarelo). 81
FIGURA 46. Tratamento cinético de $\ln[(A_{inf} - A_t)/ (A_{inf} - A_{t0})]$ vs tempo em minuto considerando um processo de primeira ordem em N_2 (esquerda). Decréscimo da banda em 525 nm referente a emissão singleto excitado da riboflavina e aumento da banda em 460 nm referente a emissão singleto excitado do lumicromo (direita). 82
FIGURA 47. Gráficos de Stern-Volmer para supressão do estado singleto excitado da Rf pelo complexo Mg-phen-fer em diferentes atmosferas: N_2 (superior), ar (centro) e O_2 (inferior) em tampão fosfato pH 7,4 (esquerda). Valores de constante de Stern-Volmer (K_{SV}) e constante velocidade bimolecular de supressão do estado singleto pelo complexo (k_q) (direita). 85
FIGURA 48. Estruturas química da amilase e amilopectina, constituintes do amido. 86
FIGURA 49. Estrutura unidimensional da proteína constituinte da gelatina. 87
FIGURA 50. Infravermelho-ATR dos filmes de amido: controle (preto) e contendo o complexo Mg-phen-fer (vermelho). 90
FIGURA 51. Avaliação através de IV-ATR da modificação da estrutura dos filmes de amido controle e contendo os complexos quando são expostos a presença e ausência de ar a 30 °C e a 40°C e guardados no escuro..... 92
FIGURA 52. Infravermelho-ATR dos filmes de gelatina sendo controle (azul), e do filme contendo o complexo Mg-phen-fer (vermelho). 93

FIGURA 53. Liberação cinética do complexo Mg-phen-fer a partir dos filmes de amido produzidos por casting no decorrer do tempo em diferentes simuladores alimentares. 96
FIGURA 54. Cinética de liberação do complexo Mg-phen-fer a partir dos filmes de gelatina produzidos por casting no decorrer do tempo em diferentes simuladores alimentares. 97
FIGURA 55. Avaliação da variação de coloração da maçã quando coberta com filme de amido contendo o complexo Mg-phen-fer e sem filme (A) e quando coberta apenas com o filme controle sem complexo e sem filme (B). 99
FIGURA 56. Atividade fungicida do complexo Mg-phen-fer na faixa de 0,001 mg/mL até 2,0 mg/mL..... 101
FIGURA 57. Atividade fungicida do ácido ferúlico na faixa de 0,09 mg/mL até 2,10 mg/mL. 102
FIGURA 58. Inibição do complexo Mg-phen-fer em relação a enzima AChE. 104
FIGURA 59. Reação de redução metabólica do sal MTT para formação de formazan. 105
FIGURA 60. Viabilidade celular das células da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y na presença do complexo Mg-phen-fer. 106

Resumo

USO VERSÁTIL DE NOVOS COMPLEXOS DE Mg(II): PROTEÇÃO A ERO'S À OXIDAÇÃO LIPÍDICA

A pesquisa por compostos que apresentem potencial antioxidante é cada vez maior devido à aplicação em áreas estratégicas como conservação de alimentos, suplementos alimentares, compósitos em embalagens inteligentes, entre outros.

Esse trabalho de pesquisa, que tem como objetivo preparar e caracterizar o complexo metálico de Mg(II) contendo na esfera de coordenação ácido ferúlico (fer) e 1,10-fenantrolina (phen; Mg-phen-fer), e sua aplicação em filmes poliméricos. O complexo foi caracterizado por infravermelho, por espectrometria de massas por injeção de elétrons (MS-ESI) e ressonância magnética nucelar de ^{1}H e DOSY-NMR. Os voltamogramas cíclicos obtidos em solução aquosa na região anódica apresentaram um processo cíclico indicando a estabilidade das espécies geradas durante a oxidação do ácido ferúlico coordenado, provavelmente pela estabilização do correspondente radical fenoxila via complexação com Mg(II), o que é interessante para aplicações antioxidantes.

O complexo Mg-phen-fer frente ao radical DPPH• apresentou um IC_{50} de 26 µM enquanto para o BHT foi de 40,9 µM. O mesmo comportamento é observado para o radical $ABTS^{\bullet+}$, complexo apresentou um IC_{50} de 6 µM enquanto para o BHT foi de 16,75 µM. O complexo apresentou inibição total da geração do $^{1}O_2$, a concentração de 1,65 µg/mL. Além disso, o complexo foi também capaz de estabilizar a riboflavina da decomposição que ocorre na presença de luz em atmosfera inerte. Em relação aos radicais peroxila que servem de modelo para radicais lipídicos, o complexo inibiu a geração destes radicais apresentando IC_{50} de 5µg/mL.

Neste trabalho foram investigados dois biopolímeros para a confecção do material da embalagem, amido de tapioca e gelatina. Constatou-se que os

filmes contendo o complexo são sempre transparentes e estáveis a temperaturas de 30 °C e 40 °C observado nas medidas de infravermelho de reflexão total atenuada (IV-ATR). A capacidade de transmissão de oxigênio nos filmes foi alterada com a incorporação do complexo sendo os filmes de amido mais susceptíveis a difusão de oxigênio do que os filmes de gelatina.

A liberação do complexo a partir das duas matrizes foi rápida para sistemas com alto percentual de água. Do filme de amido, a liberação total em água aconteceu em 30 minutos, na presença de 50 % de etanol essa liberação se dá em 200 minutos e em sistemas alcoólicos apenas 10 % da massa dos complexos foi liberada em mais de três dias. Para o filme de gelatina, independente do meio aquoso a liberação se deu em 60 min.

Com os estudos de microbiologia, para o complexo Mg-phen-fer, verificou que a mínima concentração bactericida é de 1,0 mg/mL e a mínima concentração fungicida é de 0,05 mg/mL. Esse complexo se destaca na proteção alimentícia tanto por ser um ótimo candidato a antioxidante quanto por possuir uma excelente atividade antimicrobiana.

O complexo apresenta alto potencial de aplicação, sendo que estudos com diferentes matrizes poliméricas devem ser realizados para retardar a liberação controlada atraindo um maior valor de mercado ao produto.

Abstract

VERSATILE USE OF NEW Mg(II) COMPLEXES: PROTECTION AGAINST ROS AND LIPID OXIDATION.

The search for compounds that have antioxidant properties is increasing due to their application in strategic areas such as food preservation, food supplements, active compounds in smart packaging, among others.

This research work aims to prepare and characterize metallic Mg(II) complex containing in the coordination sphere ferulic acid (fer) and 1,10-phenanthroline (phen; Mg-phen-fer) and their application in polymeric films. The complex was characterized by infrared, electron injection mass spectrometry (MS-ESI) and ^{1}H nuclear magnetic resonance and DOSY-NMR. The cyclic voltammograms obtained in aqueous solution in the anodic region showed a cyclic process indicating the stability of the species generated during the oxidation of coordinated ferulic acid, probably due to the stabilization of the corresponding phenoxyl radical via complexation with Mg(II), which is interesting for antioxidant applications.

The Mg-phen-fer complex against the DPPH• radical presented an IC_{50} of 26 µM while for the BHT it was 40.9 µM. The same behavior is observed for the complex $ABTS^{\bullet+}$ radical presented an IC_{50} of 6 µM while for the BHT it was 16.75 µM. The complex showed total inhibition of $^{1}O_2$ generation, at a concentration of 1.65 µg/mL. Furthermore, the complex was also able to stabilize riboflavin from the decomposition that occurs in the presence of light in an inert atmosphere. Regarding the peroxyl radicals that serve as a model for lipid radicals, the complex inhibited the generation of these radicals, presenting IC_{50} of 5µg/mL.

In this work, two biopolymers were investigated for making the packaging material, tapioca starch and gelatin. It was found that the films containing the complex do not favor the proliferation of microorganisms, are

always transparent, and are stable at temperatures of 30 °C and 40 °C observed in attenuated total reflection infrared (IR-ATR) measurements. The oxygen transmission capacity in the films was altered with the incorporation of the complex, with starch films being more susceptible to oxygen diffusion than gelatin films.

The release of the complex from the two matrices was quick for systems with a high percentage of water. From the starch film, the total release in water took place in 30 minutes, in the presence of 50 % ethanol this release takes place in 200 minutes and in alcoholic systems only 10 % of the mass of the complex was released in more than three days. For the gelatin film, regardless of the aqueous media, release occurred within 60 min.

With microbiology studies, for the Mg-phen-fer complex, it was verified that the minimum bactericidal concentration is 1.0 mg/mL and the minimum fungicidal concentration is 0.05 mg/mL. This complex stands out in food protection both for being a great candidate for antioxidant and for having an excellent antimicrobial activity.

The complex has a high potential for application, and studies with different polymeric matrices must be carried out to delay controlled release, attracting a greater market value to the product.

Sumário

1 Introdução 1

1.1 Radicais e Antioxidantes 1

1.2 Fatores que levam a deterioração da carne e derivados -Peroxidação Lipídica 2

1.3 Modo de ação dos antioxidantes 4

1.3.1 Transferência de átomo de hidrogênio (HAT) 5

1.2.2 Transferência de um elétron e um próton (SET-PT) 6

1.3.3 Perda de um próton seguido por transferência de elétron (SPLET) 6

1.3.4. Spin trapping e sequestro de radicais 7

1.4 Complexos metálicos como antioxidantes 8

1.5 Complexo de Mg(II) 10

1.6 Embalagens inteligentes- A segurança alimentar 11

2 Objetivos 15

2.1 Geral 15

2.2 Específicos 15

3 Material e Método 15

3.1 Síntese do complexo Mg-phen-fer 15

3.2 Síntese do complexo Mg-phen-iso 16

3.3 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho 16

3.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 16

3.4.1 RMN ^{1}H 17

3.4.2 Espectroscopia ordenada de difusão em Ressonância Magnética Nuclear (DOSY-RMN) 17

3.5 Espectrometria de massas 17

3.6 Espectroscopia de absorção eletrônica na região do Ultravioleta-Visível (UV-*vis*) 18

3.7 Luminescência 18

3.8 Determinação do pKa utilizando o método colorimétrico 18

3.9 Voltametria cíclica 19

3.10 Atividade Antioxidante 19

3.10.1 Ensaio com o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•) 19

3.10.2 Ensaio com o radical 2,2′-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina -6-ácido sulfônico ($ABTS^{\bullet+}$) 20

3.10.3 Ensaio com radical peroxila (ROO•) 21

3.10.4 Oxigênio Singleto 22

3.10.5 Estudos com a riboflavina 23

3.11 Filmes - Casting 24

3.12 Caracterização dos filmes 25

3.12.1 Massa seca 25

3.12.2 Atividade da água 25

3.12.3 Transparência-opacidade 25

3.12.4 Infravermelho 26

3.13 Estabilidade térmica e reatividade com oxigênio do ar 26

3.14 Permeabilidade ao oxigênio 26

3.15 Liberação controlada 27

3.16 Escurecimento da maçã 28

3.17 Microbiologia 29

3.17.1 Preparo das bactérias 29
3.17.2 Preparo dos fungos 30
3.18 Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) 31
3.19 Ensaio de IC_{50} em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y ... 31
4 Resultados e Discussão 33
4.1 Síntese e Caracterização 33
4.1.1 Síntese 33
4.1.2 Infravermelho 34
4.1.3 RMN 35
4.1.4 Espectrometria de massas 42
4.1.5 Propriedades espectroscópicas 47
4.1.6 Cálculo teórico 50
4.1.7 Estudos de pH 52
4.1.8 Voltametria cíclica 56
4.2 Atividade antioxidante 64
4.2.1 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•) 65
4.2.2 2,2′-Azino-bis(3-ethilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico ($ABTS^{\bullet+}$) 68
4.2.3 Radical Peroxila 71
4.2.4 Oxigênio Singleto ($^1O_2$) 74
4.2.5 Riboflavina – Estudo de caso 77
4.3 Filmes 86
4.3.1 Biopolímeros usados para os filmes de casting 86
4.3.2 Massa seca e atividade da água (a_w) 87

4.3.2 Opacidade e Transparência 88
4.3.3 Análise por infravermelho 89
4.3.4 Taxa de permeabilidade ao oxigênio (TPO_2) 94
4.3.5 Estudos de liberação 96
4.3.6 Proteção em relação a oxidação de frutas: Escurecimento da maçã 98
4.4 Dados Biológicos 99
4.4.1 Propriedades bactericidas e fungicidas do complexo - Estudos de Microbiologia Alimentar 99
4.4.2 Atividade da enzima acetilcolinesterase 102
4.4.3 Ensaio com células da linhagem de neuroblastoma 104
5 Perspectivas futuras 106
6 Conclusão 107
7 Referências Bibliográficas 109
Apêndice A 132
Apêndice B 133
Apêndice C 139

1 Introdução

1.1 Radicais e Antioxidantes

Os radicais são definidos como espécies químicas reativas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados. *In vivo* são produzidos como parte do metabolismo mitocondrial[1] e não apresentam seletividade, podendo atacar DNA, proteínas e lipídios[1], além de serem associados a várias doenças como câncer e aterosclerose,[2,3] processos degenerativos do sistema nervoso central como Alzheimer[1,4] e ao envelhecimento.[5]

Os antioxidantes são substâncias químicas que em baixas concentrações quando comparadas àquela do substrato oxidável, são capazes de retardar ou prevenir a oxidação desses substratos.[6] O radical é a espécie química que se reduz enquanto o antioxidante é a espécie química que se oxida e protege o substrato neutro, como representado na FIGURA 1. Os antioxidantes devem reagir rapidamente com os radicais impedindo que as biomoléculas sejam oxidadas. Quando o antioxidante se oxida torna-se um radical pois ficará com um elétron desemparelhado, contudo, essa molécula deve formar espécies estáveis para não dar continuidade a cadeia de formação de radicais.[7]

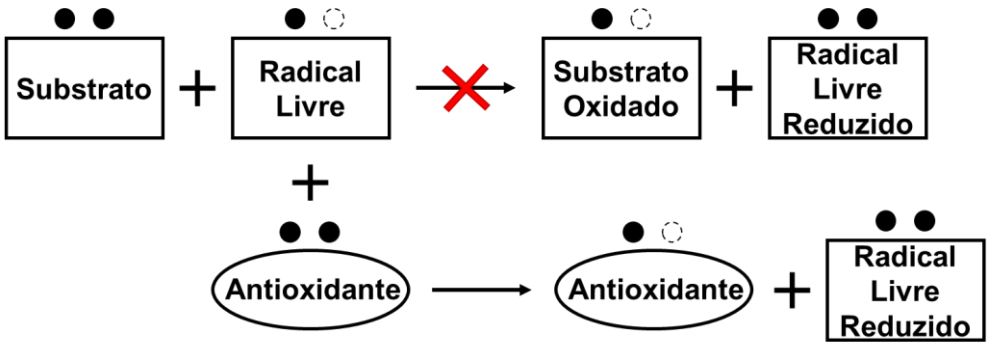


FIGURA 1. Esquema exemplificando a atuação de um antioxidante.

Em organismos vivos a primeira barreira antioxidante contra os radicais livres é a defesa enzimática constituída por enzimas como

superóxido dismutase, catalase e glutationa redutase.[8,9,10] Há também a defesa não enzimática natural onde os antioxidantes são adquiridos pela ingestão de alimentos, como os casos dos flavonoides, ácidos fenólicos, vitaminas, entre outros.[8,9,10] Existem ainda os antioxidantes sintéticos como o hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT) e galato de propila (PG) que podem ser incorporados aos alimentos e a embalagens, porém foi demonstrado que estes apresentam riscos toxicológicos e vêm sendo cada vez menos empregados.[11] As pesquisas cientificas e de mercado vêm sendo direcionadas globalmente para o uso de antioxidantes naturais ou sintéticos de baixa toxicidade.

O estresse oxidativo ocorre quando o organismo de qualquer ser vivo não é capaz de neutralizar todos os radicais gerados utilizando apenas a defesa enzimática natural, ou seja, é uma situação em que ocorre um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e o consumo dessas espécies pela defesa antioxidante enzimática.[12] Além disso, o estresse oxidativo não acontece apenas em organismos vivos, mas também é um problema para indústria alimentícia em especial às carnes e laticínios. O aumento de radicais nesses alimentos está associado a vários processos de deterioração acarretando alterações organolépticas, devido a presença de riboflavina que gera espécies reativas de oxigênio (EROs).[11,13]

1.2 Fatores que levam a deterioração da carne e derivados - Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica é o processo pelo qual os radicais livres atacam a cadeia lateral de ácidos graxos insaturados. O radical abstrai um átomo de hidrogênio próximo a ligação dupla do ácido graxo, formando um dieno conjugado como mostrado na FIGURA 2 para o ácido linoleico. O dieno conjugado é um radical lipídico instável que pode reagir com o oxigênio e formar o radical peroxil lipídico, ROO•.[14] Por se tratar da oxidação de

gorduras, os ácidos graxos saturados são mais resistentes aos radicais em relação aos ácidos graxos poli-insaturados.

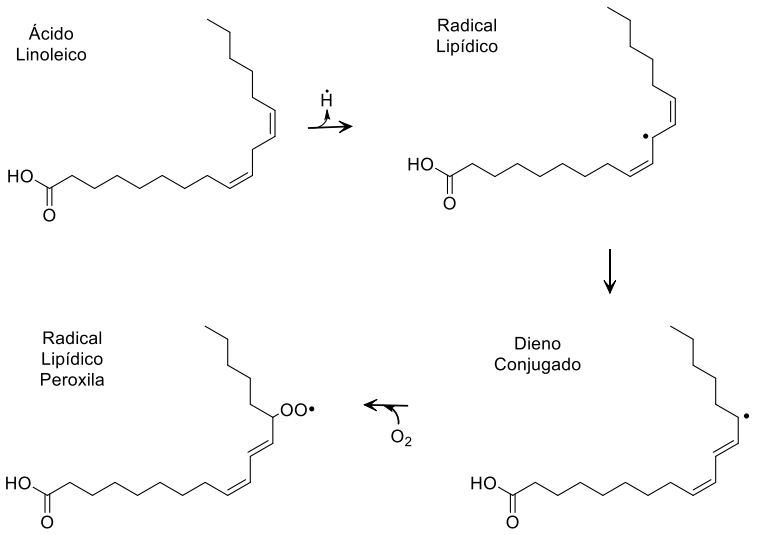


FIGURA 2. Esquema da formação do radical peroxila lipídico (ROO•) a partir do ácido linoleico.

A oxidação lipídica está relacionada com a degradação oxidativa de gorduras, a qual ocorre na presença de oxigênio ou EROs.[15] As grandes quantidades de lipídios e ácidos graxos encontrados nas carnes estão relacionadas com a qualidade nutricional e sensorial que estes produtos e seus derivados apresentam.[16] Logo, para o consumidor final, uma peça de carne ideal é aquela que apresenta uma coloração de aspecto saudável e odores agradáveis. Contudo, o aumento do tempo de exposição faz com que a carne se torne amarronzada e deteriorada devido a uma série de fatores. Como exemplo, pode-se citar a conversão da mioglobina para sua forma oxidada, a metmioglobina (MetMb), levando a deterioração da coloração e sabor do produto.[17] Além disso, a oxidação lipídica também depende da incidência de luz e a presença de pró-oxidantes, tais como os íons de ferro.[18,19]

A oxidação lipídica é um processo contínuo de produção de radicais livres e ocorre em três níveis. Como mostrado na FIGURA 3, no primeiro nível a oxidação lipídica nos tecidos musculares é combatida por fatores

intrínsecos, tais como enzimas e outras biomoléculas (superóxido dismutase, catalase, vitaminas E e C).[20] Após o abate, dá-se início aos segundo e terceiro níveis, onde esses fatores passam a perder suas propriedades antioxidantes, uma vez que as condições presentes na carne não são mais as mesmas, com a presença de pró-oxidantes e sem atividade enzimática antioxidativa.[17,21]

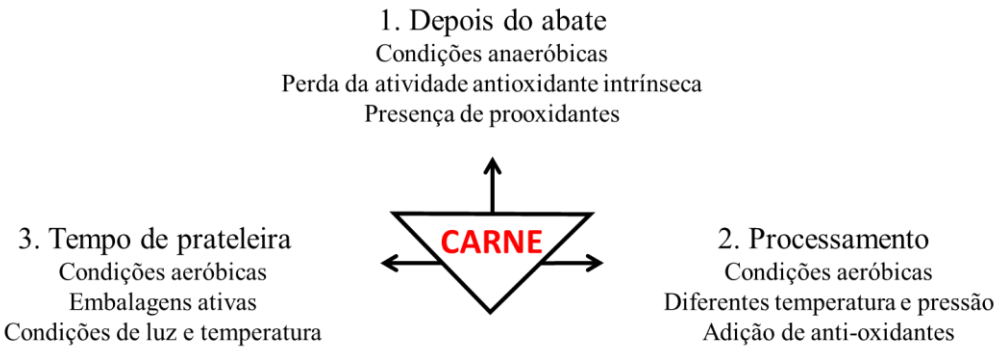


FIGURA 3. Condições da carne nos diferentes estágios de produção.

A qualidade dos produtos alimentícios como as carnes e derivados é afetada também pela presença de microrganismos aeróbicos.[22] O desenvolvimento de compostos que possam atuar tanto na proteção a EROs e oxidação lipídica quanto no combate a micróbios aeróbicos atualmente é essencial.

Em suma, a qualidade dos produtos de carne está relacionada com a oxidação lipídica da carne que ocorre durante o manuseio (processamento), tempo de prateleira e presença de microrganismos. Estes fatores acarretam um grande impacto econômico em termos de perda de lotes de carnes processadas e prontas para consumo uma vez que as mesmas se encontram em estados inferiores de qualidade.[23]

1.3 Modo de ação dos antioxidantes

Os antioxidantes podem atuar contra os radicais livres pelos seguintes mecanismos: transferência de átomo de hidrogênio (HAT, do inglês), por transferência de um elétron seguida por transferência de próton (SET-PT, do

inglês) ou pela perda de um próton seguido por transferência de elétron (SPLET, do inglês). Diferenciar estes mecanismos não é trivial, principalmente porque em várias situações mais de um mecanismo pode estar operando.[24,25,26] Há também os mecanismos de spin trapping e de sequestro de radical pela molécula antioxidante.[24] O mecanismo de ação de um antioxidante é determinado pela sua estrutura, solubilidade e condições do meio como pH, temperatura e solvente.[7]

1.3.1 Transferência de átomo de hidrogênio (HAT)

No processo HAT, o antioxidante neutraliza a espécie radicalar doando um átomo de hidrogênio, H•. A reatividade desse mecanismo é dependente do pH da solução e da energia de dissociação da ligação O-H, isto é, do valor da entalpia de dissociação da ligação (BDE).[27] Assim, quanto menor for o valor da entalpia, mais favorecido será esse processo, podendo ser exemplificado pela equação 1 e na FIGURA 4.

$$AO\text{-}OH + R\bullet \rightarrow AO\text{-}O\bullet + RH \qquad BDE \qquad \text{Eq. 1}$$

Sendo: AO-OH, antioxidante; R• radical livre; AO-O•, antioxidante oxidado e RH radical livre neutralizado.

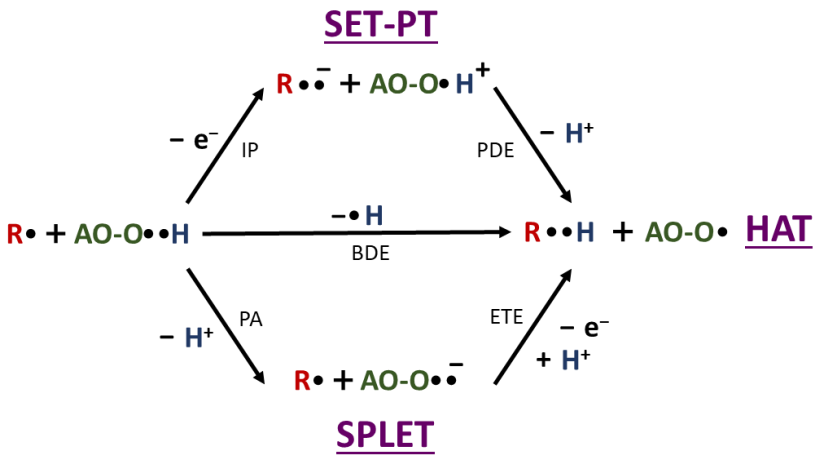


FIGURA 4. Esquema dos processos HAT, SET-PT e SPLET.

1.2.2 Transferência de um elétron e um próton (SET-PT)

No processo SET-PT, o antioxidante neutraliza a espécie radicalar pela doação de um elétron e na sequência pela transferência de próton. A reatividade deste mecanismo é dependente do pH e do potencial de ionização (IP). Esse mecanismo é favorecido em pH alto pois há uma diminuição no valor do potencial de ionização qual favorece a entalpia de dissociação de próton (PDE).[27] O SET-PT pode ser visualizado como uma sequência de reações, equações 2 a 4 e na FIGURA 4.

$$AO\text{-}OH + R\bullet \rightarrow AO\text{-}OH^{\bullet+} + R^{-} \qquad IP \qquad Eq.\ 2$$

$$AO\text{-}OH^{\bullet+} + H_2O \rightarrow AO\text{-}O^{\bullet} + H_3O^{+} \qquad PDE \qquad Eq.\ 3$$

$$R^{-} + H_3O^{+} \rightarrow RH + H_2O \qquad Eq.\ 4$$

Sendo AO-OH, antioxidante; R• radical livre; $AO\text{-}OH^{\bullet+}$ e $AO\text{-}O^{\bullet}$, antioxidante oxidado; R^{-}, radical reduzido e RH radical livre neutralizado. Uma vez que SET aconteça os antioxidantes tornam-se espécies radicalares catiônicas.

1.3.3 Perda de um próton seguido por transferência de elétron (SPLET)

No processo SPLET, o antioxidante perde um próton formando um ânion e, em seguida, doa um elétron para o radical. A reatividade deste mecanismo depende da polaridade do solvente, da afinidade do próton (PA) e da entalpia da transferência de elétron (ETE). Como alguns dos antioxidantes possuem ligação -OH esse processo é favorecido em água, pois a formação de um ânion está relacionada diretamente com a força ácida do hidrogênio o que favorece a afinidade do próton. O SPLET pode ser visualizado como as seguintes reações, equações 5 a 7 e FIGURA 4.[28,29]

$$AO\text{-}OH \leftrightarrows AO\text{-}O^{-} + H^{+} \qquad PA \qquad Eq.\ 5$$

$$AO\text{-}O^{-} + R\bullet \rightarrow AO\text{-}O\bullet + R^{-} \qquad ETE \qquad Eq.\ 6$$

$$R^{-} + H^{+} \rightarrow RH \qquad Eq.\ 7$$

Sendo AO-OH, antioxidante; AO-O^{-}, antioxidante desprotonado; R• radical livre; AO-O•, antioxidante oxidado; R−, radical reduzido e RH radical livre neutralizado.

1.3.4. Spin trapping e sequestro de radicais

O mecanismo de spin trapping seguido por ressonância paramagnética de elétrons (RPE) é um método analítico empregado para detectar e identificar espécies paramagnéticas com vida curta, como radicais livres e EROs. Essa técnica envolve a reação desses radicais com um spin trap para gerar adutos estáveis cujo sinal é detectado por RPE,[30,31] equação 8. Quando as moléculas de antioxidante e spin trap estão presentes, elas competem para capturar os radicais livres, resultando em supressão do sinal de RPE,[32] este processo é observado na equação 9. A identificação dos radicais capturados é baseada nos perfis espectrais dos adutos formados, que são caracterizados por constantes de divisão de hiperfinas (interação entre o elétron e o spin do núcleo), largura da linha ou simetria.[33] Exemplos de moléculas de spin trap são α- (4-piridil-1-óxido) -N-terc-butilnitrona (4-POBN), 5,5-Dimetil-1-pirrolin-N-óxido (DMPO) e 2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMP).

$$\underset{\text{Espécie diamagnética}}{ST} + R\bullet \rightarrow \underset{\text{Aduto Ativo no RPE}}{(ST\text{-}R)\bullet} \qquad \text{Eq. 8}$$

$$\underset{\text{Espécie diamagnética}}{ST} + AO\text{-}OH + R\bullet \rightarrow AO\text{-}O\bullet + \underset{\text{Aduto Ativo no RPE}}{(ST\text{-}nR)\bullet} + RH \qquad \text{Eq. 9}$$

onde: ST é a molécula de spin trap, R• é o radical livre, (ST-R)• é o aduto formado entre ST e R•, AO-OH é o antioxidante, AO-O• é o antioxidante oxidado, RH é o radical livre neutralizado e (ST-nR)• é o aduto formado entre o ST e o radical livre não capturado pelo antioxidante.

O mecanismo de sequestro de radicais está associado a radicais estáveis com vida longa, tais como, radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•) e cátion de radical 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-

sulfônico) ($ABTS^{\bullet+}$). As moléculas antioxidantes neutralizam esses radicais por meio da doação de um átomo de hidrogênio ou elétron, resultando no desaparecimento do sinal RPE. Esse processo é observado na equação 10, e ocorre de forma diferente em comparação com o método de spin trapping. Em suma, no mecanismo de sequestro de radicais o sinal de RPE está presente no início e diminui quando o antioxidante é adicionado, enquanto o sinal de RPE é gerado ao longo da medida por causa de formação de adutos de spin no mecanismo spin trapping.

$$SR\bullet + AO\text{-}OH \rightarrow SR\text{-}H + AO\text{-}O\bullet \qquad \text{Eq. 10}$$

Ativo no RPE
Tempo de vida longo

onde: SR• é o radical estável, AO-OH é o antioxidante, AO-O• é o antioxidante oxidado e RS-H é o radical estável neutralizado.

1.4 Complexos metálicos como antioxidantes

As propriedades químicas dos complexos metálicos podem ser projetadas usando diferentes metais e ligantes, o que possibilita seu desenvolvimento para aplicações específicas. O interesse na síntese e na avaliação da atividade de complexos metálicos com ligantes biologicamente ativos vem crescendo ao longo do tempo.[34,35,36] A combinação entre as propriedades redox dos íons metálicos e dos diferentes ligantes é uma abordagem promissora para desenvolvimento de compostos antioxidantes eficazes que podem atuar através de diferentes mecanismos.[37]

Comumente os antioxidantes que auxiliam no combate de radicais livres no organismo e em alimentos são provenientes de fontes naturais,[38] como por exemplo, frutas, sementes, legumes, chá e vinho são ricos em compostos orgânicos com alto poder antioxidante como os flavonoides, flavonas, ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinâmicos, entre outros.[39] Esses antioxidantes naturais apresentam em sua estrutura grupos ácidos

carboxílicos (para os ácidos) ou um grupo hidroxila e um grupo oxo próximos (para flavonoides e flavonas), podendo se coordenar a centros metálicos formando complexos estáveis uma vez que, em sua maioria, essas moléculas se ligam ao metal como quelatos através da coordenação dos átomos de oxigênio.[36,40]

A formação de complexos com antioxidantes naturais é favorecida para metais em baixo estado de oxidação e de spin baixo, pois a presença de uma ou mais cadeias de anéis aromáticos nesses compostos permite o fortalecimento da ligação por retrodoação, como no complexo apresentado na FIGURA 5. A coordenação de um ligante com característica antioxidante a um centro metálico permite a modulação das propriedades de ambos com as seguintes vantagens: (a) a quelação do grupo funcional para regular a solubilidade; (b) a estabilização do radical fenoxila formado pela assistência do íon metálico no processo redox inter- e intra-molecular.[37]

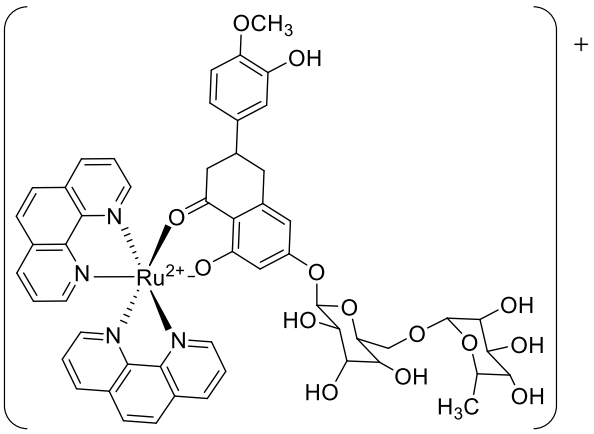


FIGURA 5. Estruturas química do complexo $[Ru(phen)_2(hesperidina)]^+$ como exemplo de um complexo metálico com antioxidantes naturais na esfera de coordenação.[41,42]

Os flavonoides, flavonas, ácidos cinâmicos, polifenóis e carotenóides possuem estruturas com anéis aromáticos e apresentam absorção no espectro de UV-vis na região até ~ 380 nm. A coordenação desses ligantes deslocam a absorção para a região do vermelho, sendo um bom indicativo se houve a formação do complexo.[43] Além disso, esses antioxidantes são luminescentes

e a diferença nas propriedades emissivas do ligante livre para o complexo formado também pode ser um indício da coordenação.[43]

1.5 Complexo de Mg(II)

O magnésio(II) é essencial em um número notável de processos biológicos, nos quais desempenha papel estrutural e/ ou catalítico, e sua deficiência também afeta o sistema enzimático antioxidante; entretanto, o mecanismo por trás desses efeitos ainda não é totalmente compreendido.[44,45] O Mg(II) é um ácido duro e forma, preferencialmente, complexos hexacoordenados com ligantes que possuam átomos de oxigênio,[46,47] em especial aqueles que contêm grupo ácido carboxílico. Por exemplo, a interconversão entre a coordenação monodentada (por meio de hidroxila) para bidentada por meio do grupo ácido carboxílico no controle da reatividade de complexo de Mg(II) foi estudada.[48]

Assim, a coordenação de produtos naturais como flavonoides, flavonas, ácidos fenólicos, entre outros, é uma boa alternativa para a coordenação ao Mg(II). Além disso, a formação de complexo entre um produto natural e o magnésio apresenta a vantagem de possuir solubilidade em água. Por exemplo, um complexo de Mg(II) contendo o flavonoide quercetina mostrou um aumento na atividade antioxidante em comparação com a quercetina livre para neutralização de radicais livres.[49]

Assim, a escolha pela coordenação de produtos naturais ao Mg(II) surge como uma alternativa. No caso do ácido ferúlico, este pode ser ingerido por seres vivos sem riscos toxicológicos (LD_{50} de 3200 mg/kg para camundongo),[50] sendo que em média uma pessoa que segue uma dieta mediterrânea ingere diariamente de 150-250 mg desse ácido.[50] Além de estar associado ao combate de radicais livres e melhora de diversas doenças como câncer, problemas cardíacos e diabetes.[50]

Além disso, ligantes N,N-aromáticos quelantes neutros também podem ser empregados para controlar a esfera de coordenação em complexos de Mg(II) hexacoordenados. Entre os muitos ligantes investigados, 1,10-fenantrolina (phen) fornece uma seleção de complexos Mg-phen com número variável de moléculas de água coordenadas, como $[Mg(phen)_2(H_2O)_2]^{2+}$,[45] $[Mg(SO_4)(phen)(H_2O)_3]$,[51] e $[Mg(phen)_3]^{2+}$.[52]

1.6 Embalagens inteligentes- A segurança alimentar

A melhoria de vida, decorrente da nossa sociedade industrial, tem levado a um crescimento populacional significativo com projeções de um aumento de 50 % da população mundial para 2050. Isso exigirá o dobro da demanda de alimentos atuais e implicará em vários desafios no que se refere à manutenção da segurança alimentar e sustentabilidade.[53]

Frente a esse cenário, é necessário o uso de pesticidas (fertilizantes, inseticidas, fungicidas, herbicidas e outros) nas áreas agrícolas bem como o uso de aditivos para garantir o transporte, a conservação e aumentar o tempo de prateleira de alimentos perecíveis.[54,55]

Em resumo, o mundo precisa de uma rede alimentar aonde os alimentos cheguem as pessoas, todos os dias, em todos os lugares de maneira acessível e inteligente oferecendo uma dieta nutritiva com qualidade e sem desperdícios. Para atingir esse objetivo, precisamos ser mais produtivos e eficientes na forma como cultivamos e criamos os animais. Além da maneira e dos cuidados adotados para conservação e transporte de alimentos para o consumo humano como carne, leite e derivados.[56] É importante ressaltar a preocupação com a deterioração por processos químicos e microbiológicos. Em todos os setores da indústria, existem diretrizes definidas que determinam como o produto é fabricado e armazenado para garantir a segurança ao redor.[57,58]

A carne é um dos muitos tipos de alimentos que degradam rapidamente se não forem refrigerados ou mantidos em condições ideais.[59] Para evitar alterações nas qualidades organolépticas (cor, sabor etc..) e nas propriedades dos alimentos perecíveis, são adicionados compostos que evitam a degradação os quais podem ser misturados diretamente a estes tais como nitrito de sódio (200-500 ppm), EDTA (275 ppm), entretanto a quantidade é limitada devido a problemas de saúde.[60] Outras estratégias como a adição de antioxidantes e/ou compostos antimicrobianos e antibacterianos em embalagens ativas são alternativas mais viáveis e exploradas atualmente.[61]

A incorporação de antioxidantes sintéticos como o BHA, BHT, Tocoferol (vitamina E) em embalagens poliméricas ajudam a manter o apelo e as qualidades saudáveis dos alimentos, retardando o ranço em gorduras, salsichas e carnes secas, além de ajudar a proteger alguns dos nutrientes naturais dos alimentos, como a vitamina A.[62] Diacetato de sódio (3 %) e lactato de sódio (5 %) estão entre os aditivos antimicrobianos naturais mais usados em carne processada.[63]

A adição de antioxidantes naturais de extratos vegetais também é uma alternativa viável, em particular em filmes poliméricos onde aumentam a estabilidade dos lipídeos limitando a perda da qualidade nutricional e sensorial. Nas condições ambientes, oxigênio e a água são fatores importantes que afetam a vida útil e tempo de prateleira de alimentos perecíveis. Nestes casos as embalagens poliméricas são essenciais na preservação dos alimentos.

Entre os materiais para confecção de filmes pela metodologia de “casting” e “coating” para aplicação em embalagens a escolha por biopolímeros vem sendo cada vez mais empregada e esses biopolímeros são provenientes de açúcares, amidos, proteínas, entre outros. Os solventes

escolhidos para dissolver esses polímeros devem ser bio-compatíveis e de baixa toxidade para o contato alimentar, como é o caso de água e alguns álcoois. E por último, os aditivos, que são substâncias adicionadas à mistura (blenda), a fim de melhorar as propriedades do filme como maleabilidade e diminuir processos de inchaço do filme pelo contato com o alimento.[64] Além de certos aditivos que são adicionados deliberadamente para serem liberados melhorando as propriedades do alimento que protege, como compostos antioxidantes e antimicrobianos, estes fatos estão resumidos na FIGURA 6.

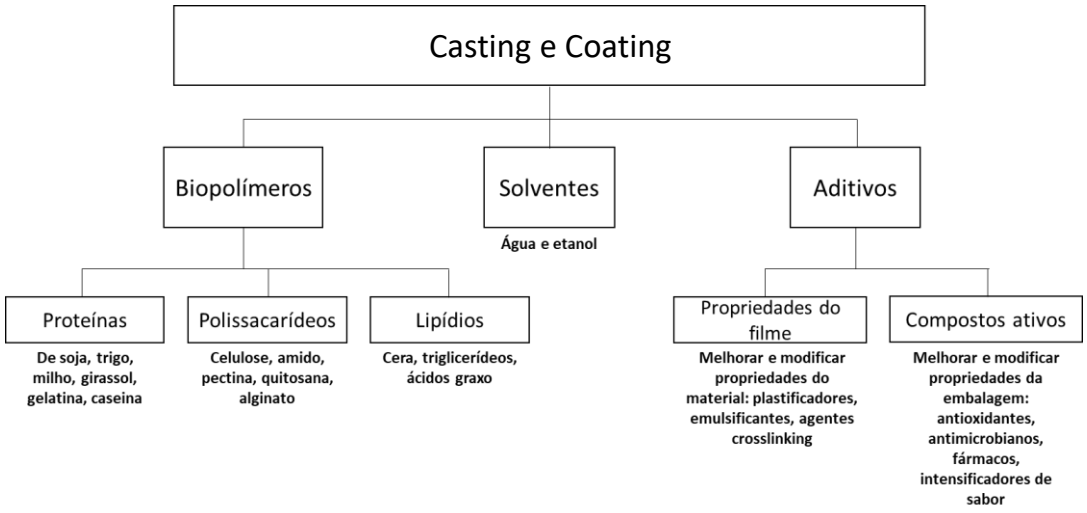


FIGURA 6. Representação esquemática dos componentes presentes em biofilmes feitos por casting e coating.

Vale ressaltar a importância da interação entre o composto ativo (CA) com o produto a ser protegido na embalagem, bem como com a matriz polimérica no qual se encontra misturado. Estes fatores determinam o método de ação destes bem como a taxa de liberação controlada do CA.

A taxa de liberação do CA de um filme polimérico para um alimento envolve três etapas:[65]

1. difusão dentro do polímero em direção à interface entre polímero e alimento,

2. transferência de massa através da interface,

3. dispersão no seio do alimento.

Embalagem com liberação controlada é uma tecnologia inovadora que usa a embalagem como um sistema de entrega para liberar CA de modo a diminuir a taxa de deterioração dos alimentos, melhorando assim a qualidade e a segurança dos alimentos durante o armazenamento prolongado, como mostrado na FIGURA 7.

A quantidade de CA liberado ao longo do tempo pela embalagem ativa não é constante e a tendência de liberação pode ser definida como uma taxa de liberação rápida inicial, seguida por taxas mais lentas. Normalmente, a etapa que controla a liberação é a difusão do CA dentro do polímero devido à resistência de movimentação.[66,67]

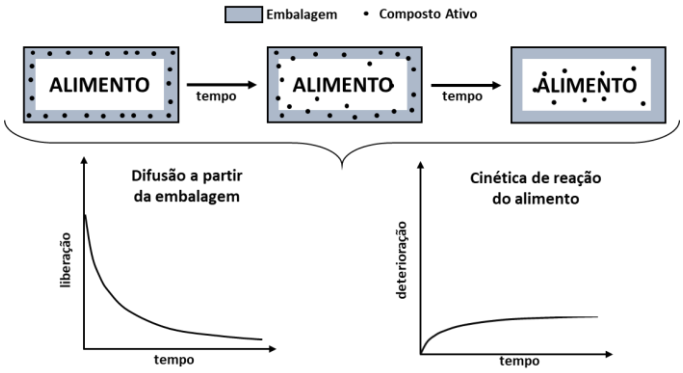


FIGURA 7. Mecanismo de ação de um sistema com liberação controlada de um composto ativo de uma embalagem para um produto.

Seydim e Sarikus[67] mostraram que os óleos de orégano e alho incorporados em filmes à base de proteína de soro de leite foram eficazes contra os microrganismos *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Escherichia Coli* e *Lactobacillus plantarum*. Um outro exemplo é um filme de celulose contendo lisozima que promove a liberação controlada desta proteína por cinco dias, podendo aumentar o tempo de vida útil de prateleira de alimentos perecíveis. Este mesmo sistema, também apresentou atividade antimicrobiana contra *Listeria innocua* parcialmente contra *E. Coli*.[68]

2 Objetivos

2.1 Geral

Desenvolver uma embalagem inteligente contendo um composto ativo com propriedades antimicrobianas e antioxidantes imobilizado em um filme polimérico com interesse em aumentar a resistência de carnes e seus derivados e o tempo de vida útil de prateleira.

2.2 Específicos

- Sintetizar os complexos do tipo $[Mg(L\text{-}L)_2(F)]^{2+}$, onde L-L= ligante quelante de diferentes propriedades ácido π e F = ácidos fenólicos, e caracterizar através de técnicas espectroscópicas de RMN e IV.
- Efeitos da luz: Investigar a desativação do oxigênio singleto gerado pelo estímulo luminoso a riboflavina pela técnica de RPE usando o sequestrador de spin TEMP.
- Investigar a atividade antioxidante *in vitro* do complexo contra diferentes radicais.
- Investigar a atividade *in vitro* do complexo contra fungos e bactérias alimentares.
- Estudar matrizes poliméricas biodegradáveis para aplicação como embalagens ativas contendo o complexo.

3 Material e Método

3.1 Síntese do complexo Mg-phen-fer

Em um balão volumétrico (50 mL) de três bocas contendo metanol (15 mL) foram adicionados os reagentes $Mg(CH_3COO)_2.4H_2O$ (0,86 g; 4,00 mmol), 1,10-fenantrolina (phen; 0,76 g; 4,20 mmol), e ácido ferúlico (fer; 0,82 g; 4,20 mmol) e trietilamina (TEA; 580 µL, 4,20 mmol). A solução foi mantida em atmosfera de N_2, agitação constante e aquecimento brando por 2 horas. No decorrer da reação o produto foi precipitado com coloração

branco pálido. Filtrou-se a solução e o sólido obtido foi lavado com metanol gelado e secado a vácuo, obtendo uma massa final de 650 mg. (rendimento 80 %).

3.2 Síntese do complexo Mg-phen-iso

Em um balão volumétrico (50 mL) de três bocas contendo metanol (15 mL) foram adicionados os reagentes $Mg(CH_3COO)_2.4H_2O$ (0,86 g; 4,00 mmol), 1,10-fenantrolina (phen; 0,76 g; 4,20 mmol), ácido isovanilico (iso; 0,70 g; 4,20 mmol) e trietilamina (TEA; 580 µL, 4,20 mmol). A solução foi mantida em atmosfera de N_2, agitação constante e aquecimento brando por 2 horas. Após esse tempo, filtrou-se a solução para retirar impurezas e reduziu o volume para 3 mL. Adicionou-se 10 mL de água gelada e deixou 12 horas na geladeira. Filtrou-se a solução e o sólido acinzentado obtido foi lavado com metanol gelado e secado a vácuo, obtendo uma massa final de 560 mg. (rendimento 70 %).

3.3 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos no estado sólido utilizando-se um espectrofotômetro SHIMADZU com transformada de Fourier, modelo IR Prestige-21 na região compreendida entre 4000 e 200 cm^{-1}. As amostras no estado sólido foram diluídas em KBr na proporção 1/100 (amostra/KBr).

3.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram obtidos em um espectrômetro BRUKER DRX 400 MHz e 600 MHz pertencentes ao laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos. Para os experimentos de RMN foi utilizado uma concentração igual a 4 mg/mL do complexo. Para aquisição e processamento dos dados foi utilizado o software Topspin (versão 3.5 pl 7).

3.4.1 RMN ^{1}H

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (^{1}H, ^{13}C, HMBC e HSQC) foram obtidos em um espectrômetro BRUKER 9,4 Tesla (400 MHz) equipado com sonda de 5 mm BFO (smart probe com ATMA®) e bobina de gradiente de campo em z.

3.4.2 Espectroscopia ordenada de difusão em Ressonância Magnética Nuclear (DOSY-RMN)

Para obter os mapas de DOSY-RMN uma sequência de pulso com minimização de correntes parasitas, empregando um comprimento de gradiente de 1400 µs (delta), 5 ms de atraso de corrente parasita longitudinal e 200 µs do tempo de recuperação entre gradientes foram aplicados. Foi utilizado um tempo de difusão total de 60 ms (grande delta). Dezesseis amplitudes de gradiente diferentes foram usadas; portanto, a força dos gradientes foi mantida variada entre 1,07 $G.cm^{-1}$ e 53,5 $G.cm^{-1}$. Para uma boa relação sinal-ruído, 16 varreduras foram realizadas, separadas por 3 s de retardo de reciclagem. O sinal do FID foi adquirido por meio da coleta de 32 k pontos de dados.

3.5 Espectrometria de massas

Espectrometria de massa de tempo de vôo de quadrupolo de ionização por eletropulverização (ESI-QTOF-MS) foram realizadas no modo positivo em um instrumento Xevo G2 (Waters Co). Os dados de MS de varredura completa foram produzidos na faixa de massa de 50-1200 Da. Para os experimentos de MS/MS por dissociação induzida por colisão (CID), argônio foi usado como gás de colisão e a energia de colisão foi aumentada até que fosse observada fragmentação suficiente do precursor. As amostras foram dissolvidas em metanol ou em água e introduzidas na fonte de ESI via infusão direta através de uma seringa de vidro de 250 µL e foram purgadas com >1 mL de metanol puro entre cada amostra. As condições da fonte ESI

foram as seguintes: voltagem capilar 1,5 kV, voltagem do cone da amostra 30 V, fluxo do gás do cone (N_2) 50 L/ hr, fluxo do gás de dessolvatação 750 L / hr, as temperaturas da fonte e da dessolvatação foram definidas 100 °C e 300 °C, respectivamente. Os dados foram analisados com o uso do software MassLynx 4.1.

3.6 Espectroscopia de absorção eletrônica na região do Ultravioleta-Visível (UV-*vis*)

Os espectros de absorção eletrônica na região do UV-*vis* foram obtidos com o auxílio de um espectrofotômetro de feixe simples Agilent 8453A. Celas de quartzo puro de caminho ótico de 1,0 cm e 4,0 mL de capacidade foram usadas nos experimentos. Para os estudos utilizando a espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-vis, as soluções preparadas eram na concentração de 1,0 mg do complexo em 10 mL de água, sendo posteriormente diluída para se ter no final uma concentração igual a 7,5 µg/mL.

3.7 Luminescência

Os espectros de emissão e de excitação foram obtidos por meio da utilização de um espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-5301 PC (lâmpada de alta pressão de xenônio de 150W e uma fotomultiplicadora do tipo R928). Para os estudos utilizando luminescência, as soluções preparadas eram na concentração de 1,0 mg do complexo em 10 mL de água, sendo posteriormente diluída para se ter no final uma concentração igual a 7,5 µg/mL.

3.8 Determinação do pKa utilizando o método colorimétrico

O pKa do complexo foi determinado pelo método colorimétrico. Soluções de concentração igual a 7,5 µg/mL do complexo foram preparadas na faixa de pH entre 2 a 12. Antes de cada medida a solução foi mantida em

repouso por meia hora para que o sistema entrasse em equilíbrio. Foi avaliado o comprimento de onda de 380 nm, considerando a seguinte Equação 11 para obter o valor de pKa.[69]

$$pKa = -\log K_a = -\log\left(\frac{Abs_{forma\ básica} - Abs_{mistura}}{Abs_{mistura} - Abs_{forma\ ácida}}\ x\ [H^+]_{mistura}\right) \qquad \text{Eq. 11}$$

3.9 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica foi realizada com um bipotenciostato/ galvanostato μStat400. Uma matriz eletroquímica impressa em plástico formada por um eletrodo de trabalho (d = 4 mm) e contra eletrodo feito de carbono vítreo e prata como eletrodo de referência foi usada para as medições. As medições foram feitas à temperatura ambiente em água pura e em uma solução tamponada (50 mmol/L, pH 4,5, 7,4 e 10,0) contendo 0,1 mol/L de KCl como eletrólito de suporte e 5 mg do composto em 1 mL de solução.

3.10 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante do complexo Mg-phen-fer frente aos radicais estáveis e espécies reativas do oxigênio foi investigada *in vitro* por procedimentos colorimétricos e por ressonância paramagnética de elétrons (RPE). Os experimentos de RPE foram realizados utilizando-se de um espectrômetro Varian E109 operando em banda X, frequência de 9,32 GHz, potência microondas de 20 mW e amplitude de modulação de 1 mT usando uma cavidade padrão retangular.

3.10.1 Ensaio com o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•)

Foram preparadas soluções estoque do radical DPPH• na concentração de 1,2 mmol/L em metanol, do complexo na concentração 1 mg/mL em água destilada e do padrão BHT na concentração de 1,52 mmol/L em metanol. Em seguida variados volumes de complexo e BHT foram adicionados em

eppendorfs para variar a concentração, sendo adicionado metanol na sequência e por último um volume fixo 150 µL de DPPH• para todas as amostras. No final cada solução continha um volume final de 2 mL. A solução reacional foi agitada em vórtex por 30 segundos e deixada no escuro por 1 hora. Após esse tempo, foram feitos espectros de UV-*vis* de cada amostra e acompanhou a banda em 517 nm.[70]

O valor de IC_{50} relacionado com a porcentagem de inibição do radical DPPH• foi obtido pela Equação 12:

$$\%I = \left(\frac{A_0 - A}{A_0}\right) X100\% \qquad \text{Eq. 12}$$

Onde: %I é porcentagem de inibição, A_0 é a absorbância da amostra padrão sem analito no comprimento de onda de 517 nm, A é a absorbância da amostra com analito no comprimento de onda de 517 nm.

3.10.2 Ensaio com o radical 2,2′-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina -6-ácido sulfônico ($ABTS^{\bullet+}$)

O radical $ABTS^{\bullet+}$ foi gerado a partir da reação entre 5,2 mL de uma solução aquosa do sal de ABTS com concentração de 7 mmol/L e 92 µL de uma solução aquosa de persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) de concentração igual a 140 mmol/L, em seguida, essa solução foi mantida em repouso no escuro por 16 horas para formação do radical. Variados volumes de complexo e BHT são adicionados em eppendorfs para variar a concentração, sendo adicionado água destilada na sequência e por último um volume fixo 30 µL de da solução do radical $ABTS^{\bullet+}$ para todas as amostras. No final cada solução continha um volume final de 2 mL. A solução reação deixada no escuro por 10 minutos. Após esse tempo, foram feitos espectros de UV-*vis* de cada amostra e acompanhou a banda em 630 nm.[71]

O valor de IC_{50} relacionado com a porcentagem de inibição do radical $ABTS^{\bullet+}$ foi obtido pela equação 13:

$$\%I = \left(\frac{A_0 - A}{A_0}\right) x100\% \qquad \text{Eq. 13}$$

Onde: %I é porcentagem de inibição, A_0 é a absorbância da amostra padrão sem analito no comprimento de onda de 630 nm, A é a absorbância da amostra com analito no comprimento de onda de 630 nm.

3.10.3 Ensaio com radical peroxila (ROO•)

O radical peroxila (ROO•) foi gerado pela formação contínua desse radical pela decomposição térmica a 37 °C por 30 minutos do 2-2'-azobis-(2-amidinopropano)-dihidrocloreto (AAPH).[72] A formação do radical peroxila foi monitorada com o sequestrador de spin α-(4-piridil-1-óxido)-N-terc-butilnitrona (POBN). Foram preparadas soluções de volume de 100 µL contendo: 20 µL AAPH (50 mmol/L), 20 µL POBN (50 mmol/L) e para o complexo Mg-phen-fer variou a concentração de 0,8 µg/mL até 16 µg/mL. Após a 30 minutos de aquecimento de cada amostra, foi transferida para um capilar de quartzo e medido da cavidade do RPE. Os espectros de RPE foram gravados a cada 30 s.

As condições das medições no RPE foram as seguintes: frequência de microondas 9,5 GHz, frequência de modulação 100 kHz, potência de microondas 5,0 mW, amplitude de modulação 2 G, largura de varredura 200 G, constante de tempo 0,128 s e temperatura 298 K.

O valor de IC_{50} relacionado com a porcentagem de inibição do oxigênio singleto foi obtido pela equação 14:

$$\%I = \left(\frac{A_0 - A}{A_0}\right) x100\% \qquad \text{Eq. 14}$$

Onde: %I é porcentagem de inibição, A_0 é a intensidade do espectro de RPE da amostra padrão sem analito, A é a intensidade do espectro de RPE da amostra com analito.

3.10.4 Oxigênio Singleto

O oxigênio singleto ($^1O_2$) foi gerado pela irradiação contínua da riboflavina com luz de 420 nm pelo período de 30 min.[73] A formação de oxigênio singleto foi monitorada com o sequestrador de spin 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinol (TEMP). Foram preparadas soluções de volume de 1 mL contendo: 130 µL TEMP (1,15 mol/L), 150 µL riboflavina (3 mol/L) e para o complexo Mg-phen-fer variou a concentração de 165 ng/mL até 4,95 µg/mL e volume final completado com tampão PBS pH 7,4. Após a 30 minutos irradiação de cada amostra, foi transferido para um capilar de quartzo e medido da cavidade do RPE. Os espectros de RPE foram gravados a cada 30 s.

As condições das medições no RPE foram as seguintes: frequência de microondas 9,5 GHz, frequência de modulação 100 kHz, potência de microondas 20 mW, amplitude de modulação 2G, largura de varredura 200 G, constante de tempo 0,128 s e temperatura 298 K.

O valor de IC_{50} relacionado com a porcentagem de inibição do oxigênio singleto foi obtido pela equação 15:

$$\%I = \left(\frac{A_0 - A}{A_0}\right) x100\% \qquad \text{Eq. 15}$$

Onde: %I é porcentagem de inibição, A_0 é a intensidade do espectro de RPE da amostra padrão sem analito, A é a intensidade do espectro de RPE da amostra com analito.

3.10.5 Estudos com a riboflavina

3.10.5.1 Ensaio riboflavina em diferentes pH's e atmosferas

Fez-se uma solução saturada de riboflavina (Rf) em tampão fosfato pH 7,4 e filtrou-se para retirar o sólido não dissolvido. Adicionaram-se 170 µL da solução de Rf em 3 mL de solução de pH 7,4 obtendo-se uma concentração final da Rf igual a 9,5 µmol/L (A_{450nm} = 0,1). Essa solução foi irradiada (λ_{IRR} = 450 nm) de 3 em 3 minutos por 15 minutos e as mudanças foram acompanhadas por UV-vis e por luminescência (λ_{EXC} = 375 nm). As atmosferas utilizadas foram ar, O_2 e N_2.

3.10.5.2 Ensaio riboflavina em tampão fosfato pH 7,4 e diferentes atmosferas na presença do complexo Mg-phen-fer

Fez-se uma solução saturada de riboflavina (Rf) em tampão fosfato pH 7,4 e filtrou para retirar o sólido não dissolvido. Preparou uma solução concentrada de complexo de concentração inicial de 1 mg/mL em tampão pH 7,4. Em uma cubeta, adicionaram-se 170 µL da solução de Rf (A_{450nm} = 0,1), variou a concentração de complexo de 4, 7, 9, 11, 13 e 15 µg/mL e completou com tampão pH 7,4 para no final obter um volume final de 3 mL. Cada solução foi irradia (λ_{IRR} = 450 nm) de 3 em 3 minutos por 15 minutos e as mudanças foram acompanhadas por UV-vis e por luminescência (λ_{EXC} = 375 nm). As atmosferas utilizadas foram ar, O_2 e N_2.

3.10.5.3 Stern-Volmer – Tempo de vida da riboflavina em diferentes atmosferas na presença do complexo Mg-phen-fer

Os tempos de vida de emissão da Rf foram medidos através do método de contagem de fótons únicos correlacionados no tempo (TCSPC) (Becker & Hickl), em um sistema composto por um controlador PicoHarp 300, driver PDL 800-B e por um detector da Becker & Hickl. As amostras foram excitadas com um laser de diodo pulsado de 450 nm (PicoQuant LDH series)

e os decaimentos foram monitorados no comprimento de onda máximos de emissão (525 nm). O software Origin 2019 foi utilizado para o ajuste dos dados experimentais de decaimento da função monoexponencial, baseado no método de ajustes de funções não lineares por mínimos quadrados.

A concentração da Rf foi mantida constante e igual a 0,38 µg/mL e variou o complexo de uma a cinco vezes maior que essa concentração (0,38 a 5,70 µg/mL), a soluções foram feitas em tampão fosfato pH 7,4. Esse procedimento foi feito para as atmosferas de O_2, N_2 e ar.

Os estudos realizados com os filmes e a aplicação microbiológica do complexo foram feitos em parceria com a Professora Sara Limbo na Università degli Studi di Milano no laboratório PackLab.

3.11 Filmes - Casting

O filme de amido de tapioca contendo o complexo foi obtido pelo processo de casting, neste, 1 g do polímero (5% $m_{amido}/m_{solvente}$), 250 mg (25% $m_{glicerol}/m_{amido}$) de glicerol e 15 mL de água deionizada foram misturados e essa solução foi aquecida e agitada até a gelatinização à 75 °C em um banho quente. Em 5 mL de água deionizada foram adicionados 10 mg de complexo até total solubilização, essa solução foi então adicionada à solução polimérica formando a blenda final. Essa blenda foi então vertida em placa de petri plástica de área igual a 56,75 cm^2 (Ø = 8,5 cm). O filme foi seco por 24-27 horas em 37 °C e 60 % de umidade relativa dentro de uma estufa com ventilação. Os filmes padrão seguiram o mesmo procedimento, porém os 20 mL de água foram adicionados de uma vez. A espessura foi medida usando um micrômetro digital Mitutoyo. Os filmes foram guardados em dessecador.

O filme de gelatina contendo o complexo foi obtido pelo processo de casting, neste, 0,5 g do polímero (5 % $m_{gelatina}/m_{solvente}$), 100 mg (20 %

$m_{glicerol}/m_{gelatina}$) de glicerol e 7 mL de água deionizada foram misturados e essa solução foi aquecida e agitada até a gelatinização à 90 °C em um banho quente. Em uma solução de 3 mL de água deionizada foram adicionados 10 mg de complexo até total solubilização, essa solução foi então adicionada à solução polimérica formando a blenda final. Essa blenda foi vertida em placa de petri plástica de área igual a 56,75 cm^2 (Ø = 8,5 cm). O filme foi seco por 16-18 horas em 23 °C dentro de uma estufa com ventilação. Os filmes padrões seguiram o mesmo procedimento, porém os 10 mL de água foram adicionados de uma vez. A espessura foi medida usando um micrômetro digital Mitutoyo. Os filmes foram guardados em dessecador.

3.12 Caracterização dos filmes

3.12.1 Massa seca

Metade de filmes, tanto de amido quanto de gelatina, foram colocados dentro de uma estufa a 103 °C até que a variação de peso fosse constante. O mesmo foi feito para os filmes contendo o complexo.

3.12.2 Atividade da água

Os experimentos para avaliar a influência e efeitos da atividade da água (a_w) sobre os filmes, foram realizados à temperatura de 25 °C utilizando o equipamento Aqualab 3TE (Decagon Devices Inc., USA). Os experimentos foram realizados em duplicata.

3.12.3 Transparência-opacidade

As medidas de transmitância da difusão óptica e a transparência foram realizadas com o espectrofotômetro UV-vis Lambda 650 (PerkinElmer) equipado com uma esfera integrativa de 150 mm. Para cada formulação dos filmes preparados foram medidos os valores de T_1, T_2, T_3 e T_4 (TABELA 1) os quais foram usados para definir o valor final de transparência-opacidade, seguinte equação:

$$\%Transparência = \left(\frac{T_4}{T_2} - \frac{T_3}{T_1}\right) x\ 100\%$$

Sendo os termos T_1 a T_4 definidos na TABELA 1.

TABELA 1. Significado dos termos T_1, T_2, T_3 e T_4 para o cálculo de opacidade dos filmes.

Termo	Amostra	Corpo Negro[1]	Padrão de Refletância	Representação
T_1	Não	Não	Sim	Luz incidente
T_2	Sim	Não	Sim	Total luz transmitida pelo filme
T_3	Não	Sim	Não	Luz desviada pelo equipamento
T_4	Sim	Sim	Não	Luz desviada pelo equipamento e amostra

[1]Corpo negro é um dispositivo para evitar dispersão de luz.

3.12.4 Infravermelho

Os espectros de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) dos filmes sem e com o complexo adicionado foram adquiridos com reflexão total atenuada (ATR) utilizando o espectrofotômetro FTIR Spectrum 100 (PerkinElmer) equipado com um acessório de ATR de cristal (Ge/Ge) à temperatura ambiente. Foram realizadas 64 varreduras para cada medida.

3.13 Estabilidade térmica e reatividade com oxigênio do ar

Para estes estudos os filmes foram armazenados dentro de sacos plásticos com ar ou no vácuo em temperaturas constantes de 30 °C e 40 °C. Após intervalos de tempo de 12 horas os filmes eram retirados dos sacos plásticos e realizadas medidas de infravermelho na região de 650 a 4000 cm^{-1}.

3.14 Permeabilidade ao oxigênio

A taxa de permeabilidade ao oxigênio dos filmes de amido sem e com o complexo foram determinadas sob umidade relativa de 40 % e temperatura

de 23 °C com o permeabilímetro Extrasolution modelo MultiPerm para O_2. Para o filme de gelatina, a taxa de permeabilidade de oxigênio foi determinada para umidade relativa de 20 % e temperatura de 23 °C. Para as medidas foi utilizado condicionamento alto do equipamento e medidas começaram após condicionamento.

3.15 Liberação controlada

A liberação controlada do complexo de Mg(II) dos filmes foi avaliada nos seguintes estimulantes/simuladores alimentares: 100 % água deionizada para sistemas alimentícios aquosos, 1:1 (etanol:água deionizada) para simular o teor alcoólicos de alimentos e 9:1 (etanol:água deionizada) para simular o teor de gordura de alimentos. Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente (25 °C) e com imersão total no meio. A cinética de liberação foi monitorada por espectroscopia UV-vis no comprimento de onda de 310 nm. Neste comprimento de onda o filme sem o complexo não absorve luz.

O seguinte procedimento foi usado no preparo das amostras: cortes de 0,5 :0,5 cm (0,025 cm^2) de filme sem o complexo (controle) e contendo o complexo (aproximadamente 0,006 mg dos complexos em cada corte de filme) e 3 mL do estimulante foram colocados em frascos transparentes de 10 mL. Em intervalos de tempo predeterminados foram obtidos os espectros de absorção da solução.

A partir de uma curva de calibração (Equação 16) realizada para o complexo, determinou-se a concentração do complexo liberado do filme em função do tempo de exposição.

Mg-phen-fer [ ] = 0,0349abs – 0,0049 (R^2 = 0,9998) Eq. 16

3.16 Escurecimento da maçã

Os experimentos de escurecimento de maçãs foram realizados a partir de medidas colorimétricas (colorímetro MINOLTA Chroma Meter mod. CR210) dos dois lados de fatias de maçãs (corte triangular) em função do tempo (a cada 30 minutos por um período de 3 horas). O equipamento foi padronizado contra um ladrilho branco (L* = 97,63, a* = -0,68, b* = 2,77).

O método utilizado para a quantificação da cor foi baseado na esfera colorida de Hunter,[74] onde as coordenadas são representadas por L* que indica luminosidade; coordenada a* indica vermelho (+) ou verde (-); e coordenada b* que indica amarelo (+) ou azul (-). A partir dos valores de Hunter L*, a*, b*, a diferença de cor total (ΔE), Equação 17.

$$\Delta E^{*}ab = \left[(\Delta L^{*})^{2} + \left(\Delta a^{*2}\right) + \left(\Delta b^{*2}\right)\right]^{1/2} \qquad \text{Equação 17}$$

Um dos lados da maçã foi recoberto com o filme de amido sem o complexo (controle) e o outro lado com o filme contendo o complexo, sendo as bandejas cobertas com filme plástico.

O valor de ΔE* (Eq. 17) foi utilizado para verificar a alteração de coloração da maçã, indicando a magnitude da diferença de cor entre tempos distintos. A escala abaixo é utilizada para verificar a diferença entre duas cores:[75]

- ΔE*ab< 0,2: diferença não perceptível,
- 0,2 <ΔE*ab< 0,5: diferença muito pequena,
- 0,2 <ΔE*ab< 0,5: diferença pequena,
- 2<ΔE*ab< 3: diferença pouco perceptível,
- 3<ΔE*ab< 6: diferença perceptível,
- 6<ΔE*ab< 12: grande diferença,
- ΔE*ab> 12: cores diferentes.

3.17 Microbiologia

Para este estudo foram realizados testes com as seguintes linhagens de Bactérias: *Listeria innocua, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Samonella ssp, Escherichia coli, Pseudomonas putida, Pseudomonas fluorescens S8, Pseudomonas fluorescens S9.* As linhagens de Fungos: *Aspergillus niger, Penicillium notatum, Rhizopus oryzae*.

A atividade antimicrobiana do complexo foi testada, empregando dois meios de culturas, em particular o caldo de soja tripticaseína para bactérias e caldo de extrato de malte para fungos. Os microrganismos que foram inoculados e tiveram sua dispersão na forma de uma suspensão de esporos, no mesmo meio de cultura, com densidade óptica (OD) a 600 nm entre 0,4< OD< 0,5.

3.17.1 Preparo das bactérias

As cepas bacterianas *Staphylococcus aureus, Pseudomonas putida, Pseudomonas fluorescens S8, Pseudomonas fluorescens S9* foram cultivadas em meio de caldo de soja tripticaseína (TSB) a 30 °C por 24 horas, enquanto as demais cepas foram cultivadas no mesmo meio de cultura, porém a 37 °C. Com os microrganismos crescidos, foram suspendidos em água deionizada para serem inoculados.

Após o preparado do meio TSB com 8 g/L de ágar, foi esterilizado a 118 °C por 20 minutos. Em placas de petri foram adicionados 13 mL do meio preparado anteriormente e inoculados 300 μL da suspenção de bactérias. Após solidificação do meio, 5 μL de solução de diferentes concentrações do complexo e ligante foram inoculados na superfície do meio solidificado. Após 24 horas de incubação na temperatura de 30 °C ou 37 °C, dependendo do patógeno, foi verificado se houve crescimento bacteriano.

Para o ligante ácido ferúlico, foram dissolvidos em 100 µL de etanol e completado a diferença com água deionizada e esterilizada para obter a concentração desejada.

As culturas de controle (controle negativo) foram sempre preparadas para as bactérias em meio de caldo de soja tripticaseína com ágar, porém sem os complexos e ligante somente o solvente utilizado (água).

3.17.2 Preparo dos fungos

Os bolores foram cultivados em meio de ágar com extrato de malte com a seguinte composição: 8 g/L de ágar, 20 g/L de extrato de malte, 2 g/L de peptona de soja, 20 g/L de glicose, o pH foi ajustado para pH 5,8 e o meio foi esterilizado a 118 °C por 20 min. As culturas de fungos foram incubadas a 30 °C por até 14 dias nesse meio para crescimento. Com os microrganismos crescidos, foram suspendidos em água deionizada para serem inoculados.

Em tubos falcon, diferentes massas do complexo foram solubilizadas e agitadas em 3 mL de água esterilizada sendo seguido pela adição de 7 mL de MEA esterilizado a 118 °C por 20 minutos. Está solução foi versada em placas de petri e após solidificação do meio 5 µL de solução dos esporos dos fungos foram inoculados na superfície do meio solidificado. Após 48 horas de incubação em 30 °C, foi verificado o crescimento ou dos fungos.

Para o ligante ácido ferúlico, a massa foi dissolvida em 300 µL de etanol, seguida pela adição de 10 mL de MEA esterilizado a 118 °C por 20 minutos. Sendo o resto do procedimento o mesmo para os complexos.

As culturas de controle (controle negativo) foram sempre preparadas tanto para os fungos em MEA sendo a mesma composição, porém sem os complexos ou ligante.

3.18 Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE)

A cinética de Michaelis-Menten foi avaliada de acordo com o método espectrofotométrico desenvolvido por Ellman.[76] Uma solução estoque de 0,1 mg/mL foi preparada dissolvendo o complexo em tampão tris-HCl (pH 8,0). Diluições em uma concentração de 0-20 μg/mL foram usados para os estudos de inibição. Misturas contendo 0-50 μL de complexo; 2,64 mL de uma solução contendo 50 mmol/L de tampão tris-HCl (pH 8,0), 100 μL de 10 mmol/L ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB, reagente de Ellman), volumes variáveis de 1,38 mmol/L de iodeto de acetiltiocolina foram incubadas em temperatura ambientes. Posteriormente, a reação foi iniciada com adição de 50 μL de solução enzimática (5,0 U/mL de AChE). A hidrólise do substrato pode ser observada pela formação de um composto amarelo (5-tio-nitrobenzoato). A absorbância foi medida a 412 nm. As medições foram feitas por 15 minutos considerando a velocidade inicial referente aos primeiros 5 min da reação.

3.19 Ensaio de IC_{50} em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y

A linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y foi cultivada em meio de cultura DMEM/DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Gibco.) suplementado com 1 % Piruvato, aminoácidos 100α e 10 % ATB (antibiótico). Durante o crescimento as células foram mantidas em garrafas de cultivo (75 mL) à 37 ºC em estufa com atmosfera de 5 % de CO_2. Ao atingirem o crescimento necessário (80 % de confluência) o meio de cultura foi removido da garrafa e as células foram tratadas com 2 mL de uma solução 10 % de tripsina/EDTA (enzima que quebra ligações covalentes e solta as células das garrafas) e deixadas reagir por 2 minutos. A tripsina foi neutralizada utilizando 2 mL do meio de cultura e a suspensão resultante foi transferida para um tubo cônico e centrifugada à 1200 RPM (rotações por

minuto) por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi suspendido novamente em um novo meio DMEM/DMEM-F12. Por fim, a suspensão foi semeada em uma placa de 96 poços com concentração final de $2{,}0x10^4$ células/poço.

Após 24 horas em estufa para um processo de adesão à placa multipoços, a linhagem SH-SY5Y foi tratada com uma diluição em série do complexo Mg-phen-fer dentro de uma faixa de concentração de 200 – 0,39 µM. Para o ensaio de IC_{50} as placas tratadas com o complexo foram mantidas em estufa à 37 ºC e atmosfera 5 % de CO_2 por 24 horas. Ao fim do tempo de incubação as placas foram tratadas com uma solução 0,75 mg/mL de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) e deixadas por no mínimo 3 horas em estufa. O meio de cultura foi então retirado dos poços e adicionou-se 100 µL de DMSO em cada poço. A leitura de absorbância da solução resultante foi realizada em um leitor de Elisa (Thermo Plate TP-READER) com filtro em 540nm e a porcentagem de viabilidade celular calculada de acordo com a Equação 18:

$$\%\ células\ viáveis = \left(\frac{D.O.amostra}{D.O.controle}\right)\ x\ 100\% \qquad \text{Eq. 18}$$

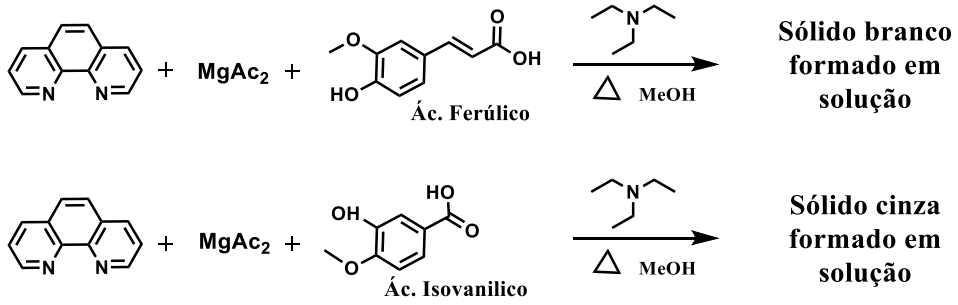
4 Resultados e Discussão

4.1 Síntese e Caracterização

O complexo principal deste trabalho é o complexo de Mg(II) que contém os ligantes ácido ferúlico (fer) e 1,10-fenantrolina (phen) designado como Mg-phen-fer. Contudo, o complexo que contêm o ácido isovanilico (iso) foi usado para determinar todo o protocolo de elucidação estrutural dessa classe de complexos, sendo denominado Mg-phen-iso.

4.1.1 Síntese

A síntese do complexo de Mg(II) utiliza-se de $Mg(CH_3COO)_2$, 1,10-fenantrolina (phen) e um ácido fenólico na proporção 1: 1: 1 em metanol com TEA, ESQUEMA 1. A reação baseia-se em outros procedimentos nos quais o grupo de pesquisa vem trabalhando.[41,42] Os ácidos fenólicos utilizados foram o ácido isovanilico (iso) e ácido ferúlico (fer).



ESQUEMA 1. Esquema reacional para obtenção dos complexos de Mg(II).

Independentemente do ácido fenólico utilizado, a reação levou à formação de uma mistura de complexos hexacoordenados e tetracoordenados ilustrados na FIGURA 8.

Todas as tentativas para obtenção de um mono cristal que permitisse a análise estrutural do complexo falharam. Por este motivo a geometria do complexo foi otimizada por cálculo computacional usando a teoria do funcional de densidade (DFT) para corroborar com os dados obtidos experimentalmente a partir das caracterizações por infravermelho (IV),

espectrometria de massas (massa ESI), espectroscopia de RMN e propriedades espectroscópicas.

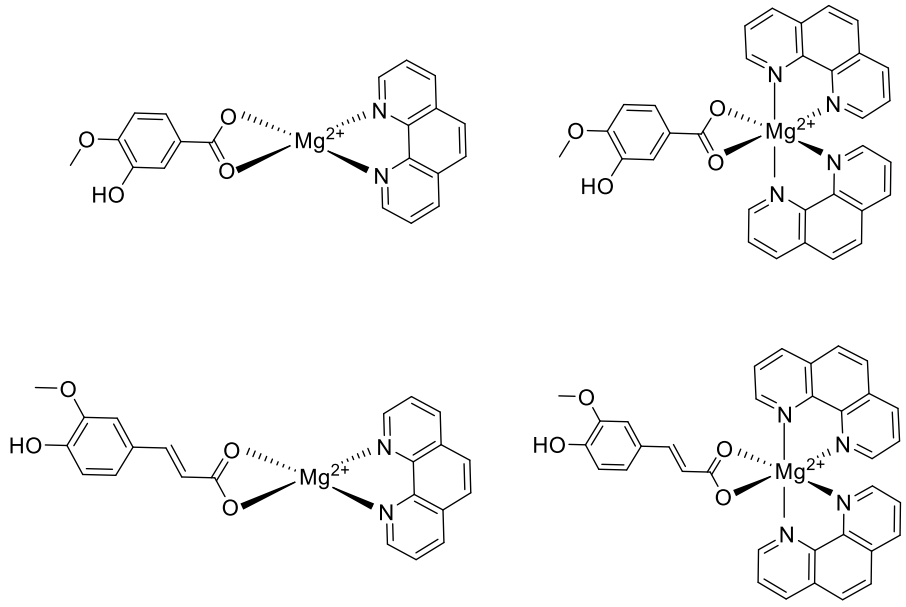


FIGURA 8. Estruturas hexa- e tetra-coordenadas dos complexos obtidos na reação utilizando o ácido isovanilico (superior) e ácido ferúlico (inferior) como ligantes.

4.1.2 Infravermelho

A coordenação dos ácidos fenólicos é proposta pela desprotonação do grupo ácido carboxílico presente na estrutura dos ácidos fenólicos, como mostrado na FIGURA 8.

O primeiro indício que o ácido fenólico se coordenou ao Mg(II) formando um complexo é avaliado por infravermelho, onde o estiramento relativo ao grupo carboxílico tem sua intensidade deslocada e diminuída. Para o complexo Mg-phen-fer, a diferença entre o complexo formado e o ligante livre é mostrada na FIGURA 9.

Pode-se observar que a coordenação do ácido ferúlico ao cátion Mg(II) leva a uma supressão do estiramento da carboxila (C=O), FIGURA 9. Os estiramentos em 1690 cm^{-1} e 1665 cm^{-1} observados no ligante livre não estão mais presentes no complexo. Esta diferença indica que com a

coordenação o grupo C=O perde sua característica de dupla ligação sendo suprimido ou deslocado para menores números de onda.[77]

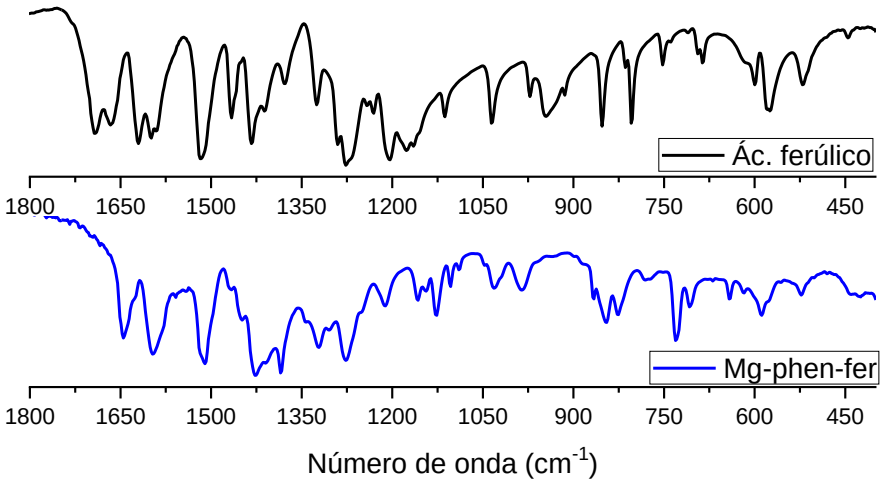


FIGURA 9. Espectro de infravermelho do ácido ferúlico (preto) e do complexo Mg-phen-fer (azul).

4.1.3 RMN

O espectro de ^{1}H-RMN do complexo Mg-phen-iso a 298 K em MeOD, FIGURA 10, mostra que os sinais da parte correspondente ao ligante iso (6,7-7,5 ppm) e da parte do ligante phen (7,5-9,2 ppm) são alargados e dificulta a quantificação exata do número de hidrogênios presente na molécula. O alargamento do sinal para os complexos poderia estar associado a quatro fatores principais. Um deles seria a presença de metal paramagnético, que não é o caso do Mg(II). Um segundo fator poderia estar associado ao isótopo ^{25}Mg (spin 5/2) contudo esse isótopo apresenta baixa abundância natural (<10 %).[78] Poderia também ser relativo à relaxação do momento quadrupolar do Mg(II) em relação aos prótons adjacentes.[78] Além desses fatores, o alargamento pode estar associado a reações de troca de ligantes.[79]

Nesse contexto, foram realizados experimentos de ^{1}H-RMN variando a temperatura entre 253 a 298 K para o Mg-phen-iso. Como mostrado na FIGURA 10, durante o decréscimo progressivo da temperatura, no espectro de ^{1}H-RMN houve uma separação dos sinais do ligante fenantrolina em dois

diferentes conjuntos: um com linhas finas que lembra phen livre em solução e outro com sinais alargados como esperado para phen coordenada ao metal. Assim, para investigar o efeito da temperatura na dinâmica de complexação do Mg-phen-iso, experimentos de RMN-DOSY foram realizados.

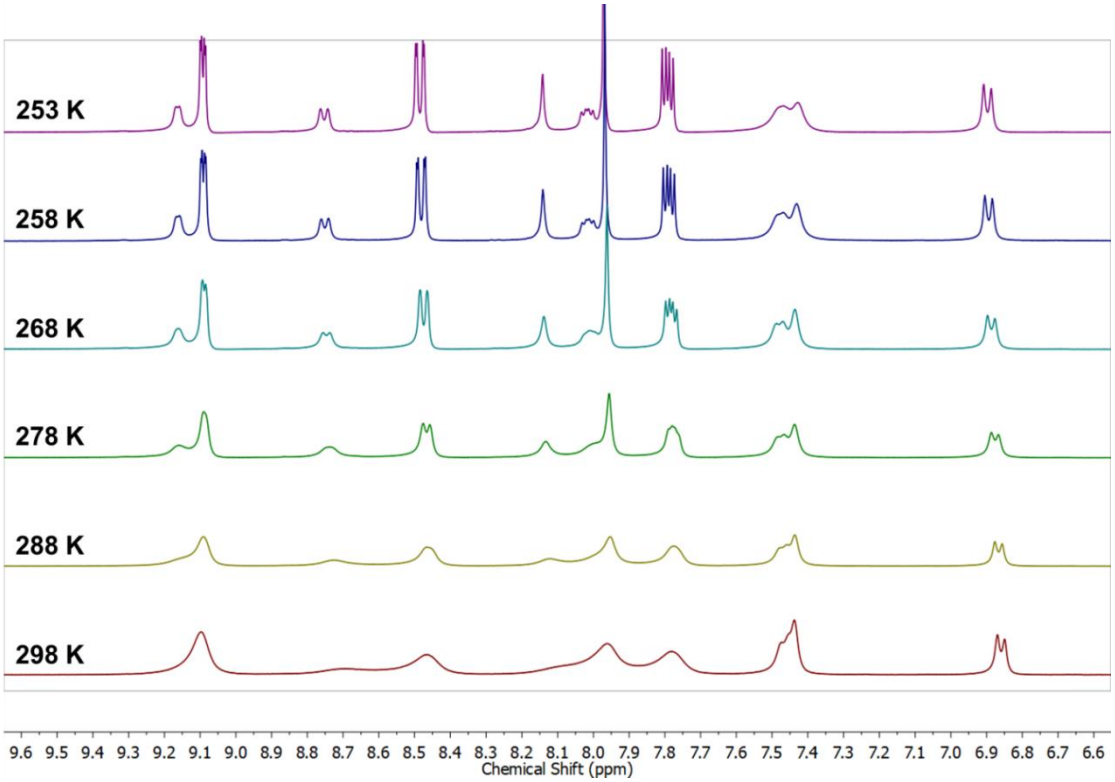


FIGURA 10. Espectros de ^{1}H-RMN de temperatura variável do complexo Mg-phen-iso em MeOD.

O mapa RMN-DOSY coletado a 298 K mostra dois coeficientes de difusão distinguíveis (FIGURA 11, lado esquerdo), provando a existência de duas componentes individuais. A componente com sinais associados a phen exibe difusão mais rápida (D = 1,53 x10^{-5} mm^2/s) em comparação com o segundo componente, que é atribuída ao ácido isovanilico (D = 1,55 x10^{-6} mm^2/s). Por outro lado, no mapa coletado a 253 K (FIGURA 11, lado direito), duas difusões distinguíveis ainda são observadas, mas com algumas diferenças.

A 253 K, a componente com difusão mais rápida (D = 1,07 x10^{-5} mm^2/s), permanece associado a phen livre, aqui com uma difusão menor por

causa da temperatura mais baixa, enquanto a segunda componente exibe um coeficiente de difusão (D = 1,22 x10^{-6} mm^2/s) associado aos sinais de ambos os ligantes, isto é, associado aos sinais alargados da phen e aos sinais do ácido isovanilico, indicando que esses dois ligantes estão complexados no mesmo centro de magnésio. Esses resultados indicam que, em baixa temperatura, o equilíbrio químico muda para a formação de apenas um complexo.

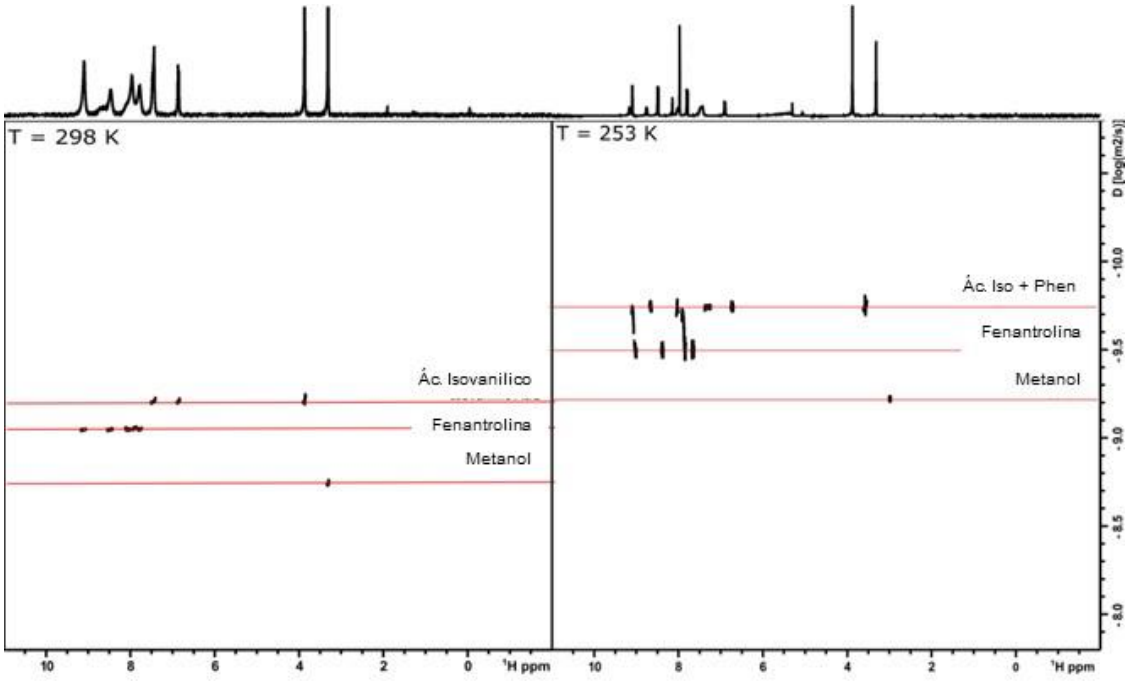


FIGURA 11. Mapa ^{1}H-DOSY-RMN obtido para o complexo Mg-phen-iso em MeOD a 298 K (painel esquerdo) e 253 K (painel direito).

Em temperaturas intermediárias (278-258 K, FIGURA 12), a dinâmica de equilíbrio da fenantrolina é muito bem observada, por exemplo, suas ressonâncias se dividem em dois conjuntos de sinais, ambos com dois coeficientes de difusão diferentes.

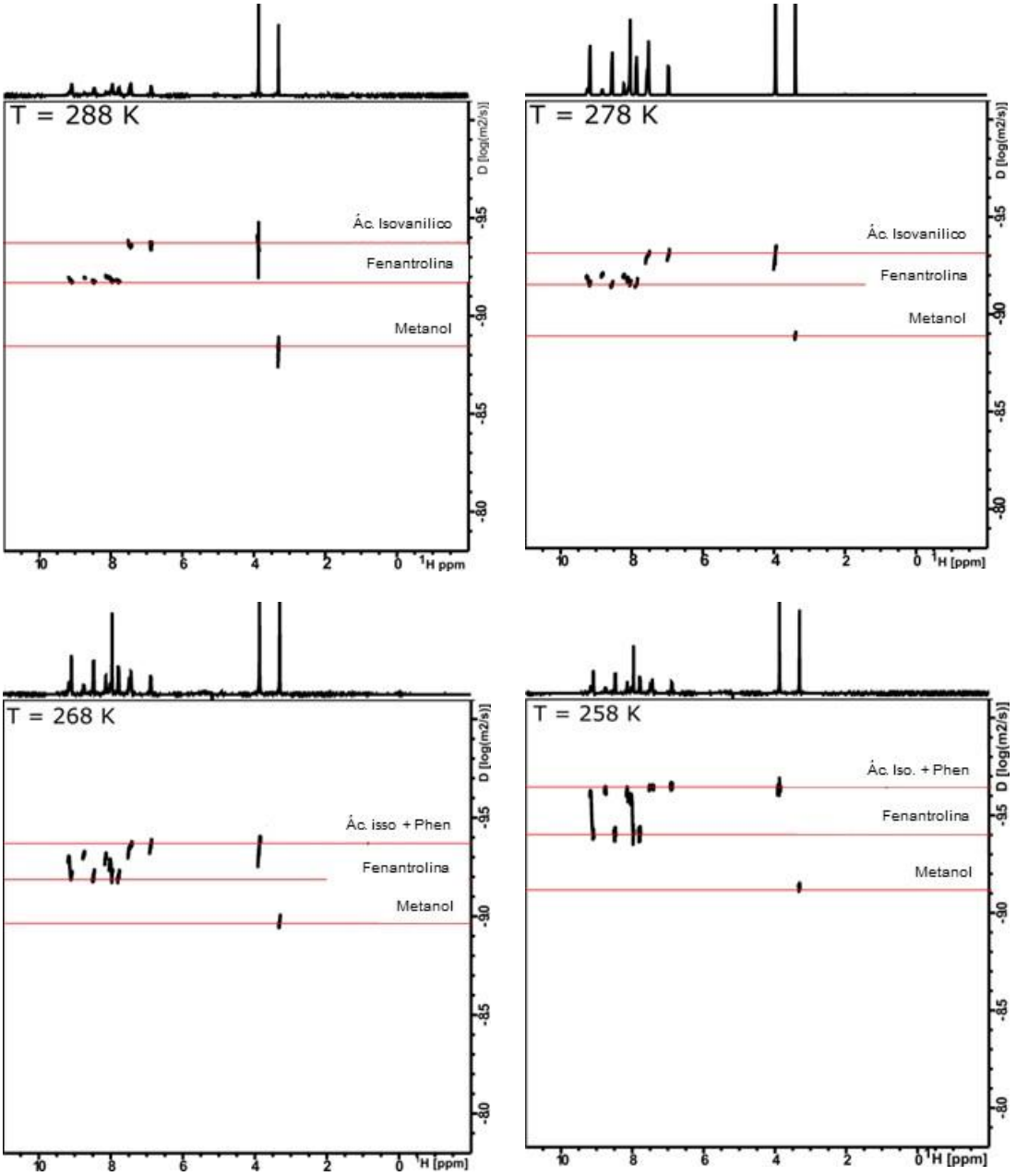


FIGURA 12. Mapas ^{1}H-DOSY-RMN obtidos para o complexo Mg-phen-iso, a 288 K (lado superior esquerdo), a 278 K (lado superior direito), a 268 K (lado inferior esquerdo) e a 258 K (lado inferior direito).

A partir dos estudos feitos com o Mg-phen-iso, foi possível estabelecer um protocolo de caracterização para complexos de Mg(II) contendo fenantrolina e ácidos fenólicos em sua esfera de coordenação utilizando ^{1}H-RMN independente do solvente utilizado.

Os espectros de ^{1}H-RMN para o complexo Mg-phen-fer e dos ligantes fenantrolina e do ácido ferúlico em D_2O são mostrados na FIGURA 13.

Como é visto, a coordenação desses ligantes ao centro metálico de Mg(II) levou uma alteração nos deslocamentos químicos em relação aos ligantes livres, indicando que houve a coordenação. Além disso, o espectro do complexo Mg-phen-fer é alargado a 298 K, o alargamento dos sinais da parte correspondente ao ligante fer (6,0-7,2 ppm) e da parte do ligante phen (7,4-9,0 ppm) dificulta a quantificação exata do número de hidrogênios presente na molécula.

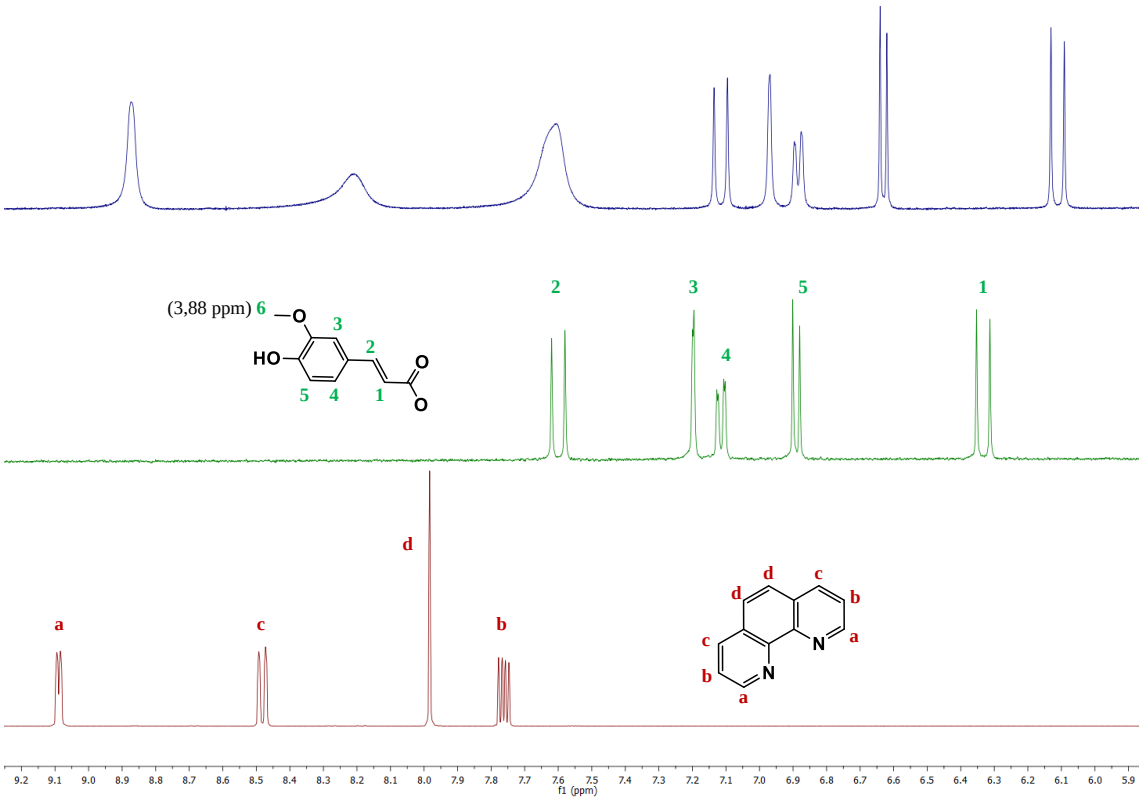


FIGURA 13. ^{1}H-RMN do complexo Mg-phen-fer a 298 K em D_2O (azul) comparado com os espectros do ácido ferúlico (verde) e da 1,10-fenantrolina (vermelho).

Nesse contexto, foram realizados experimentos de ^{1}H-RMN variando a temperatura entre 278 K a 313 K para Mg-phen-fer, FIGURA 14. No caso do complexo Mg-phen-fer, durante o decréscimo progressivo da temperatura, no espectro de ^{1}H-RMN, não houve uma separação dos sinais do ligante fenantrolina, que continuaram alargados. Os sinais referentes ao fer com a diminuição da temperatura tiveram um alargamento no sinal.

Assim, para investigar o efeito da temperatura na dinâmica de complexação do Mg-phen-fer, experimentos de RMN-DOSY foram feitos.

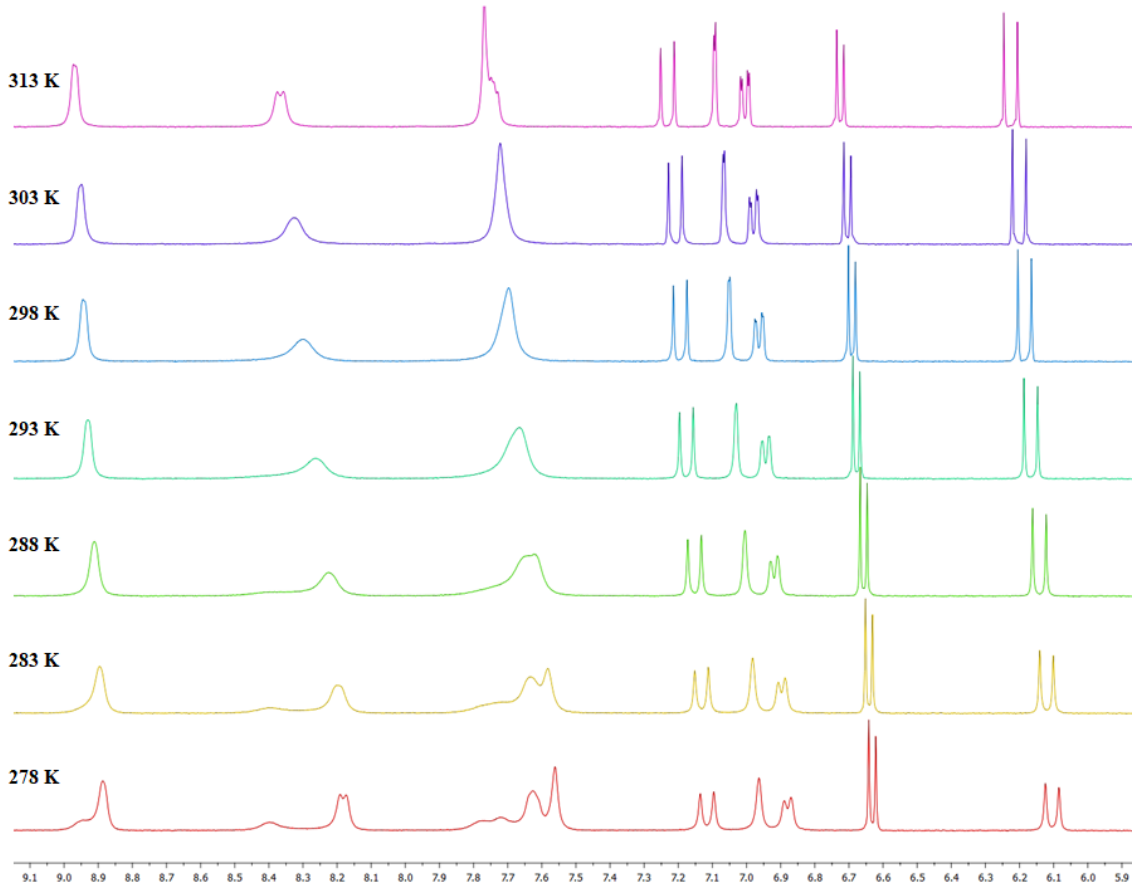


FIGURA 14. Espectros de ^{1}H-RMN de temperatura variável do complexo Mg-phen-fer em D_2O.

O mapa ^{1}H-RMN-DOSY coletado a 298 K mostra dois coeficientes de difusão distinguíveis (FIGURA 15, lado esquerdo), contudo ao contrário do complexo Mg-phen-iso, para o complexo contendo o ácido ferúlico como ligante, as duas difusões são próximas e parte delas sobreponíveis. A componente com sinais associados a phen exibe difusão mais rápida (D = 5,01 x10^{-4} mm^2/s) em comparação com o segundo componente, que é atribuído ao ácido ferúlico (D = 4,39 x10^{-4} mm^2/s).

Por outro lado, no mapa coletado a 278 K (FIGURA 15, lado direito), há apenas uma difusão (D= 2,23 x10^{-4} mm^2/s). Nessa temperatura a única

difusão está associada aos sinais de ambos os ligantes, indicando que esses dois ligantes estão complexados no mesmo centro de magnésio.

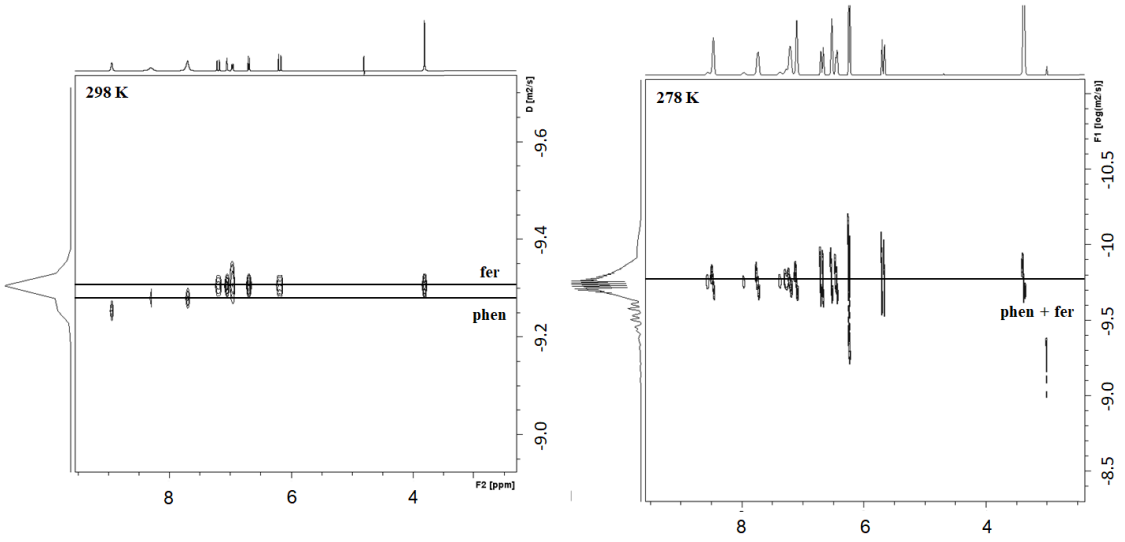


FIGURA 15. Mapa 1H-DOSY-RMN obtido para o complexo Mg-phen-fer em D_2O a 298 K (painel esquerdo) e 278 K (painel direito).

Em temperaturas intermediárias (283-293 K, FIGURA 16), praticamente não há uma dinâmica de equilíbrio, isto é, apenas uma difusão está presente indicando que apenas uma estrutura é a favorecida. Em temperaturas ≥298 K (303-313 K, FIGURA 16), acontece uma separação das difusões, provando a existência de dois componentes individuais.

A diferença mais proeminente entre os dois complexos é que para temperatura ambiente o complexo Mg-phen-iso possui um equilíbrio dinâmico entre as estruturas. Logo, a causa do alargamento do sinal visto por ^{1}H-RMN é provavelmente governado pela troca rápida do ligante fenantrolina. Enquanto para o complexo Mg-phen-fer em temperatura ambiente apenas uma estrutura é mais favorecida sendo esse equilíbrio dinâmico observado para temperaturas mais elevadas. Assim, essa hipótese sobre o comportamento em solução dos complexos foi estudada por espectrometria de massas.

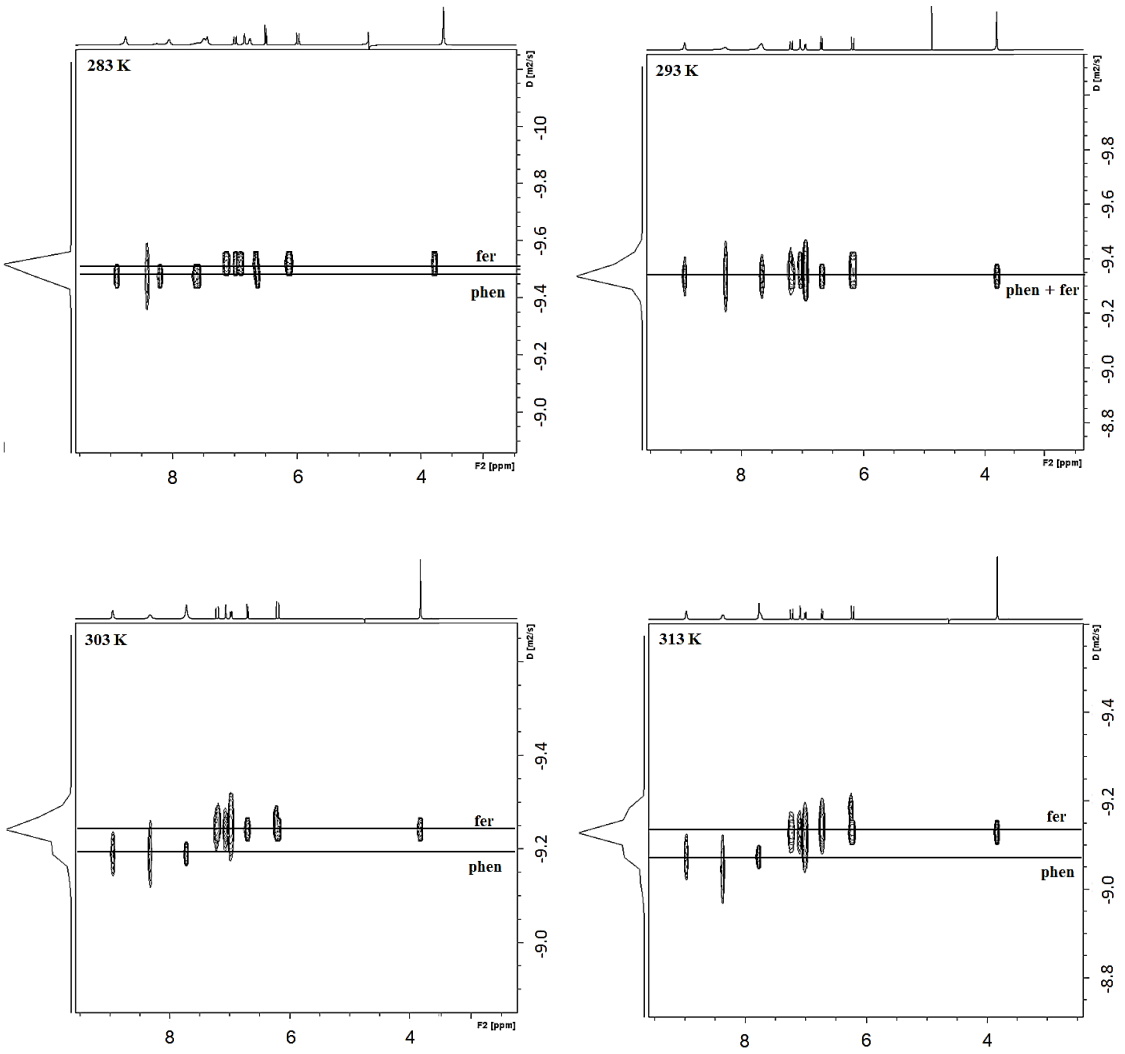


FIGURA 16. Mapas ^{1}H-DOSY-RMN obtidos para o complexo Mg-phen-fer, a 283 K (lado superior esquerdo), a 293 K (lado superior direito), a 303 K (lado inferior esquerdo) e a 313 K (lado inferior direito).

4.1.4 Espectrometria de massas

Para melhor compreender o comportamento em solução dos complexos preparados, utilizou-se da espectrometria de massas de injeção direta para estudar as espécies presentes em solução uma vez que os espectros de RMN eram sempre alargados o que dificultava propor uma estrutura química justa para os compostos. A principal dificuldade se dava pela contagem de hidrogênios pois essa era sempre a mesma independente das mudanças observadas nos espectros.

O espectro de massas de uma solução metanólica do complexo Mg-phen-iso que é preparada e medida logo em sequência, mostra a presença de três sinais em *m/z* 551,1578 ($[Mg(phen)_2(iso)]^+$), *m/z* 331,0887 ($[Mg(phen)(iso)]^+$), e em *m/z* 909,2112 (Mg-bi-iso) (pico de baixa intensidade). Esses sinais correspondem, respectivamente, a dois complexos mononucleares e um complexo binuclear, além de um sinal correspondendo a uma fenantrolina livre em *m/ z* 181,0769, FIGURAS 17.

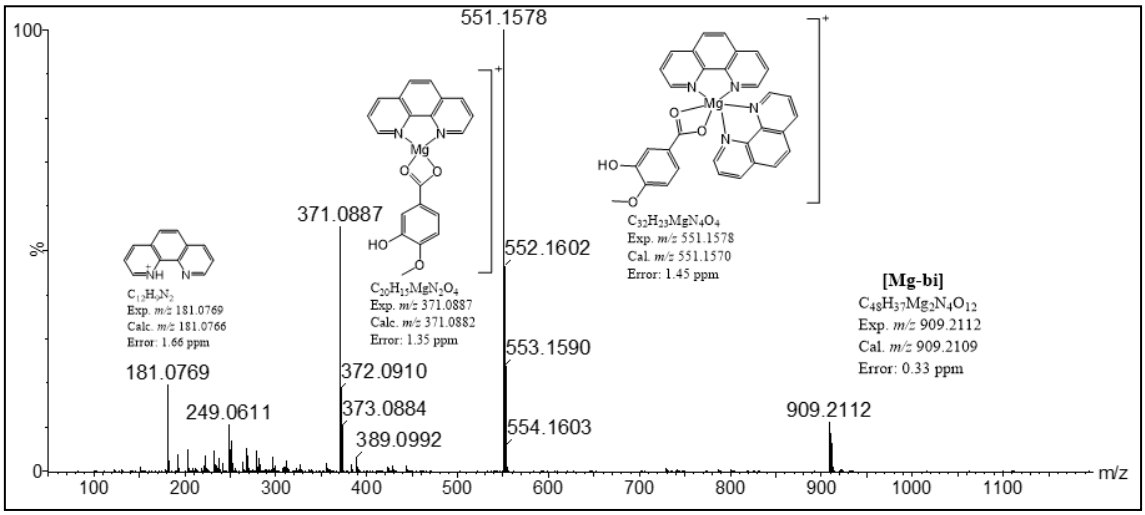


FIGURA 17. Espectro ESI(+)-MS de uma solução metanólica recém preparada do complexo Mg-phen-iso.

O padrão de fragmentação do íon de *m/z* 551,16 a 35 eV mostra a perda de um ligante phen (FIGURA 18, superior), dando origem a um complexo tetracoordenado $[Mg(phen)(iso)]^+$ (*m/z* 371,08) e indicando que a interação do centro metálico Mg(II) com ácido isovanilico é mais forte do que com phen na fase gasosa. Ao aumentar a energia de colisão para >50 eV, nenhuma perda adicional de ligante ocorre; em vez disso, foi observada a formação de fragmentos a partir da clivagem de ligações covalentes (*m/z* 356,06, 327,09 e 312,07).

O espectro de MS/MS de *m/z* 909,21 (Mg-bi-iso) em 20 eV mostra um pico base em *m/z* 729,14, correspondendo à perda de um ligante phen [(Mg-bi-iso)-1fen]$^+$, e dois picos abundantes de baixa intensidade em *m/z* 551,15

e 371,08, que foram atribuídos, respectivamente, aos íons $[Mg(phen)_2(iso)]^+$ e $[Mg(phen)(iso)]^+$, FIGURA 18.

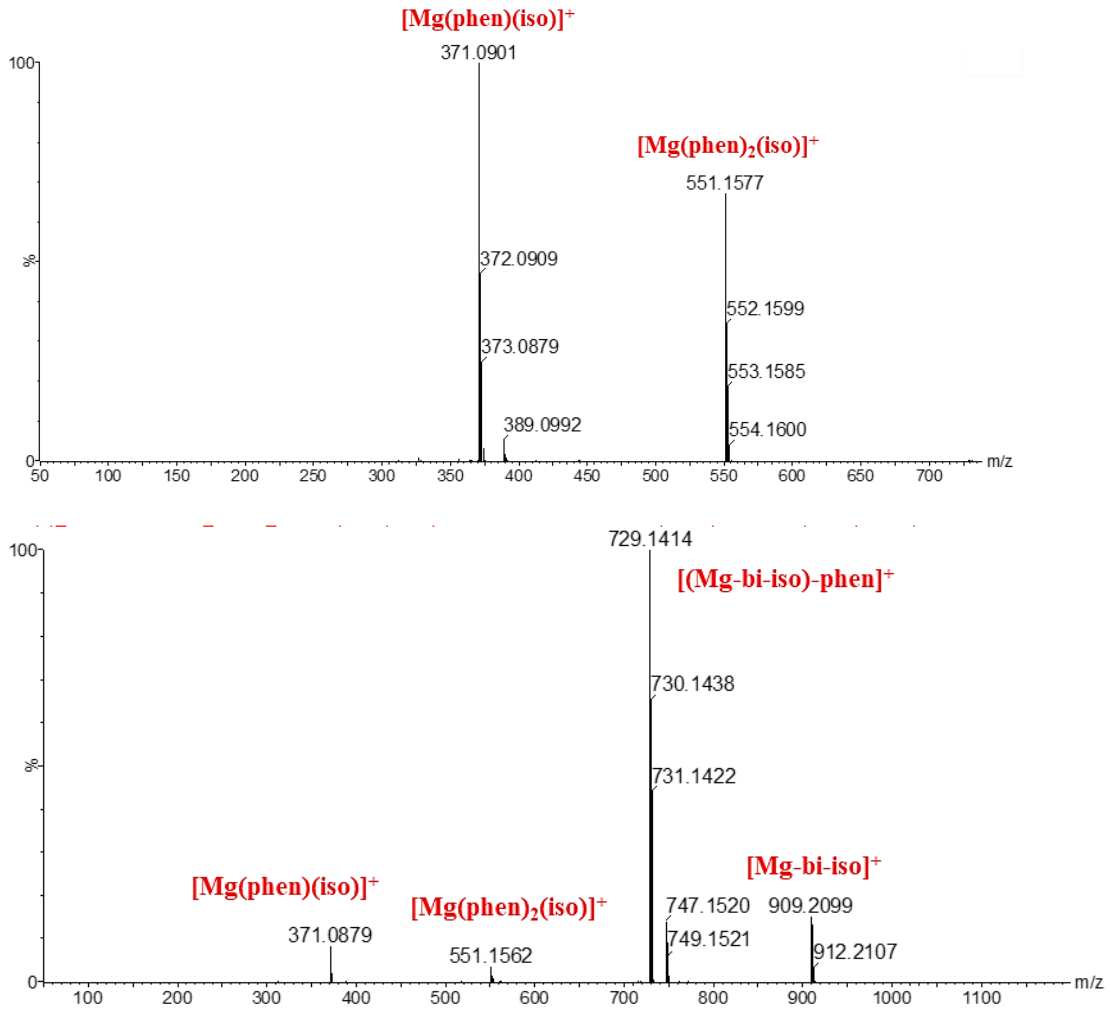


FIGURA 18. ESI(+)-MS/MS do íon *m/z* 551,15 (painel superior) e íon *m/z* 909,21 (painel inferior) em metanol.

Assim como feito para os experimentos de ^{1}H-RMN, a partir do complexo Mg-phen-iso, determinou-se o protocolo de caracterização. O espectro de massas de uma solução aquosa do complexo Mg-phen-fer que é preparada e medida em sequência, mostra a presença de três sinais em *m/z* 577,1738 ($[Mg(phen)_2(fer)]^+$), *m/z* 397,0995 ($[Mg(phen)(fer)]^+$), e em *m/z* 987,2664 (Mg-bi-fer) (pico de baixa intensidade). Esses sinais correspondem, respectivamente, a dois complexos mononucleares e um

complexo binuclear, além de um sinal correspondendo a uma fenantrolina livre em *m/z* 181,0757, FIGURAS 19.

Diferentemente ao observado para o complexo contendo o ligante ácido isovanilico, a espécie hexacoordenada é o pico base e a estrutura mais favorecida em relação a espécie tetraédrica. Outra diferença notada é que a quantidade de phen livre é menor em comparação com o espectro de massas do complexo Mg-phen-iso.

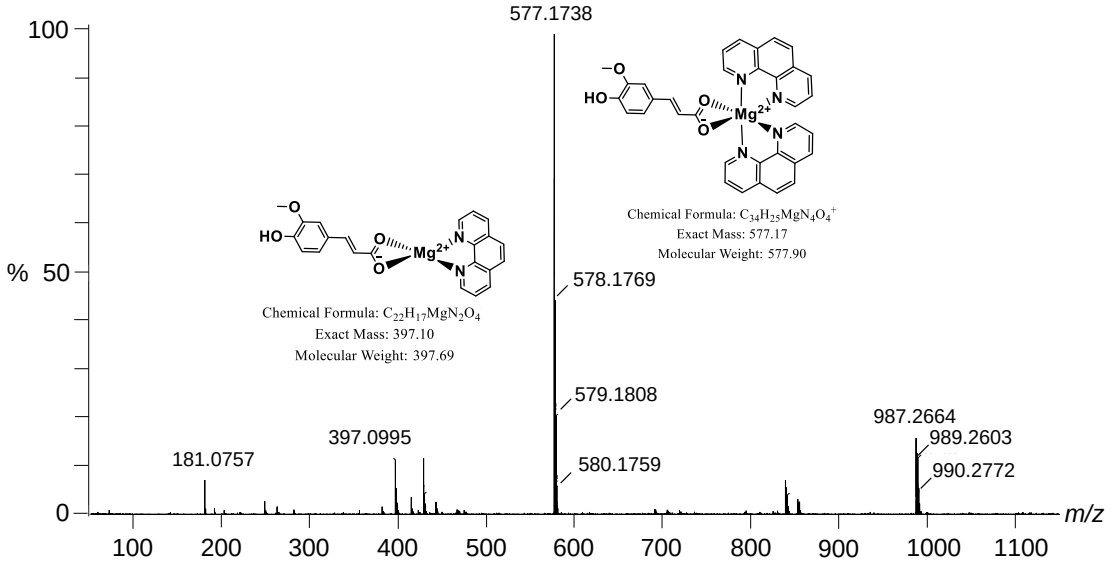


FIGURA 19. Espectro ESI(+)-MS de uma solução aquosa recém preparada do complexo Mg-phen-fer.

O padrão de fragmentação do íon de *m/z* 577,17 a 35 eV mostra a perda de um ligante phen (FIGURA 20 inferior), dando origem a um complexo tetracoordenado $[Mg(phen)(fer)]^+$ (*m/z* 371,08) e indicando que a interação do Mg(II) com o ácido ferúlico é mais forte do que com phen na fase gasosa. Ao aumentar a energia de colisão para >50 eV, nenhuma perda adicional de ligante ocorre; em vez disso, foi observada a formação de fragmentos a partir da clivagem de ligações covalentes (*m/z* 382,08; 336,08 e 212,05).

O espectro de MS/MS de *m/z* 987,25 (Mg-bi-fer) em 20 eV mostra um pico de base em *m/z* 807,19, correspondendo à perda de um ligante phen $[(Mg\text{-}bi\text{-}fer)\text{-}1phen]^+$, e dois picos com abundância baixa em *m/z* 577,16 e 397,10, que foram atribuídos aos íons $[Mg(phen)_2(fer)]^+$ e $[Mg(phen)(fer)]^+$, respectivamente, FIGURA 20.

Deve-se notar que, independentemente da solução de complexo, quando esta é mantida no escuro por três dias, apenas dois complexos estão presentes, Mg-hex e Mg-tet, além de phen livre, indicando a característica transitória das espécies de massas alta. Em concordância, o Mg(II) forma preferencialmente complexos octaédricos, embora complexos tetraédricos também tenham sido relatados dependendo da força do ligante.[80,81]

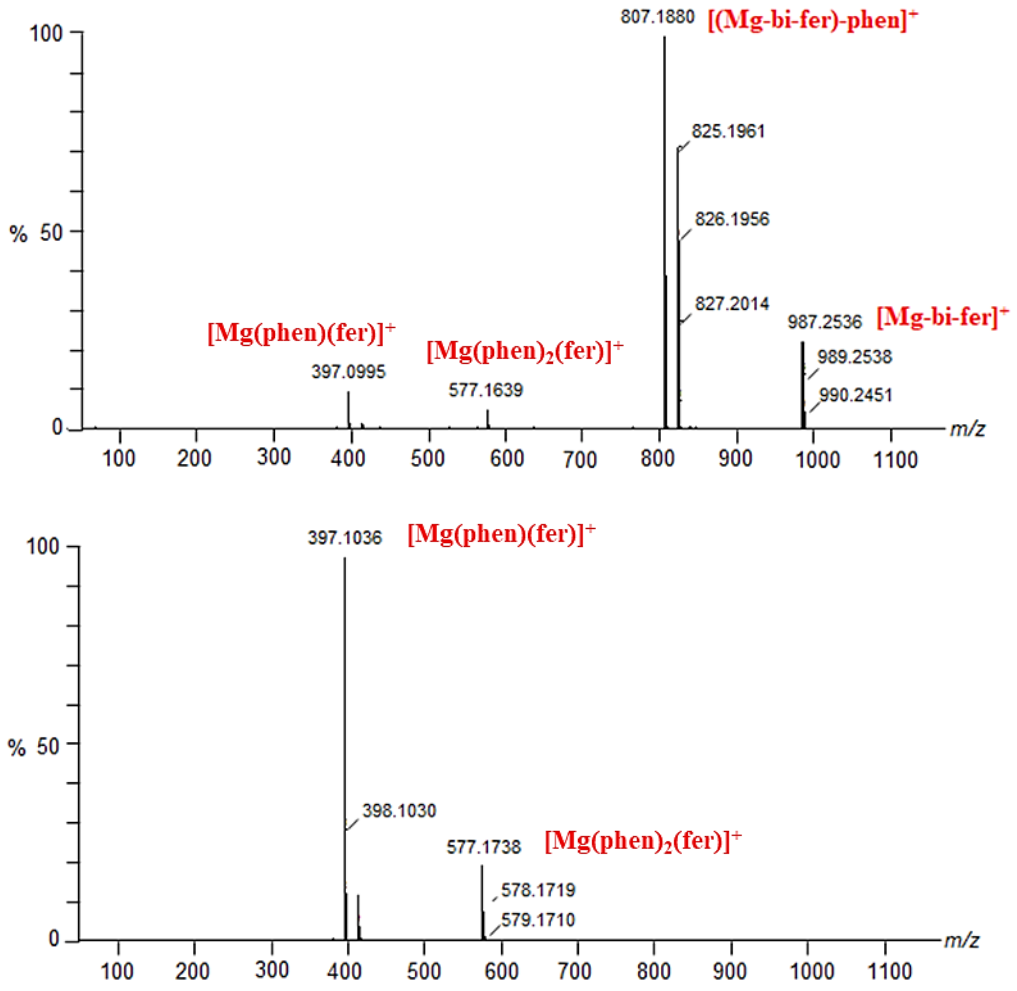


FIGURA 20. ESI(+)-MS/MS do íon m/z 577,17 (painel inferior) e íon m/z 987,25 (painel superior) em água.

Assim, a temperatura ambiente, o rápido equilíbrio entre as duas estruturas pode ser responsável pelas duas difusões diferentes observadas pelo DOSY, sendo este padrão é consistente com o equilíbrio entre os complexos hexacoordenados e tetracoordenados e pode ser associado a um processo rápido de troca de ligante phen. Além disso, a presença de um sinal de fenantrolina livre em *m/z* 181,08 reforça a hipótese de um processo dinâmico de troca de ligante de phen. Sendo esse processo de equilíbrio mais proeminente no complexo Mg-phen-iso do que no complexo Mg-phen-fer, este último como mostrado pelo espectro de massas e pelo DOSY a estrutura hexacoordenada é a mais favorecida e majoritária.

O pequeno tamanho do íon Mg(II) facilita a repulsão estérica entre os ligantes phen, podendo ocorrer um controle estérico entre duas unidades phen, promovendo uma interconversão entre as duas estruturas identificadas no espectro de massa o que seria o principal fator de alargamento do sinal visto no ^{1}H-RMN. No mais, há relatos na literatura onde complexos de Cu(I) contendo ligantes phen também é observado um equilíbrio entre as estruturas de Cu(I).[79]

4.1.5 Propriedades espectroscópicas

O ácido ferúlico, em pH neutro ou em solução orgânica, possui transições eletrônicas abaixo de 400 nm sendo caracterizado pelas absorções em 320 nm e 295 nm sendo transições do tipo n→π*. Além de uma absorção em 235 nm devido a uma transição do tipo π →π*,[82,83] FIGURA 21.

Quando ocorre a coordenação do ácido ferúlico ao centro metálico Mg(II), as absorções são deslocadas para menores comprimentos de onda, variando para 310 nm e 290 nm (n→π*), FIGURA 21. Além disso, o complexo Mg-phen-fer possui uma absorção intensa em 265 nm que está associada a transição da fenantrolina tipo π→π*. As transições eletrônicas

observadas no complexo estão relacionadas com transições intra- e inter-ligantes, pois como o íon Mg(II) possui camada de valência fechada e não apresenta orbitais d, as transições do tipo transferência de carga metal para ligante (MLCT) ou transferência de carga ligante para metal (LMCT) ou de campo ligante não são observadas.

Comportamento semelhante é observado quando o ácido ferúlico é coordenado ao Cu(II),[84] isto é, a coordenação através do grupo ácido carboxílico ocasiona um deslocamento das bandas e aumento significativo em absorbância da banda em 290 nm. Além disso, outros metais M^{2+} (Ca^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}) têm o mesmo comportamento.[83]

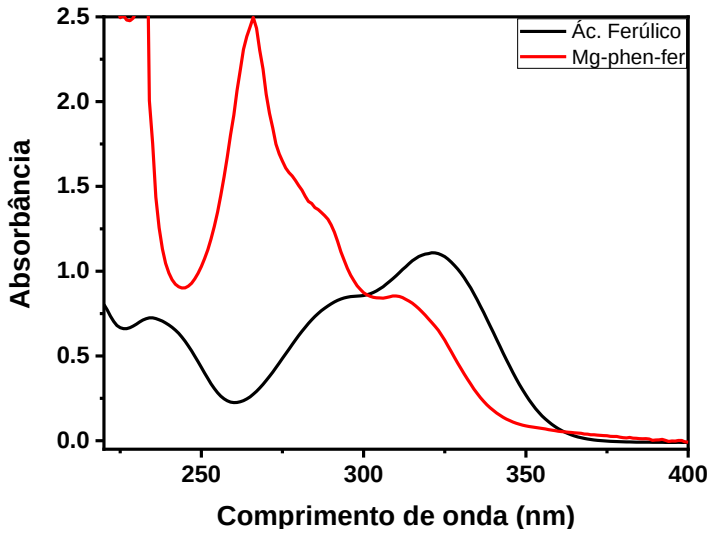


FIGURA 21. Espectro de absorção em água destilada do complexo Mg-phen-fer (vermelho) e ácido ferúlico (preto) com concentração igual a 7,5 µg/mL.

Assim como outros produtos naturais, o ácido ferúlico apresenta luminescência intrínseca. Quando o ligante fer está presente em uma solução metanol/água (1:9) e excitado a 290 nm, este apresenta emissão com $\lambda_{máx}$ = 430 nm.[85]

Em solução aquosa, o complexo Mg-phen-fer manteve as propriedades luminescentes do ligante. Quando excitado em 290 nm ou 310 nm, o complexo apresentou emissão com máximo em 420 nm, FIGURA 22.

Além disso, independentemente da atmosfera de N_2 ou O_2 a intensidade de emissão e o comprimento de onda de emissão máximo pouco se alteram, indicando que a emissão de luz do estado excitado do complexo é uma transição eletrônica singleto-singleto.

O espectro de excitação (λ_{em} = 410 nm) assemelha-se ao espectro de absorção do complexo podendo-se aferir que as propriedades luminescentes do complexo são devidas ao ligante ácido ferúlico. O descolamento de Stokes para o complexo é de 7870 cm^{-1}, qual é um valor alto e não há interferências em relação a reabsorção de energia.

O fato de o complexo absorver na região do UV e início do visível, torna-o transparente apresentando um atrativo para sua empregabilidade como um composto ativo em embalagens. Além disso, como o complexo é capaz de emitir luz, como será mais bem discutido a frente, isso garante a ele um efeito protetivo frente a riboflavina, onde o complexo é capaz de estabilizar essa molécula.

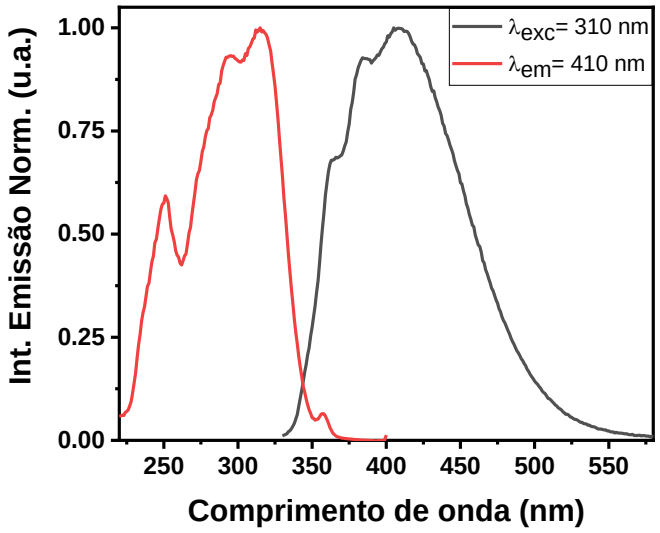


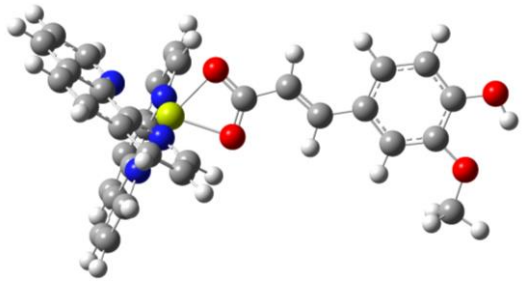
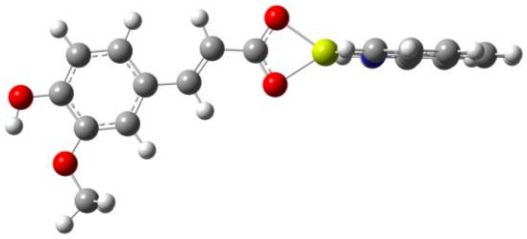
FIGURA 22. Espectros de emissão (λ_{exc} = 310 nm) e excitação (λ_{em} = 410 nm) do complexo Mg-phen-fer em água destiladana concentração de 7,5 µg/mL.

4.1.6 Cálculo teórico

As duas estruturas moleculares observadas para o complexo Mg-phen-fer foram confirmadas por cálculos computacionais usando a teoria do funcional da densidade (DFT) usando a base B3LYP/ 6-31+G*, TABELA 2.

Os valores de mínimo de energia obtidos para o complexo hexacoordenados (-2030.79 a.u.) e tetracoordenados (-1459.08 a.u) são coerentes com as observações experimentais que indicam que o complexo $[Mg(phen)_2(fer)]^+$ é a estrutura favorecida.

TABELA 2. Estruturas otimizadas dos complexos $[Mg(phen)_2fer]^+$ e $[Mg(phen)fer]^+$ em fase gasosa, base B3LYP/6-31+G*.

Mg-phen-fer	
Geometria hexacoordenada	Geometria tetracoordenada
	
Método de cálculo = RB3LYP Conjunto base = 6-31+G(d) Carga = 1 Spin = Singleto E(RB3LYP) = -2030.78593458 a.u. Momento dipolo = 12.9902 Debye Grupo pontual = C_1	Método de cálculo = RB3LYP Conjunto base = 6-31+G(d) Carga = 1 Spin = Singleto E(RB3LYP) = -1459.08262396 a.u. Momento dipolo = 15.9664 Debye Grupo pontual = C_1

A composição dos orbitais moleculares mostram uma alteração significativa na densidade eletrônica do ácido ferúlico com a coordenação ao fragmento $\{Mg(phen)_2\}^{2+}$. O orbital molecular ocupado de mais alta energia

(HOMO, E= -7,34 eV), e os orbitais moleculares HOMO-1 (E= -8,36 eV) e HOMO-2 (E= -9,24 eV) são constituídos exclusivamente pelo ácido ferúlico. O orbital molecular vazio de mais baixa energia (LUMO, E= -4,96 eV) e LUMO+1 (E= -4,90 eV) são praticamente degenerados e constituídos majoritariamente de orbitais π* do ligante 1,10-fenantrolina. Além disso, do LUMO até o LUMO+10 apenas o LUMO+6 (E= -3,39 eV) é composto pelo orbitais π* do ligante ácido ferúlico. Esses dados se encontram no apêndice A.

Os cálculos computacionais permitiram realizar a atribuição das transições eletrônicas observadas no espectro de UV-*vis* obtido experimentalmente para o complexo. Como demonstrado pelos dados experimentais e teóricos, a geometria hexacoordenada ($[Mg(phen)_2fer]^+$) é favorecida, assim para essa discussão será considerada essa estrutura.

O espectro de absorção eletrônica teórico para o complexo Mg-phen-fer é similar ao espectro experimental, como visto na FIGURA 23. Ambos os espectros apresentam: uma absorção acima de 300 nm com um ombro em 290 nm e uma absorção ao redor de 270 nm.

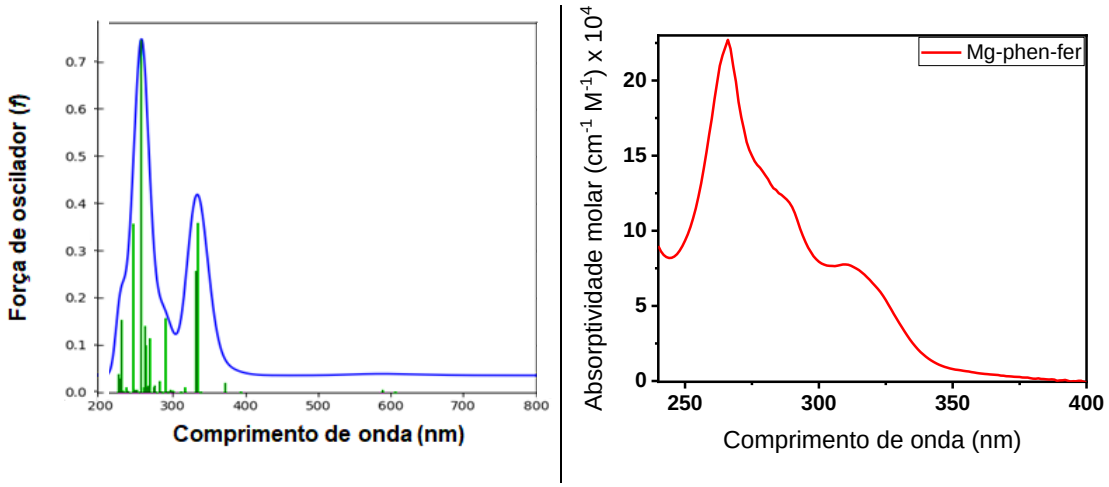


FIGURA 23. Espectros de absorção eletrônica para o complexo Mg-phen-fer em água obtidos pela simulação do método TD-FT (direita) e experimental (esquerda).

O gráfico de barras em verde representa os valores da força de oscilador (*f*) obtidos pelo cálculo computacional que estão relacionados com os valores de absortividade molar, sendo que quanto maior for o valor de *f* mais permitida é essa transição.

Na TABELA 3 estão atribuídas as transições eletrônicas de maior força de oscilador para o complexo Mg-phen-fer. A absorção em 310 nm é atribuída as transições n(fer) → π*(phen) e n(fer) → π*(fer), enquanto a transição em 265 nm é atribuída a n(phen) → π*(phen).

Os resultados computacionais mostram a interação forte entre o ácido ferúlico e a fenantrolina sugerindo um deslocamento da densidade eletrônica do ácido ferúlico para a fenantrolina o que pode promover uma melhor atividade antioxidante como será discutido abaixo.

TABELA 3.Valores de comprimento de onda, força de oscilador, transições eletrônicas predominantes e atribuições para o complexo Mg-phen-fer (H=HOMO, L=LUMO)

λ (nm)	*f*	Transições predominantes (% contribuição)	Atribuição da transição	
373	0.0198	H→L+4 (98 %)	fer (100%) → phen (97%)	n(fer) → π*(phen)
335	0.3589	H-2→L+1 (47 %)	fer (98%) → phen (100%)	n(fer) → π*(phen)
		H→L+6 (49 %)	fer (98%) → fer (96%)	n(fer) → π*(fer)
332	0.2579	H-2→L+1 (51 %)	fer (98%) → phen (100%)	n(fer) → π*(phen)
		H→L+6 (45 %)	fer (98%) → fer (96%)	n(fer) → π*(fer)

4.1.7 Estudos de pH

As carnes, em geral, apresentam um faixa de pH que varia entre 4,8 a 7,2.[86] Laticínios apresentam pH nessa faixa também,[87] como mostrado na TABELA 4. Esses dois produtos são especialmente ricos nas quantidades de riboflavina, o que os torna suscetíveis a presença de radicais livres. Assim, é importante compreender a estabilidade do complexo em diferentes pH, para

que ele não perca suas características nas mais variadas condições. O complexo se mostrou estável na faixa de pH desses alimentos, sendo que o complexo Mg-phen-fer possui um hidrogênio ionizável que é responsável pela atividade antioxidante do complexo.

TABELA 4. Faixa de pH de carnes e laticínios.

Alimento	**Faixa de pH**
Linguiça fermentada	4,8-6,0
Carne de boi	5,4-6,0
Carne de porco	5,5-6,2
Carne curada	6,2-6,4
Tecido muscular após abate	7,0-7,2
Queijos	5,0-7,0

A estabilidade do complexo é determinada pelo seu valor de pKa, pois este valor indica qual é a faixa de pH onde o complexo Mg-phen-fer mantém a sua unidade estrutural. Comparando o ácido ferúlico livre com ele coordenado ao Mg(II), a primeira observação é que ele passa de dois hidrogênios ionizáveis para apenas um. Como fica evidenciado na FIGURA 24, o complexo possui apenas um ponto de inflexão na curva de absorção *vs* pH, que equivale a pKa = 9,0. Enquanto o ligante livre apresenta $pKa_1 = 4,27$ (referente ao próton do ácido carboxílico) e $pKa_2 = 8,9$ (referente ao próton do fenol),[88] para o pKa do grupo fenol não houve uma grande diferença entre o ligante livre e coordenado.

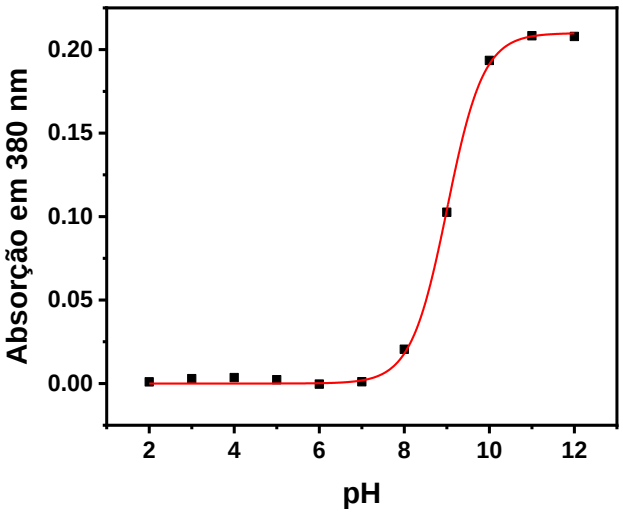


FIGURA 24. Determinação colorimétrica do valor de pKa do complexo Mg-phen-fer acompanhando a absorção em λ = 380 nm a uma concentração de 7,5 µg/mL.

O complexo a uma concentração de 13 µg/mL foi estudo numa faixa ampla de pH variando de 2 a 12. No espectro de UV-*vis* se observou que com o aumento do pH houve um deslocamento da absorção para maiores comprimentos de onda, FIGURA 24.

Em valores de pH entre 2 e 8 a forma neutra do complexo é mantida com pequenas alterações no comprimento de onda, isto é, o complexo absorve nos comprimentos de onda de 310 nm, 290 nm e 265 nm. A partir de pH 9, processo de desprotonação do grupo hidroxila da parte fenólica se inicia e tem uma alteração da banda a partir de pH 10 onde o complexo absorve em 350 nm, como mostrado na FIGURA 25.

Vale ressaltar que a absorção do complexo em pH≥ 10 se assemelha a absorção do ligante livre.[89] Isso indica que para valores básicos de pH o complexo deve estar sofrendo processos de substituição de ligantes ou está perdendo a quelação pelo grupo ácido carboxílico, ficando coordenado apenas por um oxigênio.

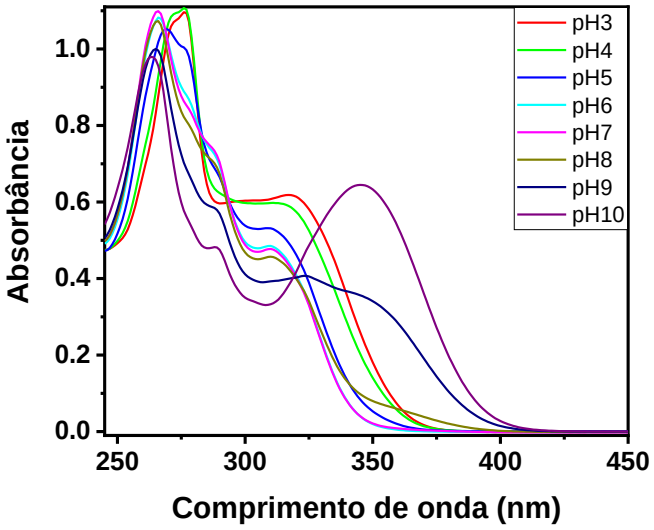


FIGURA 25. Espectros de absorção do complexo Mg-phen-fer na faixa de pH 3-10.

A estabilidade do complexo em diferentes valores de pH também foi avaliada pelas propriedades luminescentes do complexo a uma concentração de 13 μg/mL. Para o intervalo 4< pH≤ 8 o valor máximo de emissão do complexo é de 415 nm e para pH> 9 possui emissão em 465 nm.

Como visto na FIGURA 26, para uma mesma concentração até pH≤ 8, praticamente a intensidade e o máximo do espectro de emissão pouco se alteram, o que indica que a estrutura do complexo é preservada, isto é, o ácido ferúlico coordenado está em sua forma protonada mantendo a fração molar constante. Em pH básicos a emissão passa a ser devido a forma desprotonada, o que causa um deslocamento do valor máximo de emissão para maiores comprimentos de onda, além de alterar a intensidade relativa.

De modo geral, a luminescência do Mg-phen-fer corrobora com os dados de absorção que mostra a estabilidade do complexo independente dele estar em uma solução pH<9. Além disso, pelo espectro de emissão pode-se perceber que a diferença entre HOMO e LUMO da espécie protonada ou desprotonada é consideravelmente alterada, devido a variação de 50 nm no máximo de emissão. Esses processos podem ser visualizados nas equações 19-22.

4<pH≤8	Mg-phen-ferH + hν → ^{1}(Mg-phen-ferH)*	Eq. 19
	^{1}(Mg-phen-ferH)* → Mg-phen-ferH + hν' (λ_{em}= 415 nm)	Eq. 20
pH>9	(Mg-phen-fer)$^-$ + hν →^{1} ((Mg-phen-fer)$^-$)*	Eq. 21
	^{1}((Mg-phen-fer)$^-$)* → (Mg-phen-fer)$^-$ + hν" (λ_{em}= 465 nm)	Eq. 22

Portando, o complexo Mg-phen-fer que teve seu desenvolvimento pensado para ser aplicado em embalagens ativas de produtos alimentícios a fim de proteger esses contra processos de degradação relacionados a radicais livres, como a peroxidação lipídica, apresenta estabilidade dentro da faixa de pH dos alimentos para os quais este complexo se destina.

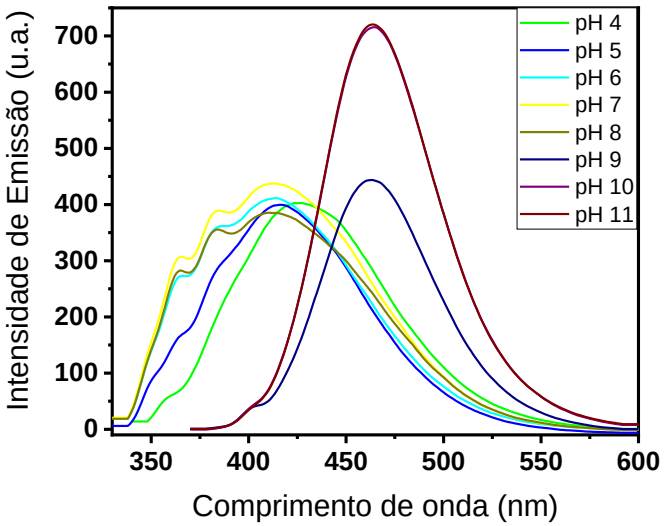


FIGURA 26. Espectros de emissão (λ_{exc}= 310 nm) do complexo Mg-phen-fer na faixa de pH 4-11.

4.1.8 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica do ácido isovanilico em solução aquosa, tampão fosfato pH 7,4, no primeiro processo oxidativo mostrou apenas um único pico anódico em +0,65 V vs Ag/AgCl e nenhuma resposta catódica. Enquanto nas mesmas condições para o ácido ferúlico o pico anódico ocorre em +0,55 V vs Ag/AgCl. Conforme mostrado na FIGURA 27, para ambos

os ligantes a corrente anódica é dependente da velocidade de varredura sendo um indicativo de reação química devido à oxidação do grupo fenol, como observado para outros ácidos fenólicos.[90]

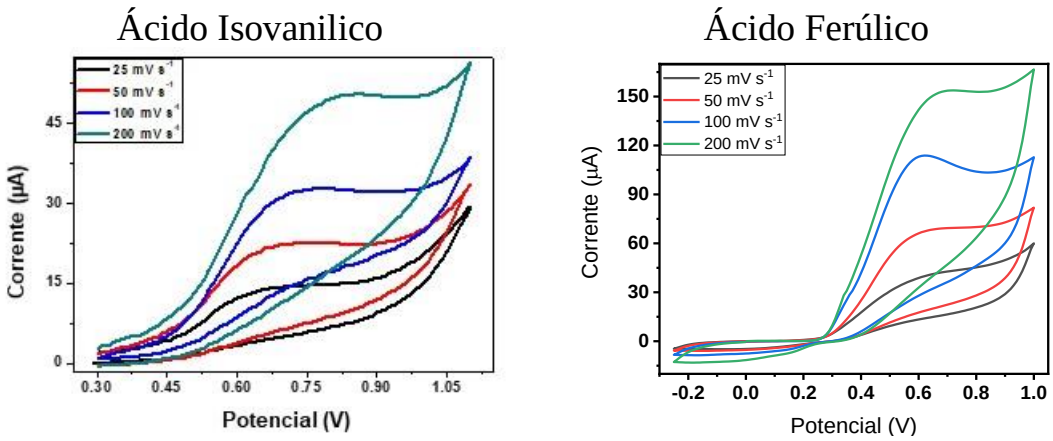


FIGURA 27. Voltamogramas cíclicos de ácido isovanilico (esquerda) e ácido ferúlico (direita) em solução tamponada a pH 7,4 com KCl 0,1 M em uma matriz eletroquímica impressa em tela formada por uma cela eletroquímica com eletrodo de trabalho em carbono vítreo (d = 4 mm), contra eletrodo e eletrodo de referência de prata a 25 °C.

A coordenação do ácido isovanilico ao centro metálico Mg(II) tem um efeito significativo na estabilidade do radical fenoxila gerado. Conforme ilustrado na FIGURA 28, para o complexo Mg-phen-iso em tampão fosfato pH 7,4, a primeira varredura oxidativa mostra apenas uma única onda anódica em +0,65 V (I). A segunda varredura mostra uma nova oxidação em -0,12 V (II) e -0,14 V (processo II'), enquanto para ciclos sucessivos houve uma mudança desses potenciais para valores mais positivo com um aumento na corrente. Em varreduras subsequentes, duas novas respostas em +0,17 V (III) e +0,10 V (III') aparecem, enquanto a corrente de pico para a onda I manteve o aumento em intensidade de corrente e deslocou-se para +0,8 V. Após 10 varreduras, as espécies geradas eletroquimicamente são estabilizadas.

Conforme mostrado na FIGURA 28, o processo de voltametria cíclica é altamente dependente do pH da solução; a resposta redutiva III, III' é

facilitada em pH alto, enquanto o outro par redox é facilitado em pH baixo. Esse tipo de comportamento é característico de processos de transferência de elétrons acoplado com transferência de prótons.[90,91]

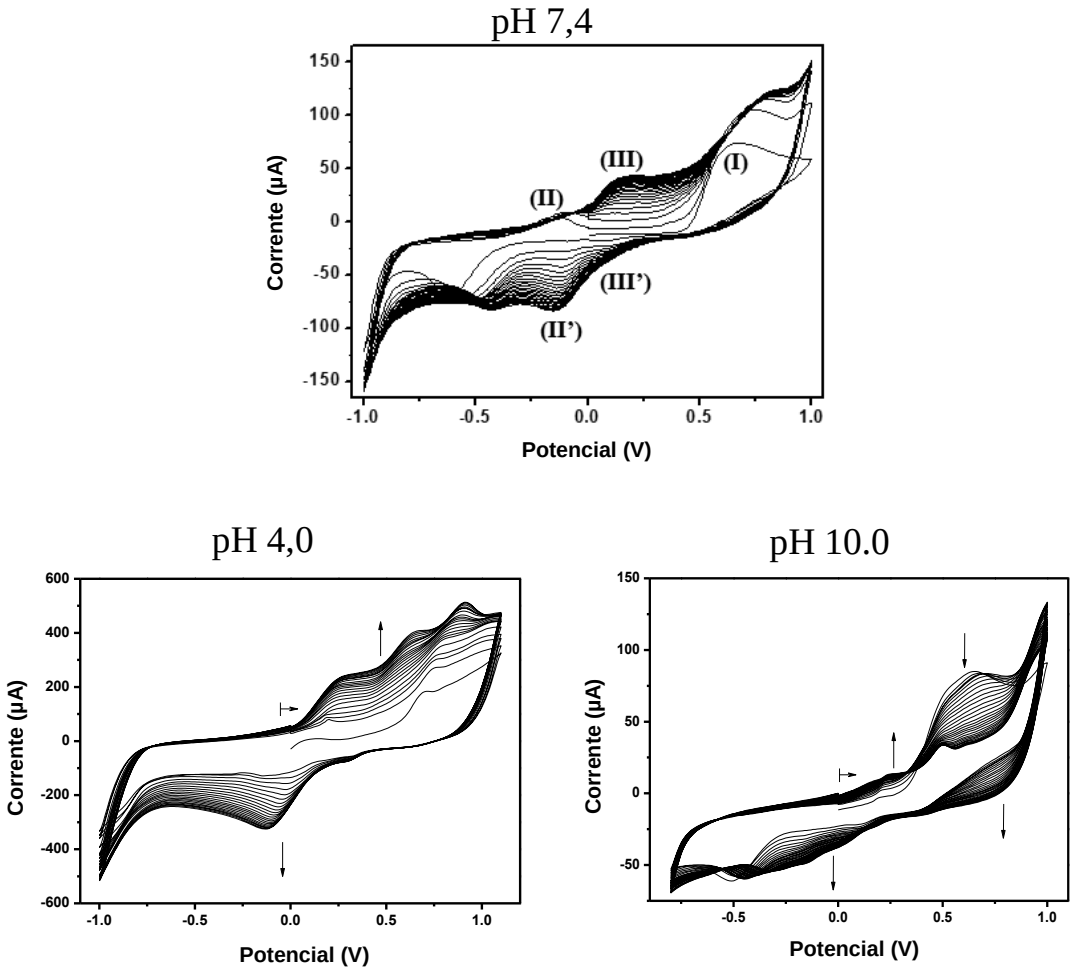
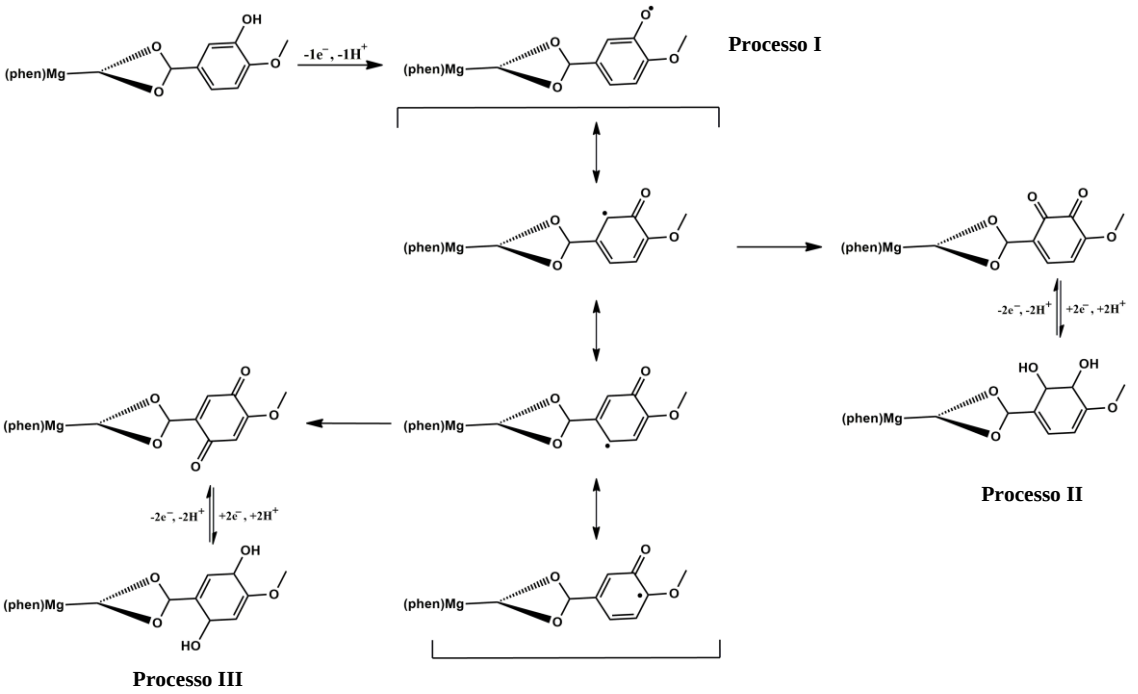


FIGURA 28. Voltamogramas cíclicos do complexo Mg-phen-iso em solução tamponada pH 4,5, pH 7,4 e pH 10,0 com 0,1M KCl, na faixa de 1,0 V a -1,0 V e v = 100 mV/s. O pico de redução a -0,50 V é atribuído à solução em branco, tampão de fosfato na presença de KCl.

No complexo Mg-phen-iso, o papel do Mg(II) é estabilizar o grupo fenolato do ligante ácido isovanilico por meio de uma forte interação eletrostática que torna o ligante iso mais fácil de desprotonar e oxidar, gerando uma espécie cíclica estável sob processo eletroquímico. Com base nos dados eletroquímicos obtidos e nos resultados da literatura,[91] todo o processo eletroquímico está associado à formação e estabilização do radical fenoxila, conforme mostrado no ESQUEMA 2.



ESQUEMA 2. Mecanismo proposto para o processo eletroquímico do complexo Mg-phen-iso.

A voltametria cíclica do ácido ferúlico em solução aquosa em diferentes pH teve um deslocamento do pico anódico para menores valores, variando de 0,58 V para pH 4,0; 0,5 V para pH 7,4; e 0,34 V para pH 9,0, todos potenciais em referência a Ag/AgCl, como mostrado na FIGURA 29. Esse comportamento é esperado para ácidos fenólicos,[92] pois com o aumento de pH, há formação de um ânion sendo mais fácil ser oxidado (menor potencial).

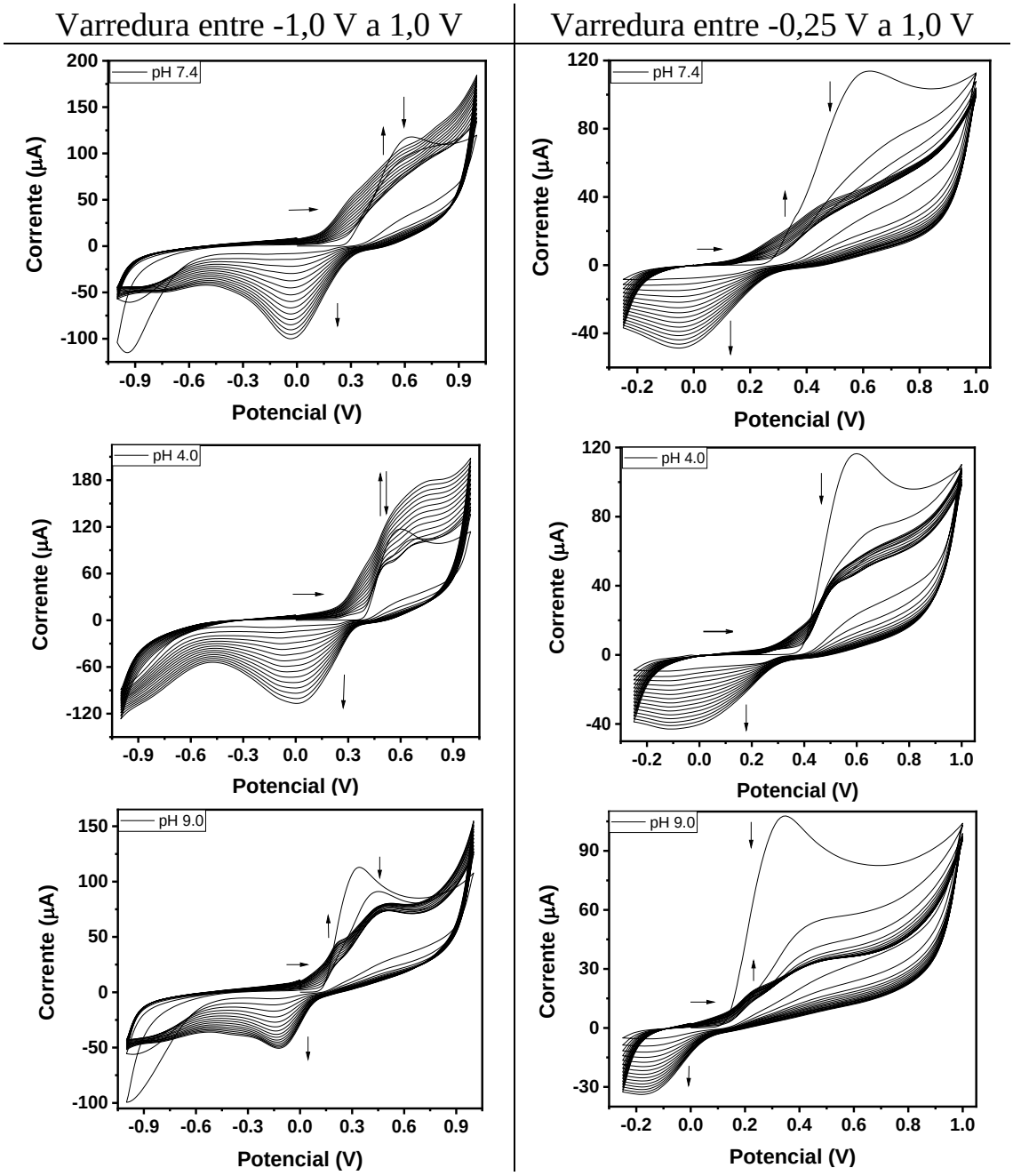


FIGURA 29. Voltamogramas cíclicos de ácido ferúlico em soluções tamponadas pH 4,0, pH 7,4 e pH 9,0 com 0,1M KCl, v = 100 mV/s e na faixa de 1,0 V a -1,0 V (lado esquerdo) e de 1,0V a -0,25 V (lado direito).

Conforme ilustrado na FIGURA 30, para o complexo Mg-phen-fer em pH 7,4, a primeira varredura oxidativa mostra duas ondas anódicas em +0,40 V (I_a) e +0,58 V (II_a). O surgimento de duas ondas anódicas pode estar associado com a presença de composto adsorvido na superfície do eletrodo.[93] Contudo como para o complexo nos demais pH e para o ácido ferúlico livre (FIGURAS 29 e 30) a presença de dois sinais de oxidação não é observada,

assim esses dois processos não estão relacionado com adsorção do complexo mas sim duas oxidações que acontecem muito próximas.

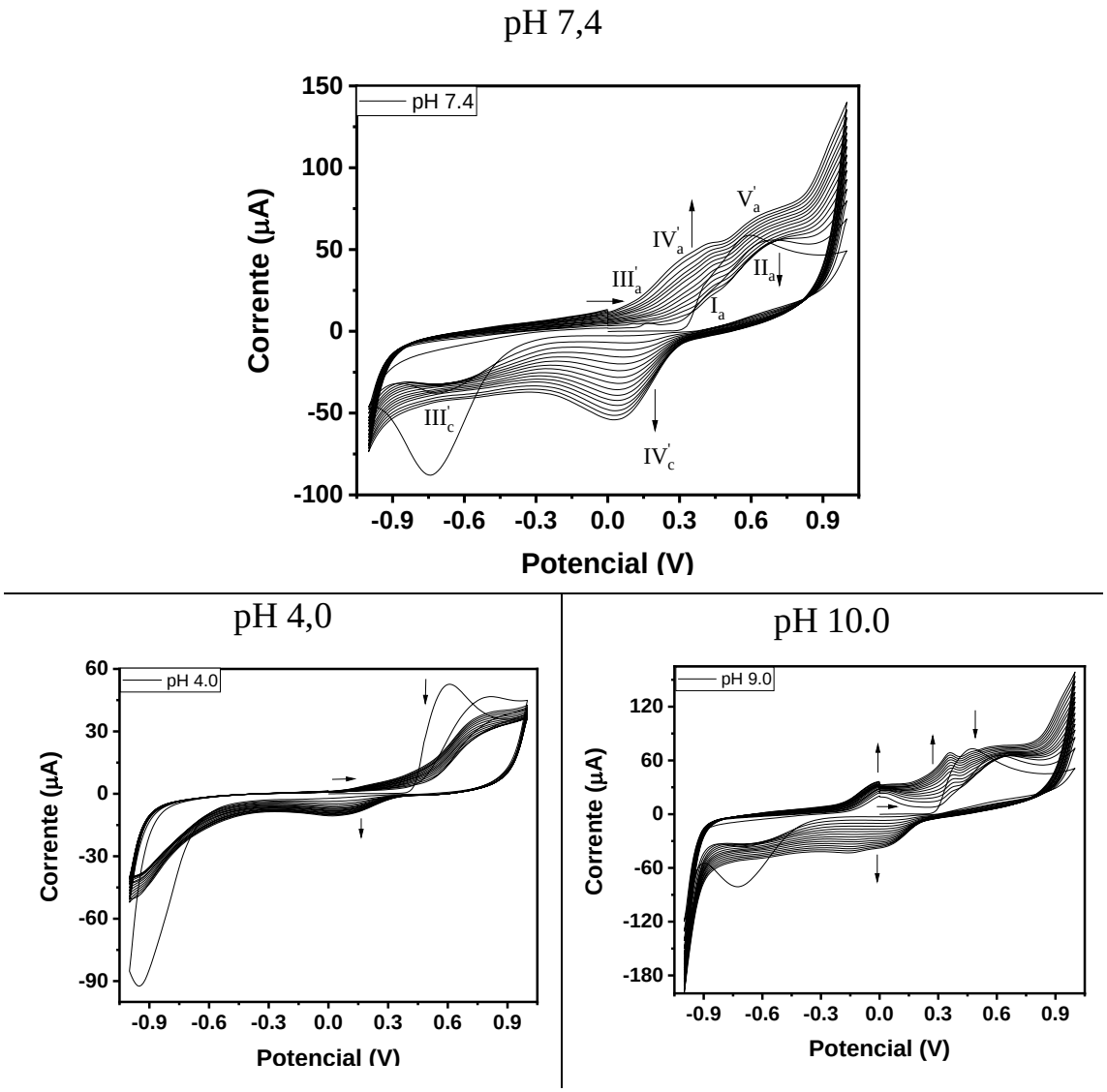


FIGURA 30. Voltamogramas cíclicos do complexo Mg-phen-fer em soluções tamponadas pH 4,0, pH 7,4 e pH 9,0 com 0,1M KCl, v = 100 mV/s e na faixa de 1,0 V a -1,0 V.

A partir do segundo ciclo, dois sinais aparecem sendo um na varredura anódica em 0,17 V (III_a') e um na varredura catódica em -0,71 V(III_c'), esses sinais desaparecem após o quarto ciclo indicando a característica transitória dessa espécie, FIGURA 30. Além disso, esses processos parecem ser um dependente do outro, uma vez que diminuindo a janela de varredura as ondas III_a' e III_c' não aparecem mais, FIGURA 31. Em varreduras subsequentes até atingir o equilíbrio, os sinais I_a e II_a tem um aumento na diferença de

potencial entre eles, deslocando a corrente de potencial para 0,35 V (IV_a') e 0,59 V (V_a') e um processo de redução que é observado em 0,04 V (IV_c').

Os voltamogramas do complexo Mg-phen-fer (FIGURAS 30 e 31) e de fer (FIGURA 29) apresentam diferenças nos valores de potencial dos processos oxi-redutivos. Entretanto deve-se notar que a diminuição da corrente é proporcionalmente maior para o ligante livre do que quando ele complexado. Este fato pode ser devido a passivação do eletrodo[94] para o ligante. Além de ser relacionado com as espécies eletroquimicamente ativas,[95] uma vez que o ligante coordenado ao Mg(II) apresenta uma maior estabilidade, o que não diminui a corrente.

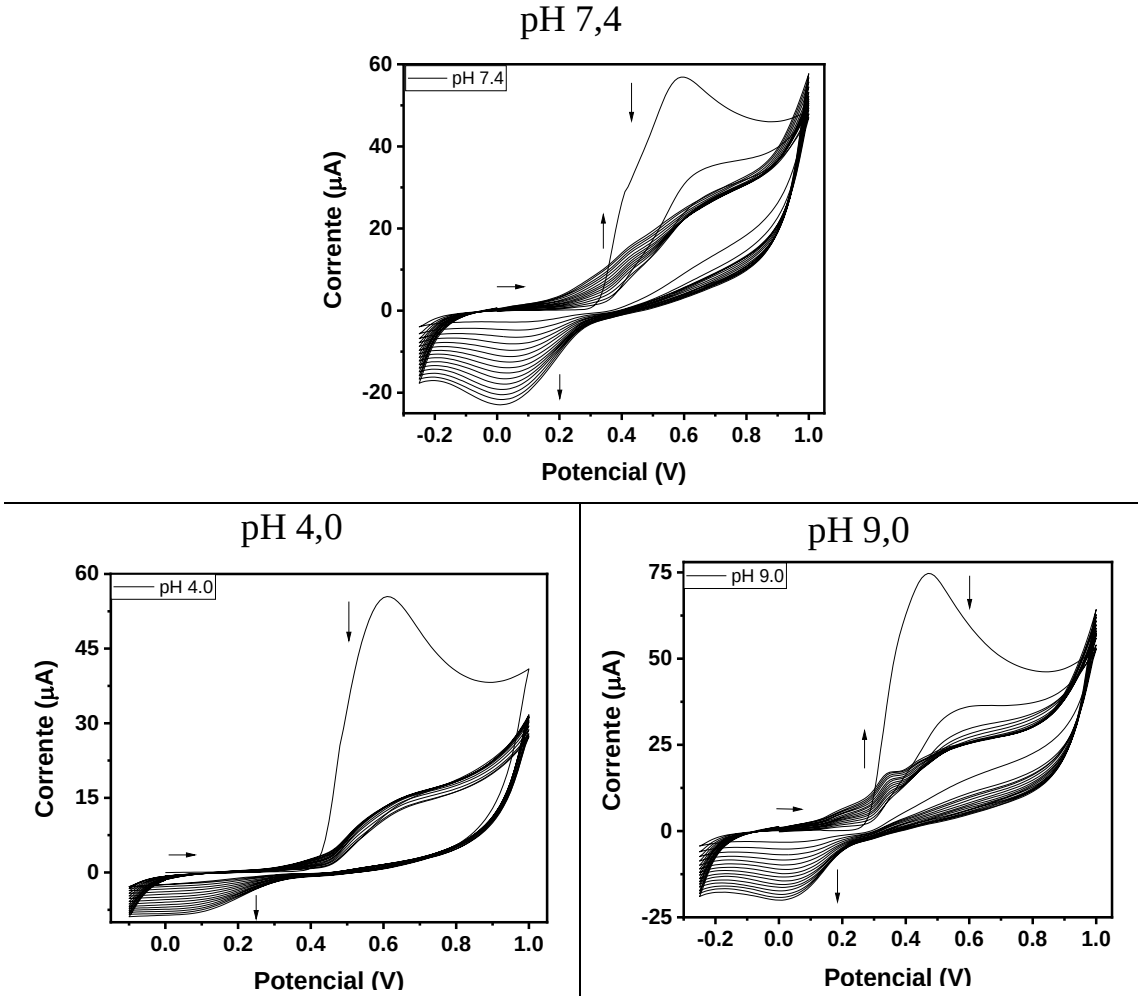
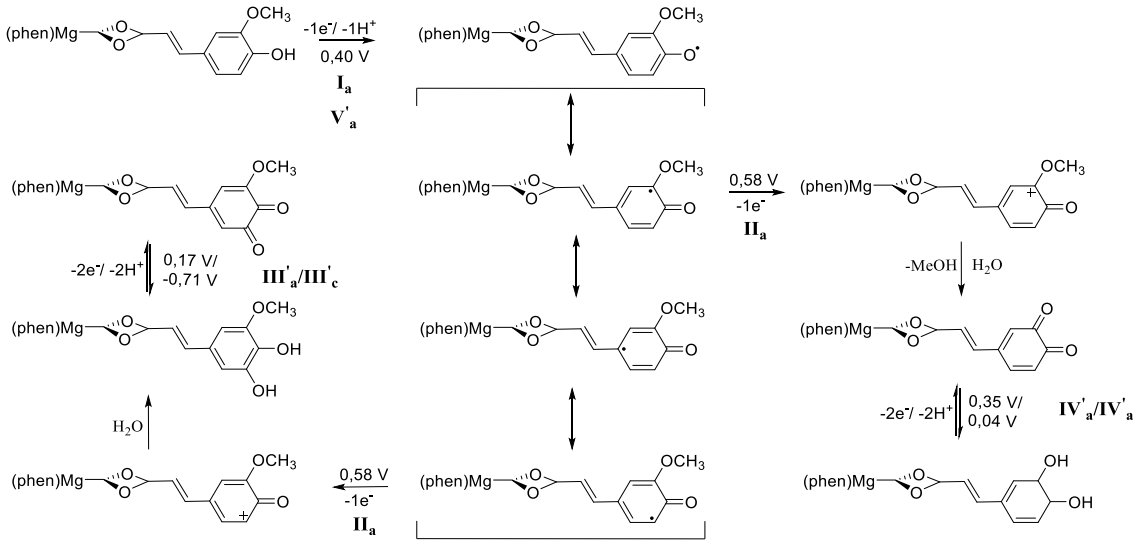


FIGURA 31. Voltamogramas cíclicos do complexo Mg-phen-fer em soluções tamponadas pH 4,0, pH 7,4 e pH 9,0 com 0,1M KCl, v = 100 mV/s e na faixa de 1,0V a -0,25 V.

Conforme mostrado nas FIGURAS 30 e 31, os processos oxi-redutivos do complexo Mg-phen-fer é dependente do pH. De modo geral os processos que são mais afetados pelo pH são as ondas III_a' e III_c', onde em pH ácido esses processos não aparecem enquanto em pH básico eles são bastante evidentes. Esse tipo de comportamento é característico de processos de transferência de elétrons acoplado com transferência de prótons.[90,91] Além disso, como é sugerido no ESQUEMA 3 forma-se um carbocátion secundário que é estabilizado em pH 9,0 pois no processo uma hidroxila se associa a esse cátion enquanto em pH 7,4 esse caminho é pouco favorecido o que leva ao estado transitório desse processo.

A coordenação do ácido ferúlico ao centro metálico Mg(II) teve um efeito significativo estabilizando a oxidação do grupo hidroxila. A oxidação leva a formação de um fenolato que pode ser mais oxidado a um radical fenoxila. Essa estabilização se deve a interação eletrostática entre o metal e ligante fer que o torna mais estável e passível de sofrer processos de redução enquanto isso não é observado para este ligante livre. Com base nos dados de voltametria cíclica obtidos e nos resultados da literatura,[91,93,96,97,98] o processo eletroquímico associado ao complexo é sugerido conforme mostrado no ESQUEMA 3.



ESQUEMA 3. Mecanismo proposto para o processo eletroquímico do complexo Mg-phen-fer.

4.2 Atividade antioxidante

Como demonstrado pela voltametria cíclica, o complexo Mg-phen-fer é um bom candidato a molécula antioxidante. Além disso, existem outras técnicas analíticas para avaliar a capacidade de antioxidantes em neutralizar os radicais livres *in vitro* e *in vivo*, entre elas técnicas espectrofotométricas e por ressonância paramagnética de elétrons. Esses métodos envolvem a análise dos mecanismos de ação dos antioxidantes. Assim, o complexo foi testado frente a diversos radicais e a diferentes espécies reativas de oxigênio.

Os ensaios que utilizam radicais estáveis (DPPH• e $ABTS^{\bullet+}$) indicaram a atividade anti-radical do complexo Mg-phen-fer, mas não necessariamente se o complexo terá atividade antioxidante contra os radicais livres. Assim, para obter a maior quantidade de informação a respeito do mecanismo de ação do complexo como antioxidante *in vitro* é fundamental testá-lo frente a diferentes radicais livres, para ter uma proteção próxima ou semelhante àquela observada *in vivo*.[99]

4.2.1 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•)

O ensaio com o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•) foi desenvolvido na década de 1950 e foi um dos primeiros utilizados para avaliar a capacidade antioxidante.[100] O radical DPPH• é estável e possui um elétron delocalizado que garante a ele a coloração roxa com máximo de absorção no comprimento de onda de 517 nm.[100]

Uma limitação desse método é o fator estérico entre o DPPH• e as moléculas do antioxidante.[101] Como o sítio radicalar está no centro da molécula, moléculas antioxidantes menores têm mais facilidade para acessar este ponto, resultando em maiores atividades quando comparadas a moléculas maiores. Devido a esse fato, a solução reacional entre o complexo Mg-phen-fer e o DPPH• ficou mantida no escuro entre 45 e 60 minutos para garantir que o processo ocorreria.[101] Contudo é um método simples, preciso e reprodutível.

O mecanismo de ação dos antioxidantes frente ao radical DPPH• pode acontecer tanto por HAT (Equação 23) quanto por SET-PT[102] (Equações 23-26).

HAT	$AO\text{-}OH + DPPH\bullet \rightarrow AO\text{-}O\bullet + DPPH\text{-}H$	Eq. 23
SPLET	$AO\text{-}OH \rightarrow AO\text{-}O^- + H^+$	Eq. 24
	$AO\text{-}O^- + DPPH\bullet \rightarrow AO\text{-}O\bullet + DPPH^-$	Eq. 25
	$AO\text{-}O\bullet + DPPH^- + H^+ \rightarrow AO\text{-}O\bullet + DPPH\text{-}H$	Eq. 26

A reação de neutralização do radical DPPH• pelo complexo Mg-phen-fer foi detectada por espectrometria de UV-*vis*, monitorando o decréscimo da banda de absorção do DPPH• no comprimento de onda de 517 nm. Descoloração se dá através da reação de redução do radical DPPH• a uma hidrazina, alterando a coloração da solução de roxo para amarelo (FIGURA 32).

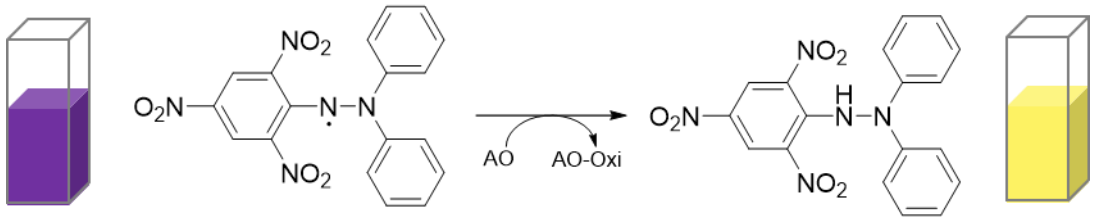


FIGURA 32. Reação de descoloração do radical DPPH•.

Como o complexo é solúvel apenas em água, o uso da solução do complexo foi sempre mantido constante e de maneira mínima pois a presença de água pode favorecer a agregação, sendo que até a proporção de 1:1 (etanol:água) não resulta em problemas de agregação.[103]

A atividade antirradical do complexo Mg-phen-fer foi comparada ao padrão BHT e ao ácido ferúlico livre. O BHT é tido como um padrão pois ele é um dos primeiros antioxidantes que a indústria alimentícia utilizou além de ser um análogo a vitamina E.

O complexo Mg-phen-fer apresentou um valor de IC_{50} = 15,6 ± 1,2 µM considerando a estrutura hexacoordenada, FIGURA 33. Essa consideração foi feita para que se pudesse comparar com o padrão. Enquanto o BHT apresentou IC_{50} = 26,7 ± 0,5 µM, FIGURA 33. Vale ressaltar que o valor de IC_{50} observado para o BHT é comparável a valores encontrados na literatura.[70]

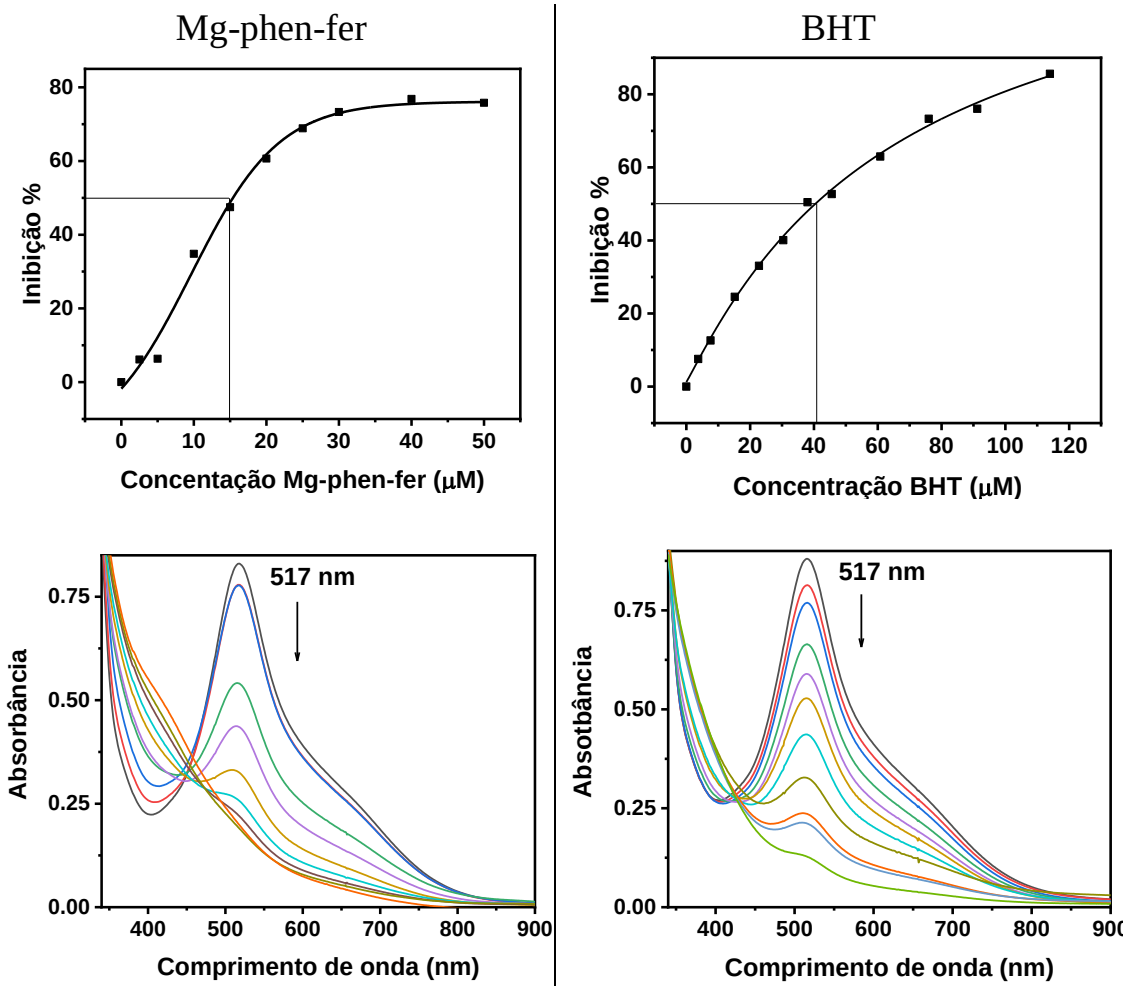


FIGURA 33. Obtenção do IC_{50} da inibição do radical DPPH• (conc. de 9 $x10^{-5}$ mol/L) para o complexo Mg-phen-fer (esquerda) e para o BHT (direita) em diferentes concentrações.

O complexo Mg-phen-fer se mostrou cerca de 1,5 vezes melhor no sequestro do radical DPPH• do que o BHT. O valor de IC_{50} do ligante livre foi de 31,4±0,82 μM próximo ao valor encontrado na literatura.[96] Ao comparar o complexo com o ligante fer, tem-se que um valor do IC_{50} deste é cerca de 2,0 vezes inferior ao determinado para o complexo, mostrando que a complexação do ácido ferúlico ao Mg(II) aumenta a atividade antioxidante.

Como todos os compostos testados (complexo, BHT e fer) possuem hidrogênios ionizáveis em suas estruturas moleculares, o modo de ação contra o radical DPPH• pode ser pelo mecanismo SPLET, onde há uma primeira etapa na qual acontece um equilíbrio químico em solução. Ou pelo mecanismo HAT, onde há a doação de um átomo de hidrogênio. A

coordenação do ácido ferúlico ao Mg(II) deixou a ligação -OH do fenol mais polarizada o que aumentou a atividade antioxidante do complexo.

Além disso, na literatura há diversos casos onde a coordenação de produtos naturais a diferentes centros metálicos como Mg(II),[104] Cu(II)[105] e Ce(IV)[106] também tiveram o mesmo efeito aqui observado, a coordenação potencializou a atividade antioxidante em relação ao ligante livre e ao padrão.

4.2.2 2,2′-Azino-bis(3-ethilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico ($ABTS^{\bullet+}$)

A oxidação do ABTS (2,2′-Azino-bis(3-ethilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) pelo oxidante persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) após 12 horas de incubação levou a formação do radical $ABTS^{\bullet+}$.[107] O radical $ABTS^{\bullet+}$ é estável e possui coloração verde, podendo ser detectado por espectrofotometria. Nesse método o radical $ABTS^{\bullet+}$ é reduzido pela transferência de um elétron do antioxidante, sendo um método baseado em SET.[102] Esse método é simples, apresenta boa sensibilidade de detecção e é reprodutivo. Uma das principais vantagens é que pode ser aplicado a soluções aquosas com diferentes pH.[108]

O radical $ABTS^{\bullet+}$ em solução apresenta absorção em 660 nm, 730 nm e 820 nm. O método por detecção colorimétrica se baseia na capacidade antiradicalar do complexo Mg-phen-fer em atuar como um antioxidante na redução do radical $ABTS^{\bullet+}$, levando a mudança da coloração da solução de verde para incolor, esquema de reações é visto na FIGURA 34. A reação de sequestro do radical $ABTS^{\bullet+}$ é acompanhada pelo decaimento da banda com máximo em 730 nm. Essa banda é normalmente selecionada devido ao fato que a coloração da maioria dos antioxidantes não influencia no valor de absorbância nesta região.[109] Contudo para o complexo Mg-phen-fer poderia

ser escolhido quaisquer das outras bandas uma vez que o complexo não absorve além de 500 nm.

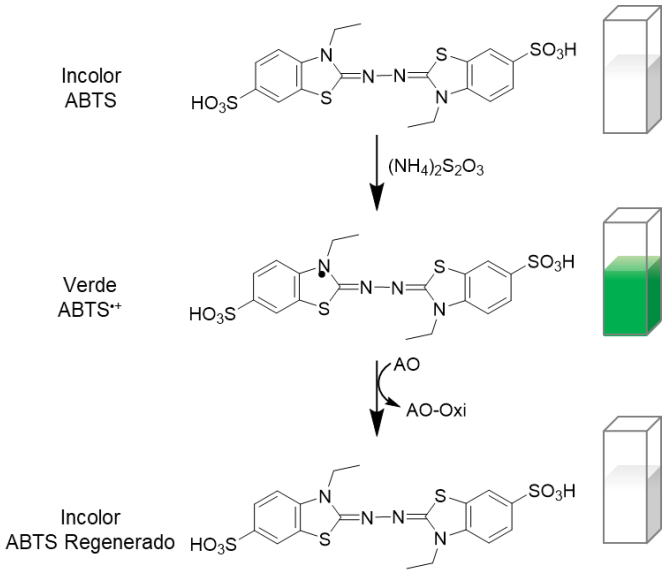


FIGURA 34. Esquema reacional entre o radical $ABTS^{\bullet+}$ e o antioxidante.

O complexo Mg-phen-fer apresentou um valor de IC_{50} = 5,44 ± 0,52 µM considerando a estrutura hexacoordenada, FIGURA 35. Essa consideração foi feita para que se pudesse comparar com o padrão. Enquanto o BHT apresentou IC_{50} = 16,75 ± 0,67 µM, FIGURA 35. Vale ressaltar que o valor de IC_{50} observado para o BHT é comparável a valores encontrados na literatura.[110,111]

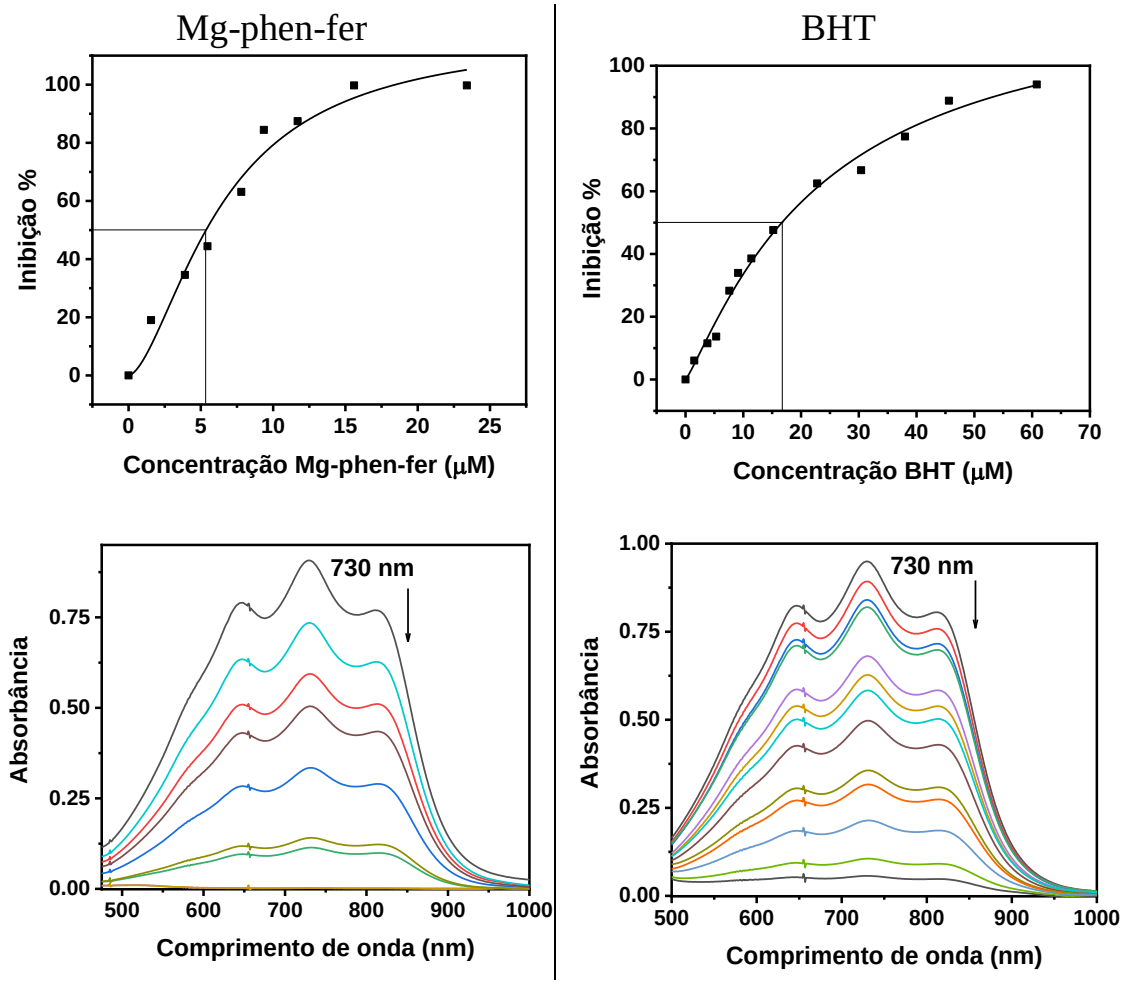


FIGURA 35. Obtenção do IC_{50} da inibição do radical $ABTS^{\bullet+}$ para o complexo Mg-phen-fer (esquerda) e para o BHT (direita) em diferentes concentrações.

O complexo Mg-phen-fer se mostrou cerca de 3 vezes melhor na neutralização do radical $ABTS^{\bullet+}$ do que o BHT. Embora o Mg(II) não seja um metal da série de transição, ele potencializou a transferência de elétron entre o ácido ferúlico e o radical, uma vez que o mecanismo de ação é o SET.

A atividade antioxidante do ácido ferúlico livre frente ao radical $ABTS^{\bullet+}$ é reportado como muito fraca devido ao impedimento estérico do grupo metoxila próximo ao -OH.[112] O valor de IC_{50} do ligante livre é reportado na escala de mili molar,[113] valor muito superior ao determinado para eles após a complexação.

Além disso, na literatura há diversos casos onde a coordenação de produtos naturais a diferentes centros metálicos como Oxovanádio(IV)[114] e

Mn(II)[115] também tiveram o mesmo efeito aqui observado, a coordenação potencializou a atividade antioxidante em relação ao ligante livre e ao padrão.

4.2.3 Radical Peroxila

O radical peroxila (ROO•) é formado pela adição eletrofílica do oxigênio molecular em radicais centrados no carbono, sendo esta reação frequentemente observada no estágio de propagação da peroxidação lipídica.[116] O tempo de meia vida desse radical em sistemas biológicos é de 17 s, podendo difundir distâncias moderadas.[1] O ROO• é um bom agente oxidante com potencial de redução igual a +1,0V (H+/ROO•),[117] podendo abstrair um átomo de hidrogênio de outras moléculas com menor potencial padrão de redução. Assim, O método para determinar a atividade antioxidante contra o ROO• chama-se ORAC (oxygen radical absorbance capacity) e a neutralização do radical ocorre pelo processo de HAT.[118]

Esse método é um bom modelo que mimetiza as reações entre antioxidantes e lipídios em sistemas alimentícios e biológicos por ser uma fonte contínua de produção do radical ROO•.[119]

Neste ensaio, o radical peroxila foi gerado pela reação térmica a 37 °C entre o AAPH (2-2'-azobis-(2-amidinopropano)-dihidrocloreto) e o O_2 atmosférico, em tampão fosfato pH=7,4, esse esquema está representado na FIGURA 36.

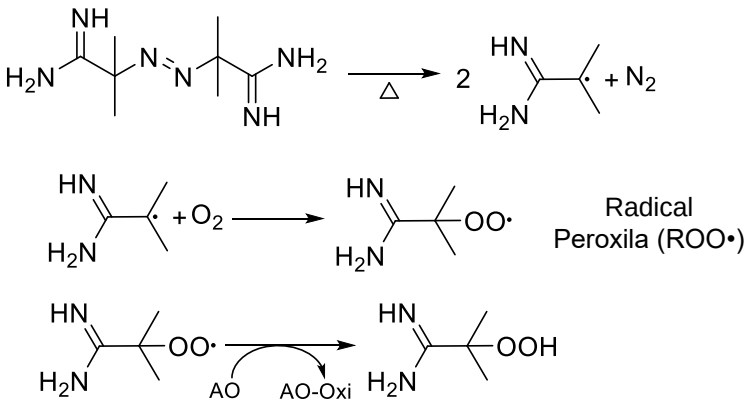


FIGURA 36. Formação do radical peroxila e reação com o antioxidante (AO).

Atividade antioxidante em relação ao radical peroxila foi avaliada por ressonância paramagnética de elétrons (RPE) utilizando o sequestrador de spin 4-POBN (α-(4-piridil-1-óxido)-N-tert-butilnitrona).[72] Os radicais ROO• formam adutos de spin estáveis com o 4-POBN (4-POBN-OOR), originando o sinal detectado que corresponde a três dubletos. Os parâmetros de acoplamento hiperfino do aduto formado são a_N = 15,5 G e a_H = 2,7 G.[120] O espectro de RPE simulado do aduto 4-POBN-OOR está mostrado na FIGURA 37. O espectro de RPE foi simulado utilizando o pacote EasySpin.[121]

O complexo Mg-phen-fer apresentou um valor de IC_{50} = 5,64 ± 0,56 µg/mL, FIGURA 38. Comparando esse valor com o ácido ferúlico livre, vê-se que o complexo foi superior na neutralização do radical peroxila, o ligante livre apresenta inibição a esse radical a concentrações > 9,7 µg/mL.[50] Já o BHT apresenta um IC_{50} = 40,25 µg/mL[122] valor muito superior comparado com o valor do complexo e do ligante, este fato se dá pelo motivo do BHT ser um antioxidante lipofílico e apresentar baixa solubilidade em água.

Analisando os três métodos empregados, tem-se que o complexo foi testado frente aos três mecanismos de ação que um antioxidante pode ter. Ao comparar os valores de IC_{50} do complexo Mg-phen-fer com o ácido

ferúlico livre, tem-se que estes são parecidos para neutralização do radical ROO•, contrastando com os valores obtidos para os radicais DPPH• e $ABTS^{\bullet+}$.

Deste modo, comparando os três ensaios pode-se sugerir que a coordenação do ácido ferúlico ao centro metálico modificou mais os processos relacionados a transferência de elétrons do que o processo de transferência de átomo de hidrogênio. Fato que está de acordo com a voltametria cíclica que mostra uma grande diferença nos processos que envolvem transferência de elétrons para o ligante fer e para quando ele está coordenado formando o complexo Mg-phen-fer.

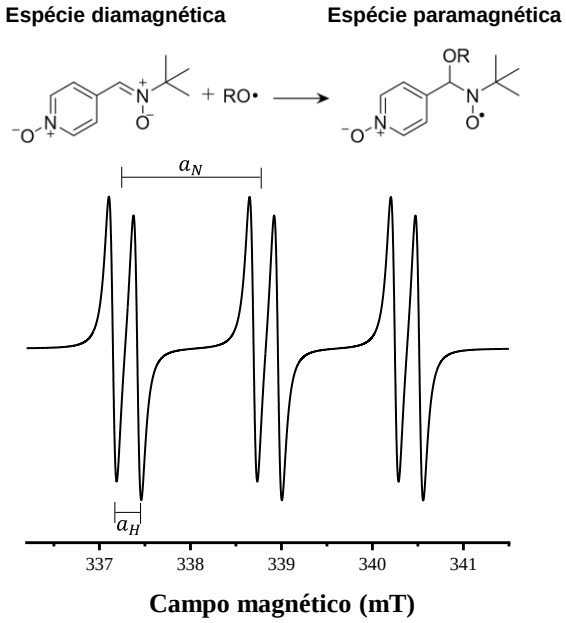


FIGURA 37. Mecanismo de reação do spin trapping 4-POBN com radical peroxila (na parte superior). Espectro simulado do aduto de spin 4-POBN-OR usando um Hamiltoniano Zeeman efetivo com os seguintes parâmetros: a_N= 15,5 G e a_H= 2,7 G (na parte inferior).

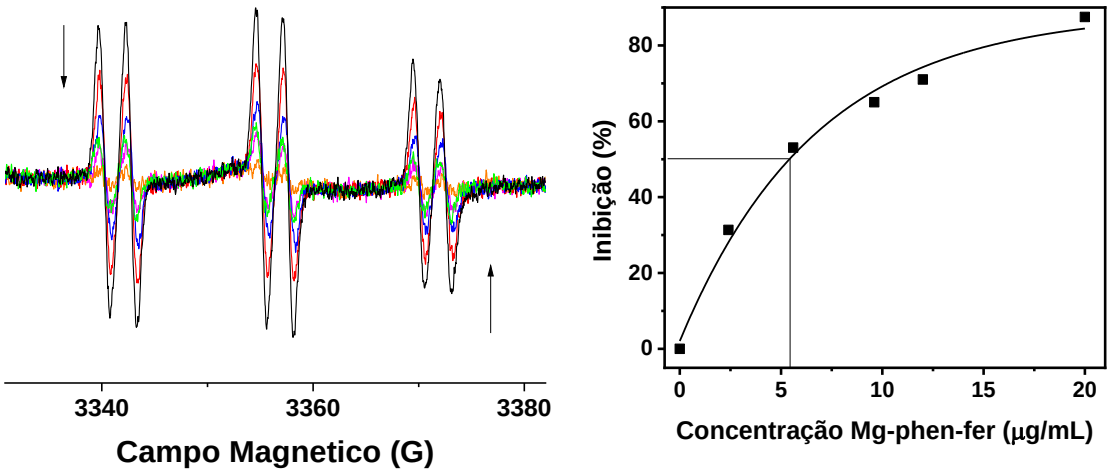


FIGURA 38. Variação da concentração do complexo Mg-phen-fer: 0 µg/mL (preto), 2,4 µg/mL (vermelho), 5,6 µg/mL (azul), 9,6 µg/mL (verde), 12 µg/mL (rosa) e 20 µg/mL (laranja), esquerda. Obtenção do IC_{50} da inibição do radical peroxila para o complexo Mg-phen-fer (direita).

4.2.4 Oxigênio Singleto ($^1O_2$)

O $^1O_2$ não é um radical mas representa uma forma eletronicamente excitada do oxigênio molecular e é um agente oxidante forte, sendo capaz de oxidar moléculas biológicas como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos e desencadear danos citotóxicos.[123] O $^1O_2$ é altamente reativo e pode ser formado a partir da reação de transferência de energia de uma molécula no estado excitado tripleto para o oxigênio molecular[124] (FIGURA 39) e, em sistemas biológicos, através da reação de desproporcionamento do radical superóxido.[125]

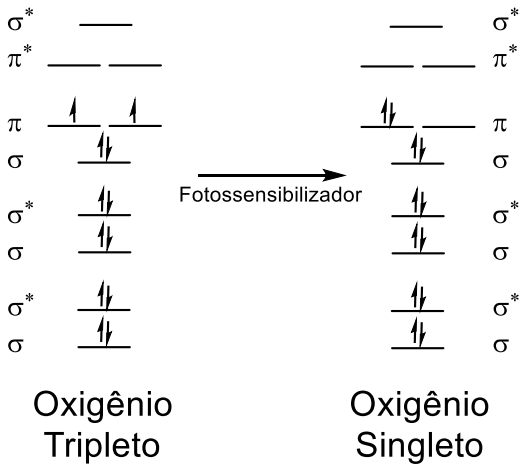


FIGURA 39. Orbital molecular do oxigênio singleto gerado a partir do oxigênio tripleto na presença de um fotossensilizador.

O modo de ação do $^1O_2$ se diferencia em parte dos demais radicais, pois, dependendo do substrato presente, pode reagir com moléculas contendo ligações duplas ou transferindo a energia de seu estado excitado para moléculas presentes no meio.[126]

O oxigênio singleto foi gerado pela irradiação contínua da mistura que continha riboflavina (Rf) com uma fonte de luz de comprimento de onda próximo a 420 nm. Como visto na FIGURA 40, a formação do $^1O_2$ se dá através do mecanismo Tipo I de reações de oxidações fotossensibilizadas.

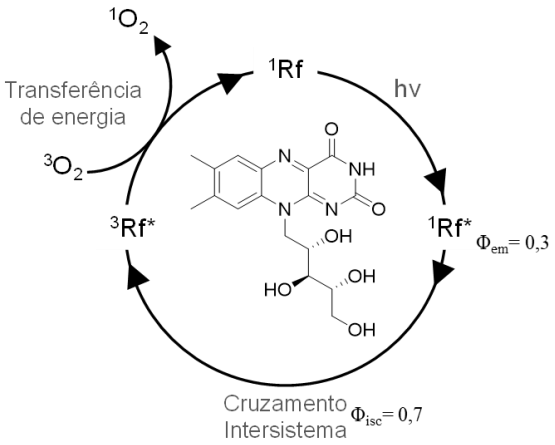


FIGURA 40. Mecanismo formação do oxigênio singleto através do mecanismo Tipo I de reações de oxidações fotossensibilizadas, utilizando a riboflavina (estrutura no meio do ciclo) como fotossensibilizador.

O oxigênio singleto foi detectado através do sequestro desse radical com sequestrador de spin 2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMP). O TEMP não apresenta sinal no RPE (diamagnético), ao reagir com o $^1O_2$ que não foi sequestrado pelo complexo Mg-phen-fer forma o aduto de spin TEMPO que é estável.[127]

O sinal detectado no espectro de RPE do aduto formado, tem como característica um sinal de tripleto com razão entre os picos de 1:1:1 e constante de acoplamento de hiperfina igual a a_N= 17.3 G e g= 2.0060,[127] como mostrado no espectro de RPE simulado na FIGURA 41.

O ensaio de RPE mostrados na FIGURA 42 se baseia na competição entre o spin trap (TEMP) e o complexo Mg-phen-fer pelo oxigênio singleto gerado pela riboflavina na presença de luz. A FIGURA 42 mostra que a inibição ocorre de maneira dependente da concentração com inibição total a uma concentração de 1,65 µg/mL para complexo e com IC_{50}= 667 ng/mL. Ao comparar com o ligante livre qual exibe um sequestro de $^1O_2$ a uma concentração de 97 µg/mL[128], tem-se que quando o complexo é formado essa inibição é expressivamente mais eficiente.

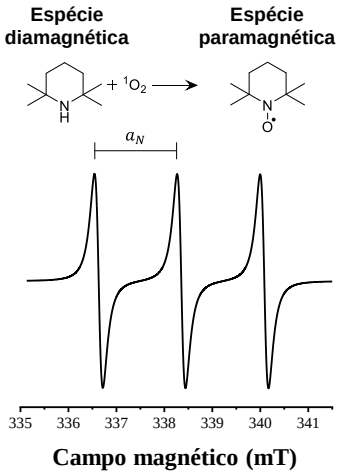


FIGURA 41. Mecanismo de reação do spin TEMP com um oxigênio singleto (na parte superior). Espectro simulado dos aduto de spin TEMPO usando um Hamiltoniano Zeeman efetivo com os seguintes parâmetros: a_N = 17,3 G e g = 2,0060.

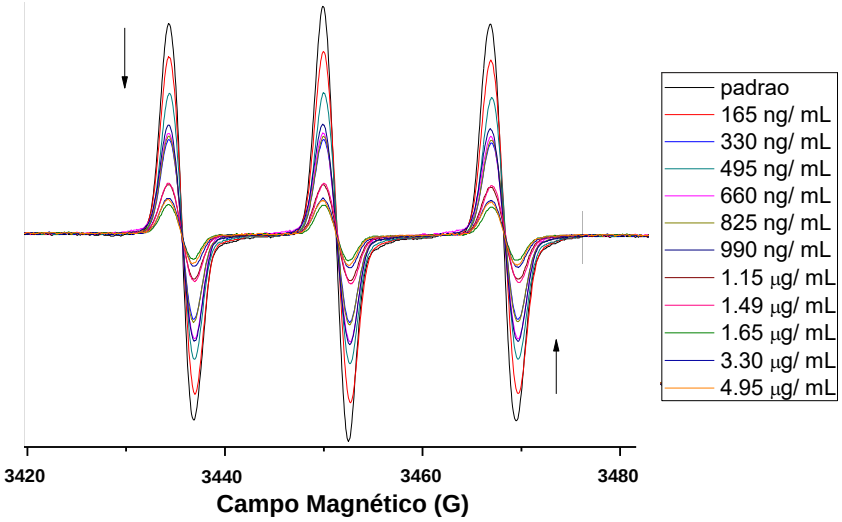


FIGURA 42. Espectros de RPE do TEMPO gerado *in situ* TEMPO (preto, controle) e inibição do $^1O_2$ após adição do complexo Mg-phen-fer variando entre 0,165 µg/mL a 4,95 µg/mL.

4.2.5 Riboflavina – Estudo de caso

A riboflavina (Rf) é uma molécula que tem suas propriedades fotofísicas moduladas pela força iônica do meio, valor de pH da solução, condições aeróbicas e anaeróbicas, entre outros.[129] A Rf apresenta pKa_1= 1,7 e pKa_2=10,2, assim a fotodescoloração da Rf é um processo que depende do estado aniônico ou não dessa molécula.[129] O espectro de absorção eletrônica da Rf é caracterizado por duas absorções em 375 nm e 450 nm, e emissão proveniente de um transição eletrônica singleto-singleto com máximo em 525 nm.

Como mostrado na FIGURA 43, a fotodescoloração da Rf é um processo que ocorre de maneira acentuada em atmosfera de N_2 enquanto em atmosfera de O_2 e ar o processo fotoquímico é cíclico. Isto ocorre pois os fotoprodutos são formados no estado tripleto excitado onde a ausência de O_2 faz com que os intermediários formados não sejam desativados.[130] Como mostrado no espectro de UV-*vis* o principal produto da fotólise é um composto denominado lumicromo.[131] Além dessa molécula, vários radicais são gerados em tampão fosfato, todos com tempo de vida curtos. A presença de lumicromo em atmosfera de N_2 é confirmada pelo espectro de emissão (FIGURA 43), pelo surgimento de uma banda em 450 nm concomitante com a diminuição da banda de 525 nm, dando origem ao espectro de emissão característico dessa molécula.[131]

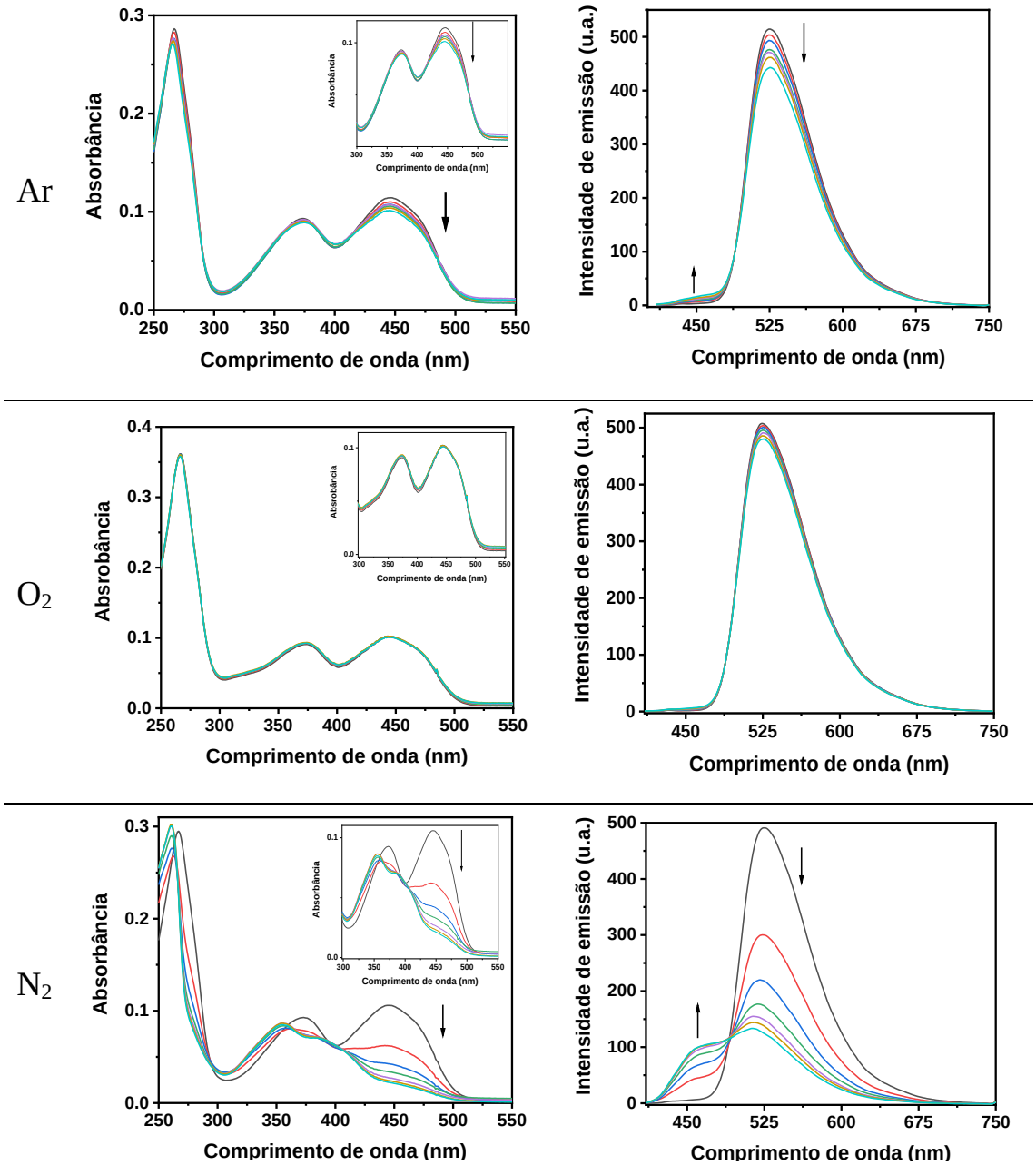


FIGURA 43. Irradiação com luz contínua (450 nm) de uma solução de Rf (10 µmol/L) em diferentes atmosferas: ar, O_2 e N_2. Instet: decaimento da absorção na região entre 300 nm e 550 nm. Tempos de irradiação: 0 minutos (preto), 3 min (vermelho), 6 min (azul), 9 min (verde), 12 min (roxo), 15 min (amarelo), 20 min (ciano).

A Rf sem estar na presença do complexo Mg-phen-fer apresenta o processo de fotodescoloração como uma cinética de primeira ordem. Na FIGURA 44 parte superior, fica evidenciado como a atmosfera influencia nesse processo. Acompanhando a banda de 450 nm na absorção, e

comparando N_2 e ar tem que a constante cinética em N_2 é mais do que o dobro daquela observada para ar, sendo $k_{obs} = 0{,}244\ min^{-1}$ e $k_{obs} = 0{,}106\ min^{-1}$, respectivamente. Além disso, pelo decréscimo da banda de emissão em 525 nm e aumento da banda de 460 nm (FIGURA 44 inferior) fica claro o efeito do oxigênio na supressão do estado excitado que leva a formação de produtos pois em ar a banda de 460 nm referente ao lumicromo não cresce nem 10 % em relação a atmosfera de N_2.

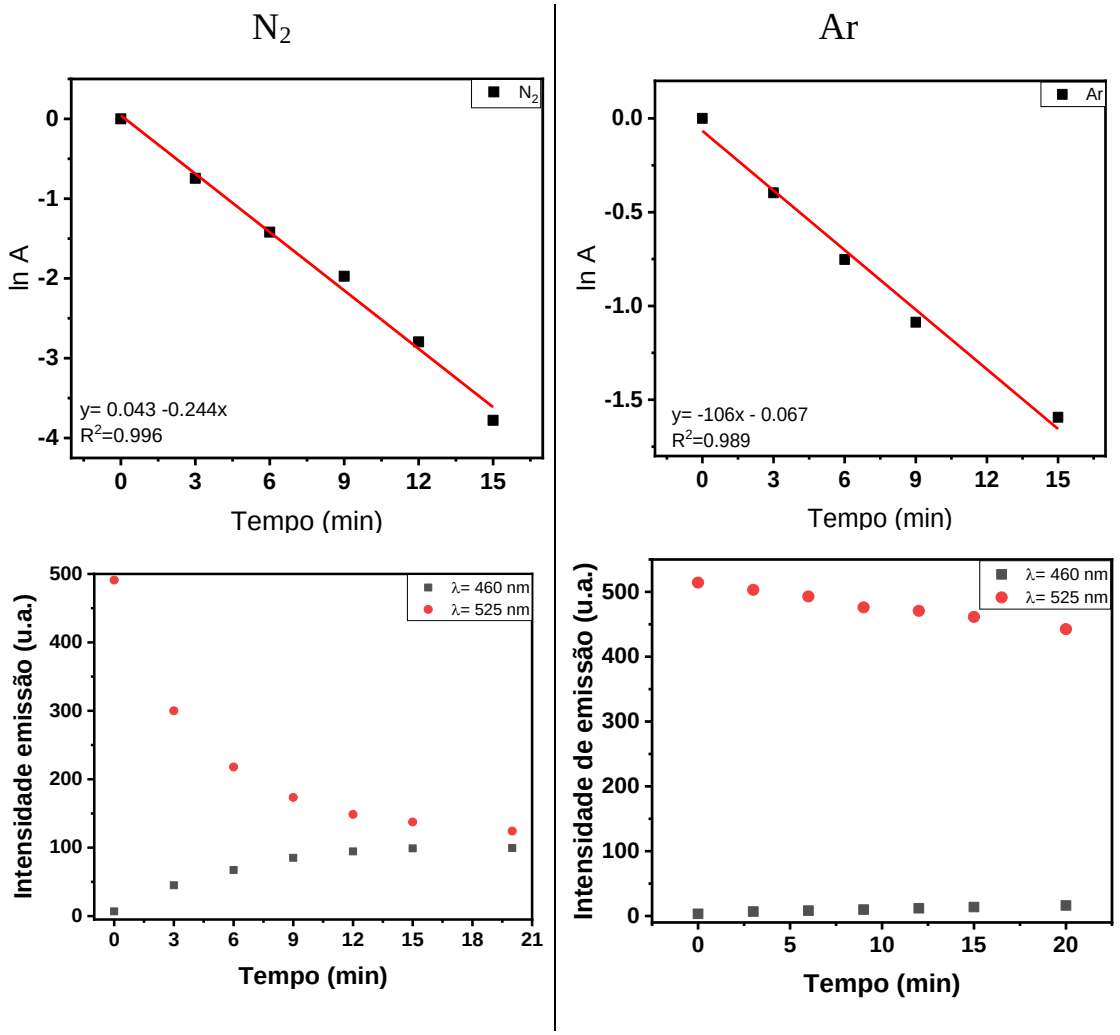


FIGURA 44. Tratamento cinético de $\ln[(A_{inf} - A_t)/ (A_{inf} - A_{t0})]$ *vs* tempo em minuto considerando um processo de primeira ordem em N_2 e ar (parte superior). Decréscimo da banda em 525 nm referente a emissão singleto excitado da riboflavina e aumento da banda em 460 nm referente a emissão singleto excitado do lumicromo (parte inferior).

Dessa forma, como visto na FIGURA 40 (o ciclo de geração de $^1O_2$) e pelos dados obtidos acima, pode-se descrever as reações que estão acontecendo nesse sistema como as Equações 27-31:

$Rf + h\nu \rightarrow {}^1Rf^*$ Eq. 27

$^1Rf^* \rightarrow Rf + h\nu'(\Phi_{em}= 0,30)$ Eq. 28

$^1Rf^* \rightarrow {}^3Rf^* (\Phi_{isc}= 0,70)$ Eq. 29

$^3Rf^* + Rf \rightarrow$ lumicromo (emissão em 460 – 600 nm) Eq. 30

$^3Rf^* + {}^3O_2 \rightarrow Rf + {}^1O_2$ Eq. 31

Uma das técnicas mais utilizadas hoje em dia para a proteção de carnes são embalagens de atmosfera modificada onde se faz uma mistura de gases como CO, O_2 e N_2 sendo sempre majoritário em gases neutros.[132] Logo, nesse tipo de embalagem de carne, o excesso de N_2 pode causar degradação da riboflavina gerando mais radicais o que diminui o tempo de prateleira do alimento bem como acelera as mudanças organolépticas da carne.

Uma vez que se determinou o comportamento da Rf em solução, decidiu-se analisar qual seria o comportamento da mesma na presença do complexo em diferentes concentrações e atmosferas.

De modo geral o complexo Mg-phen-fer foi capaz de atuar com efeito protetivo da Rf em atmosfera de N_2, onde a velocidade de formação do lumicromo diminuiu drasticamente. Como mostrado na FIGURA 45, em atmosfera de N_2 na presença de 11 µg/mL do complexo a riboflavina foi estabilizada levando a uma menor fotodegradação.

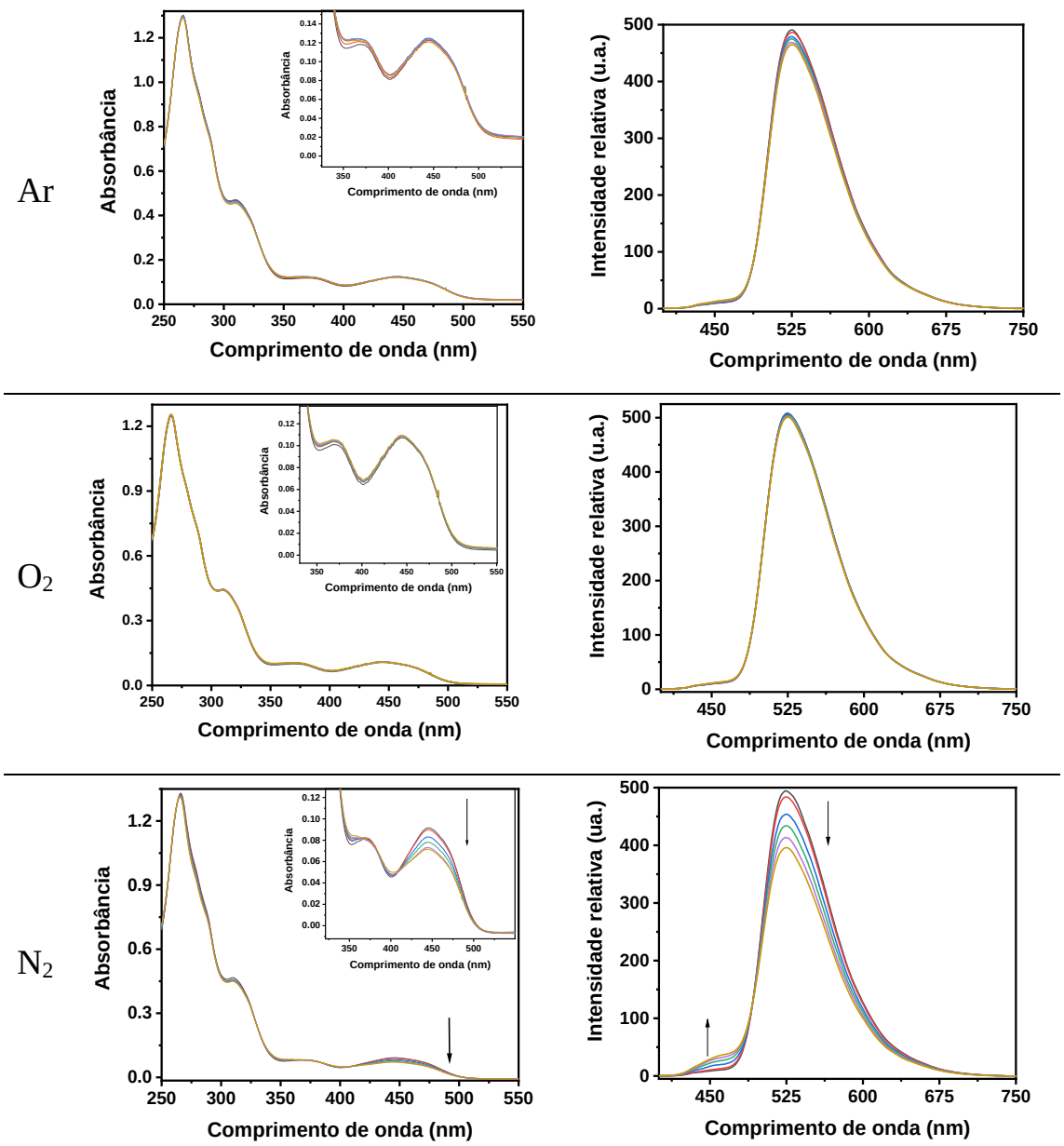


FIGURA 45. Irradiação com luz contínua (450 nm) de uma solução de Rf (10 µmol/L) e Mg-phen-fer (11 µg/L) em diferentes atmosferas: ar, O_2 e N_2. Instet: decaimento da absorção na região entre 325 nm e 550 nm. Tempos de irradiação: 0 minutos (preto), 3 min (vermelho), 6 min (azul), 9 min (verde), 12 min (roxo) e 15 min (amarelo).

Como mostrado na FIGURA 46 e TABELA 5 a presença do complexo Mg-phen-fer alterou a velocidade de degradação. De maneira geral, com o aumento da concentração do complexo para atmosfera de N_2, menor foi o processo de foto-embranquecimento. Em relação as constantes de velocidade, uma concentração de 11 µg/mL de complexo diminuiu em três vezes a constante em relação àquela sem complexo.

Em ar, da menor concentração até a maior (4 e 15 µg/mL, respectivamente) não houve alteração aparente nos espectros de UV-*vis* e nem na emissão, de modo que não foi possível obter um valor de k_{obs} pois não se observou nenhuma fotodegradação. De modo semelhante, em O_2 na presença do complexo, nenhuma alteração é observada. Estes dados são mostrados no apêndice B.

TABELA 5. Constantes de velocidade de primeira ordem (k_{obs}) para a fotodescoloração da Rf em condição anaeróbico com diferentes concentrações de complexo em tampão fosfato pH 7,4.

Concentração Mg-phen-fer (µg/mL)	k (min^{-1})
0	0,244
4	0,233
7	0,207
9	0,199
11	0,102
13	0,080

N_2

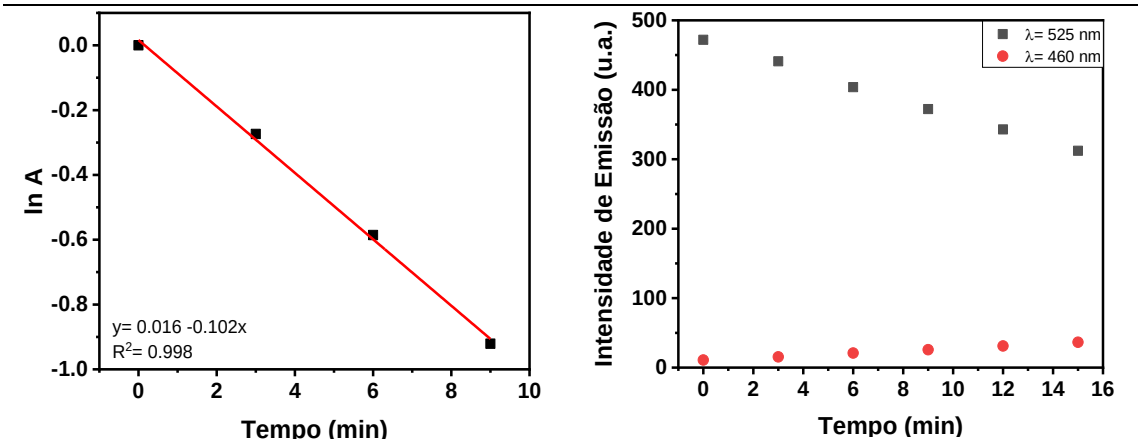


FIGURA 46. Tratamento cinético de $\ln[(A_{inf} - A_t)/ (A_{inf} - A_{t0})]$ *vs* tempo em minuto considerando um processo de primeira ordem em N_2 (esquerda). Decréscimo da banda em 525 nm referente a emissão singleto excitado da riboflavina e aumento da banda em 460 nm referente a emissão singleto excitado do lumicromo (direita).

A partir desses dados fica evidenciado que o complexo Mg-phen-fer foi eficaz em atuar na riboflavina protegendo-a contra a degradação, processo descrito nas Equações 32-35. A principal possibilidade de atuação do complexo é que este foi capaz de desativar o estado singleto excitado da Rf não permitindo que atingisse o tripleto, logo não permitiu a formação de radicais e lumicromo em excesso. Isso se deve ao fato que o complexo possui estado fundamental e excitado singleto uma vez que tanto o metal Mg(II) (por ser pequeno e camada de valência completa) e o ligante ácido ferúlico não atingem o tripleto.

A Rf em presença de O_2 tem seu estado excitado $^3Rf^*$ suprimido, o que a protege da fotodegradação. Quando esse mesmo sistema tem a presença do complexo, esse sequestra o $^1O_2$ formado como foi demonstrado na atividade antioxidante frente a esse radical.

$Rf + h\nu \rightarrow {}^1Rf^*$ Eq. 32

${}^1Rf^* \rightarrow Rf + h\nu'(\Phi_{em}= 0,30)$ Eq. 33

${}^1Rf^* + Complexo \rightarrow Rf + Complexo^*$ Eq. 34

$Complexo^* \rightarrow Complexo + h\nu''$ Eq. 35

Como o possível mecanismo de supressão da Rf excitada envolve a desativação dos estados singletos e tripleto excitados, a presença do oxigênio e do complexo Mg-phen-fer faz com que haja uma competição cinética para supressão destes estados. A desativação do estado singleto excitado ($^1Rf^*$) compete como o processo de cruzamento intersistemas ($^1Rf^* \rightarrow {}^3Rf^*$) fazendo que o rendimento quântico de formação do $^3Rf^*$ seja diminuído.

A constante de velocidade bimolecular de supressão do estado singleto (k_q) da Rf pelo complexo Mg-phen-fer foi determinado medindo-se o tempo de vida de fluorescência da Rf na presença e ausência do complexo. As constantes foram estimadas utilizando a equação de Stern-Volmer, Equações 36-38:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{SV}[Mg - phen - fer] \quad \text{Eq. 36}$$

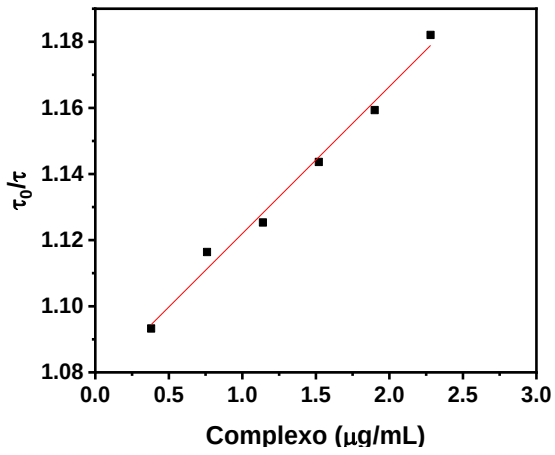
$$K_{SV} = k_q \tau_0 \quad \text{Eq. 37}$$

$$k_q = \frac{K_{SV}}{\tau_0} \quad \text{Eq. 38}$$

onde τ_0 é o tempo de vida de fluorescência da Rf na ausência do complexo, τ é o tempo de vida de fluorescência da Rf na presença do complexo, K_{SV} é a constante de Stern-Volmer e k_q é a constante de velocidade bimolecular de supressão do estado singleto pelo complexo.

Na FIGURA 47, está a análise de Stern-Volmer para cada uma das atmosferas, de modo que é possível quantificar os efeitos do complexo na desativação da fluorescência. Os experimentos foram feitos em triplicata, sendo reprodutível em todos os casos. O τ_0 observado para cada atmosferas N_2, ar e O_2 foram 4,22 ns, 3,82 ns e 3,73 ns, respectivamente. O valor de K_{SV} foi obtido pelo valor do coeficiente angular da reta, e pela equação 38, o valor de k_q. Os valores foram obtidos em µg/mL e convertidos para mol/L considerando a estrutura hexacoordenada.

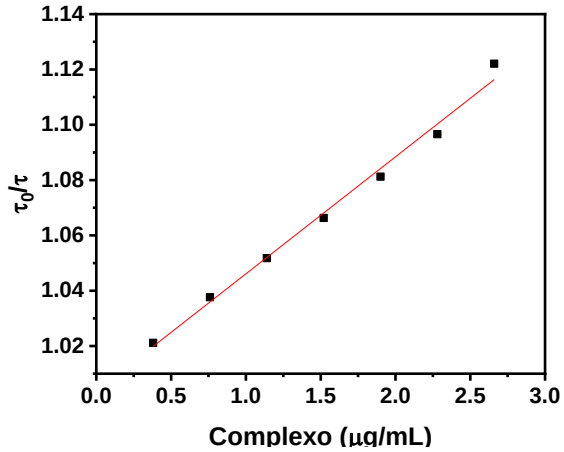
N_2



K_{SV}= 0,041±0,003 (µg/mL)$^{-1}$

k_q= 6,21 x 10^9 l/mol.s

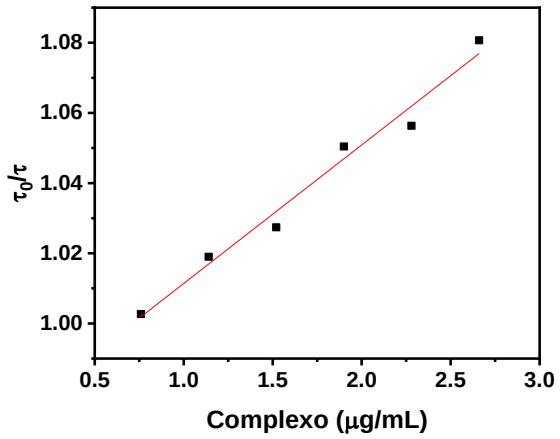
Ar



K_{SV}= 0,040±0,003 (µg/mL)$^{-1}$

k_q= 6,73 x 10^9 l/mol.s

O_2



K_{SV}= 0,040±0,001 (µg/mL)$^{-1}$

k_q= 6,77 x 10^9 l/mol.s

FIGURA 47. Gráficos de Stern-Volmer para supressão do estado singleto excitado da Rf pelo complexo Mg-phen-fer em diferentes atmosferas: N_2 (superior), ar (centro) e O_2 (inferior) em tampão fosfato pH 7,4 (esquerda). Valores de constante de Stern-Volmer (K_{SV}) e constante velocidade bimolecular de supressão do estado singleto pelo complexo (k_q) (direita).

O valor de k_q obtido nos três casos foram bastante similares e mostra que a desativação do estado singleto excitado da Rf se dá por difusão. Além disso, independentemente da atmosfera utilizada o complexo atuou de

maneira semelhante em desativar o estado singleto excitado da Rf. Contudo o rendimento quântico de cruzamento intersistema $^1Rf^* \rightarrow {}^3Rf^*$ em O_2 deve ter sido menor que 0,7, mas não inibiu a formação de oxigênio singleto.

O complexo Mg-phen-fer teve um comportamento similar ao BHT em desativar o estado singleto excitado da riboflavina, isto é, o valor de k_q para BHT é de 4,67 x 10^9 l/mol.s.[133] Comparando o valor obtido para o complexo tem-se que o complexo é um pouco superior em desativar o estado excitado singleto, sendo outro indicativo da boa atividade antioxidante do complexo.

4.3 Filmes

4.3.1 Biopolímeros usados para os filmes de casting

Para esta etapa do trabalho foram selecionados os biopolímeros, amido de tapioca e gelatina e o método de casting para confecção dos filmes.

Como mostrado na FIGURA 48, o amido é constituído por dois polissacarídeos, a amilase e a amilopectina. Os filmes de amido se formam facilmente e possuem uma boa barreira de proteção para oxigênio. Por outro lado, devido as forças intermoleculares serem fortes, o filme é quebradiço sendo necessário a adição de um plastificador. Outra questão que deve ser avaliada na confecção em filmes de amido é a facilidade de hidratação, já que o amido se hidrata e incha facilmente, como consequência apresenta uma baixa barreira de proteção ao vapor de água.[65, 134]

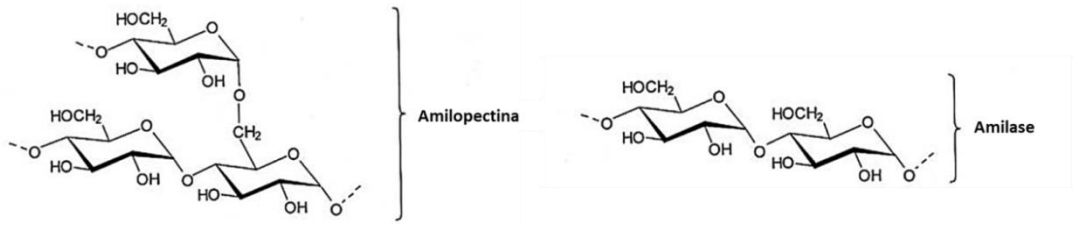


FIGURA 48. Estruturas química da amilase e amilopectina, constituintes do amido.

A gelatina é um composto proteico solúvel, obtido a partir da hidrólise parcial de colágeno, que é o principal constituinte fibroso dos ossos,

cartilagens e peles. Este biopolímero consiste em proteínas (85-92 %), sais minerais e água,[135] FIGURA 49. Os principais atributos que melhor definem a qualidade comercial da gelatina são a resistência mecânica e a estabilidade térmica. Em contrapartida, devido ao caráter hidrofílico, filmes de gelatina sofrem inchaço e têm pouca propriedade de barreira ao vapor de água.[136]

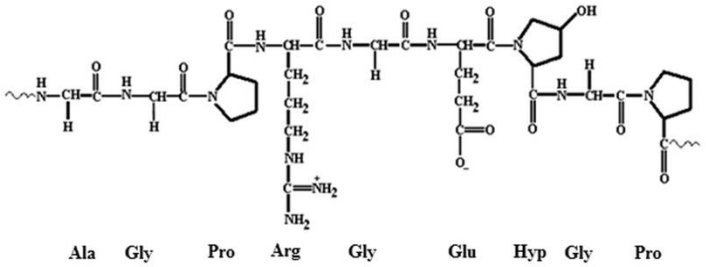


FIGURA 49. Estrutura unidimensional da proteína constituinte da gelatina.

Filmes contendo diferentes concentrações de glicerol (plastificador) foram feitos, sendo que os melhores resultados foram as formulações de 25 % (m/m) glicerol para o amido e de 20 % (m/m) glicerol para a gelatina. O principal motivo da escolha desse plastificador é que este possui o uso autorizado para aplicações na indústria alimentícia, sendo possível o contato entre este e o alimento. Em relação ao complexo, foi sempre utilizado 10 mg do Mg-phen-fer para preparar as soluções dos filmes.

4.3.2 Massa seca e atividade da água (a_w)

A quantidade de água associada aos filmes de amido e de gelatina preparados por casting foi avaliado. Observou-se uma variação de massa de 12 % para o filme de amido e 9 % para os filmes de gelatina. Os valores obtidos estão de acordo com valores encontrados na literatura.[137]

Para o armazenamento correto de filmes, é desejável que estes possuam atividade da água (a_w) abaixo de 60 % para não favorecer crescimento de microrganismos como fungos.[138] Os filmes de amido sem e com os complexos de Mg(II) apresentaram valores de atividade da água próximos a 40% e os filmes de gelatina, valores menores de 20 %.

Dessa forma, ambas as formulações se mostraram boas do ponto de vista prático, isto é, o armazenamento destes filmes com os complexos em lugares secos dificilmente propiciaria o crescimento de microrganismos indesejáveis, como fungos e leveduras.

4.3.2 Opacidade e Transparência

Os valores de opacidade para os filmes produzidos por casting, estão descritos na TABELA 6. Em todos os casos, os filmes são transparentes e não afetam a visualização de produtos através deles.

Em relação aos filmes de gelatina, como mostrado na TABELA 6, estes possuem o menor de grau de opacidade, sendo mais transparentes. Com a adição do complexo, o filme de gelatina apresentou valor inferior a 0,5 %.

Ao se comparar com poliestireno comercial que apresenta opacidade entre 0,1-3,0 %, e polipropileno (25 μm) com 2,50 % tem-se que os filmes de gelatina são tão transparentes quanto os filmes contento polímeros sintéticos e amplamente utilizados.[65]

TABELA 6. Valores de opacidade e teste visual de transparência para os filmes de gelatina e de amido produzidos por casting.

Amostra	Gelatina		Amido	
	% opacidade	Teste Visual	% opacidade	Teste Visual
Controle	0,52 %		20,05 %	
Mg-phen-fer	0,30 %		13,50 %	

As propriedades ópticas dos filmes de amido podem ser comparadas com o valor de opacidade de polietileno de baixa densidade (50 μm) comercial que é de 30 % e equivale ao valor máximo para um filme ser considerado transparente.

4.3.3 Análise por infravermelho

A partir da análise de infravermelho com refletância total atenuada (IR-ATR) é possível inferir se houve alguma interação entre o polímero e o complexo. A FIGURA 50, mostra os espectros dos filmes feitos com amido contendo o complexo Mg-phen-fer comparado com o padrão.

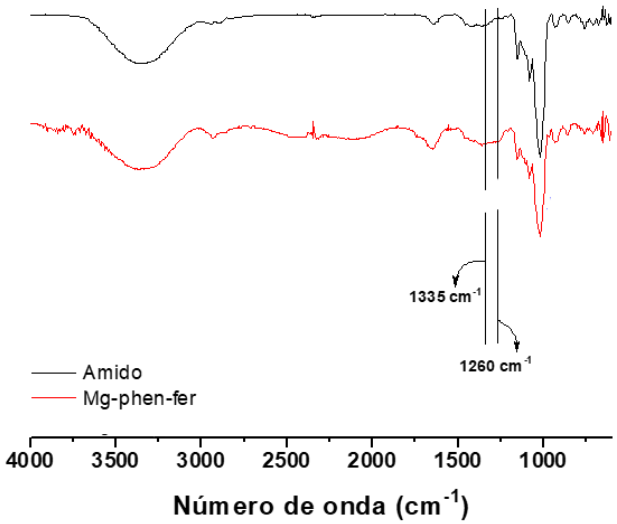


FIGURA 50. Infravermelho-ATR dos filmes de amido: controle (preto) e contendo o complexo Mg-phen-fer (vermelho).

No filme de amido sem o complexo, FIGURA 50, foi observado estiramentos em 3340 cm^{-1} devido ao estiramento -OH dos grupos presentes na estrutura do amido, 2945 cm^{-1} e 890 cm^{-1} devido ao estiramento C-H do anel da estrutura do amido, 1645 cm^{-1} reflexo do estiramento δ(O-H) da água ligada a estrutura, 1420 cm^{-1} e 1360 cm^{-1} estiramento do CH_2 do amido e 1145 cm^{-1}, 1080 cm^{-1} e 1025 cm^{-1} forte sinal devido ao estiramento C-O, valores próximos e condizentes com aqueles encontrados na literatura.[139,140]

Com a adição do complexo, FIGURA 50, o estiramento devido ao CH_2 do amido foi deslocado, variando de 1335 cm^{-1} para 1260 cm^{-1} para o filme com o complexo. Este fato é devido a interação entre as ligações C-H do amido através de ligações de hidrogênio entre o grupo hidroxilo do ácido ferúlico.

Para entender como os complexos se comportam termicamente no filme de amido, foram acompanhadas, por 144 horas, as mudanças espectrais que aconteceriam quando os filmes são colocados em temperaturas mais elevadas (30 °C e 40 °C) e na presença e ausência de oxigênio.

Nas situações apresentadas abaixo, FIGURA 51, em todos os filmes sem ou com complexo apresentaram estabilidade térmica, não ocorrendo

mudanças espectrais. Além disso, a presença ou ausência de oxigênio não afeta as interações formadas entre o amido e o complexo, por não apresentarem mudanças significativas entre os espectros de tempo zero e depois de 144 horas. A passagem de oxigênio pelos filmes porosos não altera a blenda, deixando os complexos estáveis para atuarem contra as espécies reativas de oxigênio, como será demostrado pelo estudo com o escurecimento da maçã, que é um processo radicalar. A estabilidade térmica é desejável, pois qualquer filme polimérico deve ser estável nas mais diferentes situações de temperatura e condições de oxigênio para uma maior gama de aplicação variando desde proteção alimentícia até recobrimento de superfícies.

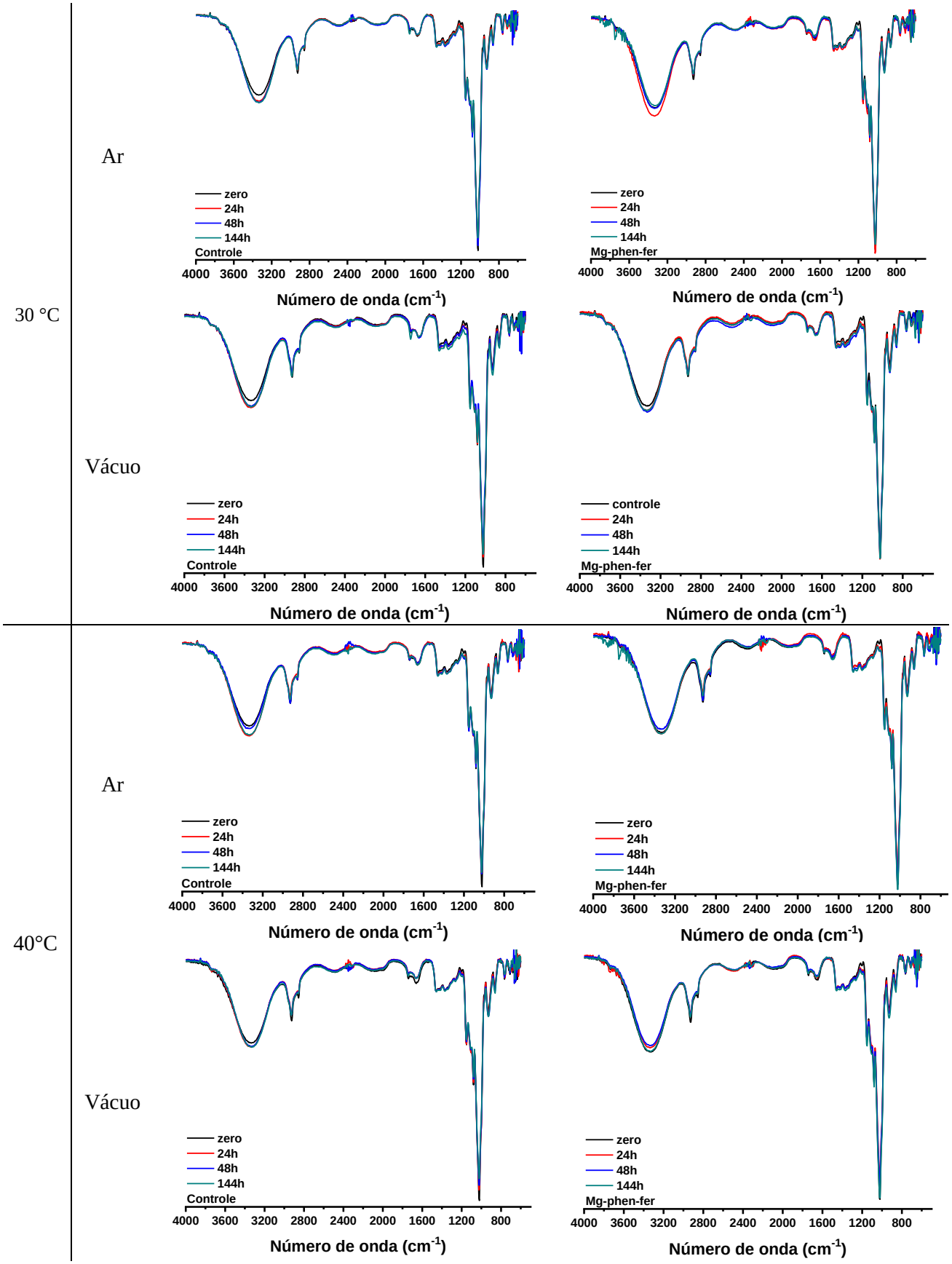


FIGURA 51. Avaliação através de IV-ATR da modificação da estrutura dos filmes de amido controle e contendo os complexos quando são expostos a presença e ausência de ar a 30 °C e a 40°C e guardados no escuro.

Além dos filmes de amido, os filmes de gelatina produzidos por casting também foram caracterizados pelo IR-ATR, como mostrados na FIGURA 52.

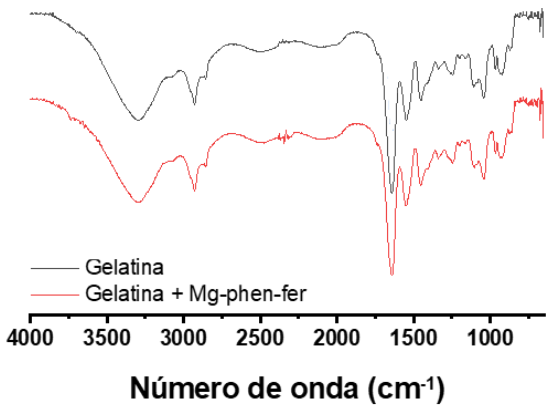


FIGURA 52. Infravermelho-ATR dos filmes de gelatina sendo controle (azul), e do filme contendo o complexo Mg-phen-fer (vermelho).

Na FIGURA 52, tanto o filme controle quanto o filme contendo o complexo Mg-phen-fer exibiram o estiramento principal em 1630 cm^{-1}, que é o pico característico da amida, representando o estiramento C=O. O pico em 1550 cm^{-1} é devido à flexão dos grupos N-H. O pico em 1240 cm^{-1} refere-se a vibração dos grupos C-N e N-H da amida. O estiramento em 1041 cm^{-1} deve-se à interação entre o glicerol e a gelatina. O pico à 3300 cm^{-1}é alongamento de N-H.[141,142]

Além disso, a inserção do complexo na matriz polimérica não levou a uma alteração, como visto para os filmes de amido. Sabe-se que a inserção dos complexos ocorreu uma vez que as medidas de opacidade mostraram isso. A falta de alteração no espectro relaciona-se ao fato da estrutura da gelatina ser mais complexa que a do amido e possuir maiores interações intramoleculares do que intermoleculares.[73]

4.3.4 Taxa de permeabilidade ao oxigênio (TPO_2)

A TPO_2 é uma característica fundamental de filmes flexíveis com propriedades de barreira a gás, principalmente relacionada à proteção de produtos sensíveis ao oxigênio. Experimentalmente, a taxa de permeabilidade ao oxigênio permite quantificar a eficácia de um filme como barreira frente a penetração de oxigênio.[143,144]

A TABELA 7 apresenta os valores da taxa de permeabilidade ao oxigênio para os filmes de amido produzidos por casting, medidos à temperatura ambiente de 23 °C e condições de umidade relativa igual a 40%.

TABELA 7. Valores de permeabilidade ao oxigênio e coeficiente de oxigênio para os filmes de casting de amido.

Condição	Amostra	Espessura (mm)	TPO_2[cc/(m²·24h)]
Casting Amido	Controle	0,125 ± 0,008	46,144
	Mg-phen-fer	0,105 ± 0,01	1228,009

Com a adição do complexo na blenda de casting de amido, a permeabilidade ao oxigênio aumentou, diminuindo suas propriedades de barreia de gás. Esse aumento está relacionado com a diminuição da fase cristalina devido a incorporação do complexo Mg-phen-fer, como é reportado para a inserção de compostos ativos.[145,146]

Assim, o aumento na TPO_2 deve-se à influência do complexo que interferiu nas propriedades da blenda pela modificação da cristalinidade do filme, ou seja, a inserção do complexo na blenda levou a um aumento da fase amorfa e, portanto, aumentou a difusão de oxigênio.

Além disso, como mostrado por Arvanitoyannis e colaboradores, mudanças na interação polímero-complexo na matriz do amido acarretam um aumento no valor de TPO_2.[147] Logo, a incorporação do complexo (concentração de 10 mg) levou a um enfraquecimento das interações

intermoleculares das cadeias de amido, facilitando o movimento das cadeias e promovendo uma maior permeabilidade ao oxigênio.

Da mesma maneira, foi estudado para os filmes de gelatina produzidos por casting. Na TABELA 8 são apresentados os valores da taxa de permeabilidade ao oxigênio para os filmes de gelatina contendo o complexo em sua formulação medidos à temperatura ambiente de 23 °C e condições de umidade relativa igual a 20 %.

TABELA 8. Valores de permeabilidade ao oxigênio e coeficiente de oxigênio para os filmes de casting de gelatina.

Condição	Amostra	Espessura (mm)	TPO_2[cc/(m²·24h)]
Casting Gelatina	Controle	0,057 ± 0,006	16, 024
	Mg-phen-fer	0,095 ± 0,005	12,618

De maneira geral, os valores de permeabilidade ao oxigênio de filmes de gelatina são normalmente menores que filmes feitos a partir de polímeros sintéticos e outros biopolimeros,[148] onde a adição dos complexos pouco alterou suas propriedades.

Nota-se, a partir da TABELA 8, a taxa de permeabilidade ao oxigênio dos filmes de gelatina contendo o complexo apresentou uma alteração pequena em relação ao controle. Os filmes de gelatina tiveram uma diminuição significantemente nos valores de TPO_2 em relação aos filmes de casting de amido, como por exemplo variando de 1228 cc/(m²·24h) no filme de amido para 12,618 cc/(m²·24h) no filme de gelatina quando ambos contêm Mg-phen-fer em suas formulações.

Assim como é visto para outros casos,[149,150] a incorporação de compostos ativos pouco altera as propriedades de barreira ao oxigênio de filmes de gelatina, pois como o processo de casting foi feito com soluções quentes acima da temperatura vítrea da gelatina, levando diminuições das

estruturas terciárias da proteína e da mobilidade molecular, dificultando a difusão do gás oxigênio o que reflete nos valores da TABELA 8.

4.3.5 Estudos de liberação

A liberação do complexo dos filmes de amido e gelatina nos diferentes estimulantes está relacionada com fatores como a solubilidade dos complexos nos diferentes solventes, propriedades de inchamento do filme e interações intermoleculares entre complexo e biopolimero.[151]

A influência e efeito do meio hidrofílico/lipofílico sobre a liberação dos complexos dos filmes em função do tempo foi avaliada com base na quantidade total de complexo liberado para as diferentes soluções em função do tempo. Os dados apresentados na FIGURA 53 são para os filmes de amido.

Filme amido contendo Mg-phen-fer

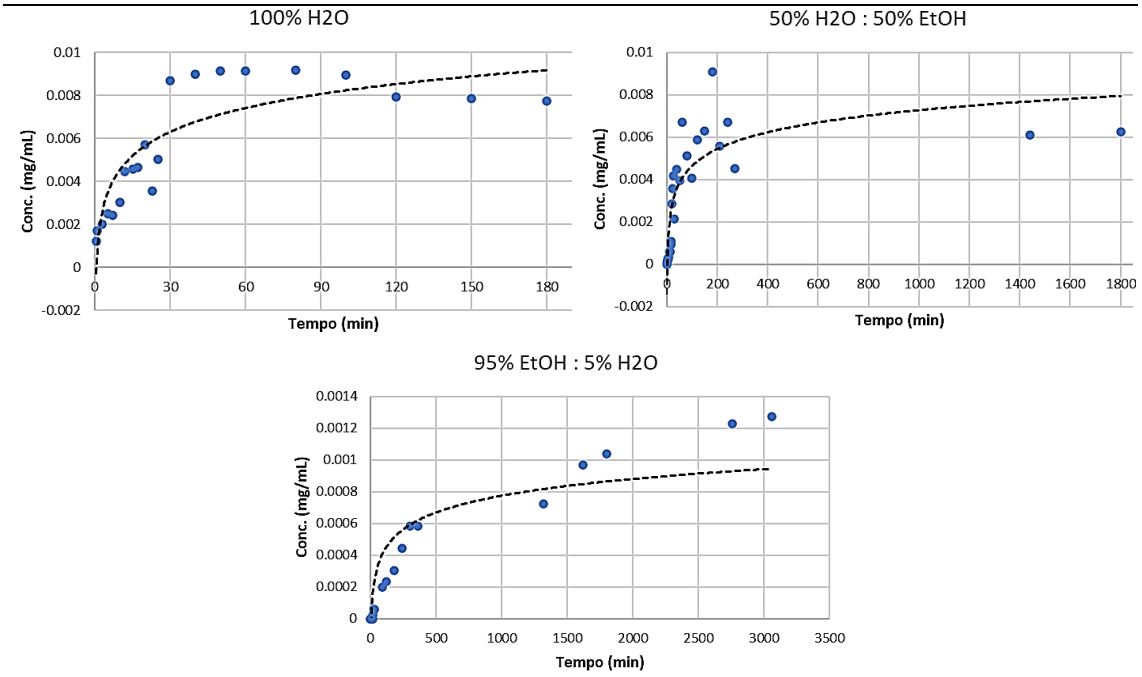


FIGURA 53. Liberação cinética do complexo Mg-phen-fer a partir dos filmes de amido produzidos por casting no decorrer do tempo em diferentes simuladores alimentares.

Em água observou-se uma liberação rápida do complexo (100 % em 30 min), mesmo comportamento é visto para flavonoides em filmes de

amido.[152] Com o aumento do teor lipofílico observou-se uma retenção do complexo durante um maior período de tempo obtendo uma completa liberação de complexo para o meio (1:1; etanol:água) em 200 min. Quando o estimulante continha 95 % etanol, apenas 10 % de liberação do complexo em 3000 min foi observada. Esses resultados estão de acordo com aqueles sobre a liberação de diferentes antioxidantes presentes no extrato de alecrim e ácido ascórbico para os mesmos estimulantes aqui estudados, ou seja, liberação rápida para sistemas com altos teores de água.[151,153]

Como mostrado na FIGURA 54, os filmes de gelatina tiveram o mesmo comportamento observado para a liberação do complexo a partir do filme de amido, ou seja, a liberação foi rápida. Outros trabalhos mostram que filmes de gelatina apresentam uma liberação rápida mesmo quando se é estudado a temperaturas de 4 °C para retardar sua liberação.[148]

Filme gelatina contendo Mg-phen-fer

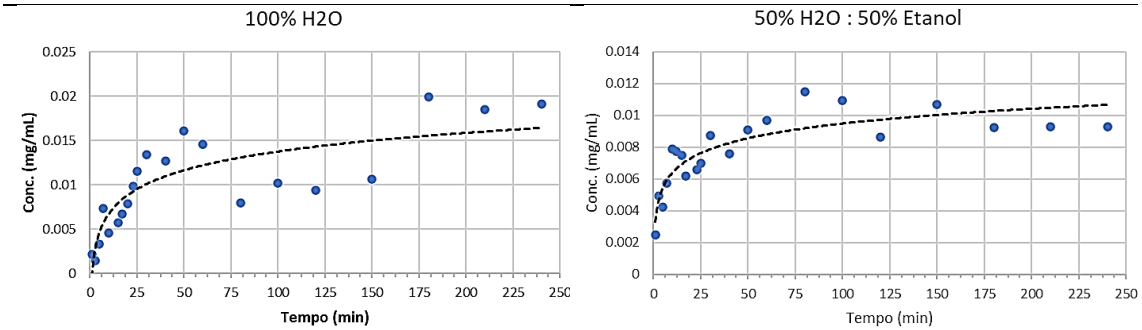


FIGURA 54. Cinética de liberação do complexo Mg-phen-fer a partir dos filmes de gelatina produzidos por casting no decorrer do tempo em diferentes simuladores alimentares.

Para ambos os filmes de amido e gelatina, houve um inchaço em solução favorecendo a transferência contínua e rápida do complexo Mg-phen-fer da matriz polimérica para os meios estimuladores. Uma liberação mais lenta a partir das matrizes poliméricas seria preferível e vantajosa pois levaria a um prolongamento das atividades antioxidantes.[66,154] Uma escolha seria a troca do biopolímeros por um polímero aniônico como pectina pois

levaria a uma interação eletrostática entre o complexo e o polímero o que possivelmente retardaria a liberação dos compostos.

4.3.6 Proteção em relação a oxidação de frutas: Escurecimento da maçã

A eficiência do filme de amido contendo o complexo para inibir a oxidação de frutas foi analisado pelo processo de escurecimento enzimático da maçã. Alterações nos valores de ΔE* estão relacionadas com as modificações na superfície da maçã causadas pela atividade de polifenol oxidases e fenol peroxidases.[155] A FIGURA 55 mostra a variação da cor da maçã em termos de coloração absoluta.

Como visto na FIGUA 55 o filme contendo o complexo Mg-phen-fer apresentou um atraso no processo de escurecimento da maçã, possuindo um aumento gradual deste. Enquanto para o caso do filme controle e sem nenhum filme, apresentaram um alto valor relativo de ΔE devido ao escurecimento rápido.

Sistemas que usam polifenóis como antioxidantes suportados em filmes para combater essas espécies, aconteceu um gradual e lento escurecimento da maçã da mesma maneira que observado para o complexo.[155]

Nas situações que se têm a presença do complexo, o processo de escurecimento atinge um máximo seguido de uma queda, fato relacionado com o complexo que ao ser liberado do filme mantém suas propriedades antioxidantes pois o ácido ferúlico apresenta uma capacidade antioxidante maior do que 1.[156]

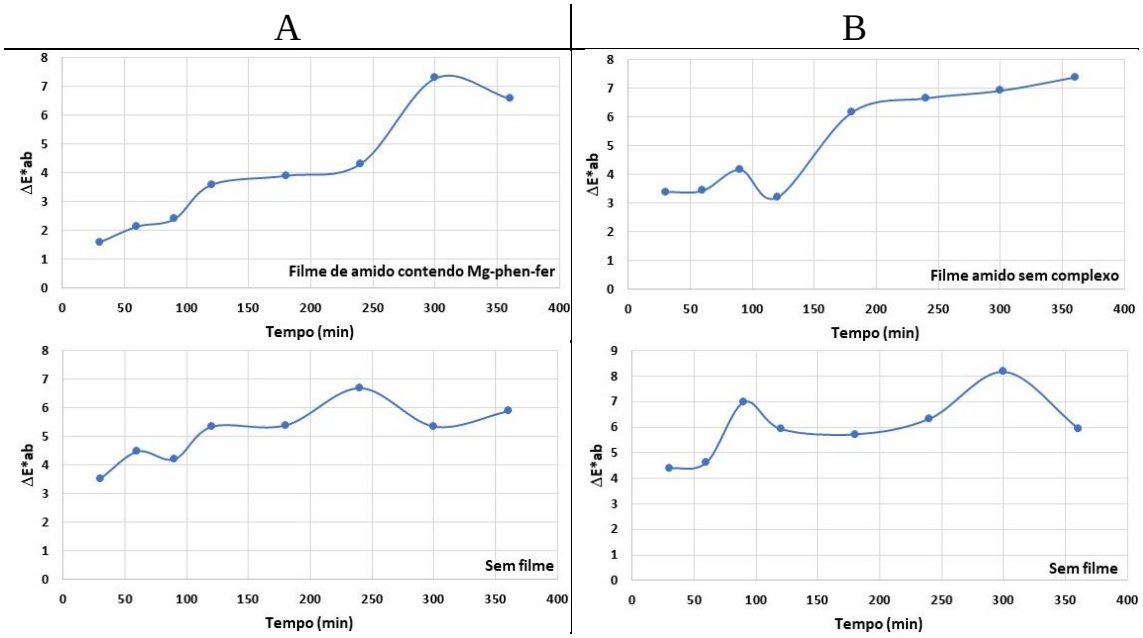


FIGURA 55. Avaliação da variação de coloração da maçã quando coberta com filme de amido contendo o complexo Mg-phen-fer e sem filme (A) e quando coberta apenas com o filme controle sem complexo e sem filme (B).

4.4 Dados Biológicos

4.4.1 Propriedades bactericidas e fungicidas do complexo - Estudos de Microbiologia Alimentar

Microbiologia alimentar é uma das principais áreas de estudos da ciência dos alimentos. Em relação a carne vermelha, os níveis de bactérias nos tecidos musculares de animais vivos e saudáveis são extremamente baixos.[157] As bactérias se encontram presentes na pele, pelo, cascos, trato gastrointestinal, sendo a contaminação da carne por contaminação cruzada.[158] A deterioração por microrganismos é tão prejudicial a carne quanto os processos oxidativos.

As bactérias selecionadas são relacionadas a processos de deterioração da carne: *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Samonella ssp*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens S8*, *Pseudomonas fluorescens S9*. O primeiro teste, como mostrado na TABELA 9, fez-se uma variação de 5 mg/mL até 0,1 mg/mL do complexo Mg-phen-fer.

Observou-se que o complexo Mg-phen-fer, de modo geral, apresentou atividade frente todas as bactérias dentro dessa faixa de concentração. Dessa forma, decidiu-se diminuir a quantidade do complexo Mg-phen-fer variando entre 2 mg/mL até 0,1 mg/mL de modo a determinar a mínima concentração bactericida.

Mesmo com a diminuição da quantidade do complexo Mg-phen-fer, a mínima concentração bactericida foi de 1 mg/mL. De modo que para *Ps. putida*, *Ps. fluor. S9 e Ps. fluor. S8* a mínima concentração bactericida foi de 1,50 mg/mL.

TABELA 9. Atividade bactericida do complexo Mg-phen-fer na faixa de 0,1 mg/mL até 5,0 mg/mL.

Patógeno	5,0 mg/mL	4,0 mg/mL	3,0 mg/mL	2,0 mg/mL	1,0 mg/mL	0,5 mg/mL	0,1 mg/mL
L. innocua	-	-	-	-	-	+	+
L. monocyt.	-	-	-	-	-	+	+
Salmonella	-	-	-	-	-	+	+
E. coli	-	-	-	-	-	+	+
St. aureus	+	+	+	+	+	+	+
Ps. Putida	-	-	-	-	-	-	+
Ps. fluor. S9	-	-	-	-	+	+	+
Ps. fluor. S8	-	-	-	-	-	+	+

- microrganimo não cresceu (complexo é capaz de suprimir o crescimento)
+ microrganimo cresceu (complexo não é capaz de suprimir o crescimento)

Além dos complexos, foi testado ácido ferúlico livre frente as bactérias. Nenhuma atividade antibactericida associada ao ligante livre foi observada na faixa de concentração estudada. Para o ácido ferúlico, na literatura, a concentração bactericida mínima para *E. coli* é de 2,5 mg/mL. *St. aureus* e *L. monocyt.* possuem valores maiores que 5,0 mg/mL e para *Pseudomona* concentrações maiores que 0,5 mg/mL é que apresenta atividade bactericida.[159,160]

Pode-se concluir que frente as essas bactérias o complexo Mg-phen-fer apresentou uma melhora na concentração bactericida mínima em relação

ao ligante livre, levando a uma diminuição da concentração em cerca de quatro vezes.

Em relação a atividade antifúngica foram testados os seguintes patógenos: *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum* e *Rhizopus oryzae*. A FIGURA 56 mostra a variação da concentração de Mg-phen-fer entre 0,001 mg/mL até 2,00 mg/mL. Foi observado um valor de concentração fungicida mínima de 0,05 mg/mL, sendo que para concentrações maiores que esse valor, o complexo Mg-phen-fer foi capaz de coibir o crescimento dos fungos, crescendo somente no controle negativo. Este valor é duas ordens de grandeza menor àquela observada para as bactérias, indicando que o complexo tem um maior potencial para ser um fungicida.

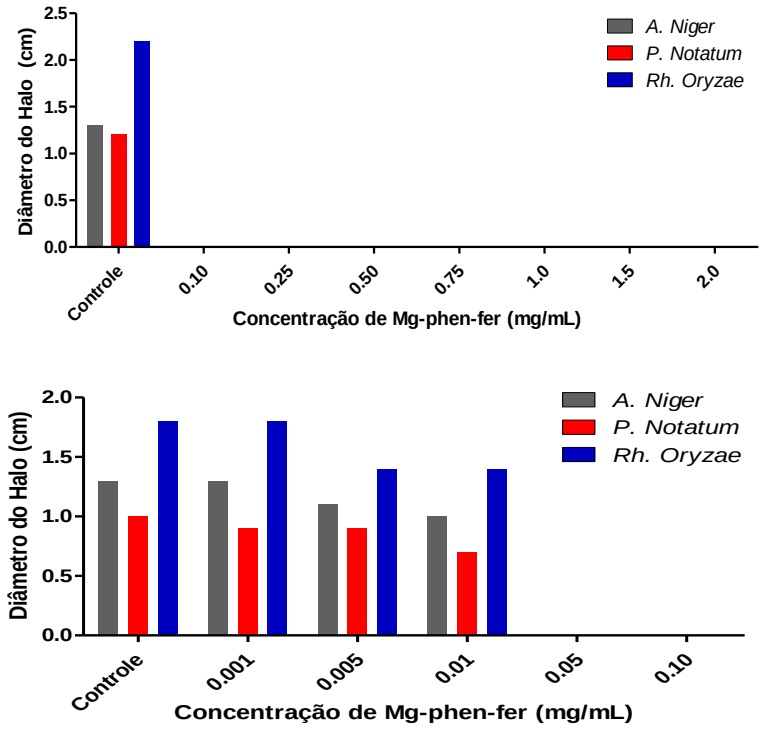


FIGURA 56. Atividade fungicida do complexo Mg-phen-fer na faixa de 0,001 mg/mL até 2,0 mg/mL.

Foi testado o ligante ácido ferúlico, como mostrado na FIGURA 57. Observou-se nenhuma atividade antibactericida associada ao ligante livre usando uma quantidade similar àquela quantidade de ligante ácido ferúlico

encontrado no complexo. Mesmo com o aumento da concentração do ligante livre, FIGURA 57, o ácido ferúlico não foi capaz de inibir os patógenos, levando a uma redução de 30 % em relação ao tamanho do controle negativo, de acordo com a literatura onde é visto uma redução de 20 %.[161]

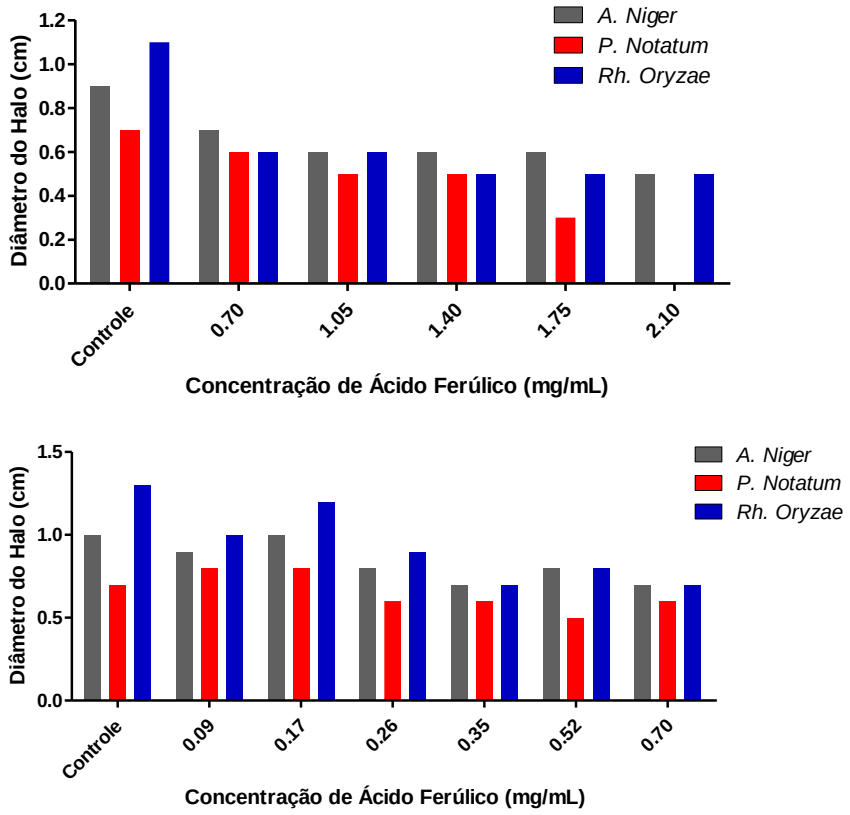


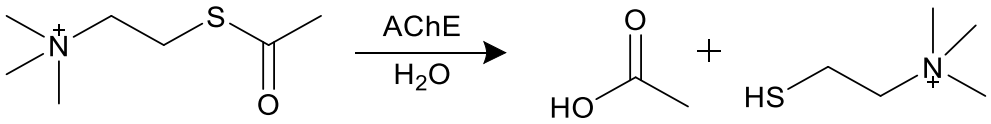
FIGURA 57. Atividade fungicida do ácido ferúlico na faixa de 0,09 mg/mL até 2,10 mg/mL.

4.4.2 Atividade da enzima acetilcolinesterase

Uma vez que o desenvolvimento do complexo Mg-phen-fer visa sua aplicação como composto ativo com propriedades antioxidantes em filmes, entender se esse composto interage com biomoléculas é de fundamental importância.

A enzima acetilcolinesterase (AChE) foi selecionada como um primeiro modelo de interação pois essa enzima está presente nos seres vivos e atua principalmente no cérebro e sistema nervo central (SNC). Essa enzima hidrolisa a acetilcolina (ACh) (neurotransmissor) em colina e ácido acético,

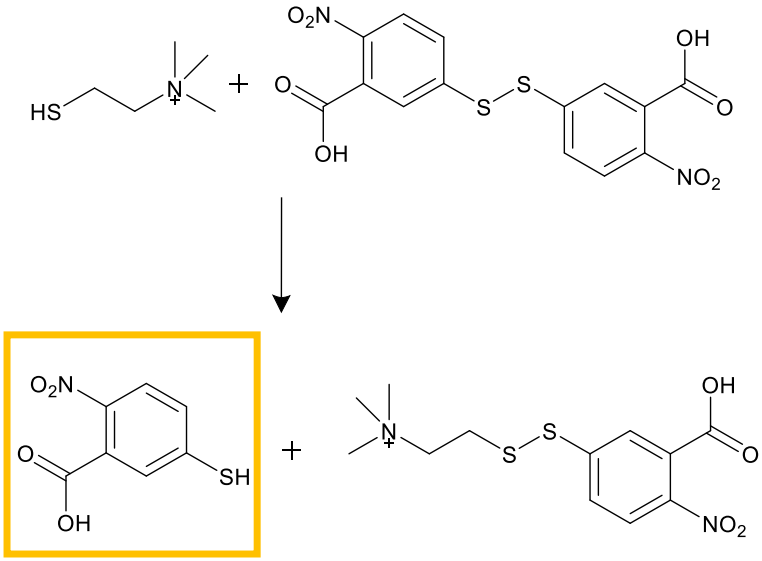
ESQUEMA 4, se a AChE é inibida acarreta um acúmulo de ACh que atrapalha as funções sinápticas pela estimulação excessiva do SNC.[162]



ESQUEMA 4. Hidrólise da acetilcolina pela enzima acetilcolinesterase.

Utilizando o método espectrofotométrico proposto por Ellman,[76] a inibição dessa enzima pelo complexo Mg-phen-fer foi avaliado para a enzima acetilcolinesterase (AChE) da espécie *electrophorus electricus* (eeAChE), que possui estrutura semelhante à da AChE humana podendo ser usada como modelo de estudo.[163]

Esse método se baseia na reação entre o ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico (reagente de Ellman, DTNB) com a base conjugada de um grupo sulfidrila livre (-R-S$^-$), presente na colina. Essa reação leva a formação do ácido 5-mercapto-2-nitrobenzóico (TBN) que é uma molécula com absorção máxima na região do visível em 412 nm com alto coeficiente de extinção molar, ESQUEMA 5.



ESQUEMA 5. Reação entre colina e reagente de Ellman levando a formação do TNB.

Variando a concentração do complexo para que se obtivesse a concentração e modo de inibição do complexo Mg-phen-fer, observou-se que o complexo não inibiu a enzima AChE, FIGURA 58. Além disso, esse ensaio é um indicativo que o Mg-phen-fer pode ser usado como molécula antioxidante para contato alimentício uma vez que ele não inibiu a AChE e consequentemente não interferiria nas propriedades cognitivas dos seres vivos.

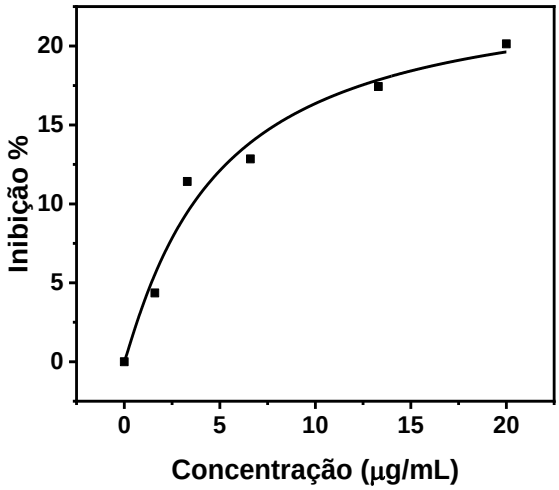


FIGURA 58. Inibição do complexo Mg-phen-fer em relação a enzima AChE.

Os dados utilizados para se obter a curva de inibição da enzima AChE estão no apêndice C.

4.4.3 Ensaio com células da linhagem de neuroblastoma

Como o complexo Mg-phen-fer não apresentou atividade de inibição em relação a enzima AChE, outro indicativo que o complexo é seguro para aplicações alimentícias foi feito através do ensaio de viabilidade celular das células da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Essa linhagem de célula é associada a células do sistema nervoso simpático que controla funções como respiração, pressão arterial, batimento cardíaco e digestão.[164]

Para calcular o IC_{50} do complexo Mg-phen-fer frente a essas células foi utilizada técnica de MTT. Esta é uma técnica colorimétrica que utiliza o

metabolismo das células saudáveis para avaliar a viabilidade celular, ou seja, o quanto de células vivas restaram no final do experimento. Para isso, utiliza-se um sal de coloração amarela conhecido como MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio)), que ao entrar em contato com a enzima redutimétrica NADH produzida pela mitocôndria de células saudáveis, é reduzido metabolicamente para formar um segundo composto (FIGURA 59), de coloração violeta, conhecido como formazan {E,Z-1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan}. O formazan violeta é insolúvel em soluções aquosas, mas pode ser facilmente solubilizado em solventes orgânicos resultando em uma solução cuja absorbância é proporcional ao número de células viáveis.[165]

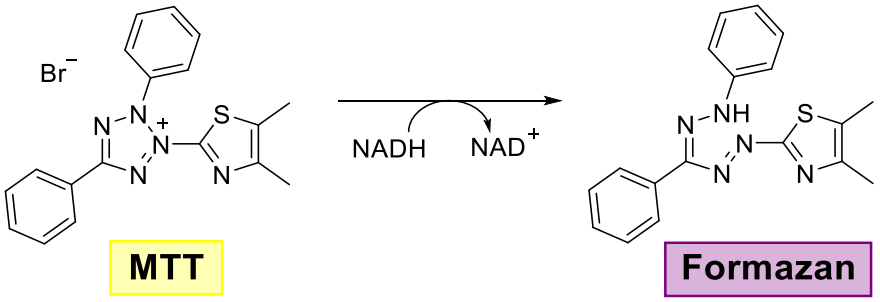


FIGURA 59. Reação de redução metabólica do sal MTT para formação de formazan.

Como mostrado na FIGURA 60, o complexo não apresentou atividade significativa contra essas células, ou seja, o complexo Mg-phen-fer não promoveu a apoptose das células independentemente da concentração utilizada sendo que para concentrações <56 µmol/L a viabilidade celular foi de 90 % e para concentrações maiores que esse valor a viabilidade celular foi de 80 %.

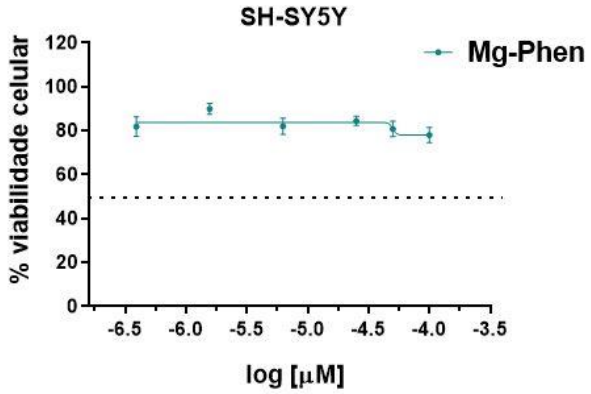


FIGURA 60. Viabilidade celular das células da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y na presença do complexo Mg-phen-fer.

Uma vez que o complexo apresentou baixa interação com a enzima AChE que está presente no sistema nervoso central, sendo um indicativo que o complexo não afetaria as propriedades cognitivas. Similarmente, o ensaio com a célula, o complexo não promoveu a apoptose desta ou de qualquer outro componente celular como mitocôndria. Assim, esses dois ensaios biológicos mostram o potencial de aplicação do complexo Mg-phen-fer como um antioxidante em embalagens ativas devido a sua falta de toxicidade como evidenciado nesses testes.

5 Perspectivas futuras

Alguns estudos preliminares sobre a utilização do complexo Mg-phen-fer em filmes de amido de tapioca para proteção de carne de porco para aumentar o tempo de prateleira foram feitos no laboratório em condições extremas, isto é, com luz constante e temperatura de 21 °C. Após 8 dias as carnes embaladas com o filme contendo o complexo não apresentava o crescimento de nenhum fungo enquanto o controle apresentava uma quantidade excessiva de esporos. Contudo, estudos relativos a tempo de prateleira da carne em presença de filmes contendo o Mg-phen-fer devem ser feitos com acompanhamento microbiológico para compreender o

mecanismo de ação do complexo bem como se dá sua liberação na superfície da carne.

Continuar com os estudos referentes a toxicologia do complexo para verificar a segurança do composto para sua aplicação em contato alimentício sem maiores riscos à saúde. Além de procurar outros bioplásticos como a pectina que possui uma característica aniônica, que possam aumentar a interação do complexo Mg-phen-fer com o polímero afim de moldar as propriedades de liberação do antioxidante.

Por último, como o grupo vem trabalhando com aplicação dos complexos de Mg(II) na área agrícola, a aplicação desse composto em culturas agrícolas pode abrir novas frentes de trabalho devido ao seu potencial como defensivo agrícola.

6 Conclusão

A síntese do complexo Mg-phen-fer é feita em condições brandas e com alto rendimento e grau de pureza. Devido ao pequeno tamanho do íon Mg(II) o complexo possui um equilíbrio entre as estruturas hexa e tetracoordenadas. Além disso o complexo se mostrou estável na faixa de pH de 4 a 8 o que confere a ele poder ser aplicado a vasta variedade de alimentos.

Ademais, neste trabalho foi possível determinar a formulação dos filmes de amido e de gelatina quanto as suas composições de polímero e plastificador, sendo os dois filmes de fácil fabricação, transparentes, flexíveis, termicamente estáveis e não favorecem o crescimento de microrganismos que possam vir a degradar os mesmos e com a adição dos complexos, essas propriedades foram mantidas.

Os filmes de gelatina são melhores barreiras frente ao oxigênio do que os filmes de amido que são mais permeáveis a este gás. Com os estudos de liberação viu-se que os complexos são liberados rapidamente para sistemas

com alto teor de água podendo o sistema ser melhorado para uma liberação mais lenta. Como evidenciou o estudo com as maçãs, uma vez liberados os complexos continuam atuando como antioxidantes não perdendo suas características.

Em relação às propriedades antioxidantes e antimicrobiana do complexo, pode-se concluir que ele apresenta ótima atividade antioxidante como evidenciado pelos estudos frente aos mais diversos radicais. Em relação à atividade antimicrobiana, o complexo Mg-phen-fer mostrou-se ser tanto um bactericida quanto fungicida.

Dessa forma, pode-se concluir que o complexo Mg-phen-fer abre uma nova alternativa aos antioxidantes sintéticos, mas ao contrário dos antioxidantes atualmente empregados o complexo mostrou-se de baixa toxicidade e com alto potencial de empregabilidade.

7 Referências Bibliográficas

1. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J Clin Biochem*. 2015;30(1):11. doi:10.1007/S12291-014-0446-0

2. Dreher D, Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer*. 1996;32(1):30-38. doi:10.1016/0959-8049(95)00531-5

3. Vendemiale G, Grattagliano I, Altomare E. An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. *Int J Clin Lab Res 1999 292*. 1999;29(2):49-55. doi:10.1007/S005990050063

4. Peña-Bautista C, Baquero M, Vento M, Cháfer-Pericás C. Free radicals in Alzheimer's disease: Lipid peroxidation biomarkers. *Clin Chim Acta*. 2019;491:85-90. doi:10.1016/j.cca.2019.01.021

5. Labat-Robert J, Robert L. Longevity and aging. Role of free radicals and xanthine oxidase. A review. *Pathol Biol*. 2014;62(2):61-66. doi:10.1016/J.PATBIO.2014.02.009

6. Volf I, Ignat I, Neamtu M, Popa VI. Thermal stability, antioxidant activity, and photo-oxidation of natural polyphenols. *Chem Pap 2013 681*. 2013;68(1):121-129. doi:10.2478/S11696-013-0417-6

7. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch Toxicol 2020 943*. 2020;94(3):651-715. doi:10.1007/S00204-020-02689-3

8. Adwas A, Elsayed ASI, Azab AE, Quwaydir FA. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *J Appl Biotechnol Bioeng*. 2019;6(1):43-47. doi:10.15406/JABB.2019.06.00173

9. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative

Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J 2012 51*. 2012;5(1):9-19. doi:10.1097/WOX.0B013E3182439613

10. Sharma GN, Gupta G, Sharma P. A Comprehensive Review of Free Radicals, Antioxidants, and Their Relationship with Human Ailments. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2018;28(2):139-154. doi:10.1615/CRITREVEUKARYOTGENEEXPR.2018022258

11. Ribeiro JS, Santos MJMC, Silva LKR, et al. Natural antioxidants used in meat products: A brief review. *Meat Sci*. 2019;148:181-188. doi:10.1016/J.MEATSCI.2018.10.016

12. Liguori I, Russo G, Curcio F, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018;13:772. doi:10.2147/CIA.S158513

13. Khan IT, Nadeem M, Imran M, Ullah R, Ajmal M, Jaspal MH. Antioxidant properties of Milk and dairy products: a comprehensive review of the current knowledge. *Lipids Health Dis*. 2019;18(1):41. doi:10.1186/s12944-019-0969-8

14. Balasaheb Nimse S, Dilipkumar Pal. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv*. 2015;5(35):27986-28006. doi:10.1039/C4RA13315C

15. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*. 1993;57(5):715S-725S. doi:10.1093/AJCN/57.5.715S

16. Maqsood S, Benjakul S. Comparative studies on molecular changes and pro-oxidative activity of haemoglobin from different fish species as influenced by pH. *Food Chem*. 2011;124(3):875-883. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2010.07.011

17. Faustman C, Sun Q, Mancini R, Suman SP. Myoglobin and lipid

oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Sci*. 2010;86(1):86-94. doi:10.1016/J.MEATSCI.2010.04.025

18. German JB. Food Processing and Lipid Oxidation. *Adv Exp Med Biol*. 1999;459:23-50. doi:10.1007/978-1-4615-4853-9_3

19. Min DB, Boff JM. Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2002;1(2):58-72. doi:10.1111/J.1541-4337.2002.TB00007.X

20. Chan KM, Decker EA, Feustman C. Endogenous skeletal muscle antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2009;34(4):403-426. doi:10.1080/10408399409527669

21. Maqsood S, Benjakul S. Retardation of haemoglobin-mediated lipid oxidation of Asian sea bass muscle by tannic acid during iced storage. *Food Chem*. 2011;124(3):1056-1062. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2010.07.077

22. Coma V. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Sci*. 2008;78(1-2):90-103. doi:10.1016/J.MEATSCI.2007.07.035

23. Baer AA, Dilger AC. Effect of fat quality on sausage processing, texture, and sensory characteristics. *Meat Sci*. 2014;96(3):1242-1249. doi:10.1016/J.MEATSCI.2013.11.001

24. Liang N, Kitts DD. Antioxidant property of coffee components: Assessment of methods that define mechanism of action. *Molecules*. 2014;19(11):19180-19208. doi:10.3390/molecules191119180

25. Moharram HA, Youssef MM. Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. *Alexandria J Food Sci Technol*. 2014;11(1):31-42. doi:10.12816/0025348

26. Chen J, Yang J, Ma L, Li J, Shahzad N, Kim CK. Structure-antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and carboxylic acid groups of phenolic acids. *Sci Rep*. 2020;10(1):1-9. doi:10.1038/s41598-020-59451-z

27. Wang G, Liu Y, Zhang L, et al. Computational study on the antioxidant property of coumarin-fused coumarins. *Food Chem*. 2020;304:125446. doi:10.1016/j.foodchem.2019.125446

28. Zheng YZ, Chen DF, Deng G, Guo R, Fu ZM. The antioxidative activity of piceatannol and its different derivatives: Antioxidative mechanism analysis. *Phytochemistry*. 2018;156:184-192. doi:10.1016/J.PHYTOCHEM.2018.10.004

29. Zeb A. Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *J Food Biochem*. 2020;44(9):e13394. doi:10.1111/JFBC.13394

30. Arroyo CM. Spin Trapping and Spin Labelling Studied Using EPR Spectroscopy. In: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. Elsevier; 2017:209-217. doi:10.1016/B978-0-12-803224-4.00291-0

31. Yue Qian S, Kadiiska MB, Guo Q, Mason RP. A novel protocol to identify and quantify all spin trapped free radicals from in vitro/in vivo interaction of HO and DMSO: LC/ESR, LC/MS, and dual spin trapping combinations. *Free Radic Biol Med*. 2005;38(1):125-135. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2004.09.024

32. Spasojević I. Free radicals and antioxidants at a glance using EPR spectroscopy. *Crit Rev Clin Lab Sci* . 2011;48(3):114-142. doi:10.3109/10408363.2011.591772

33. Villamena FA. EPR Spin Trapping. In: *Reactive Species Detection in Biology*. Elsevier; 2017:163-202. doi:10.1016/B978-0-12-420017-

3.00004-9

34. Štarha P, Trávníček Z. Non-platinum complexes containing releasable biologically active ligands. *Coord Chem Rev*. 2019;395:130-145. doi:10.1016/J.CCR.2019.06.001

35. de Fátima Â, Pereira C de P, Olímpio CRSDG, de Freitas Oliveira BG, Franco LL, da Silva PHC. Schiff bases and their metal complexes as urease inhibitors – A brief review. *J Adv Res*. 2018;13:113-126. doi:10.1016/J.JARE.2018.03.007

36. Galleano M, Verstraeten S V., Oteiza PI, Fraga CG. Antioxidant actions of flavonoids: Thermodynamic and kinetic analysis. *Arch Biochem Biophys*. 2010;501(1):23-30. doi:10.1016/J.ABB.2010.04.005

37. R. Milaeva E. Metal-Based Antioxidants - Potential Therapeutic Candidates for Prevention the Oxidative Stress - Related Carcinogenesis: Mini-Review. *Curr Top Med Chem*. 2011;11(21):2703-2713. doi:10.2174/156802611798040741

38. Gómez FS, Sánchez SP, Iradi MGG, Azman NAM, Almajano MP. Avocado Seeds: Extraction Optimization and Possible Use as Antioxidant in Food. *Antioxidants*. 2014;3(2):439-454. doi:10.3390/ANTIOX3020439

39. Cherrak SA, Mokhtari-Soulimane N, Berroukeche F, et al. In Vitro Antioxidant versus Metal Ion Chelating Properties of Flavonoids: A Structure-Activity Investigation. *PLoS One*. 2016;11(10):e0165575. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0165575

40. Kozsup M, Zhou XQ, Farkas E, et al. Synthesis, characterization and cytotoxicity studies of Co(III)-flavonolato complexes. *J Inorg Biochem*. 2021;217:111382. doi:10.1016/j.jinorgbio.2021.111382

41. Marchi RC, Silva ES, Santos JJ, et al. Synthesis, Characterization, and Low-Toxicity Study of a Magnesium(II) Complex Containing an Isovanillate Group. *ACS Omega*. 2020;5(7):3504-3512. doi:10.1021/ACSOMEGA.9B03804

42. Oliveira RMM, De Souza Daniel JF, Carlos RM. Synthesis, spectroscopic characterization and biological activity of cis-[Ru(hesperidin)(1,10′-phenanthroline)2](PF6) complex. *J Mol Struct*. 2013;1031:269-274. doi:10.1016/j.molstruc.2012.09.066

43. Khater M, Ravishankar D, Greco F, Osborn HM. Metal complexes of flavonoids: Their synthesis, characterization and enhanced antioxidant and anticancer activities. *Future Med Chem*. 2019;11(21):2845-2867. doi:10.4155/fmc-2019-0237

44. Zheltova AA, Kharitonova M V., Iezhitsa IN, Spasov AA. Magnesium deficiency and oxidative stress: an update. *Biomed 2016 64*. 2016;6(4):1-7. doi:10.7603/S40681-016-0020-6

45. Shahi A, Aslani S, Ataollahi M, Mahmoudi M. The role of magnesium in different inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*. 2019;27(4):649-661. doi:10.1007/S10787-019-00603-7

46. Bock CW, Katz AK, Markham GD, Glusker JP. Manganese as a replacement for magnesium and zinc: Functional comparison of the divalent ions. *J Am Chem Soc*. 1999;121(32):7360-7372. doi:10.1021/ja9906960

47. Todor Dudev, J. A. Cowan, Carmay Lim. Competitive Binding in Magnesium Coordination Chemistry: Water versus Ligands of Biological Interest. *J Am Chem Soc*. 1999;121(33):7665-7673. doi:10.1021/JA984470T

48. Dudev T, Lim C. Monodentate versus Bidentate Carboxylate Binding

in Magnesium and Calcium Proteins: What are the Basic Principles? *J Phys Chem B*. 2004;108(14):4546-4557. doi:10.1021/jp0310347

49. Ghosh N, Chakraborty T, Mallick S, et al. Synthesis, characterization and study of antioxidant activity of quercetin-magnesium complex. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc*. 2015;151:807-813. doi:10.1016/j.saa.2015.07.050

50. Mancuso C, Santangelo R. Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects. *Food Chem Toxicol*. 2014;65:185-195. doi:10.1016/j.fct.2013.12.024

51. Sieranski T, Kruszynski R. Magnesium sulphate complexes with hexamethylenetetramine and 1,10-phenanthroline : Thermal, structural and spectroscopic properties. *J Therm Anal Calorim*. 2012;109(1):141-152. doi:10.1007/s10973-011-1693-4

52. Capone S, De Robertis A, De Stefano C, Scarcella R. Thermodynamics of formation of magnesium, calcium, strontium and barium complexes with 2,2'-bipyridyl and 1,10-phenanthroline, at different ionic strengths in aqueous solution. *Talanta*. 1985;32:675-677. doi:10.1016/0039-9140(85)80168-5

53. Bank W. World Development Indicators 2015. World Development Indicators 2015. doi:10.1596/978-1-4648-0440-3

54. Group WB. *Enabling the Business of Agriculture 2017*. World Bank, Washington, DC; 2017. doi:10.1596/978-1-4648-1021-3

55. Brazil: Livestock and Products Semi-annual | USDA Foreign Agricultural Service. Accessed August 17, 2021. https://www.fas.usda.gov/data/brazil-livestock-and-products-semi-annual-4

56. Fletcher B, Mullane K, Platts P, et al. Advances in meat spoilage detection: A short focus on rapid methods and technologies. *CYTA - J Food*. 2018;16(1):1037-1044. doi:10.1080/19476337.2018.1525432

57. Rodriguez-Lazaro D, Gonzalez-García P, Delibato E, et al. Next day Salmonella spp. detection method based on real-time PCR for meat, dairy and vegetable food products. *Int J Food Microbiol*. 2014;184:113-120. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.021

58. Shirai H, Oshita S, Makino Y. Detection of fluorescence signals from ATP in the second derivative excitation-emission matrix of a pork meat surface for cleanliness evaluation. *J Food Eng*. 2016;168:173-179. doi:10.1016/j.jfoodeng.2015.07.032

59. Sarioglu OF, Celebioglu A, Tekinay T, Uyar T. Bacteria-immobilized electrospun fibrous polymeric webs for hexavalent chromium remediation in water. *Int J Environ Sci Technol*. 2016;13(8):2057-2066. doi:10.1007/s13762-016-1033-0

60. Federal Register :: Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption; Calcium Disodium EDTA and Disodium EDTA. Accessed August 17, 2021. https://www.federalregister.gov/documents/2000/08/08/00-19990/food-additives-permitted-for-direct-addition-to-food-for-human-consumption-calcium-disodium-edta-and

61. Sahraee S, Milani JM, Regenstein JM, Kafil HS. Protection of foods against oxidative deterioration using edible films and coatings: A review. *Food Biosci*. 2019;32:100451. doi:10.1016/j.fbio.2019.100451

62. Federal Register, Food Additives for Use in Meat and Poultry Products. Accessed August 17, 2021.

https://www.federalregister.gov/documents/2000/01/20/00-1220/food-additives-for-use-in-meat-and-poultry-products-sodium-diacetate-sodium-acetate-sodium-lactate

63. Additives in Meat and Poultry Products | Food Safety and Inspection Service. Accessed August 17, 2021. https://www.fsis.usda.gov/food-safety/safe-food-handling-and-preparation/food-safety-basics/additives-meat-and-poultry

64. Salgado PR, Ortiz CM, Musso YS, Di Giorgio L, Mauri AN. Edible films and coatings containing bioactives. *Curr Opin Food Sci*. 2015;5:86-92. doi:10.1016/j.cofs.2015.09.004

65. Piergiovanni L, Limbo S. *Food Packaging*. Springer Milan; 2010. doi:10.1007/978-88-470-1457-2

66. Wicochea-Rodríguez JD, Chalier P, Ruiz T, Gastaldi E. Active food packaging based on biopolymers and aroma compounds: How to design and control the release. *Front Chem*. 2019;7:398. doi:10.3389/fchem.2019.00398

67. Seydim AC, Sarikus G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Res Int*. 2006;39(5):639-644. doi:10.1016/j.foodres.2006.01.013

68. Mascheroni E, Capretti G, Limbo S, Piergiovanni L. Study of cellulose-lysozyme interactions aimed to a controlled release system for bioactives. *Cellulose*. 2012;19(6):1855-1866. doi:10.1007/s10570-012-9770-9

69. Salgado LEV, Vargas-Hernández C. Spectrophotometric Determination of the pKa, Isosbestic Point and Equation of Absorbance vs. pH for a Universal pH Indicator. *Am J Anal Chem*.

2014;05(17):1290-1301. doi:10.4236/ajac.2014.517135

70. Sharma OP, Bhat TK. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem*. 2009;113(4):1202-1205. doi:10.1016/j.foodchem.2008.08.008

71. Abramovič H, Grobin B, Ulrih NP, Cigić B. The methodology applied in DPPH, ABTS and folin-ciocalteau assays has a large influence on the determined antioxidant potential. *Acta Chim Slov*. 2017;64(2):491-499. doi:10.17344/acsi.2017.3408

72. Guo Q, Zhao B, Shen S, Hou J, Hu J, Xin W. ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 1999;1427(1):13-23. doi:10.1016/S0304-4165(98)00168-8

73. Choe E, Min DB. Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2006;46(1):1-22. doi:10.1080/10408390500455474

74. Min BJ, Han IY, Dawson PL. Antimicrobial gelatin films reduce Listeria monocytogenes on turkey bologna. *Poult Sci*. 2010;89(6):1307-1314. doi:10.3382/ps.2009-00451

75. Limbo S, Piergiovanni L. Shelf life of minimally processed potatoes: Part 1. Effects of high oxygen partial pressures in combination with ascorbic and citric acids on enzymatic browning. *Postharvest Biol Technol*. 2006;39(3):254-264. doi:10.1016/J.POSTHARVBIO.2005.10.016

76. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961;7(2):88-95. doi:10.1016/0006-2952(61)90145-9

77. Zeng YB, Yang N, Liu WS, Tang N. Synthesis, characterization and DNA-binding properties of La(III) complex of chrysin. *J Inorg Biochem*. 2003;97(3):258-264. doi:10.1016/S0162-0134(03)00313-1

78. Drevenšek P, Košmrlj J, Giester G, et al. X-Ray crystallographic, NMR and antimicrobial activity studies of magnesium complexes of fluoroquinolones – racemic ofloxacin and its S-form, levofloxacin. *J Inorg Biochem*. 2006;100(11):1755-1763. doi:10.1016/J.JINORGBIO.2006.06.011

79. Mitrofanov A, Manowong M, Rousselin Y, et al. Structural and electrochemical studies of copper(I) complexes with diethoxyphosphoryl-1,10-phenanthrolines. *Eur J Inorg Chem*. 2014;2014(21):3370-3386. doi:10.1002/ejic.201402161

80. Grabowski SJ. Magnesium Bonds: From Divalent Mg Centres to Trigonal and Tetrahedral Coordination. *ChemistrySelect*. 2018;3(11):3147-3154. doi:10.1002/slct.201703137

81. Bruyere JC, Gourlaouen C, Karmazin L, et al. Synthesis and Characterization of Neutral and Cationic Magnesium Complexes Supported by NHC Ligands. *Organometallics*. 2019;38(14):2748-2757. doi:10.1021/acs.organomet.9b00304

82. Mazzone G, Russo N, Toscano M. Antioxidant properties comparative study of natural hydroxycinnamic acids and structurally modified derivatives: Computational insights. *Comput Theor Chem*. 2016;1077:39-47. doi:10.1016/j.comptc.2015.10.011

83. Kalinowska M, Piekut J, Bruss A, et al. Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, 1H, 13C NMR, UV/VIS), thermogravimetric and antimicrobial studies of Ca(II), Mn(II), Cu(II), Zn(II) and Cd(II) complexes of ferulic acid. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol*

Spectrosc. 2014;122:631-638. doi:10.1016/j.saa.2013.11.089

84. Shahabadi N, Mahdavi M, Taherpour A (Arman), Ghasemhezaveh F. Synthesis, characterization and in vitro DNA binding studies of a new copper(II) complex containing antioxidant ferulic acid. *J Coord Chem*. 2017;70(15):2589-2605. doi:10.1080/00958972.2017.1363890

85. Parri E, Santinami G, Domenici V. Front-face fluorescence of honey of different botanic origin: A case study from Tuscany (Italy). *Appl Sci*. 2020;10(5):1776. doi:10.3390/app10051776

86. Young OA, West J, Hart AL, Van Otterdijk FFH. A method for early determination of meat ultimate pH. *Meat Sci*. 2004;66(2):493-498. doi:10.1016/S0309-1740(03)00140-2

87. Pastorino AJ, Hansen CL, McMahon DJ. Effect of pH on the Chemical Composition and Structure-Function Relationships of Cheddar Cheese1. *J Dairy Sci*. 2003;86(9):2751-2760. doi:10.3168/JDS.S0022-0302(03)73871-5

88. Erdemgil FZ, Şanli S, Şanli N, et al. Determination of pKa values of some hydroxylated benzoic acids in methanol–water binary mixtures by LC methodology and potentiometry. *Talanta*. 2007;72(2):489-496. doi:10.1016/J.TALANTA.2006.11.007

89. Ghigo G, Vione D, Berto S. Experimental and theoretical study of the fluorescence emission of ferulic acid: Possible insights into the fluorescence properties of humic substances. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc*. 2020;228:117587. doi:10.1016/J.SAA.2019.117587

90. Simić A, Manojlović D, Šegan D, Todorović M. Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules*. 2007;12(10):2327-2340. doi:10.3390/12102327

91. Gil ES, Couto RO. Flavonoid electrochemistry: A review on the electroanalytical applications. *Rev Bras Farmacogn*. 2013;23(3):542-558. doi:10.1590/S0102-695X2013005000031

92. Yakovleva KE, Kurzeev SA, Stepanova E V., Fedorova T V., Kuznetsov BA, Koroleva O V. Characterization of plant phenolic compounds by cyclic voltammetry. *Appl Biochem Microbiol*. 2007;43(6):661-668. doi:10.1134/S0003683807060166

93. Janeiro P, Novak I, Seruga M, Oliveira-Brett AM. Electroanalytical oxidation of p-coumaric acid. *Anal Lett*. 2007;40(17):3309-3321. doi:10.1080/00032710701672822

94. Matsushita Y, Nakamura A, Aoki D, Yagami S, Fukushima K. Bio-based polymer from ferulic acid by electropolymerization. *BioResources*. 2016;11(4):9789-9802. doi:10.15376/biores.11.4.9789-9802

95. Pisoschi AM, Cimpeanu C, Predoi G. Electrochemical Methods for Total AntioxidantCapacity and its Main Contributors Determination:A review. *Open Chem*. 2015;13(1):824-856. doi:10.1515/CHEM-2015-0099

96. Teixeira J, Gaspar A, Garrido EM, Garrido J, Borges F. Hydroxycinnamic acid antioxidants: An electrochemical overview. *Biomed Res Int*. 2013;2013:11. doi:10.1155/2013/251754

97. Trabelsi SK, Tahar NB, Trabelsi B, Abdelhedi R. Electrochemical oxidation of ferulic acid in aqueous solutions at gold oxide and lead dioxide electrodes. *J Appl Electrochem*. 2005;35(10):967-973. doi:10.1007/s10800-005-6723-0

98. da Silva LV, Lopes CB, da Silva WC, et al. Electropolymerization of ferulic acid on multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon

electrode as a versatile platform for NADH, dopamine and epinephrine separate detection. *Microchem J*. 2017;133:460-467. doi:10.1016/j.microc.2017.04.014

99. Wang H, Gao XD, Zhou GC, Cai L, Yao WB. In vitro and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from Choerospondias axillaris fruit. *Food Chem*. 2008;106(3):888-895. doi:10.1016/j.foodchem.2007.05.068

100. Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol 2011 484*. 2011;48(4):412-422. doi:10.1007/S13197-011-0251-1

101. Ionita P. The chemistry of dpph· free radical and congeners. *Int J Mol Sci*. 2021;22(4):1-15. doi:10.3390/ijms22041545

102. Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta*. 2008;613(1):1-19. doi:10.1016/j.aca.2008.02.047

103. Sanna D, Delogu G, Mulas M, Schirra M, Fadda A. Determination of Free Radical Scavenging Activity of Plant Extracts Through DPPH Assay: An EPR and UV-Vis Study. *Food Anal Methods*. 2012;5(4):759-766. doi:10.1007/s12161-011-9306-1

104. Li J, Yu K, Bai J, Zhang H, Chao J. Synthesis, characterization and free radical scavenging activity of apigenin with or without magnesium(II). *Oxid Antioxid Med Sci*. 2014;3(3):231-235. Accessed August 17, 2021. https://www.ejmoams.com/abstract/synthesis-characterization-and-free-radical-scavenging-activity-of-apigenin-with-or-without-magnesiumii-47609.html

105. Bukhari SB, Memon S, Mahroof-Tahir M, Bhanger MI. Synthesis, characterization and antioxidant activity copper–quercetin complex.

Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc. 2009;71(5):1901-1906. doi:10.1016/J.SAA.2008.07.030

106. Jabbari M, Gharib F. Solvent dependence on antioxidant activity of some water-insoluble flavonoids and their cerium(IV) complexes. *J Mol Liq*. 2012;168:36-41. doi:10.1016/j.molliq.2012.02.001

107. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci*. 1993;84(4):407-412. doi:10.1042/cs0840407

108. Sucupira NR, Silva AB da, Pereira G, Costa JN da. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde*. 2014;14(4):263-269. doi:https://doi.org/10.17921/2447-8938.2012v14n4p%25p

109. Arnao MB. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci Technol*. 2000;11(11):419-421. doi:10.1016/S0924-2244(01)00027-9

110. Fu M, Feng HJ, Chen Y, Wang D Bin, Yang GZ. Antioxidant activity of Garcinia xanthochymus leaf, root and fruit extracts in vitro. *Chin J Nat Med*. 2012;10(2):129-134. doi:10.3724/SP.J.1009.2012.00129

111. Li X, Wang X, Chen D, Chen S. Antioxidant activity and mechanism of protocatechuic acid in Vitro. *Funct Foods Heal Dis*. 2011;1(7):232-244. doi:10.31989/ffhd.v1i7.127

112. Galato D, Ckless K, Susin MF, Giacomelli C, Ribeiro-do-Valle RM, Spinelli A. Antioxidant capacity of phenolic and related compounds: Correlation among electrochemical, visible spectroscopy methods and structure-antioxidant activity. *Redox Rep*. 2001;6(4):243-250.

doi:10.1179/135100001101536391

113. Girsang E, Lister INE, Ginting CN, Bethasari M, Amalia A, Widowati W. Comparison of Antiaging and Antioxidant Activities of Protocatechuic and Ferulic Acids. *Mol Cell Biomed Sci*. 2020;4(2):68. doi:10.21705/mcbs.v4i2.90

114. Naso L, Ferrer EG, Lezama L, Rojo T, Etcheverry SB, Williams P. Role of oxidative stress in the antitumoral action of a new vanadyl(IV) complex with the flavonoid chrysin in two osteoblast cell lines: Relationship with the radical scavenger activity. *J Biol Inorg Chem*. 2010;15(6):889-902. doi:10.1007/s00775-010-0652-z

115. Yousef TA, Abu El-Reash GM. Synthesis, and biological evaluation of complexes based on thiosemicarbazone ligand. *J Mol Struct*. 2020;1201:127180. doi:10.1016/j.molstruc.2019.127180

116. Lo Scalzo R, Todaro A, Rapisarda P. Methods used to evaluate the peroxyl (ROO·) radical scavenging capacities of four common antioxidants. *Eur Food Res Technol*. 2012;235(6):1141-1148. doi:10.1007/s00217-012-1847-z

117. Buettner GR, Schafer FQ. Free radicals, oxidants, and antioxidants. In: *Teratology*. Vol 62. Wiley-Liss Inc.; 2000:234. doi:10.1002/1096-9926(200010)62:4<234::aid-tera10>3.0.co;2-9

118. Huang D, Boxin OU, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*. 2005;53(6):1841-1856. doi:10.1021/jf030723c

119. Kohri S, Fujii H, Oowada S, et al. An oxygen radical absorbance capacity-like assay that directly quantifies the antioxidant's scavenging capacity against AAPH-derived free radicals. *Anal Biochem*. 2009;386(2):167-171. doi:10.1016/j.ab.2008.12.022

120. Gao Z, Yang X, Huang K, Xu H. Free-radical scavenging and mechanism study of flavonoids extracted from the radix of Scutellaria baicalensis Georgi. *Appl Magn Reson*. 2000;19(1):35-44. doi:10.1007/BF03162259

121. Stoll S, Schweiger A. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *J Magn Reson*. 2006;178(1):42-55. doi:10.1016/j.jmr.2005.08.013

122. Adom KK, Rui HL. Rapid peroxyl radical scavenging capacity (PSC) assay for assessing both hydrophilic and lipophilic antioxidants. *J Agric Food Chem*. 2005;53(17):6572-6580. doi:10.1021/jf048318o

123. Koh E, Fluhr R. Singlet oxygen detection in biological systems: Uses and limitations. *Plant Signal Behav*. 2016;11(7):e1192742. doi:10.1080/15592324.2016.1192742

124. Edge R, Truscott TG. Singlet oxygen and free radical reactions of retinoids and carotenoids—A review. *Antioxidants*. 2018;7(1):5. doi:10.3390/antiox7010005

125. MacDonald-Wicks LK, Wood LG, Garg ML. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: A review. *J Sci Food Agric*. 2006;86(13):2046-2056. doi:10.1002/jsfa.2603

126. Ronsein GE, Miyamoto S, Bechara E, Di Mascio P, Martinez GR. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: Mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. *Quim Nova*. 2006;29(3):563-568. doi:10.1590/S0100-40422006000300027

127. Nardi G, Manet I, Monti S, Miranda MA, Lhiaubet-Vallet V. Scope and limitations of the TEMPO/EPR method for singlet oxygen detection: The misleading role of electron transfer. *Free Radic Biol Med*. 2014;77:64-70. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.020

128. Velikova VB, Edreva AM, Tsonev TD, Jones HG. Singlet oxygen quenching by phenylamides and their parent compounds. *Zeitschrift fur Naturforsch - Sect C J Biosci*. 2007;62(11-12):833-838. doi:10.1515/znc-2007-11-1211

129. Sheraz MA, Kazi SH, Ahmed S, Anwar Z, Ahmad I. Photo, thermal and chemical degradation of riboflavin. *Beilstein J Org Chem*. 2014;10(1):1999-2012. doi:10.3762/bjoc.10.208

130. Sheraz MA, Kazi SH, Ahmed S, Mirza T, Ahmad I, Evstigneev MP. Effect of phosphate buffer on the complexation and photochemical interaction of riboflavin and caffeine in aqueous solution: A kinetic study. *J Photochem Photobiol A Chem*. 2014;273:17-22. doi:10.1016/j.jphotochem.2013.09.007

131. Tyagi A, Penzkofer A. Absorption and emission spectroscopic characterization of lumichrome in aqueous solutions. *Photochem Photobiol*. 2011;87(3):524-533. doi:10.1111/j.1751-1097.2010.00836.x

132. Zhang M, Meng X, Bhandari B, Fang Z, Chen H. Recent Application of Modified Atmosphere Packaging (MAP) in Fresh and Fresh-Cut Foods. *Food Rev Int*. 2015;31(2):172-193. doi:10.1080/87559129.2014.981826

133. Criado S, Allevi C, Ceballos C, García NA. Visible-light promoted degradation of the commercial antioxidants butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT): A kinetic study. *Redox Rep*. 2007;12(6):282-288. doi:10.1179/135100007X239252

134. Jiménez A, Fabra MJ, Talens P, Chiralt A. Edible and Biodegradable Starch Films: A Review. *Food Bioprocess Technol*. 2012;5(6):2058-2076. doi:10.1007/s11947-012-0835-4

135. Bergo P, Carvalho RA, Vadala ACS, Guevara VCI, Sobral PJA. Physical properties of gelatin films plasticized with glycerol, studied by spectroscopic methods. In: *Materials Science Forum*. Vol 636-637. Trans Tech Publications Ltd; 2010:753-758. doi:10.4028/www.scientific.net/MSF.636-637.753

136. Ramos M, Valdés A, Beltrán A, Garrigós M. Gelatin-Based Films and Coatings for Food Packaging Applications. *Coatings*. 2016;6(4):41. doi:10.3390/coatings6040041

137. Yakimets I, Wellner N, Smith AC, Wilson RH, Farhat I, Mitchell J. Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state. *Polymer (Guildf)*. 2005;46(26):12577-12585. doi:10.1016/j.polymer.2005.10.090

138. Matthews KR, Kniel KE, Montville TJ. *Food Microbiology - An Introduction and More*. Vol 2. Washington, D. C.; 2008.

139. Xu YX, Kim KM, Hanna MA, Nag D. Chitosan-starch composite film: Preparation and characterization. *Ind Crops Prod*. 2005;21(2):185-192. doi:10.1016/j.indcrop.2004.03.002

140. Qiao D, Liu H, Yu L, et al. Preparation and characterization of slow-release fertilizer encapsulated by starch-based superabsorbent polymer. *Carbohydr Polym*. 2016;147:146-154. doi:10.1016/j.carbpol.2016.04.010

141. Hoque MS, Benjakul S, Prodpran T, Songtipya P. Properties of blend film based on cuttlefish (Sepia pharaonis) skin gelatin and mungbean protein isolate. *Int J Biol Macromol*. 2011;49(4):663-673. doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2011.06.028

142. Hashim DM, Man YBC, Norakasha R, Shuhaimi M, Salmah Y, Syahariza ZA. Potential use of Fourier transform infrared spectroscopy

for differentiation of bovine and porcine gelatins. *Food Chem*. 2010;118(3):856-860. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2009.05.049

143. Elhefian EA, Saalah S, Yahaya AH. INVESTIGATION ON OXYGEN PERMEABILITY AND SURFACE PROPERTIES OF AGAR FILMS. *Sci J Appl Sci Sabratha Univ*. 2018;1(1):111-119. doi:10.47891/sabujas.v1i1.111-119

144. Fabra MJ, Martínez-Sanz M, Gómez-Mascaraque LG, Gavara R, López-Rubio A. Structural and physicochemical characterization of thermoplastic corn starch films containing microalgae. *Carbohydr Polym*. 2018;186:184-191. doi:10.1016/j.carbpol.2018.01.039

145. Shen XL, Wu JM, Chen Y, Zhao G. Antimicrobial and physical properties of sweet potato starch films incorporated with potassium sorbate or chitosan. *Food Hydrocoll*. 2010;24(4):285-290. doi:10.1016/j.foodhyd.2009.10.003

146. Famá L, Rojas AM, Goyanes S, Gerschenson L. Mechanical properties of tapioca-starch edible films containing sorbates. *LWT - Food Sci Technol*. 2005;38(6):631-639. doi:10.1016/j.lwt.2004.07.024

147. Arvanitoyannis I, Biliaderis CG. Physical properties of polyol-plasticized edible blends made of methyl cellulose and soluble starch. *Carbohydr Polym*. 1999;38(1):47-58. doi:10.1016/S0144-8617(98)00087-3

148. Avena-Bustillos RJ, Chiou B, Olsen CW, Bechtel PJ, Olson DA, Mchugh TH. Gelation, Oxygen Permeability, and Mechanical Properties of Mammalian and Fish Gelatin Films. *J Food Sci*. 2011;76(7):E519-E524. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02312.x

149. Chiou B Sen, Avena-Bustillos RJ, Bechtel PJ, et al. Cold water fish gelatin films: Effects of cross-linking on thermal, mechanical, barrier,

and biodegradation properties. *Eur Polym J*. 2008;44(11):3748-3753. doi:10.1016/j.eurpolymj.2008.08.011

150. Lukasik K V., Ludescher RD. Molecular mobility in water and glycerol plasticized cold- and hot-cast gelatin films. *Food Hydrocoll*. 2006;20(1):96-105. doi:10.1016/j.foodhyd.2005.03.007

151. Ashwar BA, Shah A, Gani A, et al. Rice starch active packaging films loaded with antioxidants-development and characterization. *Starch/Staerke*. 2015;67(3-4):294-302. doi:10.1002/star.201400193

152. Menzel C, González-Martínez C, Vilaplana F, Diretto G, Chiralt A. Incorporation of natural antioxidants from rice straw into renewable starch films. *Int J Biol Macromol*. 2020;146:976-986. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.09.222

153. Piñeros-Hernandez D, Medina-Jaramillo C, López-Córdoba A, Goyanes S. Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. *Food Hydrocoll*. 2017;63:488-495. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.09.034

154. Mastromatteo M, Mastromatteo M, Conte A, Del Nobile MA. Advances in controlled release devices for food packaging applications. *Trends Food Sci Technol*. 2010;21(12):591-598. doi:10.1016/j.tifs.2010.07.010

155. Romani VP, Hernández CP, Martins VG. Pink pepper phenolic compounds incorporation in starch/protein blends and its potential to inhibit apple browning. *Food Packag Shelf Life*. 2018;15:151-158. doi:10.1016/j.fpsl.2018.01.003

156. Nenadis N, Zhang HY, Tsimidou MZ. Structure-antioxidant activity relationship of ferulic acid derivatives: Effect of carbon side chain characteristic groups. *J Agric Food Chem*. 2003;51(7):1874-1879.

doi:10.1021/jf0261452

157. McDonald K, Sun DW. Predictive food microbiology for the meat industry: A review. *Int J Food Microbiol*. 1999;52(1-2):1-27. doi:10.1016/S0168-1605(99)00126-9

158. Lawrie RA. The spoilage of meat by infecting organisms. *Lawrie's Meat Sci*. Published online January 1, 2006:157-188. doi:10.1533/9781845691615.157

159. Borges A, Ferreira C, Saavedra MJ, Simões M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microb Drug Resist*. 2013;19(4):256-265. doi:10.1089/mdr.2012.0244

160. Herald PJ, DavidsonN PM. Antibacterial Activity of Selected Hydroxycinnamic Acids. *J Food Sci*. 1983;48(4):1378-1379. doi:10.1111/j.1365-2621.1983.tb09243.x

161. Said S, Neves FM, Griffiths AJF. Cinnamic acid inhibits the growth of the fungus Neurospora crassa, but is eliminated as acetophenone. *Int Biodeterior Biodegradation*. 2004;54(1):1-6. doi:10.1016/J.IBIOD.2003.11.002

162. Colovic MB, Krstic DZ, Lazarevic-Pasti TD, Bondzic AM, Vasic VM. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr Neuropharmacol*. 2013;11(3):315-335.

163. Kasteel EEJ, Nijmeijer SM, Darney K, et al. Acetylcholinesterase inhibition in electric eel and human donor blood: an in vitro approach to investigate interspecies differences and human variability in toxicodynamics. *Arch Toxicol*. 2020;94(12):4055-4065. doi:10.1007/s00204-020-02927-8

164. de Medeiros LM, De Bastiani MA, Rico EP, et al. Cholinergic Differentiation of Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Line and Its Potential Use as an In vitro Model for Alzheimer's Disease Studies. *Mol Neurobiol*. 2019;56(11):7355-7367. doi:10.1007/s12035-019-1605-3

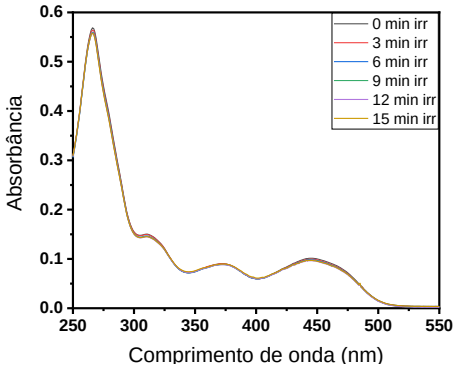
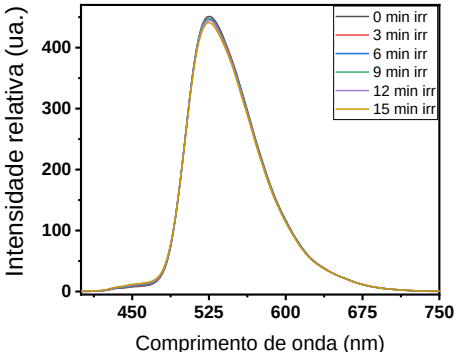
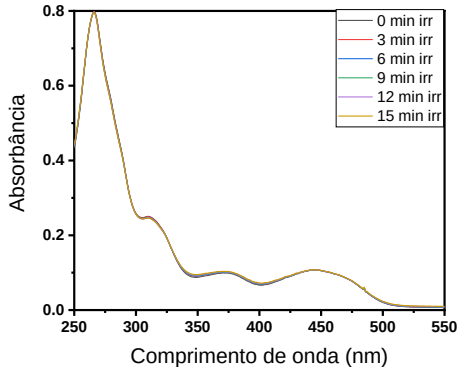
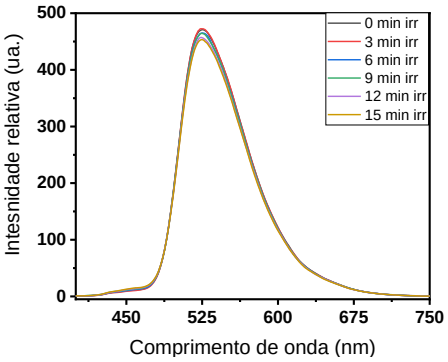
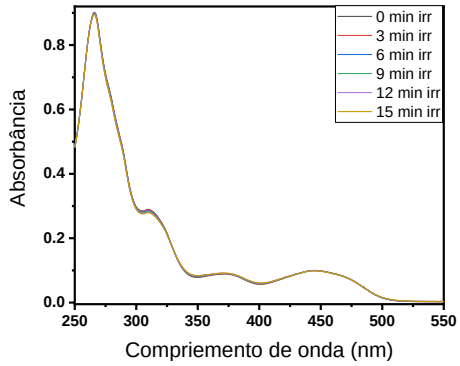
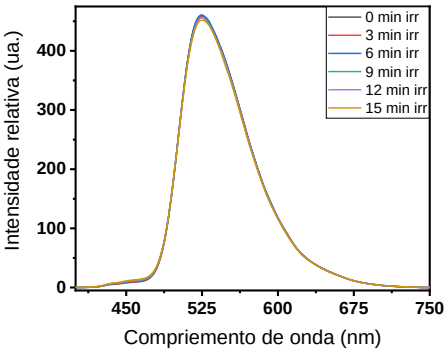
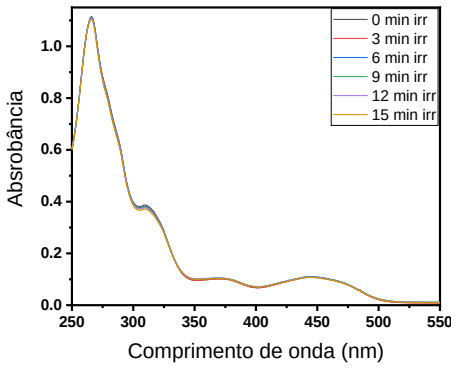
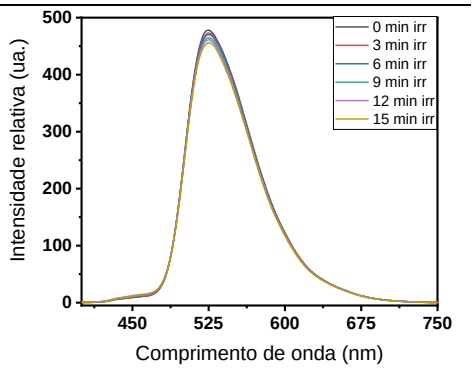
165. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4

Apêndice A

TABELA A 1. Valor de energia (eV) dos orbitais moleculares HOMO e LUMO e composição em porcentagem para o complexo $[Mg(phen)_2(fer)]^{2+}$

	Orbital	**E, eV**	**Mg**	**fer**	**phen$_a$**	**phen$_b$**
161	**L+10**	-2.34	35	0	33	32
160	**L+9**	-2.6	154	6	-30	-28
159	**L+8**	-2.87	0	0	39	63
158	**L+7**	-2.93	2	1	60	37
157	**L+6**	-3.39	1	96	1	2
156	**L+5**	-3.56	1	0	45	55
155	**L+4**	-3.68	1	3	53	43
154	**L+3**	-4.71	0	0	40	60
153	**L+2**	-4.78	1	0	60	39
152	**L+1**	-4.9	0	0	39	60
151	**LUMO**	-4.96	1	0	61	39
150	**HOMO**	-7.34	1	100	0	0
149	**H-1**	-8.36	0	100	0	0
148	**H-2**	-9.24	1	98	0	1
147	**H-3**	-9.35	0	98	0	1
146	**H-4**	-9.5	1	8	30	61
145	**H-5**	-9.53	1	43	25	31
144	**H-6**	-9.55	1	50	44	5
143	**H-7**	-9.91	0	0	21	79
142	**H-8**	-9.93	0	1	79	20
141	**H-9**	-10.06	16	72	7	5
140	**H-10**	-10.95	7	5	42	46

Apêndice B

Conc.	Absorção	Emissão
4 µg/mL		
7 µg/mL		
9 µg/mL		
11 µg/mL		

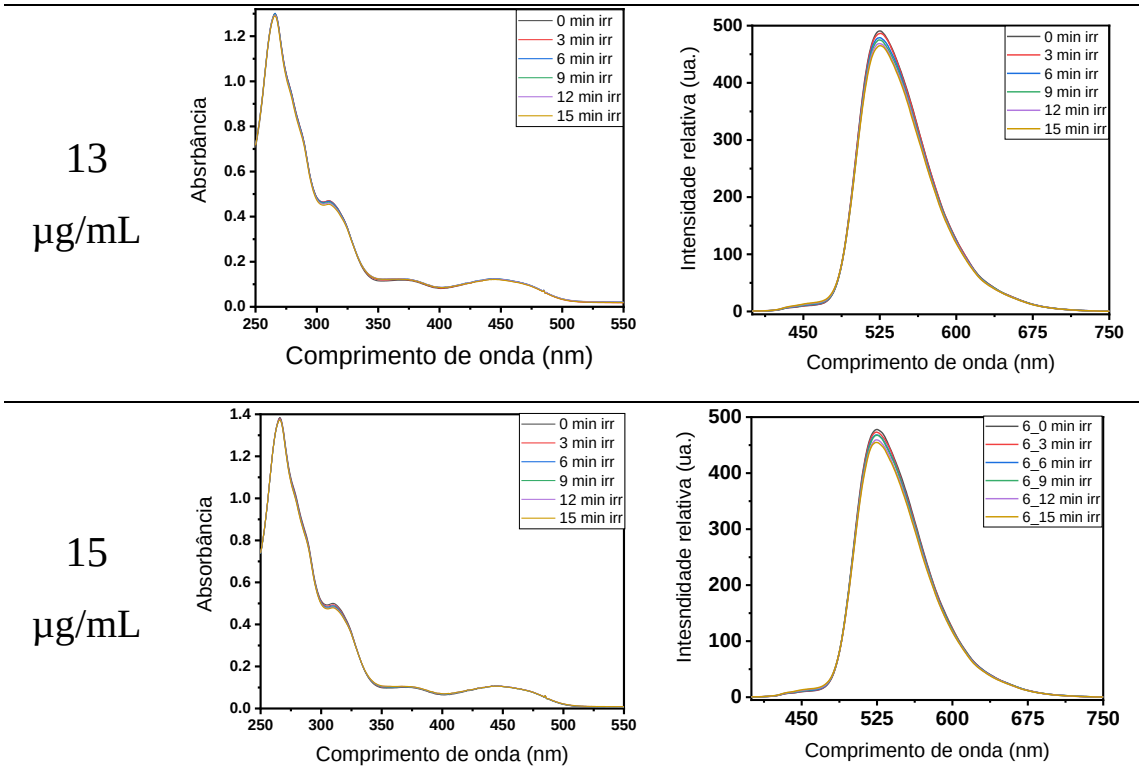
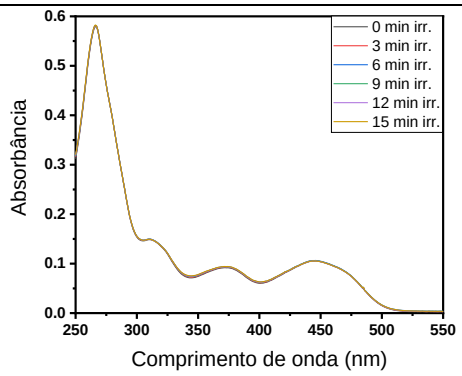
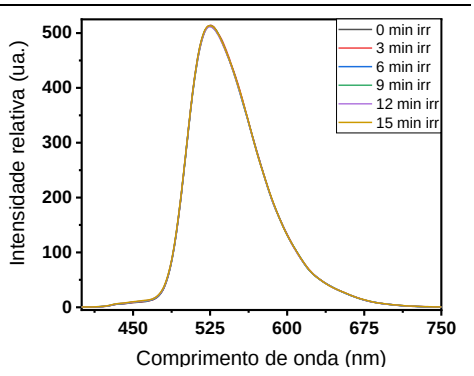
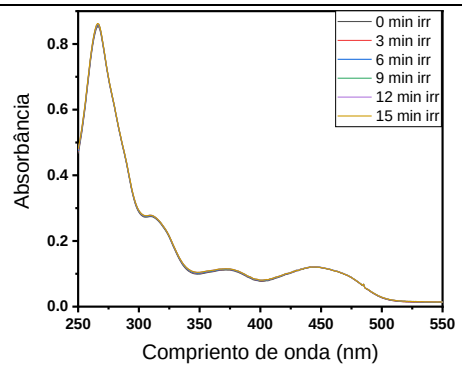
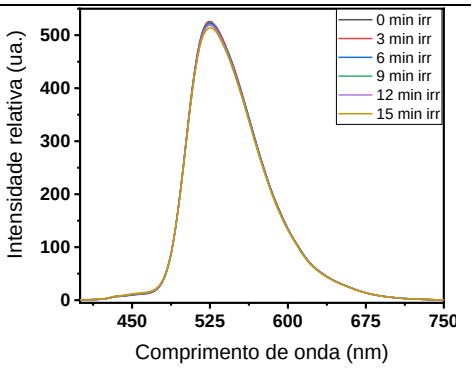
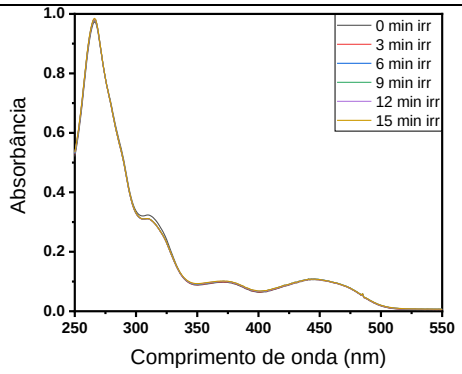
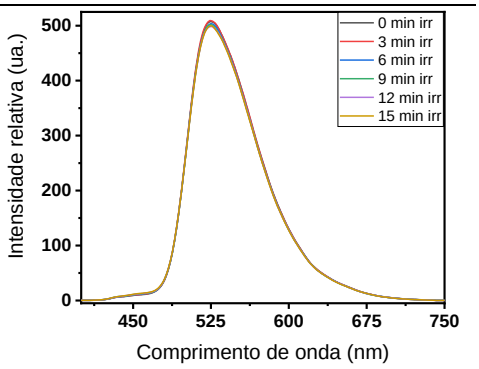
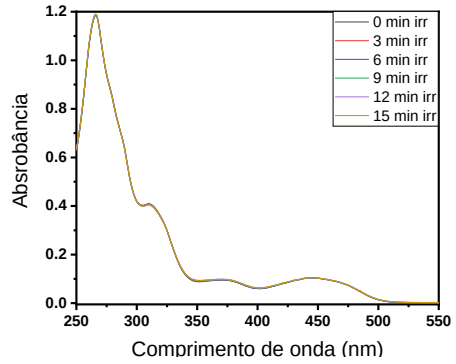
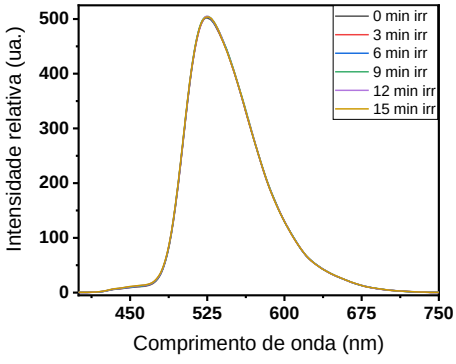


FIGURA A 1. Irradiação com luz contínua (450 nm) de uma solução de Rf (10 µmol/L) na presença de diferentes concentrações do complexo Mg-phen-fer em atmosfera de ar.

Conc.	Absorção	Emissão
4 µg/mL		
7 µg/mL		
9 µg/mL		
11 µg/mL		

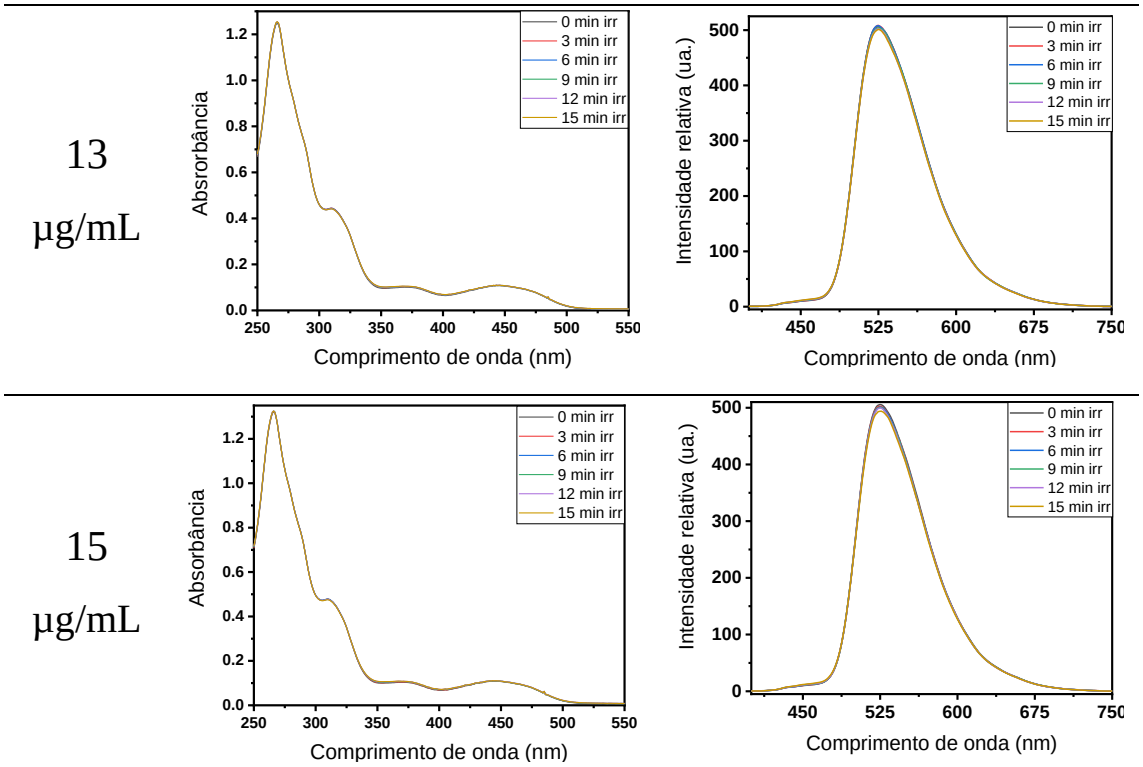
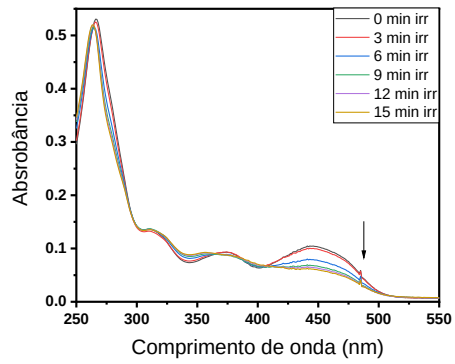
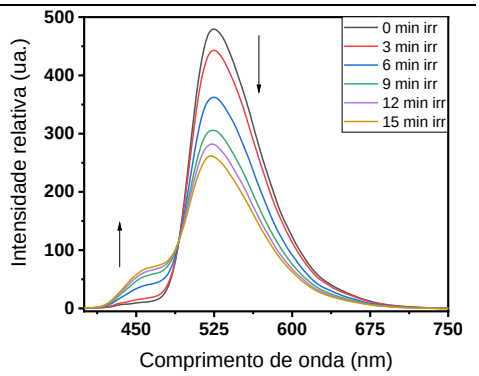
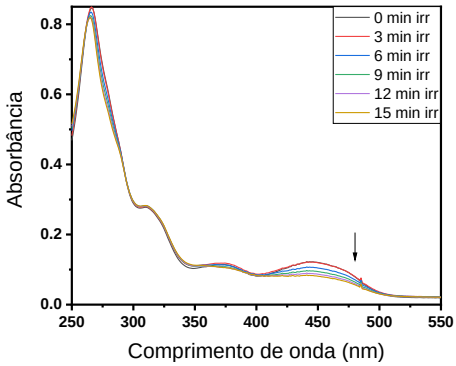
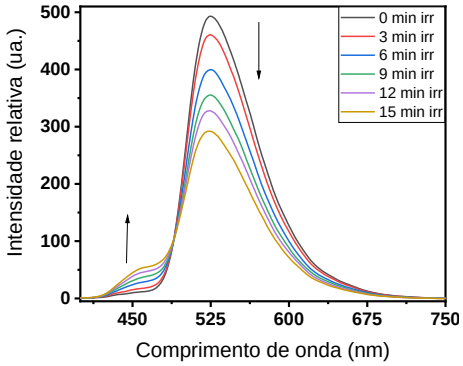
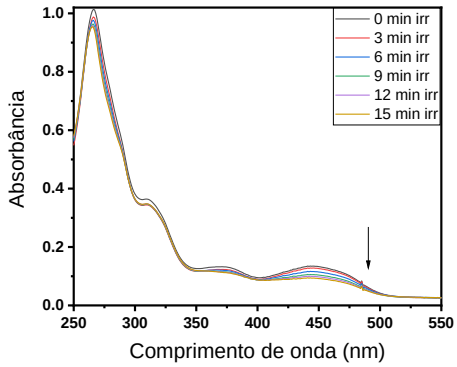
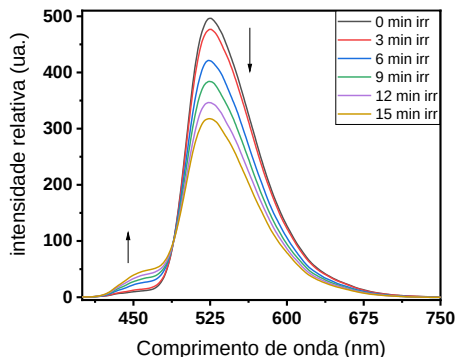
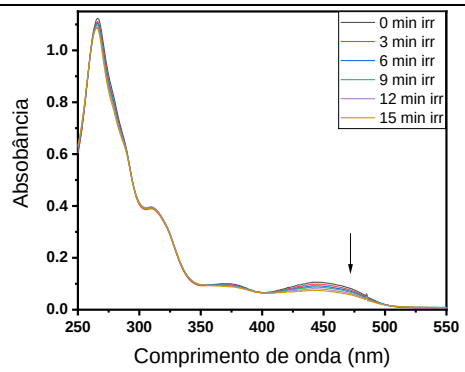
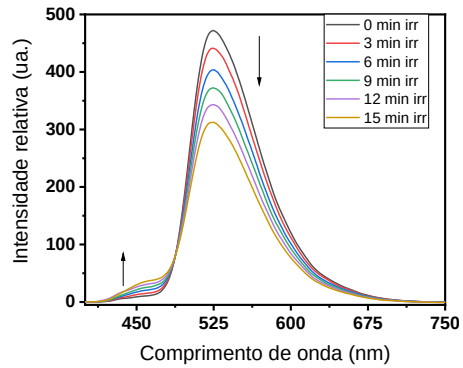


FIGURA A 2. Irradiação com luz contínua (450 nm) de uma solução de Rf (10 µmol/L) na presença de diferentes concentrações do complexo Mg-phen-fer em atmosfera de O_2.

Conc.	Absorção	Emissão
4 µg/mL		
7 µg/mL		
9 µg/mL		
11 µg/mL		

13 µg/mL

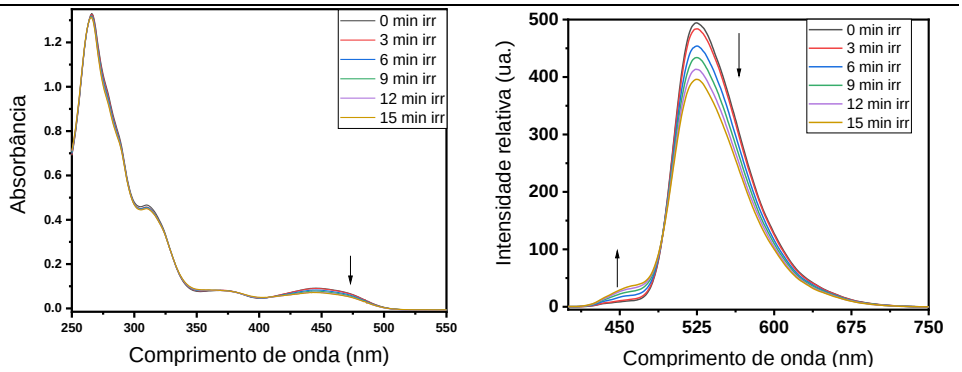
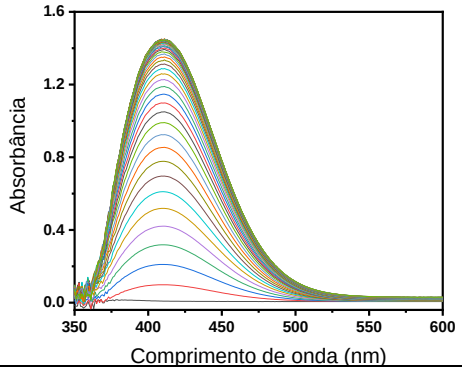
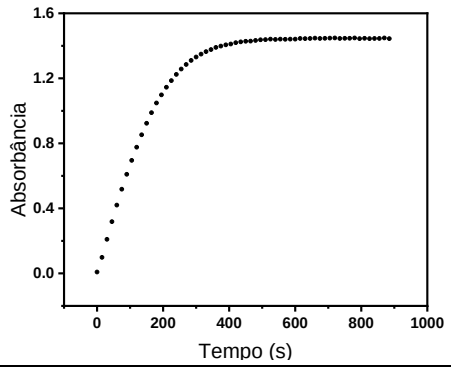


FIGURA A 3. Irradiação com luz contínua (450 nm) de uma solução de Rf (10 µmol/L) na presença de diferentes concentrações do complexo Mg-phen-fer em atmosfera de N_2.

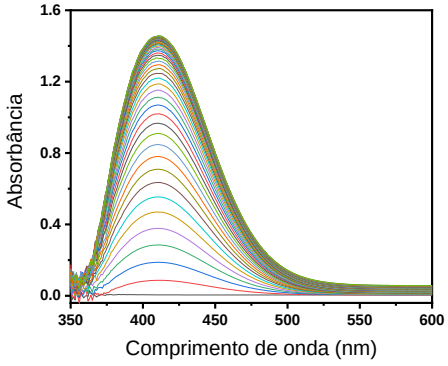
Apêndice C

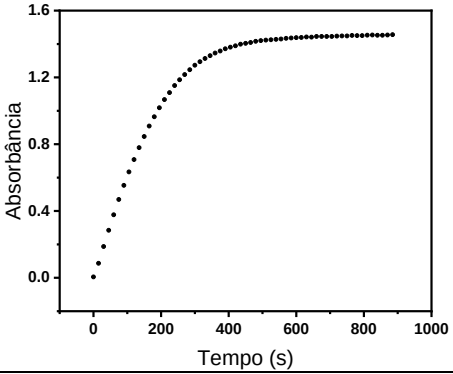
0 µg/mL



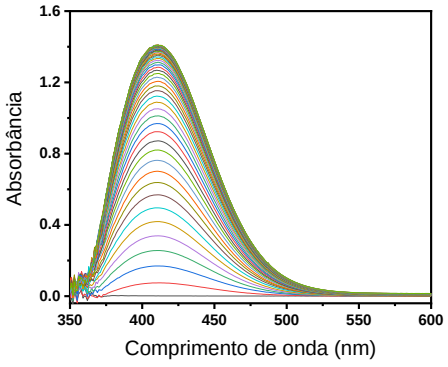


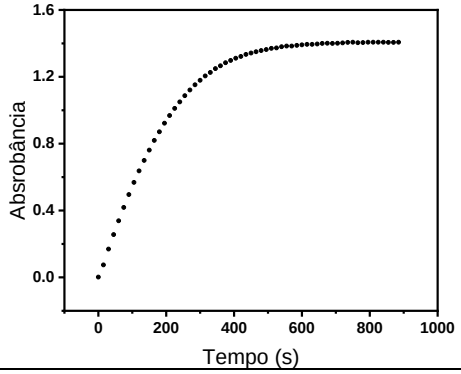
1.60 µg/mL



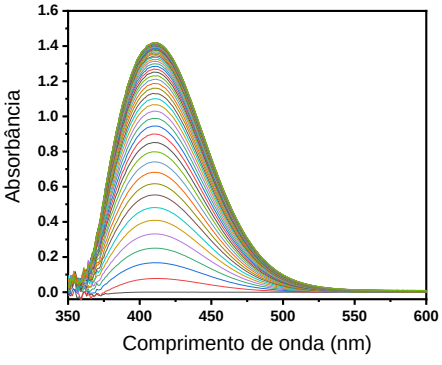


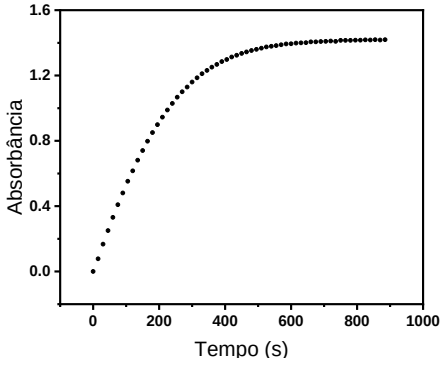
3.30 µg/mL





6.60 µg/mL





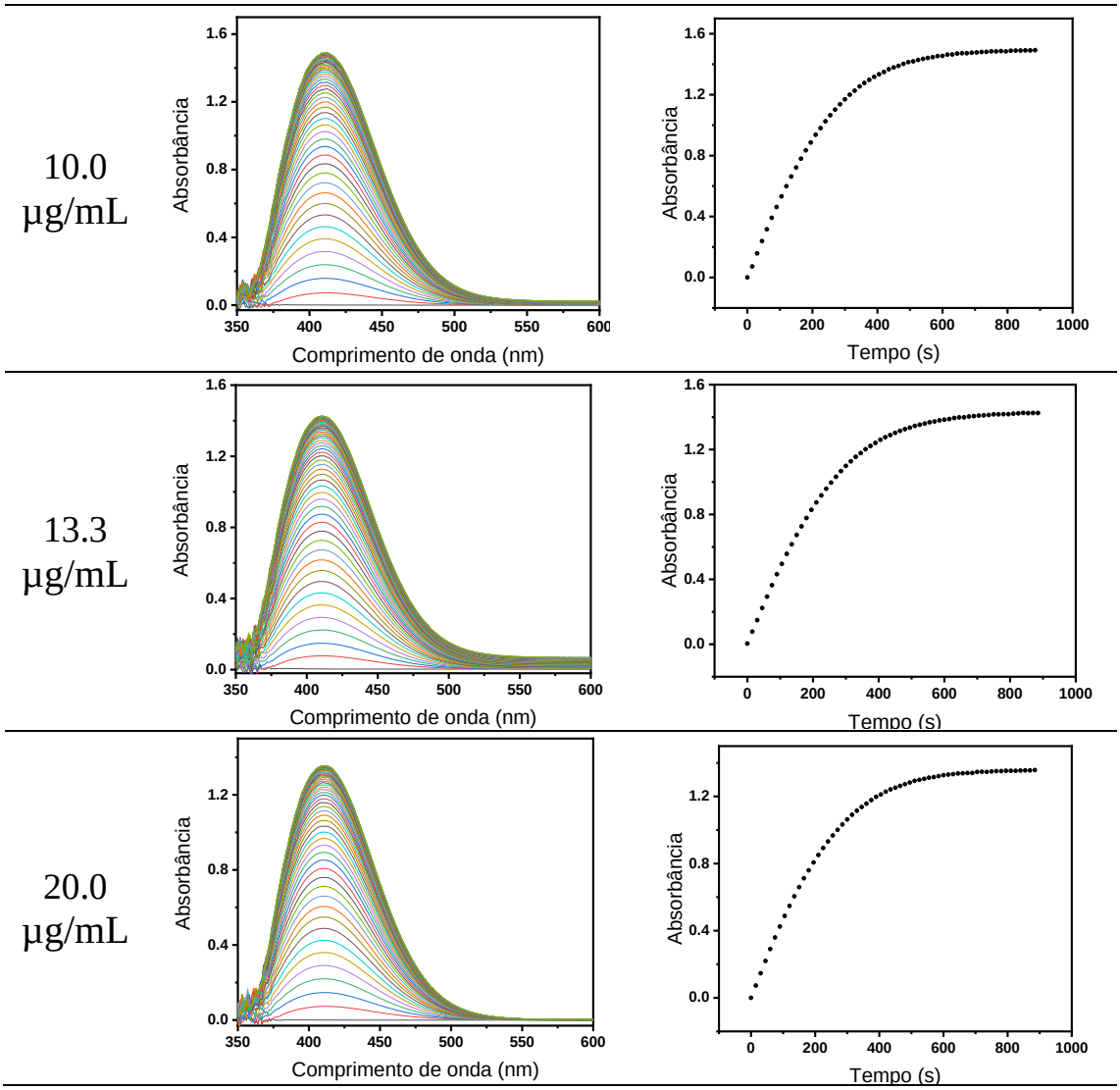


FIGURA A 4. Espectros de absorção na região do UV-*vis* e curva cinética de absorbância em 412 nm *vs.* Tempo (s) para acompanhar a formação do íon TNB na presença de diferentes concentrações do complexo Mg-phen-fer.