

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza
Instituto de Química

RODRIGO CARBALLO BLANCO

**Desenvolvimento de um Ensaio Colorimétrico em Papel para Determinação
da Atividade Antioxidante via Captura do Radical DPPH•**

Rio de Janeiro

Julho de 2025

Rodrigo Carballo Blanco

**Desenvolvimento de um Ensaio Colorimétrico em Papel para Determinação
da Atividade Antioxidante via Captura do Radical DPPH•**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Química - Atribuições Tecnológicas, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro, como
requisito parcial para a obtenção do título de
Bacharel em Química - Atribuições Tecnológicas.

Orientador: Rodolfo Santos Barboza

Rio de Janeiro

Julho de 2025

CIP - Catalogação na Publicação

C263d

Carballo Blanco, Rodrigo
Desenvolvimento de um Ensaio Colorimétrico em Papel
para Determinação da Atividade Antioxidante via
Captura do Radical DPPH• / Rodrigo Carballo Blanco.
-- Rio de Janeiro, 2025.
64 f.

Orientador: Rodolfo Santos Barboza.
Trabalho de conclusão de curso (graduação)
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de
Química, Bacharel em Química, 2025.

1. Desenvolvimento de método analítico. 2. Determinação de
atividade antioxidante. 3. DPPH. 4.
Análise colorimétrica. 5. Suporte em papel. I.
Santos Barboza, Rodolfo, orient. II. Título.

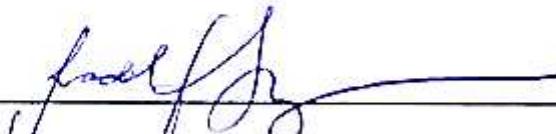
Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a
responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

Rodrigo Carballo Blanco

**Desenvolvimento de um Ensalo Colorítmétrico em Papel para Determinação da
Atividade Antioxidante via Captura do Radical DPPH•**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Química - Atribuições Tecnológicas, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro, como
requisito parcial para a obtenção do título de
Bacharel em Química - Atribuições Tecnológicas.

Aprovado por:


Prof. Dr. Rodolfo Santos Barboza (DQA-IQ-CCMN-UFRJ)


Prof. Dr. Ligia Maria Marino Valente (DQA-IQ-CCMN-UFRJ)


Prof. Dr. Rosangela Sabbatini Capella Lopes (DQA-IQ-CCMN-UFRJ)

Rio de Janeiro

Julho de 2025

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Maria e Antonio, e à minha irmã, Angela, por todos os ensinamentos, por sempre se doarem para o meu bem e por serem os pilares da pessoa que sou hoje. *A mis familiares de España, que por vivir en otro país no pueden acompañarme de cerca, pero fueran, son y siempre serán muy importantes para mí, os quiero.* Aos demais membros da minha família, tanto aos que estão aqui quanto aos que já se foram, por me apoiarem, acreditarem em mim e serem fundamentais na construção do meu caráter

Aos meus amigos, por todas as risadas, conversas e por estarem ao meu lado nos bons e maus momentos, sem eles toda essa jornada teria sido muito mais difícil. Apesar da importância de todos, seria injusto deixar de agradecer especialmente a alguns deles. Ao João, pela amizade que temos desde a infância até os dias de hoje, se alguém pode ser considerado um irmão de outra mãe não tenho dúvidas que seja ele. Às amizades que fiz no Colégio São Bento (avante Sabugo), são muitos para serem citados individualmente, mas cada um sabe (ou deveria saber) da importância que tem para mim; se tenho uma certeza é que riremos da mesma forma de uma história contada hoje ou daqui a 20 anos, não consigo imaginar uma vida sem vocês.

Aos professores que tive, desde o ensino básico ao superior, por contribuírem na minha formação acadêmica e humana, em especial ao meu orientador, Rodolfo Santos Barboza, pela orientação competente, paciência e ajuda durante todas as etapas de desenvolvimento deste trabalho, e à minha mãe, que não só me ensinou sobre a vida, mas também compartilhou a sala de aula comigo como professora.

Aos meus colegas do laboratório Labitan, especialmente à Gabi e ao Thiago, por toda ajuda que me forneceram e pelos ensinamentos passados, sem vocês meu ambiente de trabalho não seria tão leve e agradável.

Aos funcionários da UFRJ que, em meio a crises orçamentárias, seguiram prestando serviços de limpeza, alimentação, entre outros, viabilizando que inúmeros alunos pudessem continuar estudando para alcançar seus sonhos.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram direta e indiretamente para a conclusão deste trabalho.

Desenvolvimento de um Ensaio Colorimétrico em Papel para Determinação da Atividade Antioxidante via Captura do Radical DPPH•

RESUMO

A busca por métodos simples e eficazes para a determinação da atividade antioxidante tem se intensificado nas últimas décadas devido ao crescente interesse em substâncias com essa característica. O eixo principal do presente trabalho visou o desenvolvimento e a validação de um método analítico alternativo para determinação de atividade antioxidante, baseado em adaptações e/ou inovações dos ensaios tradicionais que utilizam a captura do radical DPPH•, implementando o uso de papel como suporte analítico e técnicas de análise colorimétrica de imagens digitais. Através do emprego de soluções de ácido gálico como padrão de substância antioxidante, foram estudadas condições reacionais atreladas ao ensaio de captura do referido radical, visando a adequação do uso do suporte analítico e do registro do padrão de cores gerado, buscando a obtenção do melhor desempenho analítico. A partir da regressão por mínimos quadrados parciais (PLS – *Partial Least Squares*) dos resultados obtidos com o método otimizado, obteve-se um coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,98 e um erro quadrático médio inferior a 10%, valores que indicam um notório potencial de aplicabilidade. A validação do método proposto ocorreu por meio da comparação com o desempenho de um dos métodos tradicionalmente utilizados: ensaio espectrofotométrico com DPPH• em microplaca. Uma mesma amostra de ácido gálico foi avaliada por ambos os métodos, revelando uma capacidade preditiva similar, porém, com menor dispersão, no caso do método proposto neste trabalho. Dessa forma, por entregar os mesmos resultados que o método tradicional sem a dependência de instrumentação analítica, sugere-se o método desenvolvido como uma alternativa aos métodos tradicionais consolidados na comunidade científica, podendo ser empregado em diferentes realidades laboratoriais.

Palavras-chave: análise colorimétrica; atividade antioxidante; DPPH•; suporte em papel; PLS.

Development of a Paper-Based Colorimetric Assay for the Determination of Antioxidant Activity via DPPH• Radical Scavenging

ABSTRACT

The search for simple and effective methods to determine antioxidant activity has intensified in recent decades due to the growing interest in compounds exhibiting such properties. The main focus of this study was the development and validation of an alternative analytical method for assessing antioxidant activity, based on adaptations and/or innovations of traditional assays that rely on DPPH• radical scavenging, implementing the use of paper as an analytical support and the application of digital image-based colorimetric analysis techniques. Gallic acid solutions were used as a standard antioxidant compound to investigate the reaction conditions associated with the DPPH• scavenging assay, aiming to optimize the use of the paper support and the image acquisition of the resulting color patterns, seeking to achieve the best analytical performance. Using Partial Least Squares (PLS) regression on the data obtained from the optimized method, a coefficient of determination (R^2) greater than 0,98 and a root mean square error below 10% were achieved, indicating strong potential for applicability. The proposed method was validated by comparing its performance with that of a traditionally used method: the spectrophotometric DPPH• assay in microplate. The same gallic acid sample was analyzed using both methods, revealing similar predictive capacity, however, the method developed in this study exhibited lower dispersion. Therefore, by delivering results comparable to those of the traditional method without the need for analytical instrumentation, the proposed method is suggested as an alternative to the traditional methods established in the scientific community, with potential applicability in various laboratory settings.

Keywords: colorimetric analysis; antioxidant activity; DPPH•; paper-based support; PLS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estruturas químicas de diferentes tipos de substâncias antioxidantes: queracetina (flavonol), ácido salicílico (ácido fenólico), resveratrol (estilbeno), glutationa (tripeptídeo) e vitamina E (tocoferol).	15
Figura 2 - Estruturas químicas dos antioxidantes sintéticos mais comumente usados (GÜLCİN; ALWASEL, 2023).	16
Figura 3 - Reação do radical DPPH [•] (roxo) com uma substância antioxidante (AH), gerando DPPH-H (amarelo-pálido) e um radical A [•]	17
Figura 4 – Espaço cúbico de cores RGB. Adaptado de (FAN, <i>et al.</i> , 2021).	19
Figura 5 - Representação do suporte de papel produzido.	24
Figura 6 - Representação da aplicação do produto reacional em uma tira de papel.	25
Figura 7 - Configuração da câmara de iluminação e demais dispositivos utilizados na captura de imagem.	26
Figura 8 - Arquitetura utilizada no programa <i>Orange</i> (versão 3.38.0) para gerar a regressão por PLS.	27
Figura 9 - Estruturas químicas do ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxibenzoico) e do Trolox (ácido (\pm)6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico).	30
Figura 10 - Mecanismo de regeneração de um <i>orto</i> -difenol (BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E. & BERSET, C., 1995).	32
Figura 11 - Gradiente de cores gerado após 20 minutos de reação da solução de DPPH [•] (232 mg L ⁻¹) com as soluções de ácido gálico (AG) na proporção 4:1.	32
Figura 12 - Manchas geradas após aplicação de 10 µL dos produtos reacionais gerados em 20 minutos de reação do DPPH com soluções de diferentes concentrações de ácido gálico em quadruplicata (colunas).	33
Figura 13 - Câmara de iluminação controlada e suporte da tiras usados durante a captura de imagem.	38
Figura 14 - Fotografia da plataforma analítica no interior da câmara de iluminação.	39

Figura 15 - Interface do <i>software</i> de imagem <i>ImageJ</i> e procedimento empregado na análise colorimétrica.	42
Figura 16 - Valores de RGB médios da área previamente selecionada no programa.	42
Figura 17 - Imagem de uma tira de papel, com o produto da reação entre o DPPH [•] e uma solução de ácido gálico de concentração 30,0 mg L ⁻¹ aplicado, que retrata o <i>coffee ring effect</i>	43
Figura 18 - Arquitetura empregada no programa <i>Orange</i> (versão 3.38.0) para construção do modelo PLS e avaliar sua capacidade preditiva em relação à amostra teste.	57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Regressão linear dos valores de <i>Red</i> (n=4) <i>versus</i> Concentração inicial de ácido gálico (AG).	35
Gráfico 2 - Regressão linear dos valores de <i>Green</i> (n=4) <i>versus</i> Concentração inicial de ácido gálico (AG).	35
Gráfico 3 - Regressão linear dos valores de <i>Blue</i> (n=4) <i>versus</i> Concentração inicial de ácido gálico (AG).	36
Gráfico 4 - Regressão linear das médias dos valores de <i>Red</i> (n=4) <i>versus</i> Concentração inicial de ácido gálico (AG).	37
Gráfico 5 - Regressão linear das médias dos valores de <i>Green</i> (n=4) <i>versus</i> Concentração inicial de ácido gálico (AG).	37
Gráfico 6 - Regressão linear das médias dos valores de <i>Blue</i> (n=4) <i>versus</i> Concentração inicial de ácido gálico (AG).	38
Gráfico 7 - Comparação de valores RGB obtidos em áreas distribuídas horizontalmente na plataforma analítica.	40
Gráfico 8 - Comparação de valores RGB obtidos em áreas distribuídas verticalmente na plataforma analítica.	41
Gráfico 9 - Distribuição dos resíduos do PLS.	45
Gráfico 10 - Regressão linear dos valores do percentual de inibição (n=8) <i>versus</i> a concentração inicial de ácido gálico (AG).	52
Gráfico 11 - Regressão linear dos valores médios (n=8) do percentual de inibição <i>versus</i> a concentração inicial de ácido gálico (AG).	53
Gráfico 12 - Distribuição dos resíduos da regressão linear.	54
Gráfico 13 - Regressão linear dos valores individuais do percentual de inibição <i>versus</i> a concentração inicial de ácido gálico (AG) com <i>outliers</i> removidos.	55
Gráfico 14 - Regressão linear dos valores médios do percentual de inibição <i>versus</i> a concentração inicial de ácido gálico (AG) com <i>outliers</i> removidos.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proporção dos valores de RGB em diferentes áreas analisadas.	40
Tabela 2 - Dados obtidos na etapa de análise colorimétrica organizados em uma planilha do programa Excel.	43
Tabela 3 - Parâmetros (R^2 e RMSEC) do modelo PLS gerados por diferentes grupos de dados.	45
Tabela 4 - Parâmetros obtidos nas etapas de regressão PLS (R^2 e RMSEC) e de validação cruzada <i>5-fold</i> (Q^2 e RMSECV).	47
Tabela 5 - Dados obtidos no ensaio de captura do radical DPPH \bullet utilizando o método tradicional.	51
Tabela 6 - Desvio padrão e coeficiente de variação dos valores de inibição considerando todos os dados obtidos.	54
Tabela 7 - Desvio padrão e coeficiente de variação dos valores de inibição ao remover os <i>outliers</i> identificados.	55
Tabela 8 - Valores fornecidos pelo modelo PLS do método desenvolvido na predição de amostras de ácido gálico com concentração teórica igual a 35,0 mg L $^{-1}$ (amostra teste).	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG – Ácido gálico

BHA - 2,3-terc-butil-4-hidroxianisol (*butylated hydroxyanisole*)

BHT - 2,6-di-terc-butil-p-cresol (*butylated hydroxytoluene*)

DPPH• - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

DPPH-H - 2,2-difenil-1-picrilhidrazina

GAE – Equivalentes de ácido gálico (*Gallic Acid Equivalents*)

IC₅₀ – Concentração Inibitória 50% (*Inhibitory Concentration 50%*)

k-fold – Validação cruzada com k subconjuntos

MeOH – Metanol (álcool metílico)

NIH - *National Institutes of Health*

PG – propil galato (*Propyl gallate*)

PLS – *Partial Least Squares* (Mínimos Quadrados Parciais)

RGB – R – *red* (vermelho); G – *green* (verde) e; B – *blue* (azul)

RMSEC – Raíz do Erro Quadrático Médio da Calibração (*Root Mean Square Error of Calibration*)

RMSECV – Raíz do Erro Quadrático Médio da Validação Cruzada (*Root Mean Square Error of Cross Validation*)

TBHQ – terc-butil-hidroquinona (*Tertiary butylhydroquinone*)

TE – Equivalentes de Trolox (*Trolox Equivalents*)

UV–Vis - Ultravioleta-visível

LISTA DE SÍMBOLOS

$A_{controle}$ – absorbância média das soluções de DPPH• sem ácido gálico (controle negativo)

$A_{amostra}$ – absorbância das soluções de DPPH• após reação com o ácido gálico (amostras)

\pm – mais ou menos

R^2 – coeficiente de determinação

$\sqrt{}$ – raiz quadrada

Σ – somatório

$y_{predito,i}$ – o valor predito da concentração inicial da solução de ácido gálico “i” usando a curva de calibração gerada

$y_{real,i}$ – valor real da concentração inicial da solução de ácido gálico “i”

\geq – maior ou igual

σ – desvio padrão

k – número de subconjuntos na validação cruzada

Q^2 – coeficiente de determinação da validação cruzada.

$<$ – menor

$>$ – maior

C_{max} – maior concentração da curva de calibração

C_{min} – menor concentração da curva de calibração

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVO	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 REAGENTES	24
3.2 PREPARO DO SUPORTE DE PAPEL	24
3.3 PREPARO DE SOLUÇÃO ESTOQUE DE ÁCIDO GÁLICO	24
3.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE ÁCIDO GÁLICO USADAS NA CURVA DE CALIBRAÇÃO	24
3.5 PREPARO DA SOLUÇÃO DO RADICAL DPPH•	24
3.6 REAÇÃO ENTRE O ÁCIDO GÁLICO E O DPPH•	25
3.7 APLICAÇÃO DO PRODUTO REACIONAL NO SUPORTE DE PAPEL	25
3.8 CAPTURA DA IMAGEM	25
3.9 ANÁLISE COLORIMÉTRICA	26
3.10 ORGANIZAÇÃO E AVALIAÇÃO INICIAL DOS DADOS	26
3.11 REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (PLS) E TRATAMENTO ESTATÍSTICO	26
3.12 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO POR COMPARAÇÃO COM MÉTODO TRADICIONAL	27
3.12.1 <i>Procedimento experimental</i>	27
3.12.2 <i>Tratamento e interpretação dos dados</i>	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 ESCOLHA DOS REAGENTES	29

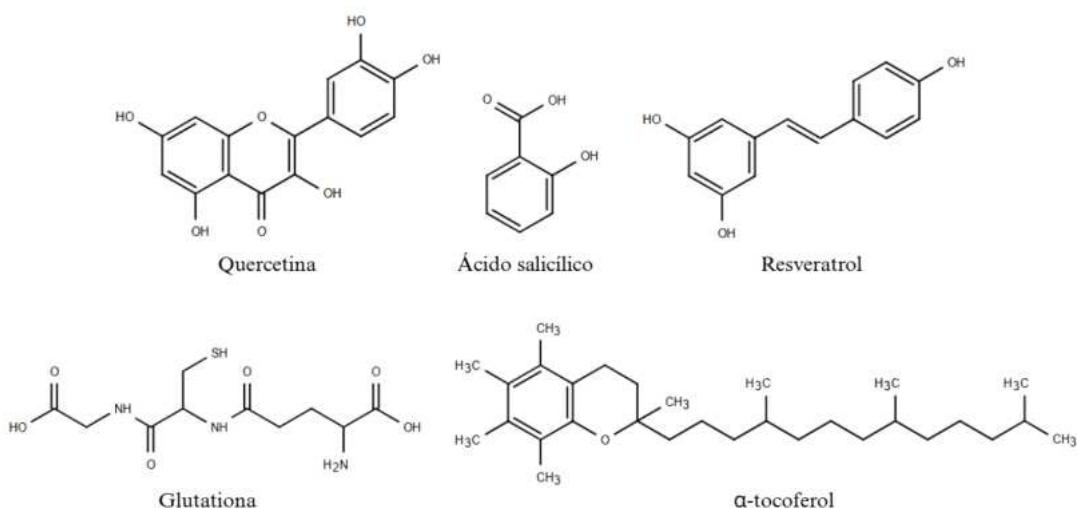
4.1.1 Radical DPPH•	29
4.1.2 Ácido gálico	29
4.2 ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS	30
4.2.1 Faixa de concentração de trabalho	30
4.2.2 Tempo de reação	31
4.2.3 Proporção entre os reagentes	31
4.3 USO DO PAPEL COMO PLATAFORMA ANALÍTICA	32
4.3.1 Escolha do tipo do papel	32
4.3.2 Aplicação das soluções	33
4.4 CAPTURA DE IMAGEM	34
4.4.1 Iluminação não controlada	34
4.4.2 Câmara de iluminação controlada	38
4.5 ANÁLISE COLORIMÉTRICA	41
4.6 REGRESSÃO PLS E TRATAMENTO ESTATÍSTICO	44
4.7 COMPARAÇÃO COM O MÉTODO TRADICIONAL	49
4.7.1 Complexidade procedural	49
4.7.2 Capacidade preditiva	50
4.7.2.1 Método tradicional	50
4.7.2.2 Método desenvolvido	56
5 CONCLUSÃO	59
6 PERSPECTIVAS	60
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, substâncias com propriedades antioxidantes vêm ganhando destaque devido a suas capacidades de combater processos de deterioração oxidativa presentes não só no organismo, mas também em diversos produtos comerciais (GÜLÇİN, 2020). Inúmeras são as substâncias capazes de retardar processos oxidativos, podendo ser de origem natural ou sintética (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Antioxidantes naturais estão presentes em plantas, animais e demais organismos, constituindo um grupo diversificado formado por tocoferóis, compostos (poli)fenólicos, como ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas; carotenoides, proteínas, minerais, dentre outras substâncias (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015) (**Figura 1**).

Figura 1 - Estruturas químicas de diferentes tipos de substâncias antioxidantes: quercetina (flavonol), ácido salicílico (ácido fenólico), resveratrol (estileno), glutationa (tripeptídeo) e α -tocoferol (tocoferol).

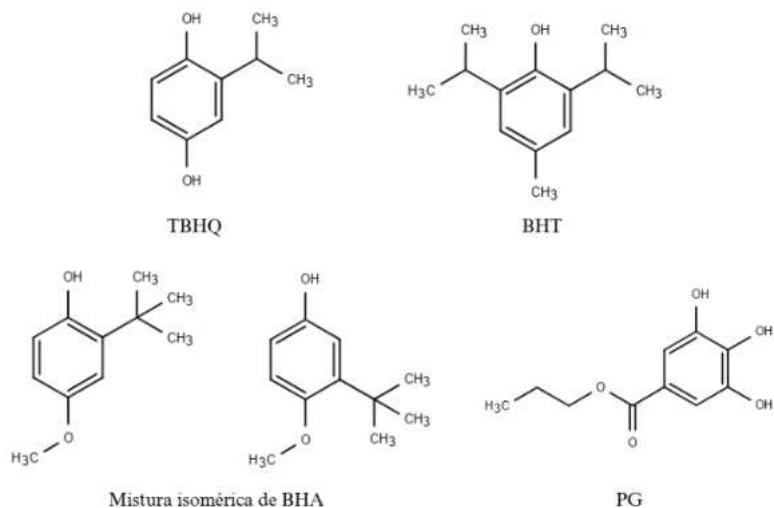


Os benefícios provenientes do consumo de alimentos como frutas e verduras é associado em boa parte à presença de antioxidantes em suas composições (GÜLÇİN, 2011). Essas substâncias desempenham um papel crucial para a prevenção de diversas enfermidades como a aterosclerose, a *diabetes mellitus*, até mesmo alguns tipos de câncer (KARADAG *et al.*, 2009; TINKEL *et al.*, 2012) e doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer (FENG *et al.*, 2023; NEHA *et al.*, 2019).

Antioxidantes sintéticos, por sua vez, são obtidos a partir de sínteses químicas e são amplamente empregados devido a seu baixo custo, produção em larga escala e estabilidade química (GÜLÇİN, 2020). Dentre os principais compostos desse tipo, destacam-se os

antioxidantes fenólicos: mistura de 2-(terc-butil)-4-hidroxianisol e 3-(tercbutil)-4-hidroxianisol (*butylated hydroxyanisole*) (BHA); 2,6-di-terc-butil-p-cresol (*butylated hydroxytoluene*) (BHT); terc-butil-hidroquinona (*tertiary butylhydroquinone*) (TBHQ); propil galato (*propyl gallate*)(PG); dentre outros (GÜLÇİN; ALWASEL, 2023).

Figura 2 - Estruturas químicas dos antioxidantes sintéticos mais comumente usados (GÜLÇİN; ALWASEL, 2023).

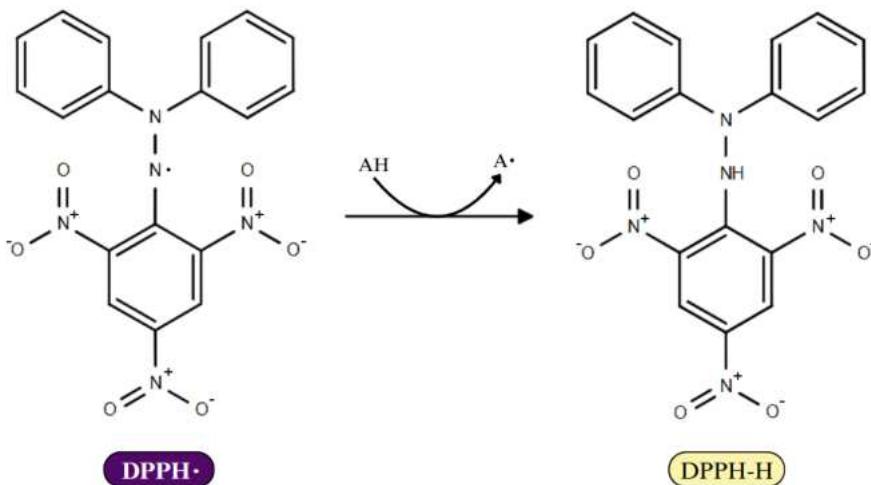


Diversos itens presentes no dia a dia comportam antioxidantes, sejam naturais ou sintéticos, em sua composição. A indústria alimentícia se vale do uso dessas substâncias na manutenção da qualidade nutricional de produtos visando um maior tempo de prateleira, evitando processos danosos como a rancidez oxidativa, por exemplo (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). A indústria farmacêutica explora a atividade antioxidante na formulação de medicamentos, avaliando diversas combinações de substâncias e seus efeitos no organismo, além de investigar extratos e frações oriundas de materiais vegetais que possam apresentar a referida propriedade de forma extensiva (SILVA *et al.*, 2024). Outras áreas como as de cosméticos, lubrificantes industriais e materiais aplicam antioxidantes em seus produtos visando promover maior estabilização química (GÜLÇİN, 2020). Dada a grande importância que os antioxidantes têm na sociedade atual, pesquisas sobre substâncias e extratos vegetais com alta capacidade antioxidant vem sendo tópicos presentes em diferentes trabalhos científicos (OLIVEIRA, 2015; GÜLÇİN; ALWASEL, 2023).

Nesse contexto, um aspecto a ser considerado é o desenvolvimento de métodos analíticos eficazes para a determinação de atividade antioxidante. Dentre os métodos mais empregados atualmente, destacam-se aqueles baseados no ensaio de captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]) (KARADAG *et al.*, 2009). O DPPH[•] é um radical estável, de

cor roxa intensa, possuindo absorção máxima em torno de 517 nm (IONITA, 2021). Ao reagir com uma ou mais substâncias antioxidantes, a conversão do DPPH[•] a sua forma reduzida, 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH-H), promove a mudança na coloração do meio reacional de roxo para amarelo-pálido (**Figura 3**) (IONITA, 2021; GÜLÇİN; ALWASEL, 2023).

Figura 3 - Reação do radical DPPH[•] (roxo) com uma substância antioxidante (AH), gerando DPPH-H (amarelo-pálido) e um radical A[•].



O consumo de DPPH[•] durante a reação leva a uma queda do valor de absorvância da solução em 517 nm. Tradicionalmente, vale-se da espectrofotometria para associar a redução da absorvância nesse comprimento de onda com a capacidade antioxidante da amostra (GÜLÇİN; ALWASEL, 2023). A porcentagem de inibição do DPPH[•] (pela amostra) é obtida ao relacionar a absorvância da solução de DPPH[•] antes ($A_{controle}$) e ao término ($A_{amostra}$) da reação com a amostra:

$$\text{Inibição (\%)} = \left(\frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle}} \right) \times 100$$

Com a porcentagem de inibição, há duas formas principais de expressão dos resultados (OLSZOWY-TOMCZYK, 2021). Uma delas se dá com o parâmetro IC₅₀, quantidade de amostra necessária para inibir a concentração inicial de DPPH[•] em 50% (OLIVEIRA, 2015). Quanto menor o valor de IC₅₀, maior o poder antioxidante da amostra. A outra consiste em correlacionar o poder de inibição da amostra com um antioxidante padrão (NENADIS; LAZARIDOU; TSIMIDOU, 2007; SILVA *et al.*, 2024; SATEANCHOCK, 2018). Nessa abordagem, faz-se uma curva padrão com o antioxidante de referência e, a partir dela, associa-se a porcentagem de inibição da amostra em equivalentes do padrão selecionado. Substâncias como Trolox, ácido ascórbico, ácido gálico, dentre outras, são normalmente empregadas como

padrão antioxidante (NENADIS; LAZARIDOU; TSIMIDOU, 2007; OLSZOWY-TOMCZYK, 2021).

A absorvância costuma ser medida com um espectrofotômetro UV-Vis ou com um leitor de microplacas (KARADAG *et al.*, 2009). Por ser um equipamento relativamente simples frente a outros equipamentos, o uso do espectrofotômetro UV-Vis é uma das razões pela alta disseminação do ensaio de captura do radical DPPH[•] (KARADAG *et al.*, 2009; GÜLÇİN; ALWASEL, 2023). Leitores de microplacas também são amplamente utilizados por permitirem a avaliação de múltiplas amostras simultaneamente, otimizando o tempo de análise (KARADAG *et al.*, 2009). De modo geral, o método do DPPH[•] é destacado pela alta simplicidade técnica e rapidez de análise, sendo amplamente empregado em estudos preliminares de antioxidantes, seja em compostos puros ou em extratos de plantas (APAK *et al.*, 2006).

Apesar de ser considerado tecnicamente mais simples, econômico e rápido em comparação com outras técnicas analíticas, o ensaio espectrofotométrico em microplacas ainda apresenta barreiras que podem inviabilizar seu uso em certos cenários. O custo elevado da instrumentação, a necessidade de treinamento técnico especializado, sobretudo para manuseio de diluições seriadas e amostras em concentrações muito baixas, além do tempo de reação necessário (que muitas vezes pode ultrapassar 30-60 min por rodada de análise), tornam o método pouco viável em contextos com recursos restritos. Ademais, a reproduzibilidade do ensaio pode ser comprometida em laboratórios com prática limitada, devido à variabilidade de parâmetros críticos como tempo de incubação, agitação, pH e controle de temperatura.

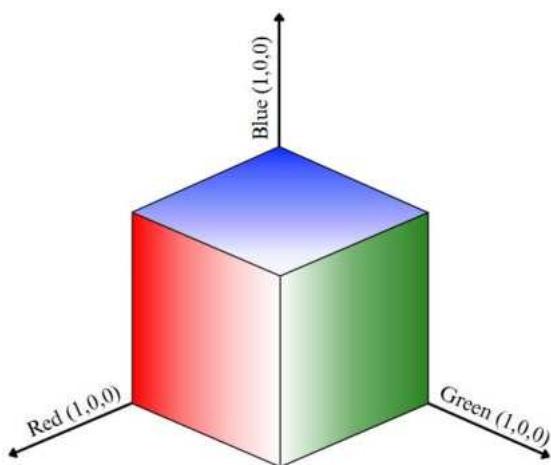
Estudos apontam que, apesar da boa precisão geralmente observada, diversos fatores podem afetar a confiabilidade dos resultados, incluindo dificuldades no momento da tomada de alíquotas, preparo de reagentes e controle de condições reacionais, resultando em variabilidade intra e inter-laboratorial (BOBO-GARCÍA *et al.*, 2015; PRIETO *et al.*, 2015). Essas limitações tornam o ensaio menos adequado para contextos com baixo suporte técnico ou financeiro, destacando a necessidade de métodos alternativos mais robustos e acessíveis.

Métodos analíticos fundamentados no uso de papel como suporte para reação, que ganham destaque pelo seu baixo custo, alta praticidade e possibilidade de portabilidade (SINGHAL *et al.*, 2021), surgem como uma alternativa potencial ao método tradicional supracitado. Características do papel, como sua flexibilidade, resistência mecânica, alta porosidade, alta molhabilidade e biocompatibilidade permitem que uma série de análises

biológicas e químicas sejam realizadas (BERASARTE *et al.*, 2025). Além disso, o fácil acesso a tecnologias como câmeras digitais, dispositivos celulares e *scanners*, permitem a conversão do produto reacional em imagem digital de forma simples e barata, fomentando a aplicação de métodos de detecção por análise de imagem (BERASARTE *et al.*, 2025). A combinação de um material de baixo custo com uma técnica de detecção extremamente acessível, cuja viabilidade é respaldada pela literatura (SATEANCHOCK *et al.*, 2018; BARBOZA *et al.*, 2022; LÓPEZ-TÉLLEZ, CAÑIZARES-MÁCIAS, 2023), pode tornar-se uma poderosa ferramenta analítica.

Em reações em que há variação de cor, como a que ocorre no ensaio de captura do radical DPPH•, a aplicação da colorimetria como técnica analítica pode ser interessante. Na química, é um método empregado para avaliar as cores de soluções, imagens ou outras fontes de informação a depender do contexto. Dentre os parâmetros colorimétricos mais empregados, destaca-se o espaço de cores RGB (Do inglês: R - *red* (vermelho), G - *green* (verde), B - *blue* (azul)) (FAN, *et al.*, 2021). O espaço RGB é representado por um cubo (**Figura 4**), em que os eixos correspondem aos três canais de cor envolvidos. De acordo com a intensidade luminosa e a cor do objeto analisado (solução, imagem, entre outros), cada componente apresenta um valor, sendo a faixa entre 0 e 255 geralmente adotada, gerando uma combinação específica dos parâmetros R, G e B (FAN, *et al.*, 2021). Com isso, não só a distinção objetiva de amostras de diferentes cores torna-se possível, mas também a associação entre a intensidade da cor gerada na reação com algum outro parâmetro, como a concentração de determinada substância-alvo ou, no caso do presente trabalho, o poder antioxidante da amostra.

Figura 4 – Espaço cúbico de cores RGB. Adaptado de (FAN, *et al.*, 2021).



Embora seja uma técnica empregada em aparelhos instrumentais, como espectrofotômetros e colorímetros, para diversos tipos de análise, ela também pode ser realizada

pela avaliação de imagens digitais obtidas a partir de dispositivos, como aparelhos celulares e câmeras digitais (BERASARTE *et al.*, 2025). A disponibilidade de aplicativos e programas de livre acesso que permitem esse tipo de análise, como o Photometrix (<https://www.photometrix.com.br/>) e o ImageJ (<https://imagej.net/ij/>), gera uma redução ainda maior dos custos operacionais e possibilitam a realização da análise por quaisquer usuários com acesso a um celular e/ou computador, a partir de quaisquer localidades.

Além do potencial analítico, o desenvolvimento de métodos que usam o papel como suporte, associado a uma técnica analítica simples, como a análise colorimétrica de imagens digitais, se alinha com os princípios da química analítica verde (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKIA; NAMIESNIK, 2013). O uso do papel, que por si só é um material seguro, biodegradável e abundante, atrelado a técnicas de avaliação de imagens digitais (obtidas por dispositivos celulares ou por outra tecnologia) permite que a análise seja realizada *in situ*, com consumo energético reduzido e baixa geração de rejeitos químicos. Diante da crescente necessidade por métodos mais sustentáveis e ambientalmente responsáveis, esses aspectos tornam-se vantagens relevantes frente a técnicas instrumentais mais tradicionais.

Contudo, embora fatores econômicos e ambientais sejam atrativos, qualquer proposta de método analítico deve ser testada e validada. Entre as etapas essenciais no desenvolvimento de um método, destaca-se o tratamento e a interpretação adequados dos dados (FERREIRA, 2015). Para isso, vale-se da quimiometria, a aplicação de ferramentas matemáticas e estatísticas à química (KOWALSKI, 1975). Seu uso permite que tendências e flutuações sejam identificadas e compreendidas a partir de testes que avaliam, por exemplo, a distribuição normal dos dados, a presença de valores aberrantes, a condição de homoscedasticidade. Dessa forma, a identificação e correção de erros gerados, além do reconhecimento de limitações inerentes da metodologia proposta, pode ser realizado, assegurando maior robustez e confiabilidade ao método desenvolvido.

Além de ser fundamental para o tratamento e interpretação corretos dos dados, a quimiometria também tem um papel importante na construção de modelos estatísticos e na validação de métodos analíticos. Modelos bem ajustados, em que as variáveis independentes (preditores) apresentam forte correlação com a variável dependente (resposta), favorecem maior robustez, precisão e capacidade de previsão do método analítico. Por isso, a escolha correta da técnica de regressão empregada tem um impacto direto na qualidade dos resultados obtidos. A existência de programas de livre acesso que dispõe de diferentes ferramentas

quimiométricas, como o Orange (<https://orangedatamining.com/>), permite o emprego da quimiometria em métodos com diferentes aplicações de modo prático, fácil e rápido.

Existem diversos tipos de regressões, diferindo na natureza da relação entre variáveis, complexidade e aplicabilidade, sendo cada um deles mais adequado para situações específicas. No contexto da colorimetria por análise de imagens digitais, é comum que múltiplas variáveis independentes, como os valores dos canais R, G e B, sejam empregadas, tornando o uso de métodos de regressão multivariados mais adequado. Ademais, é comum que os canais de cor apresentem alta colinearidade, isto é, uma forte correlação (ZHAO *et al.*, 2023). Assim, a alteração da intensidade de uma das colorações pode impactar simultaneamente os três canais, dificultando a compreensão da contribuição individual de cada um deles sobre a resposta. Por isso, em alguns tipos de análises, como espectroscópicas e colorimétricas, é fundamental que modelo de regressão utilizado lide bem com a característica de colinearidade entre os preditores.

O método de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS – *Partial Least Squares*) é o mais empregado nesses casos (ANDRADE, 2008; BERASARTE *et al.*, 2025), pois distingue e seleciona as variações dos preditores mais associadas à variável resposta, otimizando a construção do modelo preditivo. O funcionamento do PLS baseia-se na construção de componentes latentes, que são combinações lineares dos preditores originais, capazes de capturar, de forma otimizada, a variabilidade da resposta (WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001) . Isso ocorre porque o método maximiza a covariância entre as projeções das amostras nos componentes latentes (também chamados de *scores*) e a variável resposta (WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001). Dessa forma, informações dos preditores originais que não apresentam relação significativa com a resposta são minimizadas, permitindo que a modelagem se concentre nos fatores estatisticamente importantes na predição.

Após o desenvolvimento de um modelo estatístico descritivo, todo método analítico deve passar pela etapa de validação (FERREIRA, 2015). Nesta etapa verifica-se se a capacidade de generalização e predição do modelo são mantidas quando novos dados são analisados. Dentro as principais formas de realizar a validação de modelos preditivos, destacam-se a validação interna e externa. A validação interna tem como princípio a subdivisão dos dados em dois grupos: treinamento e teste. O modelo é construído com a parte dos dados destinados ao treinamento e testado com a outra, sendo o processo repetido até que todas as amostras tenham sido usadas como teste ao menos uma vez (BERETON, 2018). Já a validação externa usa dados totalmente independentes àqueles empregados na construção do modelo de regressão. Assim, é um modo mais rigoroso e realista de verificar a capacidade preditiva do modelo, no entanto

demandas de uma maior disposição de amostras, não se adequando a depender do caso (BERETON, 2018).

Diante de todo o cenário apresentado, nota-se que há uma gama de possibilidades de aparelhos, materiais e técnicas a serem exploradas no desenvolvimento de um método analítico. O ensaio de captura do radical DPPH \bullet , já consolidado no meio científico, merece investigação quanto à introdução de possíveis inovações e/ou alternativas que tornem o ensaio mais simples e atual. Como alternativa aos métodos tradicionais estabelecidos, o presente trabalho de conclusão de curso tratou do desenvolvimento de um método de determinação de atividade antioxidante cuja espinha dorsal se baseia no uso de materiais, aparelhos e programas extremamente acessíveis, buscando alcançar uma alta eficácia de análise com um baixo custo de recursos e de tempo.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método analítico simples, barato e efetivo para a determinação de atividade antioxidante a partir do ensaio de captura do radical DPPH• em papel, seguido de quantificação por análise colorimétrica de imagens digitais e uso de PLS.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Revisar a literatura sobre o ensaio tradicional de captura do radical DPPH• e identificar, por meio de estudo bibliográfico, tendências atuais em métodos analíticos aplicáveis ao ensaio com DPPH•;
- Avaliar o uso de papel como suporte analítico para o ensaio com DPPH• com detecção por análise colorimétrica de imagens digitais;
- Selecionar um padrão antioxidante com base na literatura e na disponibilidade de reagentes;
- Determinar o tipo de papel mais adequado e acessível para aplicação no método;
- Estudar e otimizar as condições da reação entre o DPPH• e o padrão antioxidante (proporções, concentrações e tempo de reação, dentre outros);
- Estabelecer um procedimento adequado para aplicação do produto reacional no papel;
- Desenvolver um sistema de captura de imagens com iluminação homogênea intra e interimagem;
- Realizar a captura de imagens do produto reacional no papel;
- Analisar as imagens obtidas por colorimetria utilizando o *software ImageJ*;
- Aplicar regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) aos dados tratados utilizando o *software Orange*;
- Avaliar a qualidade do modelo PLS por meio da correlação e do erro médio obtidos;
- Validar o método desenvolvido através da verificação da precisão intermediária e da comparação com o método espectrofotométrico tradicional.

3 MATERIAL E MÉTODOS

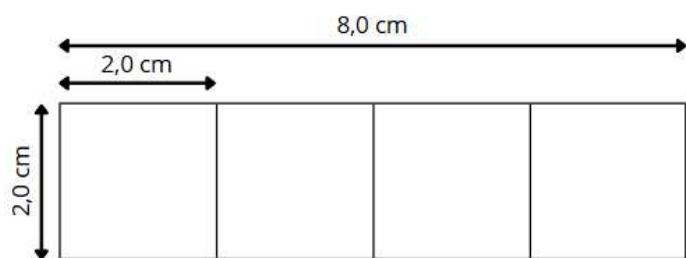
3.1 REAGENTES

Os principais reagentes utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram: álcool metílico P. A. ACS (Synth, Brasil) (MeOH); 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]) (Sigma-Aldrich, Alemanha); ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxibenzoico).

3.2 PREPARO DO SUPORTE DE PAPEL

A partir de folhas de papel linho branco (Filiperson, Brasil), de dimensão 21,0 × 29,7 cm e de gramatura igual a 180 g/m², foram preparadas tiras de 2,0 cm × 8,0 cm. Com um lápis grafite, retas paralelas foram traçadas a cada 2,0 cm do comprimento das tiras de papel conforme indicado na **Figura 5**.

Figura 5 - Representação do suporte de papel produzido.



3.3 PREPARO DE SOLUÇÃO ESTOQUE DE ÁCIDO GÁLICO

A massa de 0,0100 g de ácido gálico ($C_7H_6O_5$; 170,12 g mol⁻¹), foi solubilizada em MeOH, sendo a solução transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100,00 ± 0,08 mL. O balão foi avolumado com MeOH, formando uma solução de ácido gálico na concentração de 100 mg L⁻¹.

3.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE ÁCIDO GÁLICO USADAS NA CURVA DE CALIBRAÇÃO

A partir da transferência de alíquotas de 2,000; 3,000; 4,000; 5,000 e 6,000 mL da solução estoque de ácido gálico para balões volumétricos de 10,00 ± 0,02 mL, foram realizadas diluições com MeOH, levando a soluções de concentração: 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0 mg L⁻¹, respectivamente.

3.5 PREPARO DA SOLUÇÃO DO RADICAL DPPH[•]

A massa de 0,0116 g do radical DPPH[•] ($C_{18}H_{12}N_5O_6$; 394,3 g mol⁻¹) foi solubilizada em MeOH e transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 50,00 ± 0,05 mL. Em

seguida o balão foi avolumado com MeOH, formando uma solução de DPPH[•] na concentração de 232 mg L⁻¹.

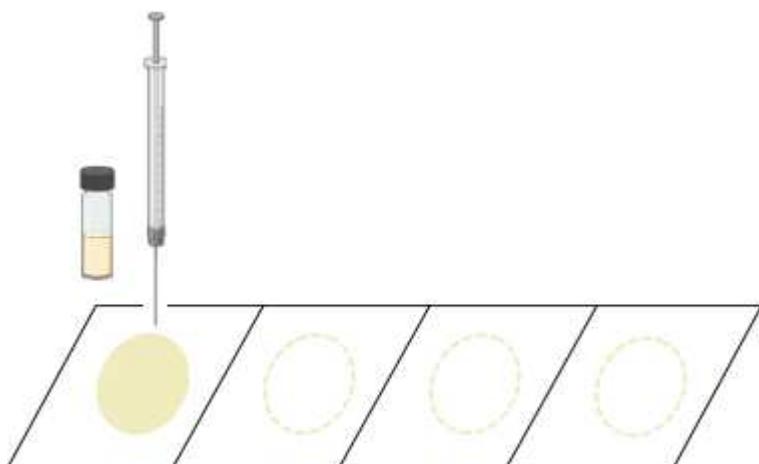
3.6 REAÇÃO ENTRE O ÁCIDO GÁLICO E O DPPH[•]

Adicionou-se 200 µL das soluções de ácido gálico de concentração 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0 mg L⁻¹ em diferentes frascos de 2 mL. Em seguida, adicionou-se 800 µL da solução do radical DPPH[•] em cada frasco contendo as soluções de ácido gálico, com intervalos de 6 minutos entre cada adição. O meio reacional foi homogeneizado inicialmente e as reações foram mantidas no escuro por 20 min.

3.7 APLICAÇÃO DO PRODUTO REACIONAL NO SUPORTE DE PAPEL

Ao término do tempo reacional de 20 min, 10 µL das soluções resultantes da reação do ácido gálico com o radical DPPH[•] foram aplicados nas tiras de papel, com o auxílio de uma seringa (702N, Hamilton, EUA), sendo o processo repetido quatro vezes (cada aplicação em um quadrado diferente para análises em quadruplicatas), como representado na **Figura 6**.

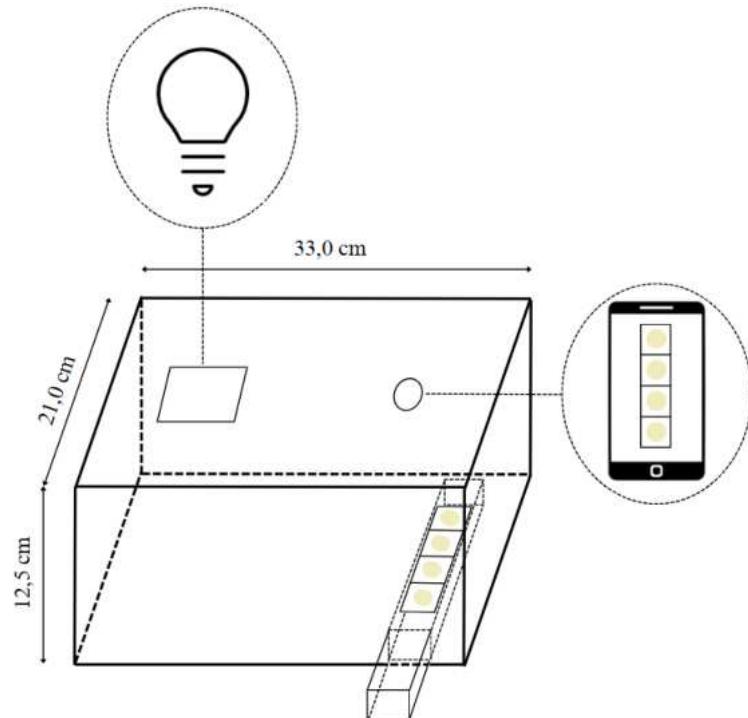
Figura 6 - Representação da aplicação do produto reacional em uma tira de papel.



3.8 CAPTURA DA IMAGEM

Logo após secagem, as tiras de papel contendo o produto reacional foram alocadas a partir de uma abertura lateral (uma por vez), em uma câmara de iluminação, cujas dimensões e principais partes são representadas na **Figura 7**. Em seguida, uma fonte de luz homogênea e uma câmera de celular foram posicionados, respectivamente, nas aberturas retangular e circular presentes na parte superior da câmara de iluminação e a captura de imagens realizada.

Figura 7 - Configuração da câmara de iluminação e demais dispositivos utilizados na captura de imagem.



3.9 ANÁLISE COLORIMÉTRICA

As imagens digitais obtidas a partir das tiras de papel foram analisadas com a utilização do programa ImageJ (1.8.0_345), de livre acesso (<https://imagej.net/ij/>). Para tanto, usando a ferramenta “*Oval*”, selecionou-se individualmente uma área circular na parte central de cada mancha (cerca de 70% da área total da mancha), e procedeu-se a medida colorimétrica dos parâmetros de RGB médio da área selecionada por meio da opção “*RGB measure*”.

3.10 ORGANIZAÇÃO E AVALIAÇÃO INICIAL DOS DADOS

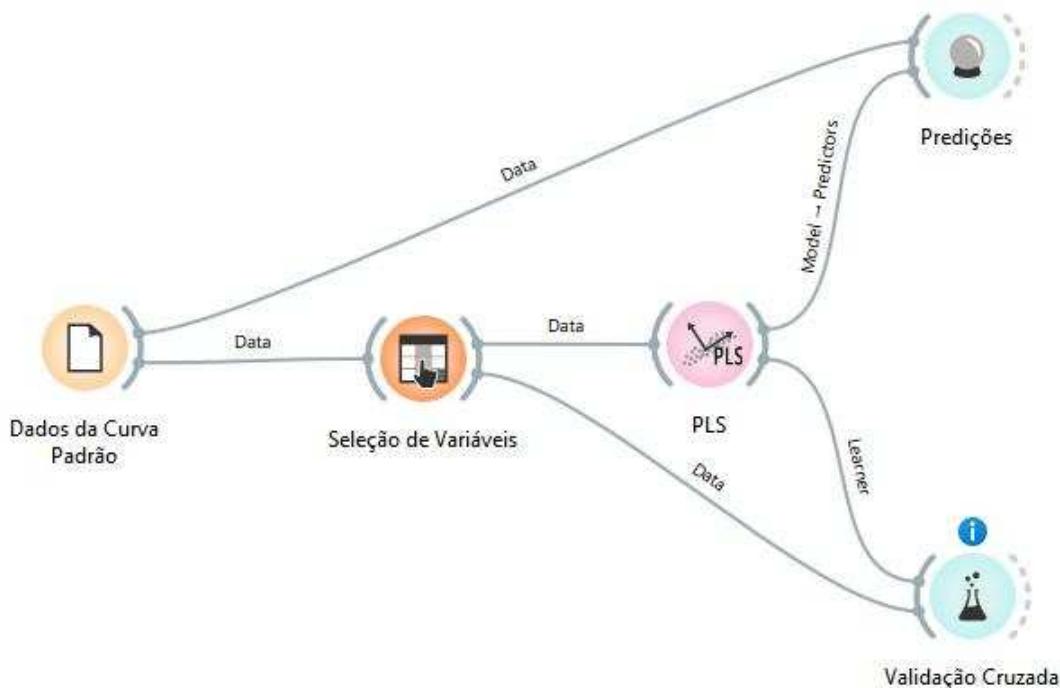
Os dados obtidos na etapa de análise colorimétrica foram organizados em uma planilha no programa Excel. A regressão linear de cada um dos componentes R, G e B, em relação à concentração inicial de ácido gálico, foi realizada a fim de verificar a o impacto causado individualmente por cada uma das variáveis na linearidade do modelo.

3.11 REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (PLS) E TRATAMENTO ESTATÍSTICO

A regressão por PLS foi realizada com o uso do programa Orange (versão 3.38.0), de livre acesso (<https://orangedatamining.com/>). Primeiramente, selecionou-se o ícone “*File*” para indicar o arquivo Excel e a planilha que continham os dados das soluções da curva padrão. Em seguida, inseriu-se o ícone “*Select Columns*” e o ícone “*PLS*” a fim de selecionar as variáveis

a serem analisadas (R, G e B em relação à concentração inicial de ácido gálico) na regressão por PLS. Os parâmetros do modelo gerado (R^2 , RMSE, entre outros) foram fornecidos em “*Predictions*”. Em “*Cross-Validation*” realizou-se a validação cruzada para verificação da robustez ao modelo gerado. Por fim, no programa Excel, foi feita uma análise dos resíduos para verificar a homoscedasticidade do modelo e identificar possíveis valores aberrantes. A arquitetura final usada no programa Orange (versão 3.38.0) está indicada na **Figura 8**.

Figura 8 - Arquitetura utilizada no programa Orange (versão 3.38.0) para gerar a regressão por PLS.



3.12 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO POR COMPARAÇÃO COM MÉTODO TRADICIONAL

3.12.1 Procedimento experimental

O método tradicional do ensaio de captura do radical DPPH• foi realizado seguindo o procedimento descrito por Silva *et al.* (2024). Com uma pipeta multicanal (8 canais) transferiu-se 100 μL de MeOH (em cada canal) nos poços presentes nas 7 primeiras colunas de uma microplaca de 96 poços. Em seguida, adicionou-se 100 μL de uma solução de ácido gálico de concentração inicial igual a 80,0 mg L^{-1} nos poços da primeira coluna da placa e realizou-se o processo de diluição seriada nos poços da coluna 1 a 5, resultando em soluções (100 μL) com concentrações de ácido gálico iguais a: 40,0; 20,0; 10,0; 5,0 ; 2,5 mg L^{-1} . Nos poços da coluna 6 (controle positivo), adicionou-se 100 μL de uma solução de ácido gálico de concentração inicial igual a 35,0 mg L^{-1} , diluindo-a a 17,5 mg L^{-1} . Removeu-se 100 μL da solução diluída

para manutenção das condições reacionais dos poços das demais colunas. Nos poços da coluna 7 (controle negativo), repetiu-se o procedimento realizado na coluna 6, mas com a adição de MeOH ao invés de uma solução de ácido gálico. Por fim, transferiu-se 100 µL de uma solução de DPPH• 0,1 mmol L⁻¹ em todos os poços das colunas 1 a 7. A microplaca foi tampada e envolta com papel alumínio e a reação foi mantida por 30 minutos. Após esse tempo, a absorvância foi medida em 517 nm em um leitor de microplacas (Spectramax M2E, Molecular Devices).

3.12.2 Tratamento e interpretação dos dados

Os dados de absorvância foram organizados e tratados estatisticamente no programa Excel. A porcentagem de inibição foi calculada por meio da seguinte expressão matemática:

$$\text{Inibição (\%)} = \left(\frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) \times 100$$

Em que A_{controle} corresponde à absorvância média das amostras de controle negativo e A_{amostra} corresponde à absorvância individual obtida em cada poço.

Realizou-se a regressão linear entre a concentração inicial de ácido gálico (variável dependente) e a porcentagem de inibição (variável independente). O valor predito para o controle positivo foi obtido e comparado com o valor obtido a partir do método desenvolvido neste trabalho.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No decorrer do desenvolvimento deste novo método analítico, questionamentos surgiram naturalmente: quais reagentes empregar e por quanto tempo promover a reação? Que faixa de concentração dos reagentes utilizar? Qual a melhor forma de aplicação das soluções no papel? Que tipo de papel usar como suporte analítico? Qual técnica de análise e modelo de regressão são os mais adequados para este método? A resolução desses e outros questionamentos serviu como um pilar para aprimorar a eficácia e manter a simplicidade da metodologia proposta por meio de adaptações realizadas. Apesar de muitas alterações terem ocorrido concomitantemente, a discussão se dará de forma individualizada a fim de evidenciar o impacto de cada uma delas.

4.1 ESCOLHA DOS REAGENTES

4.1.1 Radical DPPH•

Dentre opções encontradas na literatura (GÜLÇİN, 2020) de substâncias usadas em métodos de determinação de atividade antioxidante, escolheu-se o radical DPPH•. Seu ensaio tradicional é popularizado e consolidado no meio científico (GÜLÇİN; ALWASEL, 2023). Com isso, espera-se que um alto impacto no meio científico seja gerado com inovações no principal método utilizado na identificação preliminar de potenciais antioxidantes (GÜLÇİN; ALWASEL, 2023).

A simplicidade técnica e relativa rapidez de sua reação (a depender do antioxidante) (KARADAG *et al.*, 2009) foram outros fatores que levaram à escolha do DPPH• como um dos reagentes utilizados no presente trabalho. Além disso, as diferentes colorações do radical (roxo) e de sua forma reduzida (amarelo-pálido) (IONITA, 2021) permitem que haja um fácil monitoramento visual da reação, aspecto importante num método que utiliza análise colorimétrica.

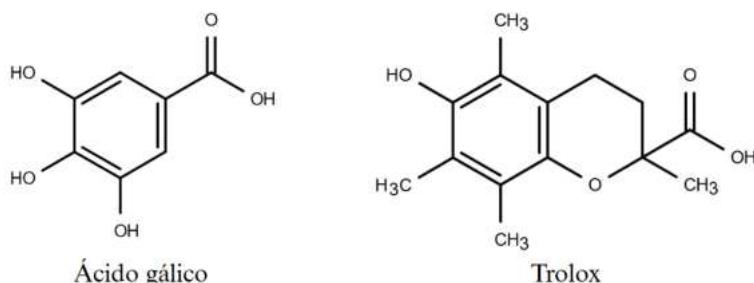
4.1.2 Ácido gálico

Por ser muito utilizado como substância antioxidante de referência no desenvolvimento de métodos analíticos (GÜLÇİN, 2020), optou-se por utilizar o ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxibenzoico). No ensaio de captura do radical DPPH• é comum que o Trolox (ácido (±)6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) seja empregado como padrão antioxidante, no entanto o ácido gálico também pode ser usado com esse intuito (NENADIS; LAZARIDOU; TSIMIDOU, 2007; OLSZOWY-TOMCZYK, 2021). A diferença é que ao invés

do resultado ser expressado na unidade “TE” (*Trolox Equivalents*) ele é expresso em “GAE” (*Gallic Acid Equivalents*).

Classificado como um ácido fenólico, é encontrado naturalmente em diferentes alimentos como uva, alcaparra, romã, chá verde, mas também pode ser produzido de forma sintética, apresentando diversas aplicações (CARVALHO, 2025; OBAFEMI, 2023; XIANG, 2024). Além de ser uma substância com relevância científica e socioeconômica, as soluções de ácido gálico são incolores, inferindo pouca ou nenhuma interferência nos ensaios colorimétricos que o emprega como substância de referência.

Figura 9 - Estruturas químicas do ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxibenzoíco) e do Trolox (ácido (\pm)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico).



4.2 ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS

4.2.1 Faixa de concentração de trabalho

Uma vez estabelecidos os reagentes, foi necessário definir uma faixa de concentração de trabalho ideal para suas soluções. Em uma primeira avaliação, fixou-se a concentração de DPPH• em 0,100% (m/v) ($2,54 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹), já que soluções de DPPH• com concentração dessa ordem de grandeza são comumente usadas por apresentarem, de forma geral, resultados mais eficazes no método tradicional (GÜLÇİN, 2020). Para as soluções de ácido gálico explorou-se um grande intervalo de concentrações, variando de 1,0 mg L⁻¹ a 10.000 mg L⁻¹.

A ideia foi promover a reação, misturando mesmos volumes dos reagentes, para verificar em qual faixa concentração de ácido gálico o produto reacional deixa de ser roxo, indicando a presença de DPPH• na forma radicalar, e passa a ser amarelo, indicando a redução à DPPH-H. Essa mudança foi observada nas soluções de concentração 10,0 mg L⁻¹ e 100 mg L⁻¹. Assim, esse intervalo foi destrinchado em demais soluções, com diferença de concentração de 10,0 mg L⁻¹ entre cada uma, para que condições que favorecessem a formação de um gradiente de cores nítido entre essas soluções fossem investigadas.

Posteriormente, na etapa de análise colorimétrica, verificou-se que o intervalo final da faixa (70,0, 80,0, 90,0, 100 mg L⁻¹) não apresentava uma relação linear com o restante dos dados. Dessa forma, estes foram desconsiderados e a faixa de concentração de trabalho incluiu cinco pontos (20,0; 30,0; 40,0; 50,0 e 60,0 mg L⁻¹), quantidade suficiente para a construção de uma curva analítica (ANVISA, 2017). Além disso, por razões discutidas no **item 4.2.3 (p. 31)**, a concentração da solução de DPPH• foi estabelecida em 232 mg L⁻¹.

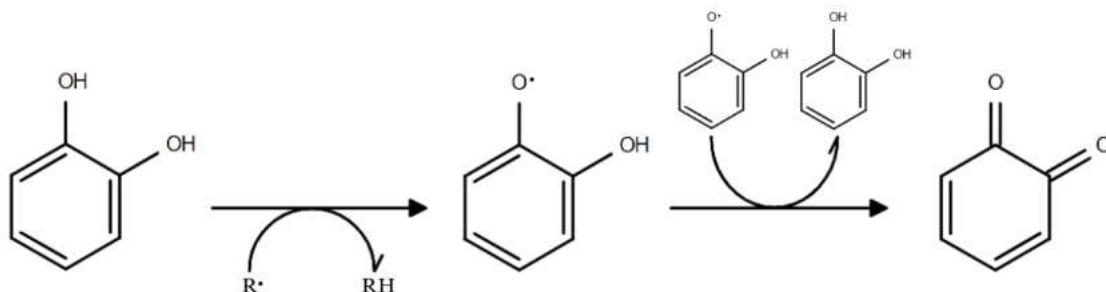
4.2.2 *Tempo de reação*

Uma das formas de manipular a variação de cor entre as soluções foi controlando o tempo de reação. Verificou-se empiricamente que a reação entre o DPPH• e o ácido gálico se caracteriza por ocorrer rapidamente nos primeiros minutos e proceder de modo mais lento a partir de 20 minutos, o que corrobora com dados encontrados na literatura (SHOJAE, M.S., MOEENFARD, M. & FARHOOSH, R., 2022). Com isso, soluções de ácido gálico de diferentes concentrações já apresentavam colorações distintas nos minutos iniciais da reação, no entanto a estabilização dessas cores se dava apenas posteriormente. Visando tornar o método o mais rápido possível sem que sua eficácia fosse perdida o tempo reacional foi estabelecido em 20 minutos. Desse modo, as soluções puderam ser distinguidas sem que houvesse alterações significativas da cor de uma mesma solução entre o fim da reação e a etapa de captura da imagem. Por fim, vale ressaltar que houve um intervalo de 6 minutos entre o início das reações para permitir que as etapas de aplicação no papel e captura de imagem fossem realizadas logo após o término de cada reação.

4.2.3 *Proporção entre os reagentes*

A outra forma de manipular o gradiente de cores dos produtos reacionais se deu explorando a proporção entre os reagentes. A reação entre o DPPH• e o ácido gálico apresenta um mecanismo complexo. Sabe-se que fatores como o solvente utilizado e a regeneração de polifenóis (**Figura 10**) impactam diretamente na estequiometria reacional, no entanto há divergências entre estudos quanto ao número de moléculas de DPPH• reduzidas por uma molécula do antioxidante: 5,34 (SHOJAE, M.S., MOEENFARD, M. & FARHOOSH, R., 2022) e 6,25 (BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E. & BERSET, C., 1995).

Figura 10 - Mecanismo de regeneração de um *orto*-difenol (BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E. & BERSET, C., 1995).



Devido à incerteza quanto à estequiometria reacional, a abordagem adotada a fim de estudar as condições que gerariam um gradiente de cores nítido foi preparar uma solução equimolar de DPPH^\bullet (232 mg L^{-1}) em relação à solução mais concentrada de ácido gálico (100 mg L^{-1}) e promover a reação por 20 minutos com diferentes proporções dos reagentes. Com base no experimento, a proporção entre o DPPH^\bullet e o ácido gálico que se mostrou mais adequada foi a 4:1, onde observou-se um gradiente de cores cuja transição, do roxo ao amarelo, ocorreu nos pontos centrais ($40,0 \text{ mg L}^{-1}$ - $70,0 \text{ mg L}^{-1}$) da faixa de concentração previamente estabelecida ($10,0 \text{ mg L}^{-1}$ – 100 mg L^{-1}) (Figura 11). Como o uso da solução DPPH^\bullet de concentração 232 mg L^{-1} permitiu a diferenciação das soluções de ácido gálico de modo satisfatório, decidiu-se mantê-la na metodologia desenvolvida.

Figura 11 - Gradiente de cores gerado após 20 minutos de reação da solução de DPPH^\bullet (232 mg L^{-1}) com as soluções de ácido gálico (AG) na proporção 4:1.



4.3 USO DO PAPEL COMO PLATAFORMA ANALÍTICA

4.3.1 Escolha do tipo do papel

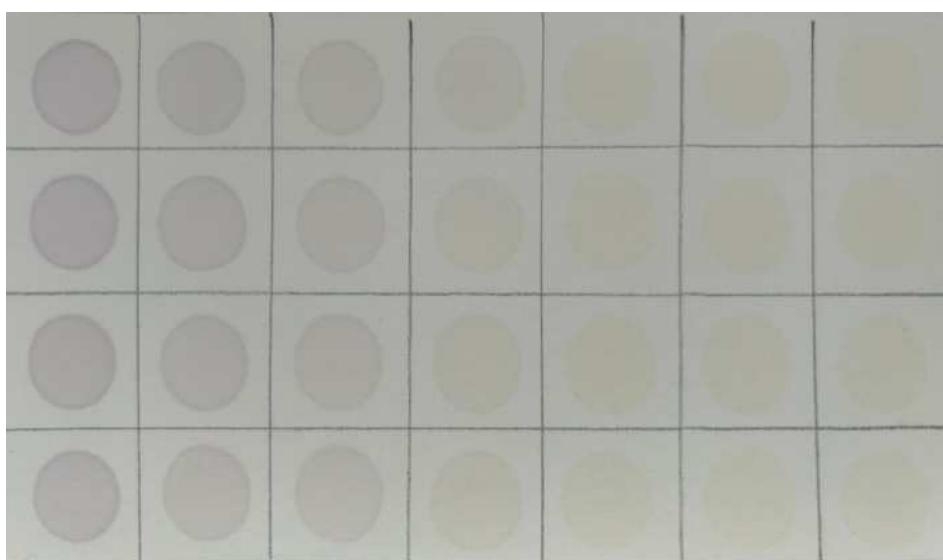
Dando seguimento ao desenvolvimento da metodologia, definiu-se o tipo de papel a ser usado como plataforma analítica. Como indicado na seção “Material e Métodos” (Item 3.2,

p. 24), dentre os tipos de papel disponíveis, optou-se por usar o papel linho. Fatores como uma boa capacidade de retenção, para evitar dispersões das soluções por capilaridade, e um preço acessível foram considerados na escolha do material. Por cada folha A4 de papel linho (Filiperson, Brasil), por exemplo, o valor de R\$ 0,57 foi encontrado comercialmente (Amazon – consulta em maio de 2025), condizendo com a proposta da metodologia de utilizar materiais de baixo custo.

4.3.2 Aplicação das soluções

Apesar de suas vantagens, o uso de papel como um aparato analítico apresentou alguns desafios. Durante o desenvolvimento do método, uma das abordagens de inserção dos reagentes estudadas consistia em primeiro aplicar o ácido gálico e posteriormente o DPPH[•], promovendo a reação no próprio papel. Contudo, o resultado das aplicações foram manchas com zonas heterocromáticas, inviabilizando a análise por colorimetria. Supõe-se que a evaporação desigual do solvente em diferentes áreas do papel foi um fator chave nesse resultado, pois sabe-se que o solvente tem influência na velocidade e na extensão reacional do ácido gálico com o DPPH[•] (SHOJAE, M.S., MOEENFARD, M. & FARHOOSH, R., 2022). Para contornar essa questão, a reação foi realizada em solução e aplicou-se o produto reacional após um tempo necessário para estabilização de sua cor, como discutido anteriormente (**Item 4.2.2, p. 32**). Dessa forma, as manchas geradas tornaram-se homogêneas em relação a cor, o que pode ser observado na **Figura 12**.

Figura 12 - Manchas geradas após aplicação de 10 µL dos produtos reacionais gerados em 20 minutos de reação do DPPH com soluções de diferentes concentrações de ácido gálico em quadruplicata (colunas).



Além da cor, o tamanho das manchas também foi uma preocupação. Devido à capilaridade do papel, a partir de um volume de líquido poderia haver interseção entre diferentes manchas. Por outro lado, com a aplicação de um volume muito baixo, a quantidade de matéria poderia ser insuficiente para possibilitar uma distinção clara entre os produtos reacionais. O volume de 10 µL mostrou-se adequado às dimensões das tiras, gerou um gradiente de cores considerado apropriado entre manchas de diferentes amostras e, por isso, foi introduzido na metodologia.

4.4 CAPTURA DE IMAGEM

Após a avaliação das condições reacionais, do suporte analítico e da forma de aplicação das amostras, buscou-se uma forma adequada de se obter uma imagem para a análise por colorimetria. Na captura de uma imagem digital para fins analíticos, cuidados extra devem ser adotados a fim de assegurar que as condições de fotografia e iluminação sejam as mesmas para as diferentes amostras (BERASARTE *et al*, 2025). A posição do objeto, do dispositivo (celular, câmera digital, entre outros) e a distância entre eles devem ser fixadas a fim de minimizar inconsistências entre imagens de diferentes amostras (FAN *et al*, 2021). Além disso, é primordial que a iluminação seja homogênea durante a análise, visto que variações na intensidade luminosa podem atenuar ou reduzir os sinais colorimétricos de uma amostra, introduzindo erros ao sistema analítico (FAN *et al*, 2021).

4.4.1 Iluminação não controlada

Ao reproduzir um experimento, já com as condições de reação e aplicação estabelecidas, a captura de imagem foi realizada em um espaço bem iluminado, mas sem controle de parâmetros como: distância da fonte de luz ao objeto, interferência luminosa externa, homogeneidade da iluminação, entre outros. Ao avaliar os valores RGB das manchas geradas, notou-se uma grande dispersão entre os dados. Como forma de ilustrar o resultado obtido, abaixo são apresentados gráficos dos valores de *Red* (Gráfico 1), *Green* (Gráfico 2) e *Blue* (Gráfico 3) pela concentração inicial de ácido gálico.

Gráfico 1 - Regressão linear dos valores de *Red* (n=4) versus Concentração inicial de ácido gálico (AG).

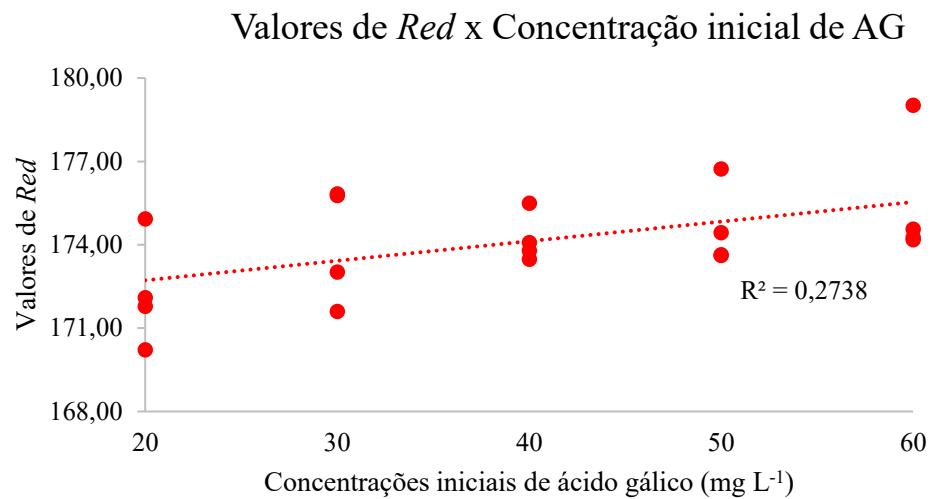


Gráfico 2 - Regressão linear dos valores de *Green* (n=4) versus Concentração inicial de ácido gálico (AG).

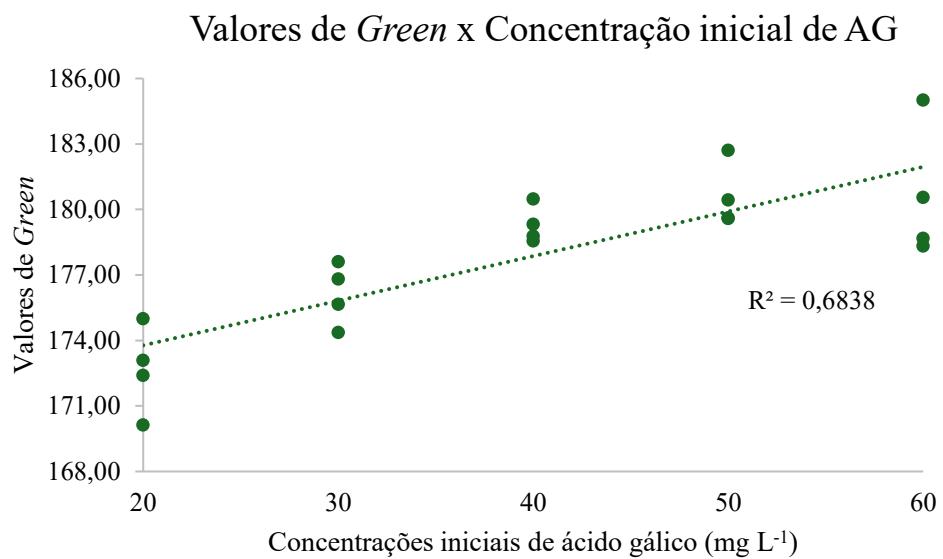
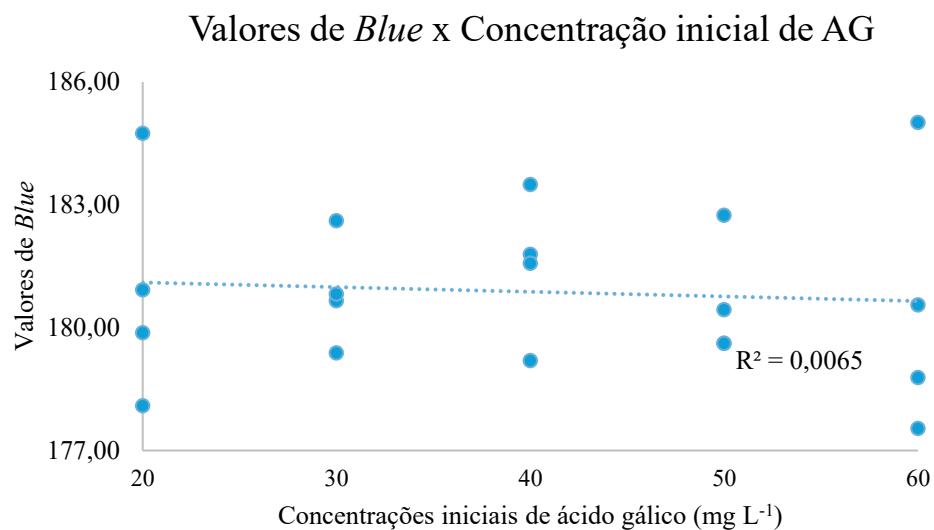


Gráfico 3 - Regressão linear dos valores de *Blue* ($n=4$) versus Concentração inicial de ácido gálico (AG).



Ao calcular as médias dos valores *Red* e *Green* obtidos e construir novos gráficos versus a concentração inicial de ácido gálico (Gráfico 4 e 5), obteve-se um resultado interessante. Houve uma melhora significativa da correlação linear dos dados (R^2 (*Red*) de 0,2738 para 0,8807; R^2 (*Green*) de 0,6838 para 0,8827), indicando que, caso a dispersão dos dados seja reduzida, haverá uma melhora dos resultados do método. Por sua vez, a construção de um novo gráfico com as médias dos valores de *Blue* (Gráfico 6) não houve uma melhora relevante no valor de R^2 (de 0,0065 para 0,2012), indicando uma baixa correlação linear entre os valores de *Blue* e a concentração de ácido gálico. Como resultado dessa avaliação, buscou-se um modo de fixar e padronizar as condições de iluminação durante a etapa de captura de imagem a fim de tornar a medição mais precisa.

Gráfico 4 - Regressão linear das médias dos valores de *Red* (n=4) versus Concentração inicial de ácido gálico (AG).

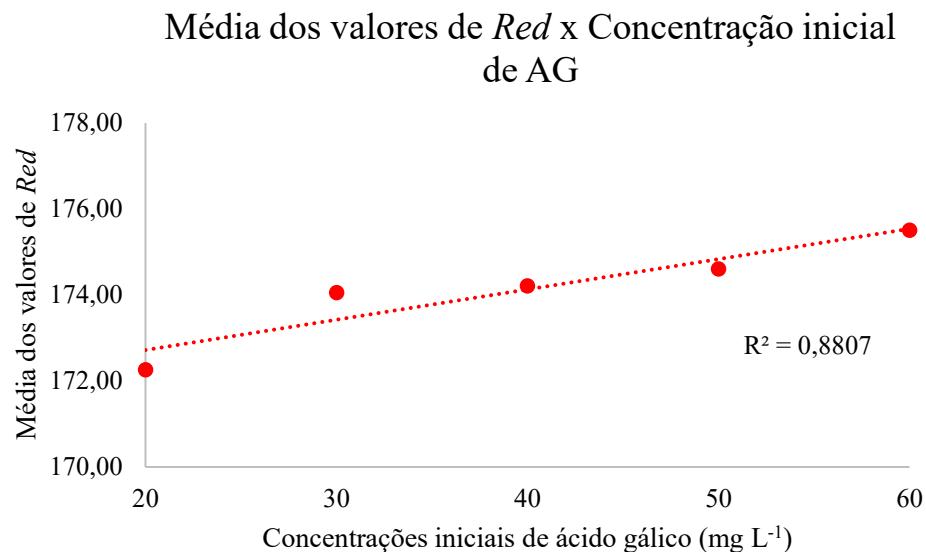


Gráfico 5 - Regressão linear das médias dos valores de *Green* (n=4) versus Concentração inicial de ácido gálico (AG).

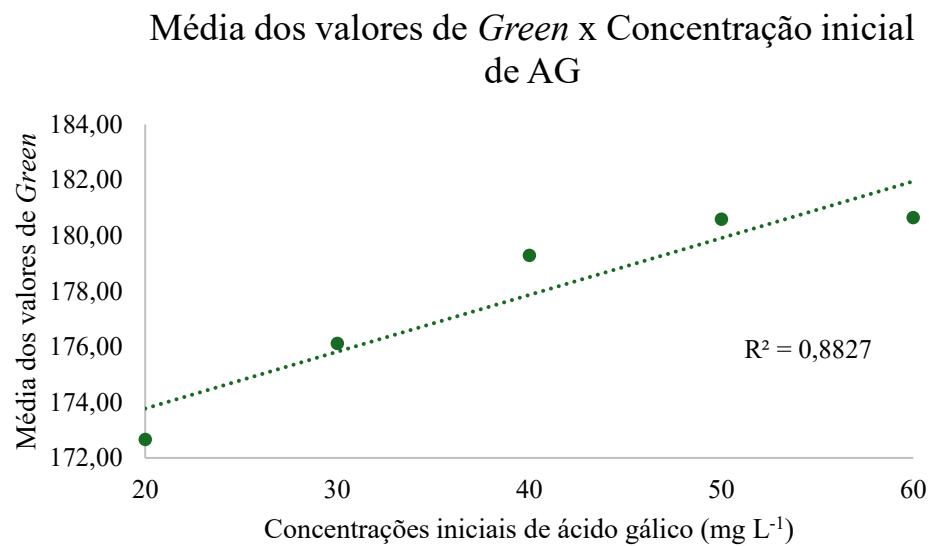
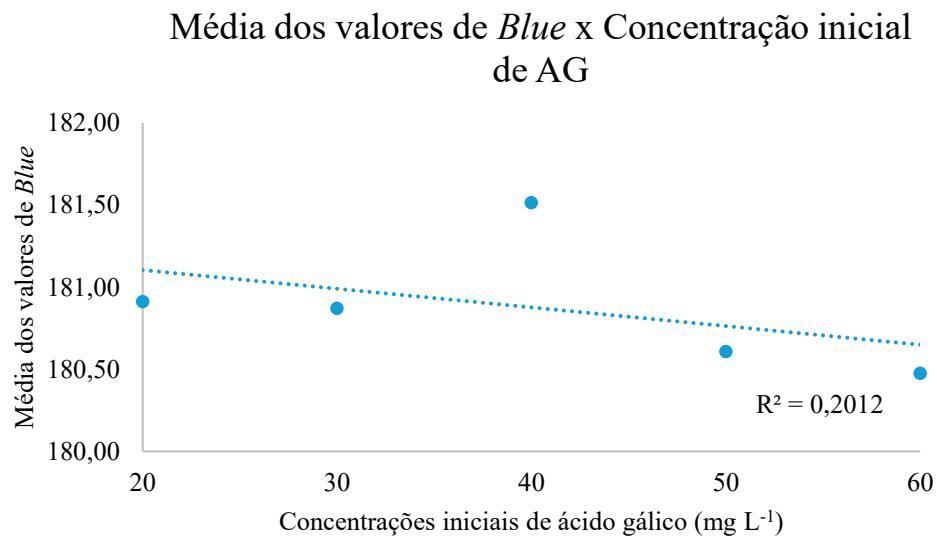


Gráfico 6 - Regressão linear das médias dos valores de *Blue* (n=4) versus Concentração inicial de ácido gálico (AG).



4.4.2 Câmara de iluminação controlada

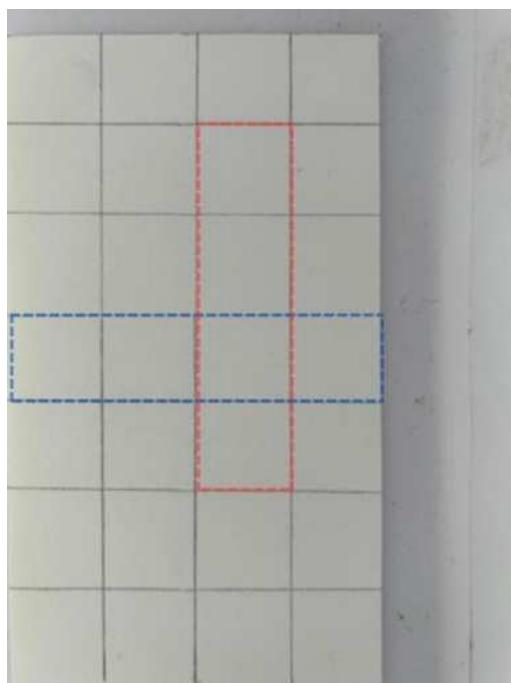
Para contornar os problemas identificados previamente na captura de imagem, usou-se uma câmara de iluminação controlada (**Figura 13**). Com o auxílio de um suporte específico, criado para ser introduzido na abertura lateral limitando a entrada de iluminação externa, a tira pôde ser alocada no interior da caixa numa posição fixa. A câmera do celular e a fonte de luz foram posicionados em duas aberturas presentes na parte superior para garantir que a iluminação dentro da câmara fosse fixa e constante e que as fotografias fossem realizadas sob as mesmas condições.

Figura 13 - Câmara de iluminação controlada e suporte da tiras usados durante a captura de imagem.



A homogeneidade da iluminação dentro da câmara foi testada por meio de um experimento simples. Uma folha de papel linho segmentada em áreas foi alocada no interior da câmara e uma fotografia foi realizada (**Figura 14**). Como o papel é um material de coloração homogênea, espera-se que, sob iluminação adequada, valores de RGB bastante similares sejam encontrados em diferentes pontos. Assim, realizou-se uma análise colorimétrica de distintas áreas distribuídas no eixo horizontal (tracejado azul) e vertical (tracejado vermelho) da plataforma analítica, como indicado na **Figura 14**.

Figura 14 - Fotografia da plataforma analítica no interior da câmara de iluminação.



Um aspecto interessante, presente em ambos os gráficos, é que a variação de um dos canais (por exemplo de *Red*) é acompanhada por uma variação bastante similar dos demais (no exemplo, de *Green* e de *Blue*).

Em primeiro lugar, verificou-se a proporção dos componentes RGB em cada área avaliada. Para isso, os valores de *Red*, *Green* e *Blue* foram medidos e individualmente foi feito o seguinte cálculo:

$$\text{Proporção} = \frac{X}{R + G + B} \quad ; \quad X = R, G \text{ ou } B$$

Os resultados foram organizados e podem ser observados na **Tabela 1**. Nota-se que a proporção dos componentes RGB em todas as áreas avaliadas foi extremamente similar, indicando que a cor do papel de fato é homogênea. Dessa forma, somente diferenças nas

condições de iluminação e fotografia sobre a área analisada poderiam causar discrepância dos valores RGB entre diferentes pontos da plataforma analítica.

Tabela 1 - Proporção dos valores de RGB em diferentes áreas analisadas.

PROPORÇÃO DOS VALORES DE RGB

CANAIS	EIXO HORIZONTAL				EIXO VERTICAL			
	1	2	3	4	1	2	3	4
RED	0,337	0,336	0,336	0,336	0,335	0,336	0,336	0,336
GREEN	0,339	0,338	0,338	0,338	0,337	0,338	0,338	0,338
BLUE	0,324	0,326	0,326	0,326	0,327	0,327	0,326	0,326

Em seguida, os valores de RGB absolutos foram avaliados. No eixo horizontal observou-se uma grande variação nos valores de R (166,21 a 188,62), G (167,21 a 189,92) e B (161,21 a 181,42) (**Gráfico 7**). Por outro lado, as áreas avaliadas ao longo do eixo vertical apresentaram baixa variação dos valores de R (170,48 a 169,69), G (171,48 a 170,43) e B (165,77 a 164,73) (**Gráfico 8**). Com isso, concluiu-se que uma mesma amostra apenas apresentaria valores de RGB similares caso a plataforma analítica tivesse uma forma reduzida e fosse posicionada verticalmente. Assim, a partir desse resultado, substitui-se a plataforma analítica utilizada até o momento pelas tiras de papel descritas no **item 3.2 (p. 24)**.

Gráfico 7 - Comparação de valores RGB obtidos em áreas distribuídas horizontalmente na plataforma analítica.

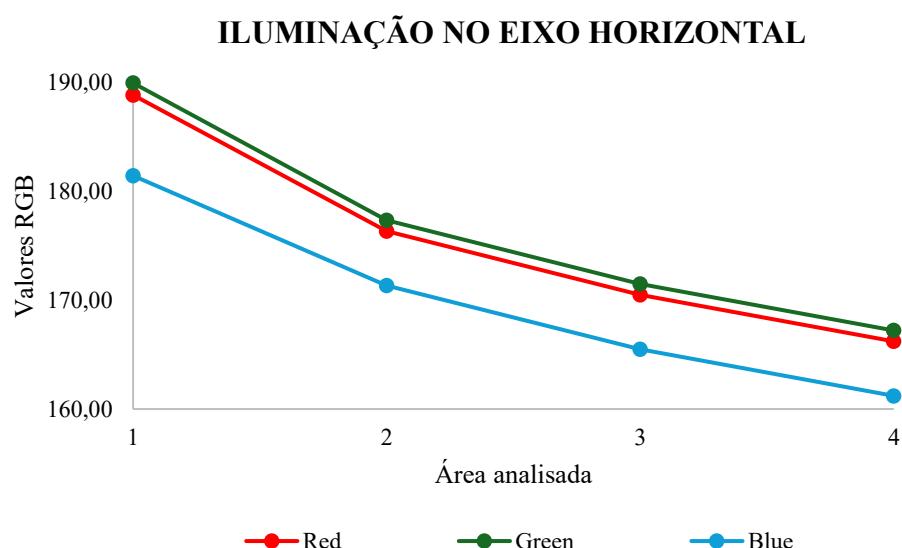
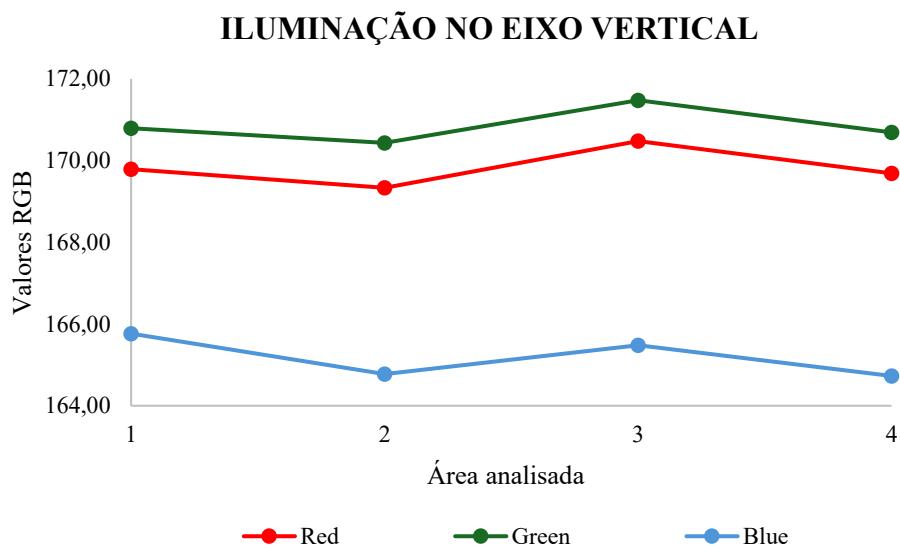


Gráfico 8 - Comparação de valores RGB obtidos em áreas distribuídas verticalmente na plataforma analítica.



4.5 ANÁLISE COLORIMÉTRICA

Há uma gama de *softwares* e aplicativos de análise de imagem que são empregados em estudos científicos: *Adobe Photoshop*, *MATLAB*, *ImageJ*, *Pantone Studio*, *PhotoMetrix* (SATEANCHOCK, S. *et al*, 2018; BERASARTE I. *et al*, 2025; FANY Y. *et al*, 2021). O programa escolhido para as análises colorimétricas do presente trabalho foi o *ImageJ*, um *software* livre (*National Institutes of Health* (NIH) – <https://imagej.net/ij/>). Selecionou-se as áreas correspondentes a cada mancha das tiras de papel e utilizou-se a ferramenta *RGB Measure*, indicada na **Figura 15**. Com isso, valores de RGB médios da área selecionada foram obtidos (**Figura 16**) de forma rápida e prática, sendo organizados em uma planilha do programa Excel (**Tabela 2**).

Figura 15 - Interface do software de imagem ImageJ e procedimento empregado na análise colorimétrica.

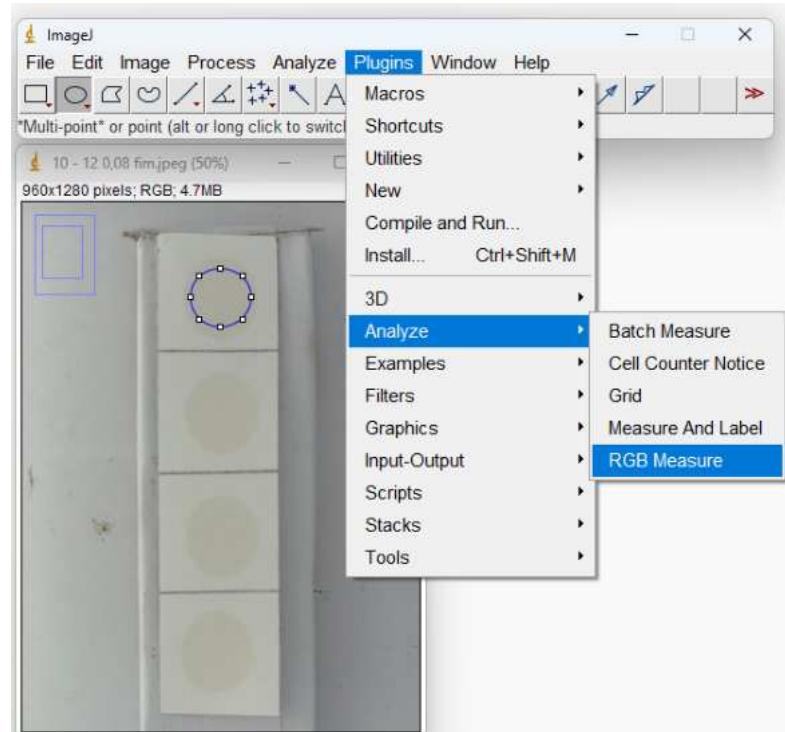


Figura 16 - Valores de RGB médios da área previamente selecionada no programa.

Label	Mean
1 Red	166.474
2 Green	166.636
3 Blue	154.312
4 (R+G+B)/3	162.474
5 0.299R+0.587G+0.114B	165.474

Tabela 2 - Dados obtidos na etapa de análise colorimétrica organizados em uma planilha do programa Excel.

Concentração (mg L ⁻¹)	Red	Green	Blue
60,0	175,72	173,72	160,72
60,0	173,96	173,40	159,93
60,0	173,96	173,49	159,98
60,0	174,20	174,44	160,83
50,0	172,16	171,36	157,96
50,0	170,44	171,44	157,44
50,0	171,61	171,42	157,82
50,0	171,29	171,36	157,67
40,0	167,86	167,78	155,78
40,0	167,04	167,03	155,04
40,0	167,52	167,86	155,18
40,0	167,62	167,68	155,60
30,0	164,98	164,58	156,75
30,0	164,97	164,95	155,19
30,0	164,76	164,76	154,76
30,0	165,98	165,95	156,21
20,0	165,77	164,77	159,77
20,0	162,22	161,22	156,22
20,0	163,13	162,13	157,13
20,0	163,90	162,90	157,90

Ao selecionar a área a ser analisada, buscou-se contemplar a maior parte da mancha sem que as bordas fossem incluídas. A exclusão das bordas se deu devido a ocorrência de um fenômeno denominado *coffee ring effect*. No processo de secagem de líquidos em um material como o papel, há um acúmulo de material nas extremidades da mancha gerada (LIANG, 2022), como pode ser observado na **Figura 17**. Desse modo, a fim de evitar inconsistências durante a análise, optou-se por trabalhar com a região das manchas que apresentasse uma cor visualmente homogênea.

Figura 17 - Imagem de uma tira de papel, com o produto da reação entre o DPPH• e uma solução de ácido gálico de concentração 30,0 mg L⁻¹ aplicado, que retrata o *coffee ring effect*.



4.6 REGRESSÃO PLS E TRATAMENTO ESTATÍSTICO

A regressão PLS foi realizada para gerar a curva de calibração do método. A decisão por empregar essa e não outra forma de regressão se deu devido à natureza dos dados. É bastante comum usar PLS em métodos analíticos que empregam a colorimetria, pois os componentes R, G e B tendem a apresentar algum tipo de correlação (WOLD.; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001). Além disso, por meio de cálculos matemáticos, o PLS atribui pesos para cada variável, permitindo interpretar quais componentes têm maior impacto na linearidade do modelo (WOLD.; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001).

O programa Orange (versão 3.38.0) gera a regressão PLS informando alguns parâmetros estatísticos. Os parâmetros usados na avaliação inicial do modelo foram o R^2 (coeficiente de determinação) e o RMSEC (Raiz do Erro Quadrático Médio da Calibração; do inglês: *Root Mean Square Error of Calibration*). O R^2 informa o quanto bem os dados estão ajustados a um modelo (FERREIRA, 2015), no caso linear. Seu valor varia de 0 a 1 e quanto mais próximo de 1, melhor o ajuste. Já o RMSEC é uma medida de dispersão média dos dados. Ele é similar ao desvio padrão, representando o erro médio que os dados usados na calibração apresentam quando testados no próprio modelo (FERREIRA, 2015). Ele é obtido a partir da seguinte expressão matemática:

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{real,i} - y_{predito,i})^2}{n}}$$

Em que $y_{real,i}$ é o valor real da concentração inicial da solução de ácido gálico “i”, $y_{predito,i}$ o valor predito da concentração inicial da solução de ácido gálico “i” usando a curva de calibração gerada e n o número de amostras

Inicialmente, avaliou-se como as variáveis preditoras (R, G e B) influenciavam no PLS. Para isso, as variáveis foram divididas em pares (R e G; R e B; G e B) com o intuito de comparar os diferentes modelos de regressão gerados, além do modelo gerado com o uso de todos os componentes de cor. Como resultado, verificou-se que o modelo que usou os valores de R, G e B apresentou o maior coeficiente de correlação ($R^2 = 0,978$) e o menor raiz do erro quadrático médio de calibração ($RMSEC = 2,095 \text{ mg L}^{-1}$) (Tabela 3), sendo o mais adequado e, portanto, adotado para a continuidade do desenvolvimento do método.

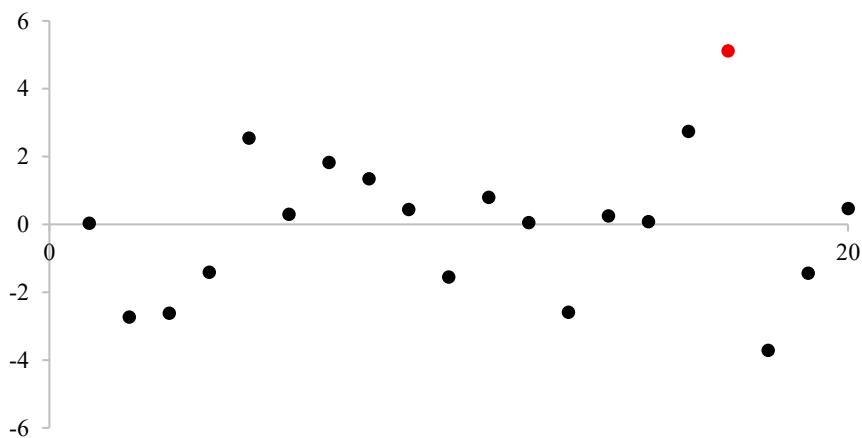
Tabela 3 - Parâmetros (R^2 e RMSEC) do modelo PLS gerados por diferentes grupos de dados.

DADOS	R^2	RMSEC (mg L ⁻¹)
RGB	0,978	2,095
RG	0,958	2,910
RB	0,771	6,763
GB	0,825	5,924

De acordo com a ANVISA (2017), a linearidade de um modelo deve ser avaliada não só pelo valor do coeficiente de determinação, mas também pela análise dos resíduos. Com isso, os resíduos do modelo foram calculados e construiu-se um gráfico exibindo a distribuição dos resíduos em torno de zero (**Gráfico 9**).

Gráfico 9 - Distribuição dos resíduos do PLS.

Distribuição dos Resíduos do PLS



Observa-se que os resíduos estão bem distribuídos em torno de zero, sem nenhuma tendência nítida, indicando homoscedasticidade dos dados. Visualmente, a distribuição dos pontos parece normal e a média deles é igual a $-0,0019$, o que reflete a aleatoriedade dos erros. Com essas informações adicionais, a linearidade do modelo pode ser avaliada com maior robustez. Considerando que métodos colorimétricos tendem a apresentar maior dispersão frente a técnicas instrumentais mais sofisticadas (FUKUY, 2005; MHATRE, 2024), um R^2 de 0,978 é um resultado bastante promissor. Vale ressaltar que o ensaio tradicional do radical DPPH[•] é comumente empregado em avaliações de triagem (MUNTEANU; APETREI, 2021), em que não é exigido um R^2 tão elevado ($\geq 0,990$) (ANVISA, 2017) como em outros métodos analíticos.

Com o intuito de detectar possíveis *outliers* que poderiam estar prejudicando o poder de predição do modelo, o desvio padrão (σ) dos resíduos foi calculado ($2,21 \text{ mg L}^{-1}$) e usou-se o critério prático de reavaliação de pontos com módulo maior a 2σ . Um único ponto (destacado em vermelho no **Gráfico 9**), de valor esperado igual a 20 mg L^{-1} e valor previsto igual a $25,113 \text{ mg L}^{-1}$, foi descartado e o PLS foi realizado novamente a fim de verificar se este ponto estava interferindo ou não na regressão. Como resultado, houve um aumento do R^2 (0,986) e uma redução do RMSEC (1,805), levando a uma melhora relevante do modelo gerado.

Embora a modelagem por PLS tenha se mostrado promissora, é essencial que o modelo seja validado para que os resultados apresentem maior grau de confiabilidade (FERREIRA, 2015). A etapa de validação verifica a capacidade de predição do modelo com dados que não foram usados em sua construção, garantindo sua robustez, evitando cenários de sobreajuste (*overfit*) e retratando sua aplicabilidade real (FERREIRA, 2015).

Em alguns tipos de regressões e modelos de *machine learning* é comum o uso da validação cruzada *k-fold* (REFAEILZADEH; TANG; LIU, 2018). Nesse método de validação, o conjunto de dados usados na etapa de modelagem é dividido aleatoriamente em k subconjuntos (*folds*) (REFAEILZADEH; TANG; LIU, 2018). O modelo é treinado (construído) com os dados de $k - 1$ partes e testado com os dados presentes na parte remanescente. O processo é repetido, alternando quais partes são usadas no teste k vezes, testando cada vez uma parte (*fold*) diferente. Geralmente, os dados são divididos em 10 partes ($k = 10$) (REFAEILZADEH; TANG; LIU, 2018), no entanto, quando não há muitos dados, como no caso deste trabalho, recomenda-se utilizar a validação cruzada 5-*fold* ($k = 5$). Dessa forma, 80% dos dados são usados na construção da curva de calibração (treinamento) e 20% não participam da regressão e são testados no modelo gerado (teste).

Todo o processo de modelagem e de validação supracitados foram realizados em dois dias diferentes (Dia 1 e Dia 2) a fim de verificar a repetibilidade do modelo PLS, assim como de toda metodologia proposta. Os valores do coeficiente de determinação (R^2) e do erro quadrático médio (RMSEC) são fornecidos como Q^2 e RMSECV, respectivamente, na validação cruzada. Uma variação baixa nesses dois parâmetros indica que o modelo PLS é robusto e apresenta uma capacidade de predição boa modelo (WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001).

As diferenças entre R^2 e Q^2 e RMSEC e RMSECV facilitam a visualização da capacidade preditiva do modelo. O esperado é que haja uma redução do coeficiente de

determinação ($Q^2 < R^2$) e um aumento na raiz do erro quadrático médio (RMSECV > RMSEC), desde que não sejam abruptas, já que isto indicaria uma situação de sobreajuste do modelo (BRO, 2002; ERIKSSON *et al*, 2001; KVALHEIM, 2010). Uma parte da literatura científica não delimita especificamente um valor aceitável para a diferença entre R^2 e Q^2 , indicando apenas que diferenças altas seriam um indício de sobreajuste. Por outro lado, outra parte considera o limite de 0,20 como boa prática na quimiometria (BRO, 2002; KVALHEIM, 2010). Assim, os resultados obtidos na regressão e na validação cruzada foram organizados na **Tabela 4** e interpretados de acordo com este o limite prático.

Tabela 4 - Parâmetros obtidos nas etapas de regressão PLS (R^2 e RMSEC) e de validação cruzada 5-fold (Q^2 e RMSECV).

PARÂMETROS	DIA 1	DIA 2
R^2	0,986	0,980
RMSEC	1,596	2,004
Q^2	0,983	0,960
RMSECV	1,805	2,608
$R^2 - Q^2$	0,003	0,020
RMSECV - RMSEC	0,209	0,604

Em primeiro lugar, os valores absolutos dos coeficientes de determinação (R^2 e Q^2) foram satisfatórios. Todos os coeficientes apresentaram um valor superior a 0,950; mostrando uma forte correlação linear dos dados, o que é extremamente razoável dado o intuito de aplicabilidade deste método analítico. Nos modelos de regressão, o R^2 obtido foi bastante elevado e similar nos dois dias (0,986 e 0,980). Nos modelos de validação cruzada houve a manutenção de um bom valor, não havendo nenhum sintoma de sobreajuste. Embora no Dia 2 observou-se uma diferença maior entre R^2 e Q^2 em relação ao Dia 1, esta diferença (0,020) ainda foi muito inferior ao limite prático estabelecido pela literatura científica (0,20) (BRO, 2002; WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001; KVALHEIM, 2010), indicando que em ambos os dias o PLS apresentou uma boa capacidade preditiva.

Em segundo lugar, a raiz do erro quadrático médio foi avaliada. No Dia 1, o RMSEC foi de 1,596 mg L⁻¹. A avaliação em relação a faixa de trabalho se deu por meio da seguinte expressão:

$$Erro\ Médio(\%) = \frac{RMSEC}{C_{max} - C_{min}} \times 100$$

Substituindo os valores de RMSEC ($1,596\text{ mg L}^{-1}$), maior concentração ($C_{max} = 60,0\text{ mg L}^{-1}$) e menor concentração ($C_{min} = 20,0\text{ mg L}^{-1}$) obteve-se um erro médio em relação a faixa de trabalho de 3,39%. Considerando o valor de RMSECV ($1,805\text{ mg L}^{-1}$), o erro médio relacionado à faixa de trabalho aumentou para 4,51%, valor ainda bem baixo. O RMSEC ($1,596\text{ mg L}^{-1}$) e o RMSECV ($1,805\text{ mg L}^{-1}$) apresentaram uma diferença de apenas 13,08%, valor excelente tendo em vista que é esperado que haja um aumento do erro ao realizar a validação cruzada.

Já no Dia 2, o RMSEC foi um pouco maior em relação ao primeiro dia: $2,004\text{ mg L}^{-1}$. A partir do cálculo apresentado previamente, erro médio relacionado à faixa de trabalho foi de 5,01%. Ao realizar o cálculo com o valor de RMSECV ($2,608\text{ mg L}^{-1}$) houve um aumento do erro para 6,52%. O RMSEC ($2,004\text{ mg L}^{-1}$) e o RMSECV ($2,608\text{ mg L}^{-1}$) apresentaram uma diferença de 30,14%. Embora o aumento do erro tenha sido maior em relação ao primeiro dia, ainda assim não é excessivo ao ponto de sugerir um sobreajuste dos dados (BRO, 2002; WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001; KVALHEIM, 2010).

De um modo geral, os resultados mostraram-se bastante promissores. Considerando a validação cruzada dos dois dias, o erro médio associado à faixa de trabalho variou de 4,51% a 6,52%, valores aceitáveis para um método analítico cujo uso é direcionado à triagem de substâncias antioxidantes. Quanto a diferença entre os valores de RMSEC e RMSECV, observou-se um comportamento distinto nos dois dias. No primeiro dia, o valor foi de 13,08%, indicando uma baixa dispersão dos dados empregados na análise. Já no segundo dia, o aumento para o valor de 30,14%, demonstrou uma inconsistência na dispersão dos dados. Provavelmente, condições diferentes na captura de imagem (como a posição das tiras em relação à fonte de luz) impactaram na precisão dos dados do Dia 2, já que a colorimetria é uma técnica que intrinsecamente gera uma dispersão considerável dos dados (FUKUY, 2005; MHATRE, 2024).

Em suma, os resultados obtidos são promissores para um método analítico desenvolvido com materiais de baixo custo, tecnologia acessível e sem a necessidade de instrumentação analítica. Contudo, uma investigação mais profunda deve ser realizada a fim de identificar as causas e como se pode reduzir variações dos dados colorimétricos, aumentando a precisão do método. Nesse contexto, sugere-se que a reprodução do método com um maior

número de replicatas seria uma das formas de adquirir mais dados e, assim, permitir uma avaliação mais ampla das flutuações associadas.

4.7 COMPARAÇÃO COM O MÉTODO TRADICIONAL

Diversas adaptações são descritas na literatura para o ensaio tradicional de captura do radical DPPH[•]. Diferentes solventes, concentrações e tempos de reação são empregados, evidenciando a falta de uma metodologia padronizada (OLIVEIRA, 2015). Diante disso, foi necessário avaliar diferentes possibilidades experimentais e escolher a mais adequada para fins comparativos com o método desenvolvido no presente trabalho.

Silva e colaboradores (2024), realizaram o ensaio de captura do radical DPPH[•] em microplacas para avaliar a atividade antioxidante de algumas substâncias puras e combinadas, incluindo o ácido gálico. Nesse estudo, estabeleceu-se uma faixa de linearidade para soluções de ácido gálico cujo intervalo de concentrações engloba as soluções usadas no método desenvolvido neste trabalho ($20,0 \text{ mg L}^{-1}$ a $60,0 \text{ mg L}^{-1}$). Por empregar a mesma substância e uma faixa de concentração bastante similar, viabilizou-se a análise de uma mesma amostra por ambos os métodos de modo satisfatório. Dessa forma, a metodologia adaptada por Silva *et al.* (2024) foi adotada como referência de método tradicional do ensaio de captura do radical DPPH[•].

4.7.1 *Complexidade procedural*

Inicialmente, foram identificadas diferenças quanto à simplicidade técnica dos métodos. Embora o método de referência permita a análise de um maior número de amostras em um tempo reduzido, devido ao uso de microplacas, ele apresentou maior complexidade tanto em relação à aparelhagem necessária quanto ao próprio procedimento.

O manuseio da pipeta multicanal exige uma maior qualificação técnica do analista. Deve-se assegurar a distribuição uniforme dos volumes em todos os canais, o que pode ser desafiador em função da disposição do líquido nas ponteiras, do alinhamento preciso com os poços da microplaca ou do mau funcionamento de algum dos canais. Outro aspecto notado foi a exigência de agilidade na realização das transferências em razão do uso de um solvente volátil, como o MeOH, cuja evaporação pode comprometer a exatidão dos resultados. Além disso, verificou-se dificuldade na homogeneização efetiva do meio reacional nos poços da microplaca, sendo adotada como alternativa a agitação manual utilizando as próprias ponteiras. A desatenção aos cuidados operacionais descritos pode levar a introdução de erros analíticos, que

se tornam ainda mais graves quando se trabalha com soluções de concentrações baixas, como é o caso do método avaliado.

Por outro lado, o método desenvolvido neste trabalho apresenta um procedimento técnico de simples realização. A transferência de volumes e a aplicação das amostras na plataforma analítica (papel) requerem apenas equipamentos básicos, como uma pipeta automática convencional e uma seringa, o que generaliza o método para diversas realidades laboratoriais. A etapa que demanda maior atenção é a captura de imagem, já que variações nas condições de iluminação entre diferentes registros podem ser a fonte de erros significativos. Assim, é importante que o analista busque fixar as posições dos dispositivos usados na captura (celular e fonte de luz) e das diferentes amostras.

Em síntese, ambos os métodos apresentam vantagens e problemáticas que exigem atenção. O método tradicional oferece a possibilidade de avaliar um número maior de amostras simultaneamente, porém demanda aparelhagem mais sofisticada e, consequentemente, maior qualificação técnica. Já o método desenvolvido tem uma simplicidade operacional que viabiliza sua aplicação em laboratórios com menor infraestrutura, em triagens rápidas e até mesmo em práticas de ensino.

4.7.2 Capacidade preditiva

No dia identificado no **item 4.6 p. 44** como Dia 1, analisou-se uma amostra de ácido gálico por meio de ambos os métodos. Decidiu-se empregar uma concentração ($35,0 \text{ mg L}^{-1}$) que se interpolasse na faixa central usada no método tradicional ($5,0 \text{ mg L}^{-1} - 80,0 \text{ mg L}^{-1}$) e desenvolvido ($20,0 \text{ mg L}^{-1} - 60,0 \text{ mg L}^{-1}$). O tratamento estatístico dos dados obtidos foi realizado da mesma forma, sendo realizada a análise de resíduos para verificar a homoscedasticidade, a normalidade e a presença de valores aberrantes. A diferença se deu apenas no modelo de regressão utilizado (PLS e regressão linear).

4.7.2.1 Método tradicional

Ao realizar o método tradicional os seguintes dados foram obtidos:

Tabela 5 – Dados obtidos no ensaio de captura do radical DPPH• utilizando o método tradicional.

Concentração inicial (mg L⁻¹)	Absorbância (517 nm)	Absorbância média (517 nm)	Inibição (%)	Inibição média (%)
80,0	0,058		78,52	
80,0	0,060		77,78	
80,0	0,059		78,15	
80,0	0,065		75,93	
80,0	0,063	0,0610	76,67	77,41
80,0	0,060		77,78	
80,0	0,063		76,67	
80,0	0,060		77,78	
40,0	0,067		75,19	
40,0	0,066		75,56	
40,0	0,072		73,33	
40,0	0,067		75,19	
40,0	0,066	0,0658	75,56	75,65
40,0	0,065		75,93	
40,0	0,064		76,30	
40,0	0,059		78,15	
20,0	0,068		74,81	
20,0	0,078		71,11	
20,0	0,066		75,56	
20,0	0,066		75,56	
20,0	0,068	0,0680	74,81	74,91
20,0	0,065		75,93	
20,0	0,065		75,93	
20,0	0,066		75,56	
10,0	0,073		72,96	
10,0	0,068		74,81	
10,0	0,068		74,81	
10,0	0,069		74,44	
10,0	0,068	0,0689	74,81	74,49
10,0	0,069		74,44	
10,0	0,067		75,19	
10,0	0,069		74,44	
5,0	0,074		72,59	
5,0	0,072		73,33	
5,0	0,072		73,33	
5,0	0,072		73,33	
5,0	0,072	0,0721	73,33	73,29
5,0	0,073		72,96	
5,0	0,071		73,70	
5,0	0,071		73,70	
	0,280		-	-
	0,278		-	-
	0,273		-	-
CONTROLE NEGATIVO	0,267	0,2700	-	-
	0,268		-	-
	0,267		-	-
	0,267		-	-
	0,260		-	-

Concentração inicial (mg L ⁻¹)	Absorbância (517 nm)	Absorbância média (517 nm)	Inibição (%)	Inibição média (%)
CONTROLE POSITIVO	0,071	0,0668	73,70	
	0,066		75,56	
	0,067		75,19	
	0,067		75,19	
	0,067		75,19	75,28
	0,068		74,81	
	0,064		76,30	
	0,064		76,30	

Sendo a inibição calculada a partir da expressão matemática indicada na seção de “Material e Métodos” (**item 3.12.2, p. 28.**). Em um primeiro momento, a regressão linear foi realizada tanto com os valores individuais (**Gráfico 10**) quanto com os valores médios (**Gráfico 11**) da porcentagem de inibição.

Gráfico 10 - Regressão linear dos valores (n=8) do percentual de inibição *versus* a concentração inicial de ácido gálico (AG).

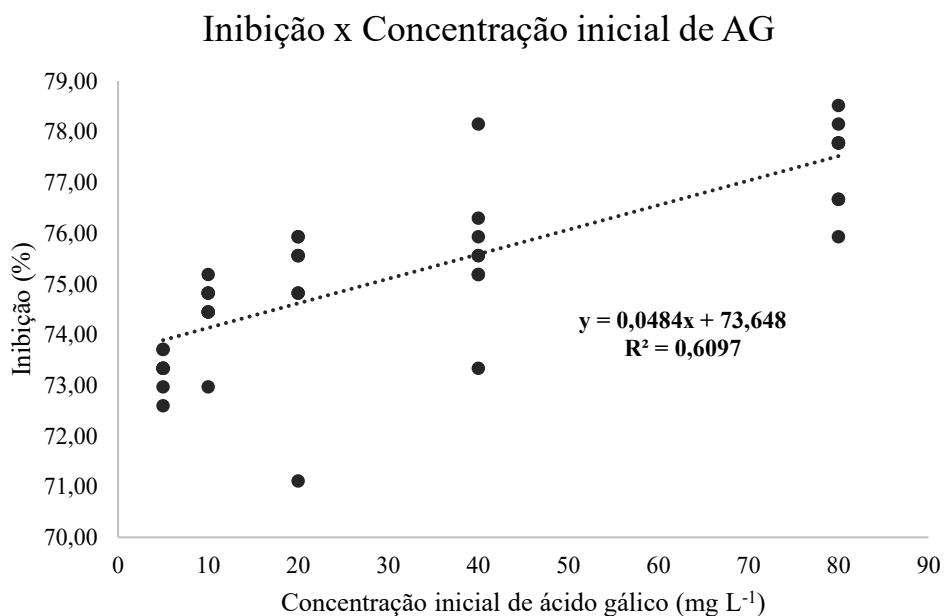
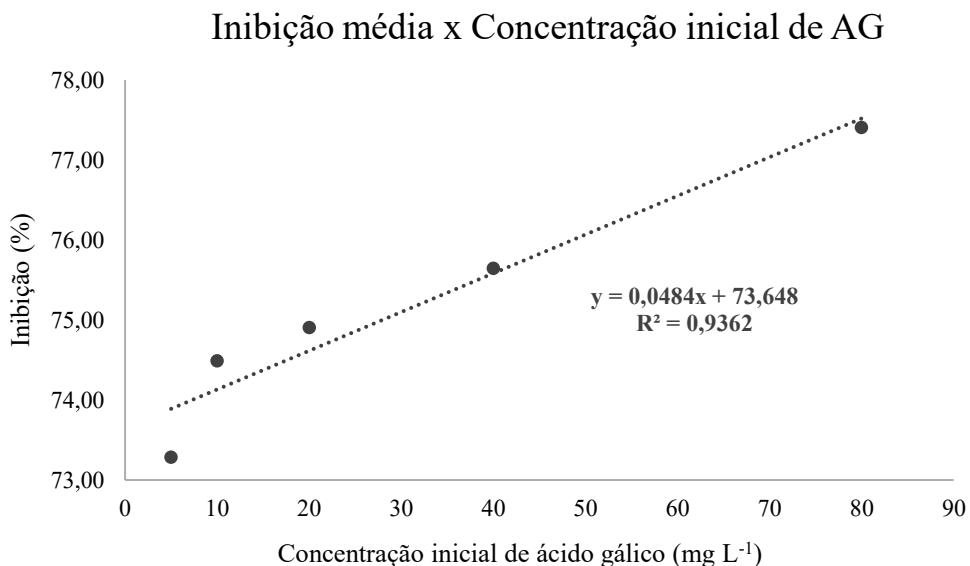


Gráfico 11 - Regressão linear dos valores médios ($n=8$) do percentual de inibição *versus* a concentração inicial de ácido gálico (AG).



Alguns pontos importantes podem ser avaliados a partir dos gráficos. Em primeiro lugar, todos os valores de inibição são maiores que 70%, indicando que a faixa de trabalho ocorre numa zona de platô característica comum na reação do DPPH•. O baixo coeficiente angular da reta (0,0484) reflete uma baixa sensibilidade do ensaio, podendo ser mais adequado utilizar soluções de menor concentração ($< 10 \text{ mg L}^{-1}$).

Em segundo lugar, ao observar o **Gráfico 10**, nota-se uma dispersão significativa dos dados, havendo indicativos visuais da presença de *outliers*, já que há dados que destoam significativamente dos demais. resultando em uma baixa correlação linear ($R^2 = 0,6097$). Ao utilizar os valores médios de inibição (**Gráfico 11**), notou-se um aumento do coeficiente de determinação (R^2 de 0,6097 a 0,9362), o que é esperado em qualquer análise, mas não necessariamente de uma forma tão abruta. Os valores de desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (CV) foram calculados a partir das seguintes equações a fim de mensurar a dispersão presente no modelo:

$$\sigma = \sqrt{\left(\frac{1}{n-1}\right) \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}$$

$$CV (\%) = \frac{\sigma}{\bar{y}} \times 100$$

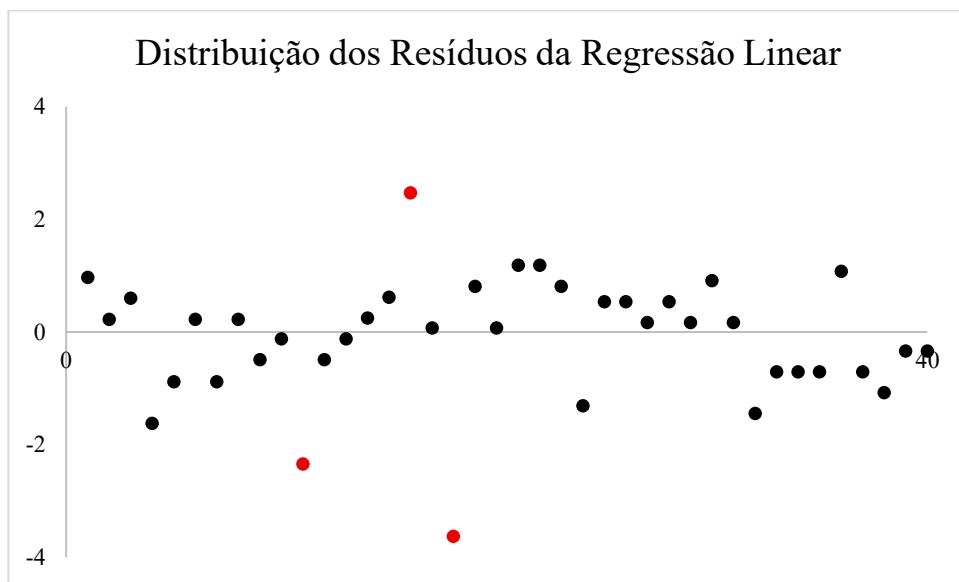
Em que n representa o número de replicatas (8), \bar{y} o valor médio da variável avaliada e y_i o valor individual de cada amostra. Os valores foram obtidos e organizados na tabela abaixo.

Tabela 6 - Desvio padrão e coeficiente de variação dos valores de inibição considerando todos os dados obtidos.

Concentração inicial (mg L ⁻¹)	Inibição média (%)	Desvio Padrão (%)	Coeficiente de Variação (%)
80,0	77,41	0,89	1,14
40,0	75,65	1,34	1,77
20,0	74,91	1,59	2,13
10,0	74,49	0,67	0,90
5,0	73,29	0,37	0,50
35,0	75,28	0,83	1,11

O aumento do desvio padrão nas concentrações de 20,0 0 mg L⁻¹ e 40,0 mg L⁻¹ reforçou o indicativo gráfico da presença de *outliers*. Com isso, a análise de resíduos foi realizada e o critério prático de reavaliar pontos cujo valor ultrapassasse o módulo de 2σ foi adotado.

Gráfico 12 - Distribuição dos resíduos da regressão linear.



Os pontos que estão em vermelho no gráfico R foram removidos por ultrapassar o critério estabelecido. Em seguida, as métricas de dispersão foram recalculadas sem esses valores (**Tabela 7**).

Tabela 7 - Desvio padrão e coeficiente de variação dos valores de inibição ao remover os *outliers* identificados.

Concentração inicial (mg L^{-1})	Inibição média (%)	Desvio Padrão (%)	Coeficiente de Variação (%)
80,0	77,41	0,89	1,14
40,0	75,65	0,43	0,57
20,0	74,91	0,46	0,61
10,0	74,49	0,67	0,90
5,0	73,29	0,37	0,50
35,0	75,28	0,83	1,11

Como resultado notou-se uma redução significativa do desvio padrão e, consequentemente do coeficiente de variação. Por isso, decidiu-se remover os *outliers* e refazer a regressão linear.

Gráfico 13 - Regressão linear dos valores individuais do percentual de inibição *versus* a concentração inicial de ácido gálico (AG) com *outliers* removidos.

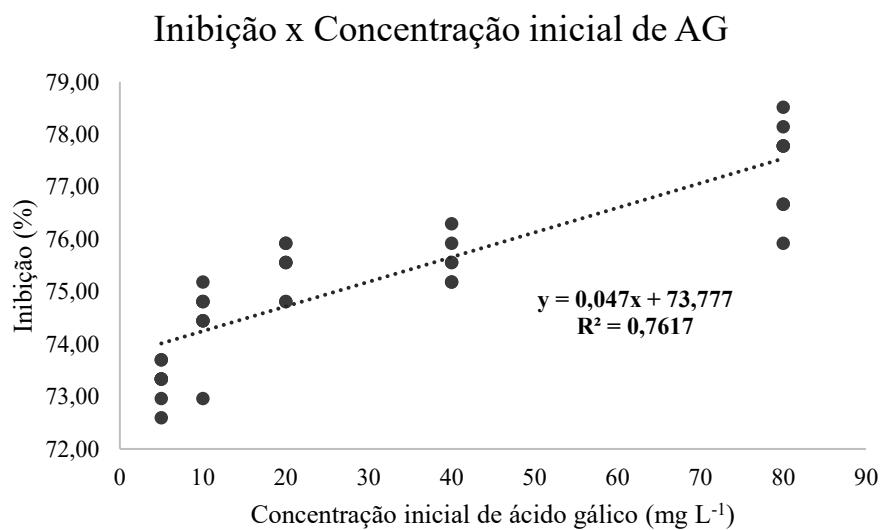
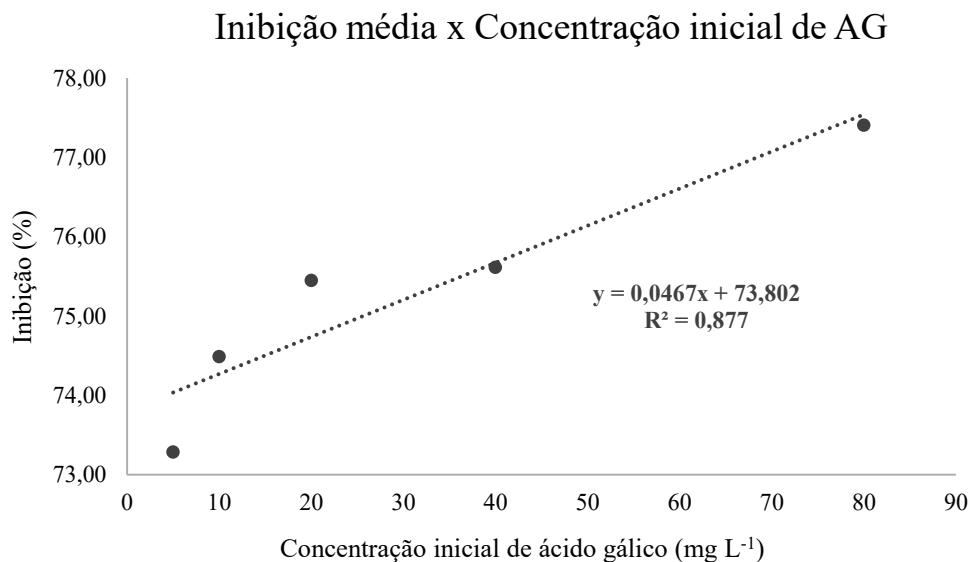


Gráfico 14 - Regressão linear dos valores médios do percentual de inibição *versus* a concentração inicial de ácido gálico (AG) com *outliers* removidos.



Embora o valor de R^2 obtido ao usar as médias da inibição apresentou uma redução (0,9362 para 0,8770), optou-se por empregar este modelo na análise da amostra teste, por apresentar uma maior coerência estatística. Substituindo os valores de porcentagem de inibição encontrados para a amostra teste na equação fornecida pelo modelo obteve-se o seguinte valor de concentração:

$$36,5 \pm 12,5 \text{ mg L}^{-1} (n = 8)$$

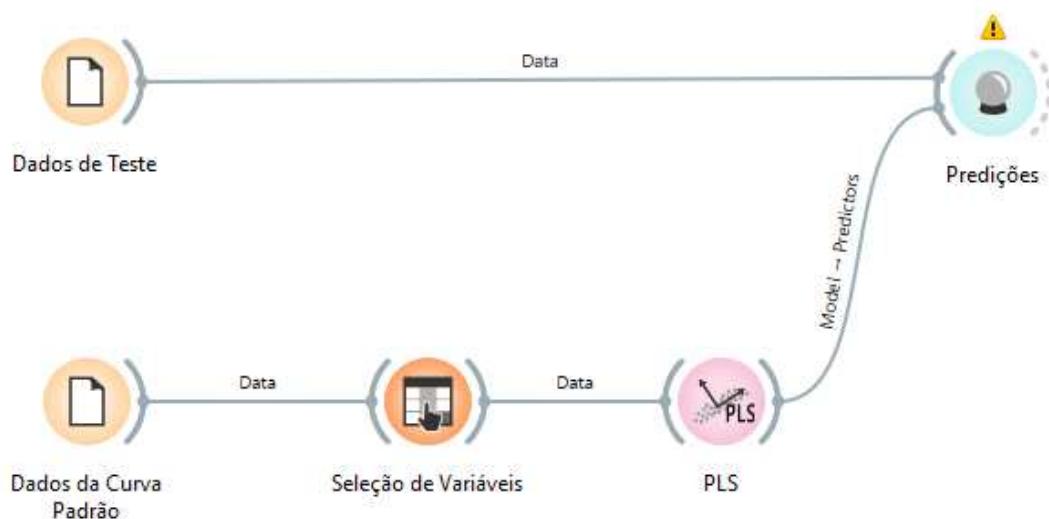
Apesar de uma boa exatidão, apresentando uma diferença de aproximadamente 4,3% em relação ao valor real ($35,0 \text{ mg L}^{-1}$), houve uma dispersão considerável. Como o coeficiente de variação, apresentado na **Tabela 7**, teve um valor bastante reduzido (1,11%), a alta variabilidade nas concentrações estimadas não vem de inconsistências experimentais. Provavelmente, pela faixa de trabalho se situar no “platô” da curva, grandes incertezas são geradas com pequenas variações da absorvância medida e, consequentemente da porcentagem de inibição. Embora o estudo de Silva *et al.* (2024) indique a faixa adotada como linear, o ideal seria verificar o comportamento deste método utilizando concentrações reduzidas. Assim, uma conclusão mais assertiva do resultado poderia ser realizada.

4.7.2.2 Método desenvolvido

A construção do modelo de regressão e a análise estatística dos dados já foi apresentada previamente no **item 4.5 (Tabela 2, p. 43)**. Para avaliar a amostra teste, de concentração igual

a 35,0 mg/L, com o uso do programa Orange (versão 3.38.0), a arquitetura apresentada na **Figura 18** foi elaborada.

Figura 18 - Arquitetura empregada no programa Orange (versão 3.38.0) para construção do modelo PLS e avaliar sua capacidade preditiva em relação à amostra teste.



Como pode ser observado, os dados da curva padrão são totalmente independentes dos dados da amostra teste, sendo uma forma mais rigorosa e realista de verificar a capacidade preditiva do modelo (BERETON, 2018). O ícone “Predições” forneceu os resultados das concentrações calculadas, além do erro do modelo, ambos apresentados na **Tabela 8**.

Tabela 8 - Valores fornecidos pelo modelo PLS do método desenvolvido na predição de amostras de ácido gálico com concentração teórica igual a 35,0 mg L⁻¹ (amostra teste).

Concentração teórica (mg L ⁻¹)	Concentração calculada (mg L ⁻¹)	Erro do PLS (mg L ⁻¹)
35,0	38,5	3,47
35,0	36,4	1,37
35,0	38,4	3,39
35,0	35,9	0,87

Nota-se que duas das replicatas tiveram um valor mais próximo do valor real, apresentando um erro de apenas 0,9 mg L⁻¹ e 1,4 mg L⁻¹, enquanto as demais tiveram uma divergência maior, com erros de 3,4 mg L⁻¹ e 3,5 mg L⁻¹. Calculando a média dos valores fornecidos e o desvio padrão, a concentração prevista da amostra analisada foi de:

$$37,3 \pm 1,3 \text{ mg L}^{-1} (n = 4)$$

Em relação à exatidão, o valor encontrado foi 6,57% acima do esperado ($35,0 \text{ mg L}^{-1}$), representando um bom resultado. Nota-se, na **Tabela 8**, que todos os erros do PLS apresentaram valores positivos, indicando a ocorrência de um possível erro sistemático em alguma etapa do procedimento, como no preparo das soluções ou na aplicação do produto reacional no papel. Em relação à precisão, o valor do desvio padrão foi bem baixo, representando somente 3,25% de erro médio em relação à faixa de trabalho. sendo considerado um excelente resultado dado a simplicidade técnica do método.

Diante dos resultados dos métodos empregados, o método proposto foi validado segundo a comparação com um dos métodos mais tradicionalmente utilizados, uma vez que ambos os métodos apresentaram um bom desempenho quanto à exatidão, ainda mais considerando suas aplicações em ensaios preliminares ou avaliação de triagem. Quanto à precisão, o método tradicional não forneceu um bom resultado. Provavelmente, o uso de uma faixa de concentração em uma região de baixa sensibilidade prejudicou a interpretação adequada deste parâmetro, tendo em vista que a literatura (APAK *et al.*, 2006; GÜLÇİN, ALWASEL, 2023; KARADAG *et al.*, 2009;) respalda fortemente o ensaio tradicional do radical DPPH•.

5 CONCLUSÃO

Em um contexto de crescente interesse por substâncias antioxidantes, destaca-se a importância no desenvolvimento de novos métodos analíticos voltados para essa área. Com o uso de materiais de baixo custo efetivo e tecnologia acessível o presente trabalho buscou implementar adaptações e/ou inovações no ensaio de captura do radical DPPH•.

O método desenvolvido mostrou-se como uma potencial alternativa aos métodos tradicionais consolidados. Parâmetros fornecidos na etapa de validação cruzada, como um Q^2 superior a 0,95 e um erro médio relacionado à faixa de trabalho de apenas 6,52%, tornam este método propício para ensaios de triagem e avaliações preliminares de substâncias antioxidantes. Ademais, a análise de uma amostra teste apresentou resultados promissores quanto à exatidão e precisão do método, exibindo uma capacidade preditiva similar ao método tradicional empregado por SILVA *et al.*, 2024 (ensaio espectrofotométrico com DPPH• em microplaca) com menor incerteza em relação ao resultado gerado.

Além dos resultados promissores, o método desenvolvido apresenta outras vantagens interessantes. Ele permite que a avaliação preliminar da atividade antioxidante seja realizada em diferentes realidades laboratoriais, já que sua realização não depende de aparelhagem instrumental. Ademais, tem um consumo energético mínimo, gera poucos resíduos químicos e pode ser realizado *in situ*, se tornando um método mais alinhando com os princípios da química analítica verde (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKIA; NAMIESNIK, 2013) em comparação à abordagem tradicional.

6 PERSPECTIVAS

Como perspectiva, seria interessante encontrar uma forma de ampliar a faixa de trabalho do método, já que o uso de uma faixa restrita em baixas concentrações suscetibiliza uma maior dispersão dos dados. A avaliação de um número maior de replicatas, bem como de outras condições reacionais, ou até mesmo outros padrões antioxidantes, poderiam gerar resultados ainda mais satisfatórios.

Por fim, a realização de testes com amostras mais complexas, como extratos de plantas, por exemplo, seria uma etapa importante para avaliação/verificação do potencial prático de aplicações do método desenvolvido.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova*, v. 33, n. 10, p. 2002 – 2010, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010001000033>
- ANDRADE, J. M. *et al.* A tutorial on multivariate calibration in atomic spectrometry techniques. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, Cambridge, v. 23, p. 15–28, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/B701663H>
- APAK, R. *et al.* Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, v. 78, n. 5, p. 957–998, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1351/PAC-REP-12-07-15>
- BARBOZA, R. S. *et al.* Interdisciplinary education through the development of a cost-effective photometric pH meter sensor using natural pigments. *Química Nova*, v. 45, n° 6, p. 750-759, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170869>
- BERASARTE, I. *et al.* Chemometrics and digital image colorimetry approaches applied to paper-based analytical devices: A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 1339, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2024.343577>
- BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, v. 181, n. 4617, p. 1199 - 1200, 1958. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- BOBO-GARCÍA, G.; DAVIDOV-PARDO, G.; ARROQUI, C.; VÍRSEDA, P.; MARÍN-ARROYO, M. R.; NAVARRO, M. Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science and Food and Agriculture*, vol. 95, n° 1, p. 204-209, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jsfa.6706>
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 jul. 2017. Disponível em: <https://www.in.gov.br>
- BRERETON, R. G. *et al.* Chemometrics in analytical chemistry – Part II: modeling, validation, and applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 410, p. 5891–5899, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1283-4>
- BRO, R. *et al.* Cross-validation of component models: A critical look at current methods. *Journal of Chemometrics*, v. 16, n. 3, p. 129–140, 2002. Disponível em: [10.1007/s00216-007-1790-1](https://doi.org/10.1007/s00216-007-1790-1)
- CAROCHO, M.; FERREIRA, I. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, v. 51, p. 15-25, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
- CARVALHO, H. *et al.* Underexploited fruits from the Brazilian Cerrado: Biodiversity, phenolic composition and biological activities. *Food Bioscience*, v. 66, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.106269>
- FAN, Y. *et al.* Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review. *Measurement*, v. 171, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2020.108829>

FENG, J. et al. Oxidative stress, the blood-brain barrier and neurodegenerative diseases: The critical beneficial role of dietary antioxidants. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, v. 13, p. 3988-4024, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.07.010>

FERREIRA, M. M. C. *Quimiometria: Conceitos, Métodos e Aplicações*. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2015.

FUKUI, Y. et al. Comparison of colorimetric and HPLC methods for determination of δ-aminolevulinic acid in urine with reference to dose-response relationship in occupational exposure to lead. *Industrial Health*, v. 43, n. 4, p. 691–698, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.2486/indhealth.43.691>

GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKIA Z.; NAMIESNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *Trends in Analytical chemistry*, v. 50, p. 78 – 84, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, v. 86, p. 345-391, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0774-2>

GÜLÇİN, I. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, v. 94, p. 651-715, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>

GÜLÇİN, I., ALWASEL S. H. DPPH Radical Scavenging Assay. *Processes*, v. 11, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pr11082248>

IONITA, P. The Chemistry of DPPH Free Radical and Congeners. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 1545, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22041545>

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*, v. 2, p. 41-60, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12161-008-9067-7>

KVALHEIM, O. M. Validation in chemometrics. *Journal of Chemometrics*, v. 24, n. 3, p. 180–187, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.06.056>

LIANG, Y. et al. The application of coffee-ring effect in analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 157, art. 116752, dez. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116752>

LÓPEZ-TÉLLEZ J. M.; CAÑIZARES-MÁCIAS, M. P. A paper-based analytical device with in-situ Carrez pretreatment for the determination of total polyphenolic content and antioxidant capacity. *Food Chemistry*, v. 405, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134952>

MHATRE, S. et al. Comparison of colorimetric, spectroscopic and electrochemical techniques for quantification of hydrogen sulfide. *Biotechniques*, v. 72, n. 2, p. 71-80, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.2144/btn-2023-0075>

MUNTEANU, I.G.; APETREI, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Science*, v. 22, n. 3380, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>

- NEHA, K. *et al.* Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 178, p. 687-704, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.010>
- NENADIS, N., LAZARIDOU, O.; TSIMIDOU, M. Z. Use of reference compounds in antioxidant activity assessment. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 5452–5460, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf070473q>
- OBAFEMI, T. *et al.* Gallic acid and neurodegenerative diseases. *Phytomedicine Plus*, v. 3, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2023.100492>
- OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 17, n. 1, p. 36–44, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_165
- OLSZOWY-TOMCZYK, M. How to express the antioxidant properties of substances properly? *Chemical Papers*, v. 75, p. 6157-6167, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11696-021-01799-1>
- POHANKA, M. Assays of antioxidant capacity: Optics and voltammetry. *International Journal of Electrochemical Science*, v. 18, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijoes.2023.100276>
- PRIETO, M. A.; VÁZQUEZ, J. A.; MURADO, M. A. Crocin bleaching antioxidant assay revisited: Application to microplate to analyse antioxidant and pro-oxidant activities. *Food Chemistry*, v. 167, p. 299-310, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.114>
- REFAEILZADEH, P., TANG, L., LIU, H. Cross-Validation. In: LIU, L., ÖZSU, M.T. (eds) *Encyclopedia of Database Systems*. Springer, Boston, MA, 2009. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-0-387-39940-9_565
- SATEANCHOCK, S. *et al.* A cost-effective assay for antioxidant using simple cotton thread combining paper based device with mobile phone detection. *Talanta*, v. 177, p. 171-175, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.073>
- SHAHIDI, F., AMBIGAIAPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects: A review. *Journal of Functional Foods*, v. 18, p. 820-897. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>
- SHOJAEI, M.S., MOEENFARD, M. & FARHOOSH, R. Kinetics and stoichiometry of gallic acid and methyl gallate in scavenging DPPH radical as affected by the reaction solvent. *Sci Rep* 12, 8765 (2022). Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12803-3>
- SILVA, F. *et al.* A rapid and simplified DPPH assay for analysis of antioxidant interactions in binary combinations. *Microchemical Journal*, v. 202, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.110801>
- SINGHAL, H. R. *et al.* One-dollar microfluidic paper-based analytical devices: Do-It-Yourself approaches. *Microchemical Journal*, v. 165, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106126>
- TINKEL, J.; HASSANAIN, H.; KHOURI, S. J. Cardiovascular antioxidant therapy: a review of supplements, pharmacotherapies, and mechanisms. *Cardiology in Review*, v. 20, p. 77-83, 2012. Disponível em: [10.1097/CRD.0b013e31823dbbad](https://doi.org/10.1097/CRD.0b013e31823dbbad)

KOWALSKI, E. R. Chemometrics: Views and Propositions. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, v. 15, n. 3, p. 201-203, 1975. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ci60004a002>

WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 58, p. 109–130, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00155-1](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00155-1)

XIANG, Z. *et al.* Dietary gallic acid as an antioxidant: A review of its food industry applications, health benefits, bioavailability, nano-delivery systems, and drug interactions. *Food Research International*, v. 180, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114068>

ZHAO, S. *et al.* Colorimetric characterization of color imaging system based on Kernel Partial Least Squares. *Sensors*, v. 23, n. 12, art. 5706, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/s23125706>