

Jamille Valéria Piovesan

**DETERMINAÇÃO ELETRONALÍTICA DE COMPOSTOS
FENÓLICOS UTILIZANDO UM ELETRODO DE PASTA DE
CARBONO MODIFICADO COM POLI(VINILPIRROLIDONA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como um dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Almir Spinelli

**Florianópolis
2014**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Piovesan, Jamille Valéria

DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS
UTILIZANDO UM ELETRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO COM
POLI(VINILPIRROLIDONA) / Jamille Valéria Piovesan ;
orientador, Almir Spinelli - Florianópolis, SC, 2014.
107 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Eletrodo de pasta de carbono. 3.
Eletrodos quimicamente modificados. 4.
Poli(vinilpirrolidona). 5. Compostos fenólicos. I.
Spinelli, Almir. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Jamille Valéria Piovesan

**DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA DE COMPOSTOS
FENÓLICOS UTILIZANDO UM ELETRODO DE PASTA DE
CARBONO MODIFICADO COM POLI(VINILPIRROLIDONA)**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção do Título de Mestre em
Química no Programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 21 de fevereiro de 2014.



Prof. Dr. Hugo Alejandro Gallardo Olmedo
Coordenador do Programa


BANCA EXAMINADORA:




Prof. Dr. Almir Spinelli
Orientador



Prof. Dr. Iolanda C. Vieira
(UFSC)



Prof. Dr. Vera Lúcia A. F.
Bascunan (UFSC)



Prof. Dr. Christiana
Andrade Pessoa (UEPG)

*Dedico aos meus pais,
Adelia e Valmor.*

Este trabalho foi desenvolvido no Grupo de Estudos de Processos Eletroquímicos e Eletroanalíticos (GEPEEA), laboratório 310 do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, sob orientação do Prof. Dr. Almir Spinelli.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida e por estar comigo em todos os momentos;

Aos meus pais, Adelia e Valmor, por não medirem esforços para a realização dos meus sonhos. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, dando amor, apoio, compreensão e me fazendo acreditar que sou capaz! Amo muito vocês!

Aos meus amados irmãos, Gracielle e Arlen e aos meus cunhados Leandro e Lauriane pela ajuda e por se fazerem sempre presentes com seu amor, carinho e apoio;

Ao professor Dr. Almir Spinelli, por ter acreditado em mim desde o início e pela orientação e paciência durante a realização deste trabalho;

Aos colegas do Grupo de Estudos em Processos Eletroquímicos e Eletroanalíticos: Paulo, Camila, Fernando, Otoniel, Lara, Giles, Éder e Edinho, pela amizade e companheirismo e por tornarem essa jornada muito mais divertida. Foi muito bom poder contar com vocês!

À Dr^a. Daniela Brondani, ao doutorando Eduardo Zapp e à Prof^a Dr^a. Iolanda Cruz Vieira, do Laboratório de Biossensores da UFSC, pela importante colaboração na realização das medidas espectroscópicas;

A todos os integrantes da banca, por aceitarem fazer parte da mesma;

A TODOS os meus professores, em especial aos das Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade Federal de Santa Catarina, pelos conhecimentos e valores construídos ao longo dos últimos anos;

Ao Programa de Pós Graduação em Química da UFSC, pela oportunidade de concluir este trabalho;

Ao CNPq e à CAPES pelo suporte financeiro.

TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O MESTRADO

- Artigo publicado em revista científica:

PIOVESAN, J. V.; SPINELLI, A. Determination of quercetin in a pharmaceutical sample by square-wave voltammetry using a poly(vinylpyrrolidone)-modified carbon-paste electrode. **Journal of Brazilian Chemical Society**, 2014, aceito para publicação.

- Resumos publicados em congressos:

1 – PIOVESAN, J. V.; SPINELLI, A. Determinação de quercetina em amostra farmacêutica utilizando um eletrodo de pasta de carbono modificado com poli(vinilpirrolidona). In: XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (SIBEE), Campos do Jordão – SP: **Anais do XIX SIBEE**, 2013.

2 – PIOVESAN, J. V.; SPINELLI, A. Estudo eletroquímico do canferol utilizando um eletrodo de pasta de carbono modificado com polivinilpirrolidona. In: V Simpósio de Graduação e Pós-graduação em Química da UEPG, Ponta Grossa – PR: **Anais do V Simpósio de Graduação e Pós-graduação em Química da UEPG**, 2013.

“Não sei o que possa parecer aos olhos do mundo, mas aos meus pareço apenas ter sido como um menino brincando à beira-mar, divertindo-me com o fato de encontrar de vez em quando um seixo mais liso ou uma concha mais bonita do que o normal, enquanto o grande oceano da verdade permanece completamente por descobrir à minha frente.”

Isaac Newton

RESUMO

Um eletrodo de pasta de carbono modificado com o polímero poli(vinilpirrolidona) foi utilizado para o estudo eletroquímico de quercetina e canferol e na determinação eletroanalítica de compostos fenólicos em matrizes farmacêuticas e vegetais. Sobre este eletrodo, voltamogramas cíclicos da quercetina apresentaram três picos de oxidação localizados em +0,32, +0,78 e +1,04 V. A eletro-oxidação no primeiro pico conduz à formação da orto-quinona correspondente, a qual pode ser reduzida em condições experimentais favoráveis. Nestas condições favoráveis, a reação é quase-reversível e o processo é controlado por difusão. Este comportamento foi explorado para a determinação eletroanalítica da quercetina por voltametria de onda-quadrada. A curva de calibração obtida para a quercetina foi linear na faixa de concentração de 0,5 a 5,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,998$). Os limites de detecção e quantificação foram de 0,17 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,52 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. O sensor foi usado para determinação de quercetina em produtos farmacêuticos. A exatidão dos resultados fornecidos pelo sensor foi avaliada por comparação com os resultados obtidos pela técnica UV-vis. O sensor foi aplicado também no estudo do comportamento eletroquímico do canferol e na quantificação de compostos fenólicos totais em amostras vegetais. Sobre este eletrodo, os voltamogramas cíclicos para o canferol apresentaram apenas um pico de oxidação em +0,58 V e um sinal de redução em +0,46 V. Em condições favoráveis, a reação é quase-reversível e o processo é controlado por difusão. A curva de calibração para o canferol apresentou duas faixas lineares nos intervalos de concentração de 0,05 a 0,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e de 0,50 a 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,980$). Utilizando a faixa de maior sensibilidade, os limites de detecção e quantificação foram de 45,0 nmol L^{-1} e 138,0 nmol L^{-1} , respectivamente. O sensor foi aplicado para a determinação eletroanalítica de compostos fenólicos por voltametria de onda-quadrada em amostras vegetais. Os teores de compostos fenólicos totais foram expressos em mg equivalente de canferol (EC)/g de planta em natura. O vegetal que apresentou maior teor de compostos fenólicos foi o espinafre (0,32 mg g^{-1}), seguido da couve (0,29 mg g^{-1}), do brócolis (0,21 mg g^{-1}) e por fim, com menor concentração, a chicória (0,08 mg g^{-1}). A exatidão dos resultados fornecidos pelo sensor foi avaliada por comparação com os resultados obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu para determinação de compostos fenólicos totais.

Palavras-chave: eletrodo de pasta de carbono, eletrodos quimicamente modificados, poli(vinilpirrolidona), compostos fenólicos, quercetina, canferol, métodos voltamétricos.

ABSTRACT

A carbon paste electrode modified with poly (vinylpyrrolidone) polymer was used to study the electrochemical quercetin and kaempferol and the electroanalytical determination of phenol compounds and in pharmaceutical vegetable matrices. About this electrode , cyclic voltammograms of quercetin presented three oxidation peaks located at +0.32 , +0.78 and +1.04 V. The electro-oxidation in the first peak leads to the formation of the corresponding ortho-quinone, which can be reduced in favorable experimental conditions. Under these favorable conditions, the reaction is quasi-reversible, and the process is controlled by diffusion. This behavior has been exploited for the electroanalytical determination of quercetin by square-wave voltammetry. The calibration curve obtained for quercetin was linear in the concentration range from 0.5 to 5.5 mmol L⁻¹ (R² = 0.998). The limits of detection and quantification were 0.17 μmol L⁻¹ and 0.52 μmol L⁻¹, respectively. The sensor was used for the determination of quercetin in pharmaceuticals. The accuracy of the results provided by the sensor was evaluated by comparison with the results obtained by UV-vis technique. The sensor was also applied to study the electrochemical behavior of kaempferol and quantification of phenolic compounds in plant samples. About this electrode, cyclic voltammograms for kaempferol showed only one oxidation peak at +0.58 V and a signal reduction in +0.46 V. Under favorable conditions, the reaction is quasi-reversible, and the process is controlled by diffusion. The calibration curve for the kaempferol showed two linear ranges in concentration ranges of 0.05 to 0.50 μmol L⁻¹ and 0.50 to 6.0 μmol L⁻¹ (R² = 0.980). Using the most sensitive range, the limits of detection and quantification were 45.0 nmol L⁻¹ and 138.0 nmol L⁻¹, respectively. The sensor was applied to the electroanalytical determination of phenolics by square-wave voltammetry compounds in plant samples. The content of total phenolic compounds were expressed in terms of kaempferol (CE)/g of plant in nature mg. The plant that showed a higher content of phenolics was spinach (0.32 mg g⁻¹), followed by the cauliflower (0.29 mg g⁻¹), broccoli (0.21 mg g⁻¹) and, finally, with lower concentrations, chicory (0.08 mg g⁻¹). The accuracy of the results provided by the sensor was evaluated by comparison with the results obtained by Folin-Ciocalteu method.

Keywords: carbon paste electrode, chemically modified electrodes, phenolic compounds, poly(vinylpyrrolidone), quercetin, kaempferol, voltammetric methods.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Estrutura geral dos flavonóides | 33 |
| Figura 2 - Estrutura química da quercetina..... | 35 |
| Figura 3 - Estrutura química do canferol | 36 |
| Figura 4 - Voltamogramas cíclicos para quercetina 1,0 mmol L ⁻¹ sobre o CPE/PVP em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 6,0), $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, (a) 1º ciclo e (b) 2º ciclo. | 49 |
| Figura 5 - Representação da reação redox da quercetina na superfície do CPE modificado com PVP..... | 50 |
| Figura 6 - Voltamogramas cíclicos sobre o CPE (a e c) e o CPE/PVP (b e d) na ausência e na presença de quercetina 1,0 mmol L ⁻¹ em tampão | 51 |
| Figura 7 - Voltamogramas cíclicos para quercetina 1,0 mmol L ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 6,0) sobre o CPE/PVP; (a - e) = 40, 30, 20, 10, 5% de PVP, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ | 53 |
| Figura 8 - Voltamogramas cíclicos para quercetina 1,0 mmol L ⁻¹ em tampão B-R 0,1 mol L ⁻¹ sobre o CPE/PVP. (A) (a) pH 2,0, (b) pH 3,0 e (c) pH 4,0; (B) (a) pH 5,0, (b) pH 6,0, (c) pH 7,0, (d) pH 8,0 e (e) pH 9,0, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ | 54 |
| Figura 9 - Variação (A) do potencial de pico de oxidação e (B) da corrente de pico anódico em função do pH do eletrólito suporte para 1,0 mmol L ⁻¹ de quercetina em 0,1 mol L ⁻¹ de tampão B-R sobre o CPE/PVP por voltametria cíclica, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ | 55 |
| Figura 10 - Voltamogramas cíclicos para quercetina 1,0 mmol L ⁻¹ sobre o CPE/PVP obtidos em (A) pH 2,0 e (B) pH 3,0 em (a) tampão B-R e (b) tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ ; (C) pH 4,0 e (D) pH 5,0 em (a) tampão B-R e (b) tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ , $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ | 56 |
| Figura 11 - (A) Voltamogramas cíclicos para quercetina 1,0 mmol L ⁻¹ em tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 5,0), (a - n) $\nu = 10$ a 500 mV s^{-1} ; (B) gráfico de i_p vs. $\nu^{1/2}$; (C) gráfico de $\log i$ vs. $\log \nu$ | 59 |
| Figura 12 - Voltamogramas para quercetina 1,0 mmol L ⁻¹ em tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 5,0) sobre o CPE/PVP: (a) LSV, (b) DPV e (c) SWV,..... | 61 |
| Figura 13 - Dependência da corrente resultante com a variação da (A) frequência ($a = 80 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$); (B) incremento ($a = 80 \text{ mV}$ e $f = 60 \text{ Hz}$) e (C) amplitude ($f = 60 \text{ Hz}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$) para quercetina 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 5,0). | 62 |
| Figura 14 - (A) Voltamogramas de onda quadrada para (a) branco, (b) quercetina 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (c) 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (d) 1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (e) 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (f) 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (g) 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (h) 3,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (i) 4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (j) 4,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (k) 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (l) 5,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 5,0), $f = 60 \text{ Hz}$; $a = 100 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$; (B) Curva de calibração para a quercetina..... | 64 |
| Figura 15 - Respostas de Δi para medidas sucessivas de diferentes concentrações de quercetina (a) 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (b) 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (c) 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ | |

| | |
|--|----|
| em tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 5,0) sobre o CPE/PVP; $f = 60$ Hz; $a = 100$ mV e $\Delta E_s = 4$ mV..... | 67 |
| Figura 16 - Respostas de Δi para medidas <i>inter dia</i> de diferentes concentrações de quercetina (a) 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (b) 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (c) 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 5,0) sobre o CPE/PVP; $f = 60$ Hz; $a = 100$ mV e $\Delta E_s = 4$ mV..... | 68 |
| Figura 17 - (A) Voltamogramas de onda quadrada para (a) amostra, (b - g) adições sucessivas de quercetina 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 5,0), $f = 60$ Hz; $a = 100$ mV e $\Delta E_s = 4$ mV; (B) (a) Curva de calibração para a quercetina e (b) curva de adição de padrão..... | 68 |
| Figura 18 - (A) Espectros de absorção no UV-vis para (a) etanol, solução de quercetina (b) 3,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (c) 6,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (d) 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (e) 13,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (f) 16,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (g) 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (h) 23,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (i) 26,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (j) 30,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (k) 33,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (l) 36,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (B) Espectros de absorção no UV-vis para (a) amostra, (b-h) adições sucessivas de quercetina 3,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (C) (a) Curva de calibração para a quercetina e (b) curva de adição de padrão..... | 70 |
| Figura 19 - Voltamogramas cíclicos sobre o CPE (a) e o CPE/PVP (b) na ausência (inserção) e na presença de canferol 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R 0,1 mol L ⁻¹ (pH 3,0), $\nu = 100$ mV s ⁻¹ | 74 |
| Figura 20 - Mecanismo de oxi-redução do canferol..... | 75 |
| Figura 21 - Voltamogramas cíclicos para canferol 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R 0,1 mol L ⁻¹ (pH 3,0) sobre o CPE/PVP; (a - d) = 30, 20, 10, 5% de PVP, $\nu = 100$ mV s ⁻¹ | 76 |
| Figura 22 - Voltamogramas cíclicos para canferol 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R 0,1 mol L ⁻¹ sobre o CPE/PVP. (A) (a) pH 2,0, (b) pH 3,0, (c) pH 4,0, (d) pH 5,0 e (e) pH 6,0; (B) (a) pH 7,0, (b) pH 8,0, (c) pH 9,0 e (d) pH 10,0, $\nu = 100$ mV s ⁻¹ | 77 |
| Figura 23 - Variação (A) do potencial de pico de oxidação e (B) da corrente.. | 78 |
| Figura 24 - Voltamogramas cíclicos para canferol 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em (a) tampão B-R 0,1 mol L ⁻¹ (pH 3,0) e (b) tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 3,0), $\nu = 100$ mV s ⁻¹ | 79 |
| Figura 25 - (A) Voltamogramas cíclicos para canferol 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R 0,1 mol L ⁻¹ (pH 3,0) sobre o CPE/PVP, (a - o) $\nu = 10$ a 500 mV s ⁻¹ ; (B) gráfico de i vs. $\nu^{1/2}$ e (C) (a) log de i_{pa} vs. log de ν e (b) log de i_{pc} vs. log de ν .. | 80 |
| Figura 26 - Voltamogramas para canferol 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão..... | 82 |
| Figura 27 - Dependência da corrente resultante com a variação da (A) frequência ($a = 60$ mV e $\Delta E_s = 3$ mV); (B) incremento ($a = 60$ mV e $f = 100$ Hz) e (C) amplitude ($f = 100$ Hz e $\Delta E_s = 3$ mV) para canferol 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R 0,1 mol L ⁻¹ (pH 3,0)..... | 83 |
| Figura 28 - (A) Voltamogramas de onda quadrada para (a) branco, (b) canferol 0,05 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (c) 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (d) 0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (e) 0,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (f) 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (g) 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (h) 1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (i) 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (j) 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (k) 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (l) 3,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (m) 4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (n) 4,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (o) 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, | |

| | |
|---|----|
| (p) 5,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R 0,1 mol L^{-1} (pH 3,0), $f = 100 \text{ Hz}$; $a = 100 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$; (B) Curva de calibração para o canferol, em mol L^{-1} e (C) Curva de calibração para o canferol, em mg L^{-1} | 85 |
| Figura 29 - Respostas relativas para possíveis interferentes na | 88 |
| Figura 30 - Voltamogramas de onda quadrada para as amostras de (a) chicória, (b) brócolis, (c) couve e (d) espinafre em solução tampão B-R 0,1 mol L^{-1} (pH 3,0), $f = 100 \text{ Hz}$; $a = 100 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ | 89 |
| Figura 31 - Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do | 91 |
| Figura 32 - Curva de calibração para a determinação de compostos fenólicos totais. | 91 |
| Figura 33 - Correlação entre a concentração de compostos fenólicos totais obtida pelos métodos de FC e CPE/PVP. | 92 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Otimização dos parâmetros para a determinação de quercetina..... | 63 |
| Tabela 2 - Características analíticas da curva de calibração da quercetina. | 66 |
| Tabela 3 - Determinação de quercetina em preparação farmacêutica..... | 72 |
| Tabela 4 - Otimização dos parâmetros experimentais para a..... | 84 |
| Tabela 5 - Características analíticas da curva de calibração para o canferol.... | 87 |
| Tabela 6 - Teor de compostos fenólicos totais em amostras vegetais..... | 89 |
| Tabela 7 - Teor de compostos fenólicos totais em amostras vegetais..... | 93 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- Δi – Corrente resultante
 ΔE_s – Incremento de potencial
 v – Velocidade de variação de potencial
 a – Amplitude de pulso
Ag/AgCl – Eletrodo de referência de prata/cloreto de prata
CE – (do inglês *Capillary Electrophoresis*) – Eletroforese capilar
CE-ED – (do inglês *Capillary Electrophoresis-Electrochemical Detector*)
Eletroforese capilar com detector eletroquímico
CPE – (do inglês *carbon paste electrode*) – Eletrodo de pasta de carbono
CPE/PVP – Eletrodo de pasta de carbono modificado com poli(vinilpirrolidona)
CV – (do inglês *cyclic voltammetry*) – Voltametria cíclica
DP – Desvio padrão
DPV – (do inglês *differential pulse voltammetry*) – Voltametria de pulso diferencial
E – Potencial
EA – eletrodo auxiliar
 E_{po} – Potencial de pico de oxidação
 E_{pr} – Potencial de pico de redução
EQM – Eletrodo quimicamente modificado
eV – Elétron-volt
 f – frequência de pulso
GC – (do inglês *gas chromatography*) – Cromatografia gasosa
HPLC – (do inglês *high performance liquid chromatography*) – Cromatografia líquida de alta eficiência
 i – Corrente
 i_p – Corrente de pico
LC – (do inglês *liquid chromatography*) – Cromatografia líquida
LC/MS – (do inglês *liquid chromatography-mass spectrometry*) – Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa
LC/UV – (do inglês *liquid chromatography-ultraviolet detection*) – Cromatografia líquida acoplada ao detector de ultravioleta
LD – Limite de detecção
LQ – Limite de quantificação
LSV – (do inglês *linear scan voltammetry*) – Voltametria de varredura linear
 m/v – Massa/volume
 m/z – Razão massa/carga
nm – Nanômetro
Pt – Platina

PVP – Poli(vinilpirrolidona)

RSD – Desvio padrão relativo

SWV – (do inglês *square wave voltammetry*) – Voltametria de onda quadrada

V – “Volt”, unidade de potencial

v/v – Volume/volume

UV-vis – Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 27 |
| 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... | 29 |
| 2.1 Eletrodos de pasta de carbono..... | 29 |
| 2.2 Eletrodos quimicamente modificados..... | 30 |
| 2.3 Poli(vinilpirrolidona)..... | 31 |
| 2.4 Compostos fenólicos..... | 32 |
| 2.4.1 <i>Quercetina.....</i> | <i>34</i> |
| 2.4.2 <i>Canferol.....</i> | <i>36</i> |
| 2.5 Determinação analítica de compostos fenólicos..... | 37 |
| 2.6 Técnicas eletroanalíticas..... | 40 |
| 3 OBJETIVOS..... | 43 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 43 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 43 |
| 4 PARTE EXPERIMENTAL..... | 45 |
| 4.1 Reagentes, soluções e amostras..... | 45 |
| 4.1.1 <i>Reagentes.....</i> | <i>45</i> |
| 4.1.2 <i>Soluções.....</i> | <i>45</i> |
| 4.1.3 <i>Amostras.....</i> | <i>45</i> |
| 4.2 Instrumentação..... | 46 |
| 4.2.1 <i>Medidas eletroquímicas.....</i> | <i>46</i> |
| 4.2.2 <i>Medidas de espectroscopia UV-vis.....</i> | <i>46</i> |
| 4.3 Metodologia..... | 47 |
| 4.3.1 <i>Preparação do eletrodo de pasta de carbono.....</i> | <i>47</i> |
| 4.3.2 <i>Medidas eletroquímicas.....</i> | <i>47</i> |
| 4.3.3 <i>Medidas espectroscópicas.....</i> | <i>47</i> |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 49 |
| 5.1 Estudos com a quercetina..... | 49 |
| 5.1.1 <i>Comportamento eletroquímico da quercetina.....</i> | <i>49</i> |
| 5.1.2 <i>Otimização das condições experimentais.....</i> | <i>52</i> |
| 5.1.3 <i>Estudo da velocidade de varredura.....</i> | <i>57</i> |
| 5.1.4 <i>Seleção e otimização da técnica eletroanalítica.....</i> | <i>60</i> |
| 5.1.5 <i>Curva de calibração.....</i> | <i>64</i> |
| 5.1.6 <i>Repetibilidade intra e inter dia e estabilidade do eletrodo.....</i> | <i>66</i> |
| 5.1.7 <i>Determinação eletroanalítica em amostra farmacêutica.....</i> | <i>68</i> |
| 5.1.8 <i>Método comparativo.....</i> | <i>69</i> |
| 5.1.9 <i>Seletividade, precisão e exatidão.....</i> | <i>72</i> |
| 5.2 Estudos com o canferol..... | 74 |
| 5.2.1 <i>Comportamento voltamétrico do canferol sobre o CPE/PVP.....</i> | <i>74</i> |
| 5.2.2 <i>Otimização das condições experimentais.....</i> | <i>75</i> |
| 5.2.3 <i>Estudo da velocidade de varredura.....</i> | <i>79</i> |
| 5.2.4 <i>Seleção e otimização da técnica eletroanalítica.....</i> | <i>81</i> |

| | |
|---|-----------|
| 5.2.5 Curva de calibração | 84 |
| 5.2.6 Repetibilidade intra e inter dia | 87 |
| 5.2.7 Seletividade do método | 87 |
| 5.2.8 Determinação de compostos fenólicos totais em amostras vegetais | 88 |
| 5.2.9 Método comparativo | 90 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS..... | 95 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 97 |

1 INTRODUÇÃO

Os fenóis constituem uma classe de compostos encontrada em larga escala na natureza, principalmente em plantas. São responsáveis pelas propriedades organolépticas e de coloração de muitas frutas e flores (CAMPANELLA *et al.*, 1993). Os teores de compostos fenólicos totais em alimentos dependem principalmente da genética, mas podem ser influenciados também por fatores como estação do ano, clima, composição do solo, estado de maturação, preparo, processamento e estocagem (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008). O interesse no estudo desta classe de compostos e principalmente a necessidade de sua caracterização e quantificação em matrizes complexas vem adquirindo cada vez mais importância devido à sua utilização nas indústrias (farmacêutica e de alimentos), bem como em diferentes áreas do conhecimento (medicina, química e biologia).

As detecções de compostos fenólicos são relatadas na literatura como sendo principalmente através de métodos espectrofotométricos e cromatográficos. Porém, a metodologia eletroquímica vem se tornando bastante difundida, principalmente com a utilização de eletrodos modificados. Com o aperfeiçoamento das técnicas eletroanalíticas, os sensores eletroquímicos ganharam novos espaços em diversas áreas da pesquisa, permitindo a detecção e quantificação de substâncias em níveis de concentração cada vez menores. Dentre as espécies de interesse, podemos destacar os compostos fenólicos. A exemplo das modernas e sofisticadas técnicas analíticas, as principais vantagens das metodologias voltamétricas são o baixo custo e a rapidez operacional (SOUZA *et al.*, 2004), o que as torna uma excelente alternativa às demais técnicas analíticas.

Nesse sentido, este trabalho pretende utilizar um sensor eletroanalítico baseado na modificação da pasta de carbono com poli(vinilpirrolidona), já aplicado em outro trabalho na determinação de rutina em amostras farmacêuticas. Neste trabalho, o objetivo foi investigar o comportamento eletroquímico da quercetina e do canferol e realizar a determinação quantitativa destes e de outros compostos fenólicos em amostras farmacêuticas e vegetais.

Para fins de apresentação, esta dissertação foi dividida em seis capítulos, além deste introdutório. É apresentada no capítulo 2 uma revisão bibliográfica sobre os temas em estudo. Nos capítulos 3 e 4 são apresentados os objetivos e a parte experimental, respectivamente. Os resultados para a metodologia de determinação de quercetina e de quantificação de compostos fenólicos totais são apresentados no capítulo 5, juntamente com a discussão sobre eles. No capítulo 6 são feitas as considerações finais do trabalho e, finalmente no capítulo 7 são exibidas as referências bibliográficas que foram utilizadas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Eletrodos de pasta de carbono

A primeira proposta de um eletrodo de pasta de carbono (CPE, *do inglês carbon paste electrode*) é atribuída a Adams, e ocorreu quando este tentava preparar um eletrodo gotejante de grafite para ser utilizado em potenciais positivos, onde o mercúrio metálico apresenta oxidação (ADAMS, 1958). Desde então a proposta sofreu um expressivo desenvolvimento e o CPE tornou-se um dos sensores mais empregados para determinação de compostos eletroativos em solução. A pasta de carbono é resultante da mistura de grafite em pó ou outro material carbonáceo e um líquido orgânico, denominado agente aglutinante. Este agente serve para preencher os espaços entre as partículas de grafite, formando uma pasta compacta que possibilita sua fixação ao eletrodo. Tamanho uniforme, alta pureza química e baixa capacidade de adsorção de impurezas eletroativas são propriedades indispensáveis ao pó de grafite. O aglutinante deve ser quimicamente inerte e imiscível em soluções aquosas, além de possuir baixa volatilidade, alta viscosidade e elevada pureza. A parafina e o óleo mineral são aglutinantes não condutores amplamente utilizados para esta aplicação. Os CPEs apresentam diversas vantagens em relação a outros tipos de eletrodos, como por exemplo, versatilidade, baixo custo, baixa corrente de fundo, facilidade de renovação da superfície, ampla faixa de potencial de trabalho e fácil construção (KALCHER *et al.*, 1995; ŠVANCARA; SCHACHL, 1999).

Além de todas estas características, uma das principais vantagens de utilizar a pasta de carbono para a construção de sensores é a possibilidade de modificação interna do material, diferentemente do que ocorre com eletrodos sólidos convencionais, em que a modificação ocorre apenas na superfície do eletrodo. Com o avanço das pesquisas em eletroanálise, estudos têm sido realizados com o objetivo principal de se obter novos sensores com desempenho analítico superior para aplicação na determinação de compostos. Deste modo, diferentes materiais como, polímeros, componentes biológicos (ex.: enzimas, tecidos vegetais, etc.), complexos biomiméticos, nanotubos de carbono, líquidos iônicos, nanopartículas, entre outros, vêm sendo incorporados aos CPEs tradicionais, dando origem aos CPEs modificados, os quais serão abordados no próximo subtítulo desta fundamentação (ŠVANCARA *et al.*, 2001; PEREIRA *et al.*, 2002; CRESPILO; REZENDE, 2007; FERNANDES *et al.*, 2008; FRANZOI *et al.*, 2008; FRANZOI *et al.*, 2009 A; ŠVANCARA *et al.*, 2009 A e B; FRANZOI *et al.*, 2011).

2.2 Eletrodos quimicamente modificados

Devido à crescente necessidade de identificação e quantificação de analitos de forma rápida, específica e em quantidades de amostras muito pequenas, foram desenvolvidos eletrodos quimicamente modificados (EQM). O termo eletrodo quimicamente modificado foi inicialmente utilizado na eletroquímica por MOSES e colaboradores em 1975 para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas, convenientemente imobilizadas em suas superfícies com o objetivo de pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução. A modificação do eletrodo normalmente confere a este as características físico-químicas (reatividade, seletividade, sensibilidade, etc.) do modificador, possibilitando assim o desenvolvimento de dispositivos com respostas adequados para diferentes propósitos e aplicações (MOSES; WIER; MURRAY, 1975).

Os eletrodos quimicamente modificados vêm sendo muito utilizados nas últimas décadas (MOSES; WIER; MURRAY, 1975; PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002; SOUZA, 1997). Do ponto de vista analítico a sensibilidade e/ou a seletividade de uma determinação deve aumentar com a utilização de um EQM para que seu uso seja justificado. Isto pode ser obtido por meio de um ou mais dos seguintes fenômenos: pré concentração, eletrocatalise e exclusão de interferentes. Em geral a obtenção de sensibilidades mais altas ocorre por pré concentração da espécie de interesse ou por eletrocatalise, sendo que a aplicação de qualquer destes princípios resulta em inerente aumento da seletividade. Ganhos adicionais neste item podem ser alcançados pela utilização de recobrimento com membranas poliméricas que bloqueiam o acesso de espécies interferentes à superfície do eletrodo (SOUZA, 1997).

Atualmente, com o desenvolvimento de novos métodos eletroanalíticos e de novos materiais para a construção de sensores, tem sido necessário um intenso trabalho de investigação da eletroquímica tanto do material suporte como do agente modificador.

A modificação do material suporte pode ser realizada de diferentes maneiras, sendo que as mais utilizadas são: i) adsorção: consiste na dissolução do agente modificador em um solvente apropriado e na exposição, em geral por imersão, do eletrodo na solução; ii) eletrodeposição: ocorre pela deposição de uma espécie na superfície do eletrodo mediante a aplicação de um potencial apropriado; iii) formação de compósitos: consiste em adicionar um agente modificador (ou solução deste) ao substrato do eletrodo, de modo a formar um compósito; iv) ligação covalente: neste tipo de modificação, o modificador é ligado covalentemente à superfície do eletrodo e v) adição de filmes poliméricos:

imobilização de policamadas da espécie ativa na superfície do eletrodo (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002).

Em particular, a modificação de um eletrodo de pasta de carbono é feita pela adição de diferentes classes de compostos à mistura de pó de grafite e agente aglutinante, resultando na formação de um compósito com propriedades particulares. Tais compósitos apresentam características condutoras e podem ser aplicados no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. A utilização de agentes modificadores com diferentes propriedades físico-químicas permite a preparação de sensores aplicáveis a inúmeras finalidades.

Dessa forma, a rapidez, o baixo custo da modificação, os baixos limites de detecção e a grande gama de aplicações, são as principais vantagens dos sensores quimicamente modificados, tornando estes uma alternativa extremamente viável aos métodos tradicionais de análise. Neste trabalho otimizou-se a utilização de um eletrodo de pasta de carbono modificado com poli(vinilpirrolidona), cujas características são descritas a seguir.

2.3 Poli(vinilpirrolidona)

A poli(vinilpirrolidona) (PVP) é um polímero com inúmeras propriedades, entre elas, a mais documentada é a de extrair compostos fenólicos de sucos de frutas e extratos de plantas (BORNEMAN; GOKMEN; NIJHUIS, 2001). No entanto, estudos sobre o uso de PVP para a construção ou modificação de eletrodos são ainda pouco encontrados (FRANZOI; SPINELLI; VIEIRA, 2008; YANG; WANG; HU, 2006; HE; DANG; HU; HU, 2004). Em um estudo, a rutina, um flavonóide com uma estrutura química semelhante à da quercetina, foi determinada usando um eletrodo de pasta de carbono modificado com PVP (FRANZOI; SPINELLI; VIEIRA, 2008). Os autores relataram que a PVP favorece a adsorção da rutina na superfície do eletrodo, devido à formação de ligações de hidrogênio entre o grupo imida da PVP e o grupo hidroxila da rutina. Esta propriedade de adsorção foi explorada para a acumulação de rutina sobre a superfície do sensor. Depois de um tempo de pré-concentração de 10 min, a curva de calibração, obtida por voltametria de varredura linear, apresentou boa linearidade no intervalo de concentração de rutina de 0,39 a 13,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O limite de detecção foi de 0,15 $\mu\text{mol L}^{-1}$. No entanto, este sensor não foi testado para outros compostos fenólicos usando diferentes técnicas eletroanalíticas e condições experimentais. Nesse sentido, o foco deste trabalho foi utilizar um CPE modificado com PVP, como o que acabamos de descrever, para ser empregado na determinação de compostos fenólicos. A otimização das condições experimentais foi efetuada, com o objetivo de

propor uma metodologia que não necessitasse de pré-concentração, diminuindo assim o tempo das análises.

2.4 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (LEE *et al.*, 2005). Os compostos fenólicos de maior ocorrência natural apresentam-se conjugados com mono e polissacarídeos, através de um ou mais dos grupos fenólicos, e podem também ocorrer como derivados funcionais, como ésteres e metil ésteres. A atividade antioxidante dos

compostos fenólicos depende da sua estrutura, particularmente do número e posição dos grupos hidroxila e da natureza das substituições nos anéis aromáticos. Existem cerca de 8.000 diferentes compostos fenólicos que, de acordo com sua estrutura química, são divididos em classes: ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e taninos. Dentre as classes de compostos fenólicos presentes em plantas e reconhecidos como principais componentes da dieta estão principalmente os flavonóides e os ácidos fenólicos (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006).

Os flavonóides são comumente utilizados com a finalidade de inibir ou retardar a oxidação lipídica de óleos, gorduras e alimentos gordurosos, são empregados na indústria de alimentos, e por essa propriedade são conhecidos também como agentes antioxidantes.

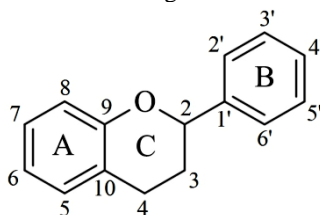
De acordo com a Food and Drug Administration (FDA), antioxidantes são substâncias que podem retardar ou inibir a oxidação de lipídios e/ou outras moléculas, evitando o início ou propagação das reações de oxidação em cadeia (ADEGOKE *et al.*, 1998). Pode-se definir antioxidante, de modo mais amplo, como substâncias que em pequenas concentrações (0,01% ou menos), na presença de substratos oxidáveis, retardam ou previnem significativamente a oxidação dos mesmos (HALLIWELL, 1996; MELO; GUERRA, 2002). Todavia, do ponto de vista químico, os antioxidantes são compostos aromáticos que contem pelo menos uma hidroxila. De acordo com seu mecanismo de ação, os antioxidantes podem ser classificados como sequestradores de radicais livres (reagem com radicais livres interrompendo a propagação de reações); como captadores de oxigênio (desativam o oxigênio singlete que pode iniciar uma nova cadeia de propagação de radicais livres); ou como quelantes de íons metálicos capazes de catalisar a peroxidação lipídica (SÁNCHEZ-MORENO; LAURRAURI; CALIXITO-SAURA, 1999).

Os antioxidantes podem ser divididos em duas subclasses: naturais ou sintéticos. Os flavonóides constituem uma importante classe de

antioxidantes naturais frequentemente encontrados em diversas plantas, frutas e vegetais. A maioria dos compostos dessa classe possui 15 átomos de carbono no núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas (C6-C3-C6). Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas anéis A, B e C e os átomos de carbono recebem a numeração com números ordinários para os núcleos A e C e os mesmos números seguidos de uma linha (') para o núcleo B (Figura 1) (PIETTA, 2000; SIMÕES *et al.*, 2001).

Os flavonóides apresentam-se frequentemente como agliconas, glicosídeos e derivados metilados e são divididos em classes de acordo com o nível de oxidação do anel C, as quais incluem as antocianidinas, flavanóis (catequinas), flavonas, flavonóis, flavanonas e isoflavonas entre outras (HAVSTEEN, 1983; AHERNE *et al.*, 2002; HEIM *et al.*, 2002).

Figura 1 - Estrutura geral dos flavonóides



Fonte: adaptado de PIETTA, 2000.

Além da indústria de alimentos, a utilização de flavonóides como agentes antioxidantes têm chamado atenção de pesquisadores também nas áreas nutricional e médica, devido ao seu elevado potencial na prevenção de doenças crônicas e degenerativas (KANATT; CHANDER; SHARMA, 2007). Os flavonóides, por exemplo, constituem uma grande e importante classe de compostos com atividades biológicas como antimalarial, anticarcinogênica, citotóxica, mutagênica e antimicrobiana, as quais são atribuídas a sua capacidade redutora (SUN; WANG; WUA, 2007).

Segundo diversos autores, o interesse econômico pelos flavonóides é decorrente de suas propriedades particulares, como por exemplo, o fato de alguns apresentarem cor e poderem ser usados como pigmentos, sua importância no processo de tanagem, na fermentação do chá-da-índia, manufatura do cacau e por conferirem cor e valor nutricional a alguns alimentos e principalmente por suas atividades biológicas e farmacológicas (SADIK *et al.*, 2003; CAI *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2006).

São conhecidos mais de 4200 flavonóides, sendo que o número de novas estruturas identificadas praticamente dobrou nas últimas décadas. Os

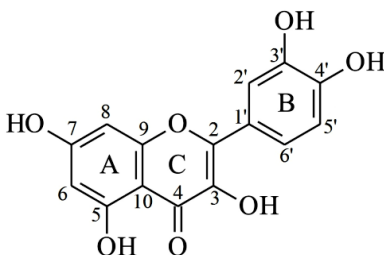
flavonóides consumidos a partir da dieta são absorvidos através do estômago e intestino. São metabolizados principalmente no fígado, sendo a mucosa intestinal, túbulos renais, pulmão, pele e placenta sítios secundários de metabolização. Seus metabólitos são excretados principalmente na urina e nas fezes (ONG; KHOO, 2000).

As aplicações terapêuticas dos flavonóides no tratamento e prevenção de doenças em humanos são demonstradas em vários estudos. Entre as aplicações médicas dos flavonóides mais bem documentadas estão o uso no tratamento e prevenção de alergias, asma e inflamação. Os efeitos benéficos também estão relacionados em doenças como o câncer, doenças cardiovasculares, catarata diabética e cirrose (ONG; KHOO, 1996). Apresentam ainda propriedades hepatoprotetoras, anti-trombóticas e antivirais (SAIJA *et al.*, 1995; ONG; KHOO, 2000; SIMÕES *et al.*, 2001; VESSAL *et al.*, 2003).

Os flavonóides utilizados para esta pesquisa foram a quercetina e o canferol, os quais foram escolhidos pela facilidade de serem encontrados em matrizes farmacêuticas e naturais e também por apresentarem estruturas semelhantes à analitos já utilizados em outros estudos do grupo de pesquisa. As propriedades físico-químicas destes dois flavonóides são bastante semelhantes, e são descritas a seguir.

2.4.1 Quercetina

A quercetina (5,7,3',4' tetrahidroxi-flavonol, Figura 2) é um flavonóide que pertence à classe dos flavonóis e que foi identificada pela primeira vez na espécie vegetal *Quercus sp*, da qual originou-se seu nome trivial (SIMÕES *et al.*, 2001). Esse flavonol é encontrado sob a forma de um sólido amorfo amarelo, em geral dihidratado, com ponto de fusão de 314 °C, é solúvel em etanol, acetona, acetato de etila e em soluções aquosas alcalinas, e pouco solúvel em água (SIMÕES *et al.*, 2001). A fórmula química molecular é $C_{15}H_{10}O_7 \cdot 2 H_2O$ e a massa molar é de 338,27 g mol⁻¹. Apresenta em sua estrutura o grupo catecol no anel B (C-3' e C4'), o substituinte OH na posição C-3, a carbonila em C-4 e a insaturação entre C-2 e C-3 no anel C. A Figura 2 mostra detalhadamente a estrutura química da quercetina, a numeração dos átomos de carbono e a denominação de cada anel.

Figura 2 - Estrutura química da quercetina

Fonte: adaptado de MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ *et al.*, 2010.

A quercetina é encontrada nas espécies vegetais (por exemplo, foi isolada das folhas da espécie vegetal *Eugenia jambolana* (TIMBOLA *et al.*, 2002), nas frutas, nos vegetais e nas bebidas, além de ser o principal flavonol presente na dieta humana, sendo particularmente abundante nas cebolas (cerca de 0,3 mg/g) e nos chás (10 a 25 mg/L⁻¹) (MOURE *et al.*, 2001).

Nas análises espectroscópicas da quercetina descritas por diversos autores, observa-se que: i) no espectro de ultravioleta há duas bandas de absorção máxima, uma mais intensa entre 350 e 390 nm (Banda I) devido à presença do anel B, e outra de menor intensidade situada entre 240 e 290 nm (Banda II) referente ao anel A (JORGENSEN *et al.*, 1998); ii) no espectro de infravermelho as principais bandas de absorção são as relacionadas a sistemas aromáticos (1609, 1562, 1522 cm⁻¹), à função carbonila α,β -insaturada (1666 cm⁻¹) e a grupos hidroxila (3408 cm⁻¹) (JORGENSEN *et al.*, 1998); iii) no espectro de massas por impacto eletrônico em 70 eV aparece um pico correspondente ao íon molecular de m/z 302 u.m.a. representante da fórmula molecular C₁₅H₁₀O₇, sem as moléculas de água de hidratação (JORGENSEN *et al.*, 1998).

A quercetina possui três hidrogênios ionizáveis, sendo $pK_{a1} = 6,74$, $pK_{a2} = 9,02$ e $pK_{a3} = 11,55$ a 20 °C. Rice-Evans e colaboradores (RICE-EVANS; PACKER, 1998), em seus estudos de correlação estrutural-atividade de flavonóides revelam que a dissociação dos substituintes hidroxilas OH ocorre na seguinte sequência: 7-OH > 4'-OH > 5-OH. Todavia, Lemanska e colaboradores (LEMANSKA *et al.*, 2001) mostram em seus estudos sobre a influência do pH sobre as propriedades antioxidantes e sobre o mecanismo de ação antioxidante de flavonóides que a sequência de dissociação é: 4'-OH > 7-OH > 3'-OH > 3-OH > 5-OH, porém descrevem apenas três valores de pK_a . A desprotonação dos substituintes OH situados em B-4' e/ou A-7 é facilitada e atribuída à

possibilidade de deslocalização de carga do ânion para o grupo carbonila presente em C-4 (LEMANSKA *et al.*, 2001).

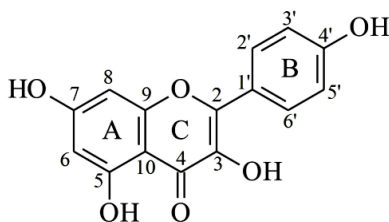
A quercetina apresenta efeitos benéficos à saúde e exerce múltiplas atividades biológicas, muitas destas dependentes do elevado poder antioxidante que este flavonol apresenta. As atividades biológicas importantes incluem: antioxidante, antialérgica, antiinflamatória e antiviral. Também encontra-se disponível no mercado na forma purificada, o que permite seu uso na forma isolada, entretanto o emprego em produtos farmacêuticos e cosméticos é ainda um tanto restrito devido à sua reduzida hidrossolubilidade. (AHERNE; O'BRIEN, 2002; BRETT; GHICA, 2003; HOFFMANN-RIBANI *et al.*, 2009; KORKINA; AFANAS'EV, 1997).

É importante salientar que a quercetina não apresenta apenas propriedades benéficas ao metabolismo celular, mas também possui efeitos citotóxicos e mutagênicos responsáveis por muitos processos degenerativos. Diante disso, nos últimos anos o número de publicações revelando as propriedades biológicas e o mecanismo de atuação da quercetina aumentou significativamente (KORKINA; AFANAS'EV, 1997).

2.4.2 Canferol

O canferol (5,7,4' trihidroxi-flavonol, Figura 3) é um flavonóide encontrado em diversas plantas comestíveis como brócolis, repolho, couve, feijão, escarola, alho-poró, tomate, morango, uva, entre outros. Possui fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_6$ e massa molar de $286,23 \text{ g mol}^{-1}$. Apresenta-se como um sólido amarelo cristalino com ponto de fusão de $278 \text{ }^\circ\text{C}$. É pouco solúvel em água, mas altamente solúvel em etanol e éter dietílico.

Figura 3 - Estrutura química do canferol



Fonte: adaptado de CHEN *et al.*, 2000.

Estudos epidemiológicos demonstraram uma associação positiva entre o consumo de alimentos ricos em canferol e o risco reduzido de desenvolvimento de câncer (LEE *et al.*, 2010; CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2011).

Estudos demonstram que o canferol é um agente antioxidante forte que ajuda a prevenir o dano oxidativo das células, lipídios e DNA. Previne também a arteriosclerose através da inibição da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade e a formação de plaquetas no sangue.

Estudos também confirmaram que canferol atua como um agente quimiopreventivo, o que significa que inibe a formação de células cancerosas. Um estudo realizado *in vitro* (KOWALSKI *et al.*, 2005) mostrou que o canferol inibe a proteína quimioatrativa de monócitos (MCP-1). A MCP-1 desempenha um papel importante nas etapas iniciais da formação da placa aterosclerótica. Os flavonóides canferol e quercetina também parecem agir em sinergia na redução da proliferação celular de células cancerígenas, o que significa que os tratamentos combinados com quercetina e canferol são mais eficazes do que os efeitos de cada flavonóide isolado. Esta foi uma conclusão obtida a partir de um estudo realizado por Ackland e colaboradores (ACKLAND *et al.*, 2005) intitulado “*ação antiproliferativa sinérgica dos flavonóis quercetina e canferol em culturas de células de câncer humano*”.

Em outro estudo, realizado na Universidade de Chiang Mai, na Tailândia, pesquisadores descobriram que o canferol pode ajudar no combate ao câncer, também de outra forma, reduzindo a resistência das células cancerosas às drogas anti-câncer (LIMTRAKUL *et al.*, 2005).

Além da propriedade anticarcinogênica, estudos pré-clínicos demonstraram que o canferol possui outras propriedades farmacológicas incluindo atividade antiinflamatória, antimicrobiana, cardioprotetora, neuroprotetora, antidiabética, antiestrogênica, analgésica e antialérgica (LEE *et al.*, 2010a; LEE *et al.*, 2010b; CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2011). Estudos comprovaram que o canferol como agente anticarcinogênico é muito menos tóxico para as células normais, em comparação com medicamentos de quimioterapia padrão (ZHANG *et al.*, 2008).

Por outro lado, o canferol pode atuar não somente como um potente promotor de apoptose, mas também é capaz de modificar uma série de vias de sinalização celular, provocando desequilíbrio no funcionamento das células (RAMOS, 2007).

2.5 Determinação analítica de compostos fenólicos

Nos últimos anos diversas novas metodologias vêm sendo desenvolvidas para a análise de flavonóides: HPLC (MIEAN; MOHAMED, 2001; HOFFMANN-RIBANI *et al.*, 2009; HUBER *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2009), CE-ED (CHEN, *et al.*, 2000; CAO, *et al.*, 2001; CAO *et al.*, 2002; XU, *et al.*, 2007; CHEN, *et al.*, 2008 A e B), espectrofotometria (HASSAN, *et al.*, 1999; PEJIC, *et al.*, 2004) e também, técnicas

eletroanalíticas utilizando eletrodos modificados (HE *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2006; XU; KIM, 2006; JIN *et al.*, 2009).

Outros métodos cromatográficos, tais como cromatografia em papel e em camada delgada, também são bastante utilizados (PETERSON; DWYER, 1998). A detecção através de espectrometria de massas *tandem* também se mostrou útil na determinação da quercetina e de seus metabólitos em fluidos biológicos (WITTIG *et al.*, 2001).

No entanto, a técnica mais frequentemente utilizada ainda é a espectroscopia no ultravioleta, podendo-se citar o método desenvolvido e avaliado por Petrovick e colaboradores (PETROVICK, 1993). Pejić e outros autores (PEJIĆ *et al.*, 2004) desenvolveram um método espectrofotométrico para determinação de quercetina na sua forma isolada e em preparações farmacêuticas, utilizando solução etanólica a 50% em 370 nm. O método foi aplicado na determinação em cápsulas contendo quercetina e vitamina C, comercializadas com o nome de *Quercetin+C Twinlab*[®].

Com relação à técnica de HPLC, recentemente foi desenvolvido um método com o intuito de separar as três principais substâncias constituintes da *A. satureioides*: quercetina, 3-O-metilquercetina e luteolina, e de padronizar de forma eficiente preparações fitofarmacêuticas (DE SOUZA *et al.*, 2002). A otimização deste método, com ênfase na quercetina possibilitou o desenvolvimento e a validação da técnica cromatográfica, proposta por Webber (WEBBER *et al.*, 2003), que apresenta um tempo de análise consideravelmente menor do que o método original.

Em outro trabalho, pesquisadores usaram a técnica de LC-MS para determinar a absorção, metabolismo e excreção do canferol através de um estudo farmacocinético em fluidos biológicos humanos (DUPONT *et al.*, 2004). Neste trabalho, chicória foi ingerida pelos pacientes como fonte de canferol. Os autores determinaram por LC-MS a concentração de canferol no plasma sanguíneo e na urina após um período de 24 h.

No entanto, o elevado custo da instrumentação necessária para a execução destas técnicas, bem como a dificuldade de preparação das amostras, limitam seu uso em alguns casos. Nesse sentido, as técnicas eletroanalíticas surgem como uma alternativa simples, de baixo custo e com alta sensibilidade para análise de flavonóides. Nesse contexto, JANEIRO e BRETT (2004) investigaram a oxidação eletroquímica da (+)- catequina utilizando as técnicas de voltametria cíclica (CV), voltametria de pulso diferencial (DPV) e voltametria de onda quadrada (SWV).

Devido ao aumento do interesse em relação à determinação eletroquímica de quercetina, um grande número de sensores e técnicas tem sido propostos. Alguns trabalhos relatando os resultados mais recentes obtidos foram selecionados e são aqui detalhados. A determinação de quercetina e rutina através da análise por injeção em fluxo e eletroforese

capilar utilizando detecção eletroquímica foi recentemente descrita (MAGNUSZEWSKA; KROGULEC, 2013). Em outro estudo, um polímero molecularmente impresso com base no polipirrol com óxido de grafeno foi fabricado e utilizado para a determinação eletroquímica da quercetina (SUN *et al.*, 2013). A curva de calibração obtida por voltametria de pulso diferencial, em solução tampão Britton-Robinson (pH 3,5) foi linear para concentrações no intervalo de 0,6-15,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com um limite de detecção de 48 nmol L^{-1} . O eletrodo mostrou boa estabilidade e reprodutibilidade. Os flavonóides com estruturas químicas semelhantes como rutina e morina não interferiram na determinação da quercetina. A determinação eletroquímica da quercetina também foi estudada por voltametria de onda quadrada sobre um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro auto-organizadas nas superfícies de p-aminotiofenol e óxido de grafeno (YOLA; ATAR, 2014). A faixa de linearidade para a curva de calibração de quercetina foi de 1,0 a 10,0 pmol L^{-1} , com um limite de detecção de 0,3 pmol L^{-1} . O sensor foi aplicado com sucesso para a determinação de quercetina em preparações farmacêuticas. Em outro trabalho, um eletrodo de grafite com 5-amino-2-mercapto-1,3,4-tiadiazol eletroquimicamente polimerizado foi utilizado para o monitoramento eletroquímico de quercetina (MUTI *et al.*, 2013). Um aumento de seis vezes no sinal de quercetina foi obtido utilizando o eletrodo modificado em relação ao eletrodo não modificado. A oxidação eletroquímica da quercetina em tampão citrato foi investigada usando um eletrodo de Nafion modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (ZHU; SUJARI; AB GHANI, 2013). Empregando voltametria de onda quadrada com redissolução anódica e usando os parâmetros otimizados, o teor de quercetina mostrou-se entre 2,89 mg g^{-1} e 4,21 mg g^{-1} em frutos secos e congelados de *Acanthopanax sessiliflorus* (*A. sessiliflorus*), respectivamente. Um procedimento usando a técnica de voltametria de pulso diferencial foi proposto para a determinação de quercetina em solução aquosa usando um simples eletrodo de carbono (SATPATI *et al.*, 2011). O limite de detecção obtido usando este material foi de 38,5 nmol L^{-1} . Um eletrodo de nanotubos de carbono modificado com micropartículas de cobre foi construído e vem sendo utilizado para a determinação da quercetina em suco de maçã (OLIVEIRA; MASCARO, 2011). O desempenho do eletrodo de nanotubo modificado foi comparado com o eletrodo não modificado para a determinação de quercetina e um limite de detecção inferior foi obtido. Nanopartículas de Co_3O_4 também foram usadas como agente modificador para eletrodos de carbono vítreo para preparar um sensor para a determinação de quercetina (WANG *et al.*, 2011). O comportamento eletroquímico de quercetina sobre o sensor foi estudado através de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada. Sob condições ótimas, as correntes de pico foram linearmente dependentes das concentrações de

quercetina na faixa de 0,5-330 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com um limite de detecção de 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Este método foi aplicado com sucesso para determinar a concentração de quercetina em cápsulas de *Ginkgo biloba* e amostras de folhas e de urina humana.

Com relação à determinação de compostos fenólicos totais por técnicas eletroanalíticas, foram desenvolvidos biossensores amperométricos a base de tirosinase e lacase. Estes biossensores apresentaram uma excelente sensibilidade para diferentes classes de compostos fenólicos e a grande versatilidade apresentada por eles permitiu o desenvolvimento de diferentes dispositivos, tais como, eletrodos impressos, sensores remotos e sistema de análise em fluxo com célula de diálise. Tais sistemas foram empregados no monitoramento de espécies fenólicas em efluentes de uma indústria de papel, e os níveis de detecção e quantificação foram inferiores a $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (FREIRE, 2002). Em outro trabalho, autores propuseram um biossensor para polifenóis, baseado na modificação de eletrodo de carbono vítreo com nanopartículas bimetálicas (Pt-Pd) dispersas no líquido iônico 1-butil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato (Pt-Pd-BMI.PF₆) em conjunto com uma enzima peroxidase (PO) de couve-flor, imobilizados em nanoargila. Utilizou-se a técnica de voltametria de onda quadrada e o biossensor apresentou boa repetibilidade e reprodutibilidade, baixo limite de detecção (na ordem de $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) para o ácido cafeico (CA), e adequada estabilidade (manutenção de 80% da resposta em mais de 80 dias de avaliação). Sob condições otimizadas o biossensor foi aplicado na determinação do índice de polifenóis em amostras comerciais de vinho branco, usando CA como padrão. A recuperação de CA a partir de amostras de vinho variou entre 95,5-108,3%. Os valores para o método proposto apresentou uma boa correlação ($R = 0,990$) com os valores obtidos com a metodologia espectrofotométrica (método de Folin-Ciocalteu) (PUSCH *et al.*, 2013).

Estudos realizando a determinação de canferol de maneira isolada são raramente encontrados. Esta observação é justificada pelo pequeno número de amostras nas quais seja encontrado apenas o canferol, e que sejam isentas de outros flavonóides.

2.6 Técnicas eletroanalíticas

A química eletroanalítica compreende um conjunto de técnicas baseadas nas propriedades elétricas como corrente, potencial, condutividade, resistência ou carga de um analito, o qual está imerso em solução numa cela eletroquímica. Estudos sobre processos de oxidação e redução em vários meios, adsorção em superfícies e mecanismos de transferência de elétrons, inclusive com a utilização de eletrodos

modificados, são algumas das numerosas aplicações das técnicas eletroanalíticas (SOUZA *et al.*, 2003; SKOOG *et al.*, 2006).

Segundo RUPP e ZUMAN (1992), uma grande vantagem destas técnicas é a possibilidade de, muitas vezes, a medida ser realizada diretamente na amostra, sem necessidade de etapas de purificação ou de separações prévias. Além disso, não é necessária a adição de outros reagentes para análise, pois o analito interage diretamente com a superfície do eletrodo. Tais técnicas também tornam possível a análise de materiais coloridos ou amostras contendo partículas sólidas. Além disso o desenvolvimento da instrumentação eletroanalítica contribuiu intensamente na melhoria da sensibilidade destas técnicas. Atualmente os limites de detecção e quantificação já podem ser comparados aos de outros métodos, se utilizadas técnicas de pulso e de redissolução.

Além disso, rapidez, baixo custo, possibilidade de miniaturização e facilidade de operação dos instrumentos, são outros fatores que levaram ao desenvolvimento de técnicas eletroanalíticas cada vez mais sensíveis e adequadas para a quantificação de espécies de interesse em diferentes áreas de estudo, tais como medicina, bioquímica, química ambiental e de alimentos (SOUZA *et al.*, 2003; SKOOG *et al.*, 2006).

Neste trabalho as técnicas eletroanalíticas utilizadas foram a voltametria cíclica (CV), para otimização das condições experimentais e realização dos estudos cinéticos, e voltametria linear (LSV), de onda quadrada (SWV) e de pulso diferencial (DPV), para avaliar qual das 3 técnicas apresenta a maior sensibilidade na determinação de quercetina e canferol. Na construção das curvas de calibração e na determinação nas amostras, optou-se por utilizar a SWV, justamente por esta se mostrar mais sensível que as demais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Otimizar uma metodologia eletroanalítica baseada na utilização de um CPE modificado com PVP, para ser aplicada na determinação de compostos fenólicos em matrizes farmacêuticas e naturais.

3.2 Objetivos específicos

- Aplicar um eletrodo de pasta de carbono modificado com PVP, já descrito na literatura (FRANZOI *et al.*, 2008), na determinação eletroanalítica de flavonóides, visando propor uma metodologia simples, segura, de baixo custo e com geração mínima de resíduos;
- Investigar eletroquimicamente o processo de oxidação e redução da quercetina e do canferol sobre a superfície do eletrodo modificado;
- Selecionar a técnica que apresenta maior sensibilidade na determinação eletroanalítica dos flavonóides (SWV, DPV ou LSV);
- Avaliar e otimizar os parâmetros experimentais da metodologia (pH e eletrólito suporte, proporção de PVP, parâmetros da SWV);
- Aplicar a metodologia proposta na determinação de quercetina em amostra farmacêutica e de compostos fenólicos totais em amostras vegetais.
- Estudar os possíveis interferentes na determinação dos analitos;
- Avaliar a repetibilidade e a estabilidade das respostas eletroquímicas dos sensores;
- Comparar os resultados da metodologia proposta com os obtidos através dos métodos oficiais.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes, soluções e amostras

4.1.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho apresentavam grau analítico e foram utilizados sem purificação prévia. Quercetina e canferol, entre outros padrões analíticos foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os reagentes utilizados no preparo das soluções tampão foram: ácido acético (CH_3COOH), acetato de sódio (NaCH_3COO), ácido bórico (H_3BO_3), ácido fosfórico (H_3PO_4) e fosfato monossódico de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). NaOH e HCl também foram adquiridos da Sigma-Aldrich com grau de pureza analítica. A PVP foi gentilmente cedida para este trabalho pelo Grupo de Estudo em Materiais Poliméricos (POLIMAT-UFSC) e apresentava massa molar de $1.300.000 \text{ g mol}^{-1}$.

4.1.2 Soluções

Para o preparo das soluções, utilizou-se água Milli-Q, obtida em um sistema Millipore (Bedford, MA, USA), com resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$. Todas as soluções tampão foram preparadas na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e posteriormente tiveram os valores de pH ajustados com soluções de HCl ou NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. A solução estoque de quercetina foi preparada em etanol absoluto na concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. A solução estoque de canferol foi preparada na concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de água e etanol absoluto (30:70, v/v). As soluções tampão e estoque foram mantidas sob temperatura inferior a $5 \text{ }^\circ\text{C}$ por no máximo 90 dias e mostraram-se estáveis nestas condições.

4.1.3 Amostras

A amostra referente à formulação farmacêutica de cápsulas de quercetina foi preparada mediante abertura manual de 5 cápsulas. A massa obtida para as 5 cápsulas foi de 1,7 g. Em seguida, realizou-se dissolução da massa média referente a uma cápsula (0,34 g) em etanol absoluto. A solução resultante foi diluída tomando-se $170 \mu\text{L}$ da mesma e completando o volume com etanol absoluto até 25 mL. $500 \mu\text{L}$ da solução final foram adicionados na célula eletroquímica para realizar as determinações.

Para a determinação de compostos fenólicos totais foram utilizados quatro vegetais diferentes: espinafre, brócolis, couve verde e chicória, todos adquiridos em um supermercado da região de Florianópolis, SC, Brasil. Os vegetais foram lavados com água destilada e secos a temperatura de $25,0 \pm$

0,5 °C. A extração dos fenóis totais destas matrizes foi realizada pela maceração de 5 g da planta fresca (folhas, flores e caule) juntamente com 100 mL de solução de etanol absoluto e água (70:30, v/v), pelo período de 10 min. Em seguida foram adicionados mais 100 mL de etanol e a mistura foi submetida a banho ultrassônico por 10 min. Por fim, os extratos etanólicos foram filtrados em papel de porosidade média (25 µm) e armazenadas sob temperatura inferior a 5 °C por no máximo 48 h. Para as determinações de compostos fenólicos totais, efetuou-se adições de 100 µL do extrato etanólico à célula eletroquímica contendo o eletrólito suporte.

4.2 Instrumentação

4.2.1 Medidas eletroquímicas

As medidas voltamétricas foram realizadas num potenciostato/galvanostato da marca *PalmSens* (Palm Instruments BV, The Netherlands), interfaciado a um computador com o *software PStace* (versão 2.5.2) para aquisição e processamento dos dados. Utilizou-se uma célula eletroquímica de três eletrodos, contendo o CPE/PVP como eletrodo de trabalho ($A = 0,314 \text{ mm}^2$), um eletrodo de Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹ KCl) como referência e uma placa de Pt como eletrodo auxiliar, com área geométrica superior à do eletrodo de trabalho.

Todas as medidas de pH foram realizadas usando um pHmetro da marca *HANNA* (HANNA Instruments Inc., Woonsocket, USA) modelo HI 2221. Um ultrassom *UNIQUE* (*UNIQUE*, São Paulo, Brasil) modelo *UltraCleaner 800* foi utilizado no preparo de algumas soluções, para auxiliar na dissolução dos reagentes. Para promover a agitação da solução na célula eletroquímica, utilizou-se um agitador magnético *IKA* (*IKA-Werke GmbH & Co.KG*, Staufen, Alemanha) modelo *IKA lab disc*.

4.2.2 Medidas de espectroscopia UV-vis

As medidas de espectroscopia de UV-vis para a quantificação da quercetina foram realizadas usando o espectrofotômetro *Agilent Cary 60* (Agilent Technologies, United States) e uma célula de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm. Para a determinação de fenóis totais utilizou-se um espectrofotômetro monocromático da marca *Micronal* (*Micronal SA*, São Paulo, Brasil) modelo B572 e uma célula de vidro com caminho óptico de 1,0 cm.

4.3 Metodologia

4.3.1 Preparação do eletrodo de pasta de carbono

O CPE/PVP foi preparado pela maceração manual de 10 mg (5% m/m) de PVP e 160 mg (80% m/m) de grafite em pó durante 10 min, a fim de obter uma dispersão uniforme do polímero no grafite em pó. Em seguida adicionou-se 30 mg (15% m/m) de óleo mineral e macerou-se por 20 min para obtenção da pasta. A pasta modificada foi introduzida numa seringa plástica com volume de 1,0 mL e um fio de cobre foi inserido para obtenção do contato elétrico. Entre as medidas, o eletrodo foi polido manualmente sobre uma folha de papel, a fim de se obter uma superfície renovada. Para fins de comparação, foram preparados eletrodos com quantidades diferentes de PVP a saber: 5, 10, 20, 30 e 40 % m/m. Um CPE sem modificação também foi preparado. Neste caso, a proporção de grafite foi 85% e de óleo 15% (m/m).

4.3.2 Medidas eletroquímicas

As medidas de voltametria foram feitas, em 10 mL de solução tampão (Britton–Robinson (B-R), fosfato ou acetato), na faixa de pH compreendida entre 2,0 e 12,0, a $25,0 \pm 0,5$ °C e todos os potenciais foram medidos vs. Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹ KCl). Os parâmetros da voltametria de onda quadrada (amplitude, frequência e incremento) foram otimizados, sendo que as faixas investigadas foram: $a = 10$ a 100 mV; $f = 10$ a 100 Hz e $\Delta E_s = 1$ a 10 mV. Na construção das curvas de calibração, adições sucessivas das soluções estoque de quercetina e de canferol foram realizadas com uma micropipeta. Após cada adição, a solução da célula era agitada e, retirada a agitação, os voltamogramas de onda quadrada eram registrados.

No estudo do canferol, a interferência de outros compostos fenólicos foi avaliada utilizando soluções etanólicas de miricetina, luteolina, ácido cafeico, ácido ascórbico, rutina e quercetina, todas na concentração de 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

4.3.3 Medidas espectroscópicas

Para a quantificação da quercetina usando espectroscopia UV-vis realizou-se as leituras no comprimento de onda entre 300 a 450 nm. Utilizou-se soluções no intervalo de concentração de 3,0 a 35,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A absorbância máxima para tais soluções foi avaliada em 373 nm.

A concentração de fenóis totais foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Singleton & Rossi (SINGLETON; ROSSI, 1965).

Em um tubo de ensaio, foram adicionados: a) 2,35 mL de água Milli-Q; b) 100 μL de amostra (ou volumes diferentes de solução estoque) e c) 150 μL de reagente de Folin-Ciocalteu (mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstico). Após 6 min de incubação foram adicionados 450 μL de solução aquosa de Ca_2CO_3 a 20% (m/v). Em seguida, as amostras foram mantidas a temperatura ambiente ($25,0 \pm 0,5$ °C) e sob ausência de luz pelo período de 2 h. Por fim, foram efetuadas leituras de absorbância em 765 nm. Para a quantificação de fenóis totais nas amostras foi empregada uma curva de calibração com solução estoque de canferol na faixa de concentração de 1,8 a 6,5 mg L^{-1} . O teor de fenóis totais foi expresso em mg equivalente de canferol (EC)/g de planta *in natura*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudos com a quercetina

5.1.1 Comportamento eletroquímico da quercetina sobre o CPE/PVP

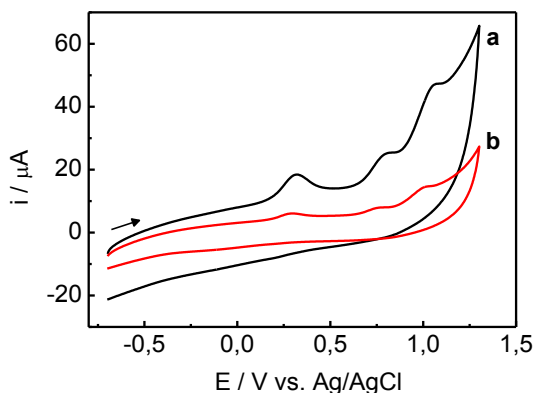
Medidas eletroquímicas preliminares utilizando CV foram realizadas a fim de investigar o comportamento geral da quercetina na superfície dos eletrodos.

A

Figura 4 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para a quercetina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) realizados com o sensor CPE/PVP entre $-0,7$ e $+1,3 \text{ V}$ numa velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . O primeiro ciclo (

Figura 4a) exibiu claramente três picos de oxidação bem definidos em $+0,32 \text{ V}$, $+0,78 \text{ V}$ e $+1,04 \text{ V}$ na varredura direta. Não foram observados picos de redução na varredura inversa.

Figura 4 - Voltamogramas cíclicos para quercetina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ sobre o CPE/PVP em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0), $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, (a) 1º ciclo e (b) 2º ciclo.



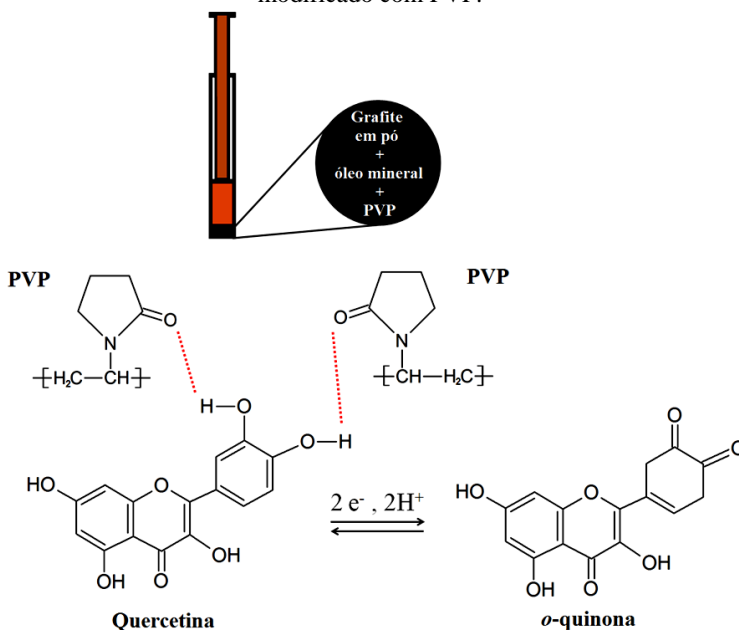
Este comportamento foi semelhante ao observado anteriormente por outros autores (TIMBOLA *et al.*, 2006). Para o segundo ciclo (

Figura 4b) e os ciclos seguintes (dados não mostrados) observou-se uma diminuição significativa nos valores de corrente, indicando que a superfície do eletrodo é bloqueada pela forte adsorção de reagente e dos produtos da reação de oxidação. A adsorção de flavonóides tem sido

atribuída à formação de uma ligação de hidrogênio entre os grupos hidroxila do composto fenólico e o grupo carbonila presente na PVP. Esta propriedade já foi usada e descrita por outros pesquisadores para propor um sensor à base de PVP para determinação de rutina (FRANZOI; SPINELLI; VIEIRA, 2008). No entanto, para obtenção de bons resultados o trabalho descreve uma metodologia em que é necessário um tempo de acumulação de 10 min.

A Figura 5 ilustra a oxidação da quercetina à sua *o*-quinona correspondente sobre a superfície do CPE/PVP, e as interações que ocorrem entre a molécula do flavonóide e a superfície do eletrodo.

Figura 5 - Representação da reação redox da quercetina na superfície do CPE modificado com PVP.



Fonte: Adaptado de FRANZOI *et al.*, 2008.

Muitos pesquisadores têm estudado o mecanismo eletroquímico dos flavonóides em geral, bem como da quercetina (JORGENSEN *et al.*, 1998; HOTTA *et al.*, 2001; BRETT; GHICA, 2003; TIMBOLA *et al.*, 2006; MEDVIDOVIC-KOSANOVIC *et al.*, 2010). Esses trabalhos mostram que a oxidação da quercetina ocorre nos grupos OH, como representado na Figura 5, resultando na formação da *o*-quinona correspondente. Outros autores

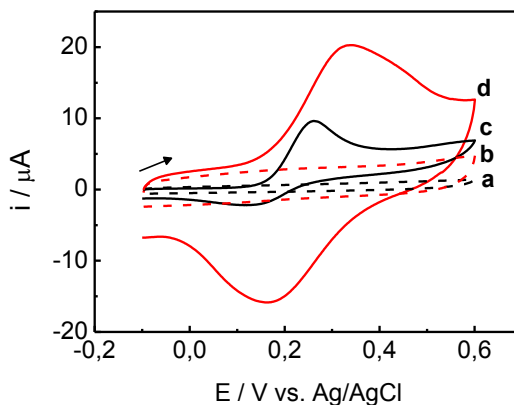
também sugerem a formação deste mesmo produto, o qual é um composto instável que pode sofrer reações químicas homogêneas tais como rearranjos intramoleculares (HENDRICKSON, *et al.*, 1994; JORGENSEN *et al.*, 1998; YANG *et al.*, 2001; BRETT; GHICA, 2003).

A Figura 6 mostra os voltamogramas cíclicos para quercetina 1,0 mmol L⁻¹ em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0), sobre o CPE e o CPE/PVP. O intervalo de potencial escolhido corresponde ao intervalo de potencial que compreende o primeiro pico mostrado na

Figura 4.

Como esperado, na ausência de quercetina não foram observados picos para o CPE (Figura 6a) e o CPE/PVP (Figura 6b). Por outro lado, na presença do flavonóide, um pico de oxidação bem definido em 0,25 V e um pequeno pico de redução em 0,14 V foram observadas utilizando o CPE (Figura 6c). Para o sensor CPE/PVP (Figura 6d) os picos observados foram em 0,32 V para a oxidação e 0,17 V para a redução. Além disso, o CPE modificado apresentou melhor resposta, expresso pelo aumento significativo nos valores das correntes de oxidação e de redução e também um aumento na reversibilidade da reação, comparado ao eletrodo não modificado.

Figura 6 - Voltamogramas cíclicos sobre o CPE (a e c) e o CPE/PVP (b e d) na ausência e na presença de quercetina 1,0 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0), $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



Como citado anteriormente, a oxidação da quercetina ocorre no grupo catecol no anel B, levando à formação da orto-quinona correspondente, através de uma reação envolvendo dois elétrons e dois prótons. O primeiro pico (+0,32 V) está associado a este processo. Se o

potencial é invertido antes de o segundo pico (antes de +0,7 V), a reação é reversível ou, pelo menos, quase-reversível, e um pico de redução é claramente observado (Figura 6c-d). Além disso, a formação dos produtos do segundo e terceiro picos e sua adsorção na superfície do eletrodo, não são observadas. Este comportamento foi investigado com o objetivo de avaliar a aplicabilidade do sensor CPE/PVP para a determinação isolada de quercetina. Assim, todas as experiências descritas nas seções seguintes foram realizadas no intervalo de potencial mostrado na Figura 6.

5.1.2 Otimização das condições experimentais

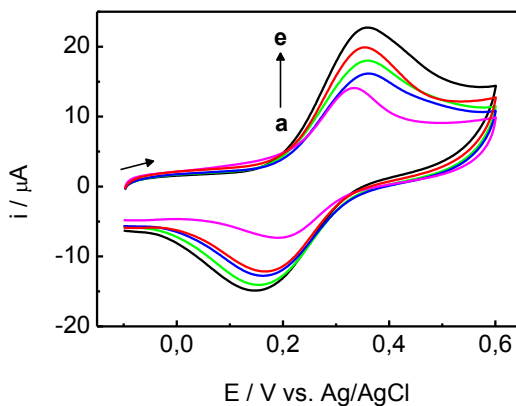
A fim de otimizar a resposta do sensor, alguns parâmetros experimentais foram estudados, são eles: porcentagem de PVP e pH e composição do eletrólito suporte.

5.1.2.1 Proporção de agente modificador

Para a preparação do eletrodo não modificado utilizou-se a proporção 80:15 (m/m) de pó de grafite: óleo mineral. No entanto, como mencionado anteriormente, o polímero usado como agente modificador promove a adsorção de quercetina na superfície do eletrodo, influenciando a sua resposta redox. Por isso, o efeito da porcentagem de PVP foi investigado no intervalo de 5 a 40% (m/m).

A Figura 7 mostra os voltamogramas cíclicos para CPE com diferentes proporções de PVP. Observou-se que o aumento na quantidade de PVP não provocou aumento do sinal analítico, mas pelo contrário: para quantidades mais elevadas de PVP (acima de 5%) os perfis voltamétricos apresentaram menores valores de i_{pa} e i_{pc} . Para proporção acima de 40% a consistência da pasta e a resposta voltamétrica foram menos satisfatórias. Assim, a proporção de PVP escolhida para a construção do sensor foi de 5% (m/m).

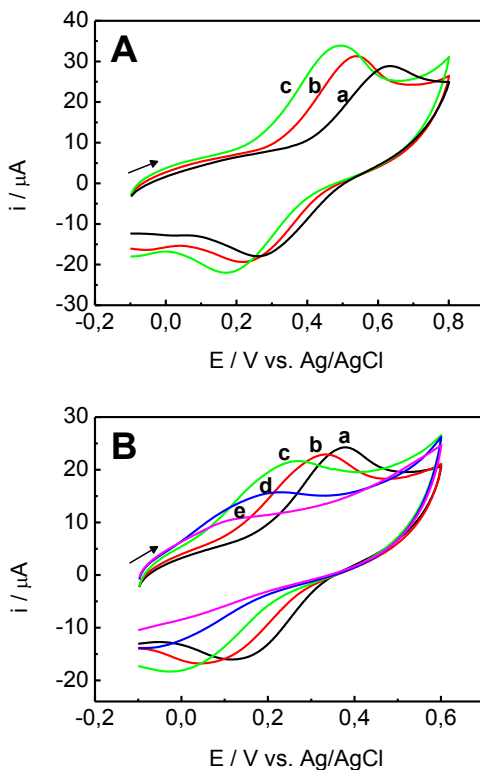
Figura 7 - Voltamogramas cíclicos para quercetina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) sobre o CPE/PVP; (a - e) = 40, 30, 20, 10, 5% de PVP, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



5.1.2.2 pH e natureza do eletrólito suporte

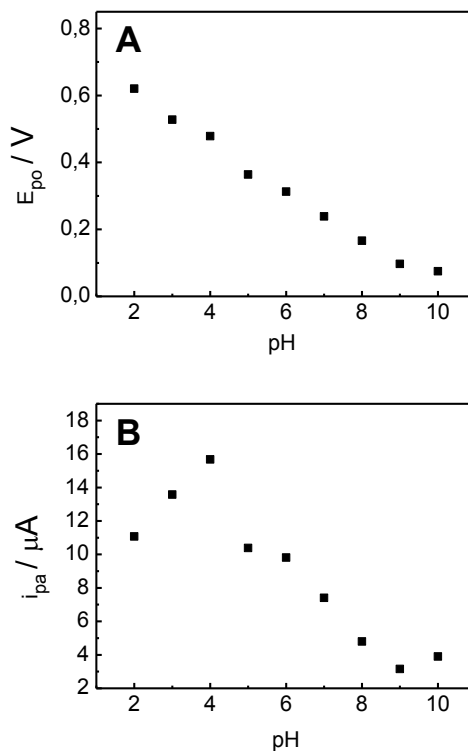
A influência da natureza e do pH do eletrólito suporte também foi investigada. Variando o pH do eletrólito suporte na faixa de 2,0 a 12,0 (utilizando solução tampão B-R) observou-se maiores valores de corrente de oxidação e de redução em pH inferiores a 5,0 (Figura 8). Em valores de pH maiores que 9,0 nenhum sinal redox foi observado.

Figura 8 - Voltamogramas cíclicos para quercetina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sobre o CPE/PVP. (A) (a) pH 2,0, (b) pH 3,0 e (c) pH 4,0; (B) (a) pH 5,0, (b) pH 6,0, (c) pH 7,0, (d) pH 8,0 e (e) pH 9,0, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



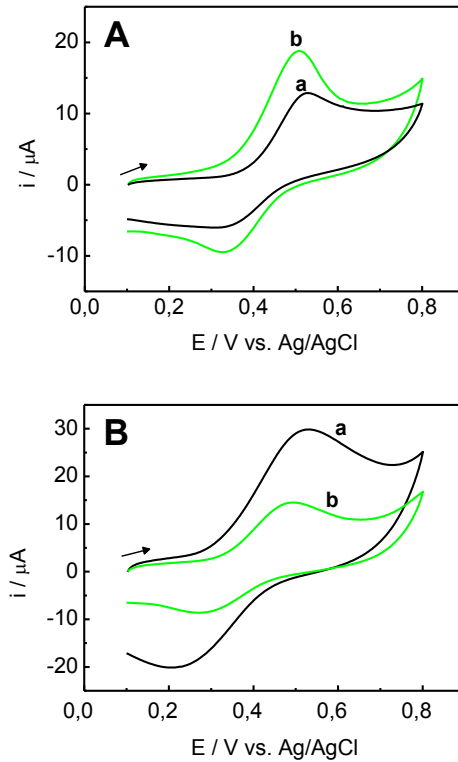
A Figura 9A mostra o deslocamento do potencial de pico de oxidação em função do pH do eletrólito suporte. Observa-se que o potencial do pico de oxidação desloca-se para valores menos positivos à medida que o pH da solução aumenta. O coeficiente angular da reta ($70,3 \text{ mV}$) está condizente com o valor característico de processos que envolvem o mesmo número de prótons e elétrons ($59,2 \text{ mV}$). A Figura 9B mostra como a corrente de pico anódico varia em função do pH do eletrólito suporte. Os experimentos foram feitos em triplicata e os melhores resultados foram obtidos no intervalo de pH de 2,0 a 5,0. Os pHs compreendidos nesse intervalo foram avaliados no próximo estudo relacionado à natureza do eletrólito suporte.

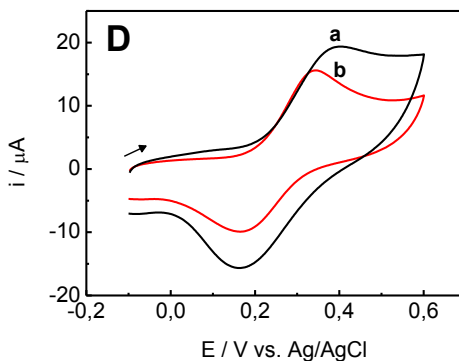
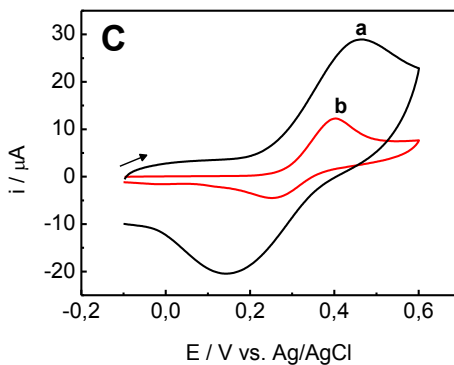
Figura 9 - Variação (A) do potencial de pico de oxidação e (B) da corrente de pico anódico em função do pH do eletrólito suporte para $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de quercetina em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão B-R sobre o CPE/PVP por voltametria cíclica, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



Tais resultados indicam que a quercetina apresenta melhor resposta eletroquímica em pHs ácidos. Assim, selecionou-se os valores de pH na faixa de 2,0, a 5,0 para investigar a influência da natureza do eletrólito na resposta eletroquímica da quercetina. A Figura 10 apresenta os voltamogramas cíclicos para quercetina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos e pHs.

Figura 10 - Voltamogramas cíclicos para quercetina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ sobre o CPE/PVP obtidos em (A) pH 2,0 e (B) pH 3,0 em (a) tampão B-R e (b) tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; (C) pH 4,0 e (D) pH 5,0 em (a) tampão B-R e (b) tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.





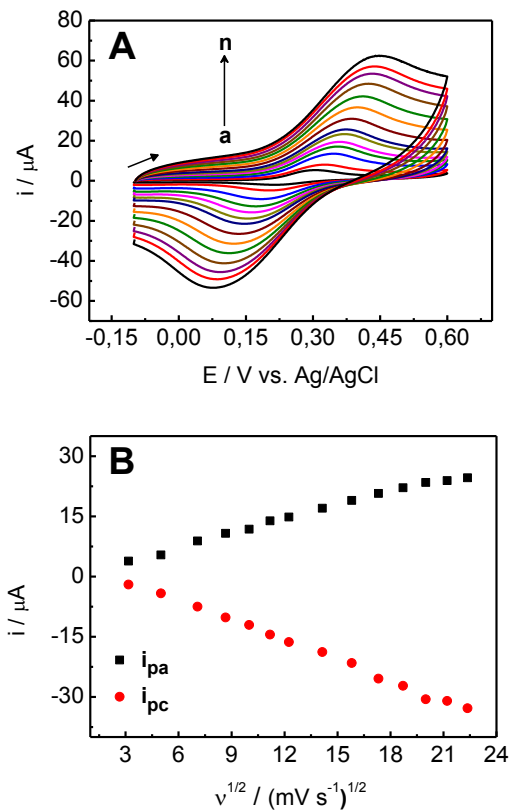
Observam-se alterações significativas nas respostas tanto com relação ao formato do voltamograma, quanto aos valores de corrente de pico. O melhor compromisso entre as correntes anódica e catódica e o perfil voltamétrico foi observado em tampão acetato pH 5,0 (Figura 10D, curva b), o qual foi selecionado para o desenvolvimento da metodologia.

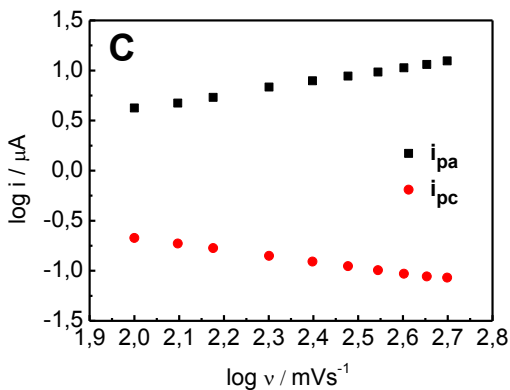
5.1.3 Estudo da velocidade de varredura

A Figura 11A mostra o efeito da velocidade de varredura (v) sobre o perfil voltamétrico da quercetina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0) sobre o CPE/PVP. A influência da velocidade de varredura foi estudada num intervalo de 10 a 500 mV s^{-1} . Em todas as varreduras um par redox foi observado, sendo que para velocidades superiores a 300 mV s^{-1} os picos de oxidação e de redução apresentaram menor definição. Os resultados indicam que a quercetina e a *o*-quinona correspondente podem

co-existir na superfície do sensor. Os potenciais de oxidação (E_{po}) e redução (E_{pr}) apresentaram deslocamento para valores mais positivos e negativos, respectivamente, proporcionalmente ao aumento da velocidade de varredura, indicando um comportamento característico de reações quase-reversíveis. Além disso, a razão entre as corrente de pico catódico e anódico (i_{pc}/i_{pa}) tem um pequeno desvio de 1,0. Para investigar a relação entre as correntes de pico e a velocidade de varredura, foram obtidos os valores de i_{pa} e i_{pc} , como mostrado na Figura 11B. As correntes de ambos os picos foram linearmente proporcionais à raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$). As equações de regressão linear correspondente são $i_{pa} / \mu A = 0,732 + 1,122 v^{1/2} / (mV s^{-1})^{1/2}$ ($R = 0,992$) e $i_{pc} / \mu A = 4,104 - 1,668 v^{1/2} / (mV s^{-1})^{1/2}$ ($R = 0,996$). Estes resultados indicam que a reação redox da quercetina sobre o CPE/PVP é um processo controlado por difusão. Além disso, o gráfico de $\log i$ vs. $\log v$ (Figura 11C) apresenta uma inclinação de 0,67 para a reação de oxidação e 0,58 para a reação de redução, confirmando assim, que ambas as reações são controladas por difusão, porém há uma pequena contribuição da adsorção. Sendo a reação redox da quercetina controlada por adsorção, optou-se por não realizar etapa de pré-concentração do analito sobre a superfície do eletrodo, facilitando assim as medidas e principalmente diminuindo o tempo das análises.

Figura 11 - (A) Voltamogramas cíclicos para quercetina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0), (a - n) $v = 10$ a 500 mV s^{-1} ; (B) gráfico de i_p vs. $v^{1/2}$; (C) gráfico de $\log i$ vs. $\log v$.

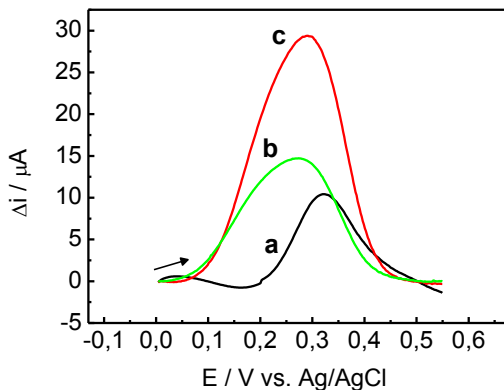




5.1.4 Seleção e otimização da técnica eletroanalítica

Foram investigadas diferentes técnicas eletroanalíticas a fim de avaliar a sensibilidade destas para a determinação de quercetina. Utilizou-se as voltametrias linear (LSV), de onda quadrada (SWV) e de pulso diferencial (DPV). Utilizou-se uma concentração de quercetina de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0), e as medidas foram realizadas sobre o CPE/PVP. Os parâmetros de cada técnica foram ajustados de modo a se obter a mesma velocidade de varredura durante todas as medidas. A Figura 12 mostra a sobreposição dos voltamogramas obtidos utilizando as três técnicas. Observa-se que o voltamograma de SWV (curva c) exibe maior sensibilidade nesta análise, pois apresenta maior sinal de corrente resultante quando comparado aos voltamogramas obtidos pelas outras técnicas. Este resultado era esperado, uma vez que a DPV e a LSV fornecem somente o valor da corrente de oxidação ou da corrente de redução (dependendo do sentido de variação do potencial), enquanto que a corrente resultante (Δi) na SWV é a diferença das correntes de oxidação e redução e, como estas têm sinais opostos, Δi será sempre maior do que os valores de i_{pa} e i_{pc} isolados. Neste caso, sendo a reação da quercetina um processo quase-reversível, este efeito foi observado. Assim, a otimização da metodologia foi direcionada para a utilização da SWV a qual, para a finalidade desejada, demonstrou-se mais sensível que as demais.

Figura 12 - Voltamogramas para quercetina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0) sobre o CPE/PVP: (a) LSV, (b) DPV e (c) SWV, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



5.1.4.1 Otimização dos parâmetros da SWV

A otimização dos parâmetros da técnica eletroanalítica é de extrema importância para se obter um maior valor de corrente resultante, o que implica no aumento da sensibilidade da técnica.

Assim, os parâmetros instrumentais investigados foram a frequência de aplicação dos pulsos (f), o incremento de potencial (ΔE_s) e a amplitude de pulso (a). Para a escolha da condição ideal de trabalho, observou-se o perfil voltamétrico que exibisse o melhor compromisso entre a intensidade de corrente resultante e a resolução dos picos.

A otimização dos parâmetros de SWV foi realizada em uma solução de quercetina $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0). Os intervalos estudados foram: frequência (f) = 10 a 100 Hz; amplitude (a) = 10 a 100 mV e incremento (ΔE_s) = 1 a 10 mV. As respostas de Δi com a variação destes parâmetros são mostradas na

Figura 13. Na

Figura 13A observa-se que à medida que a frequência aumenta, ocorre um aumento nos valores de corrente resultante, até o valor de 60 Hz (valor selecionado), sendo que para frequências maiores o valor da corrente resultante permanece praticamente constante. Para o incremento (

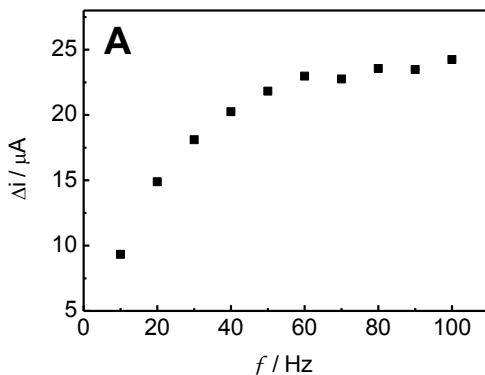
Figura 13B), ocorre um aumento da corrente resultante com o aumento do incremento até o valor de 4 mV. Para incrementos maiores uma queda significativa de corrente foi observada. A velocidade de varredura em SWV é obtida pelo produto da frequência e do incremento, sendo que o aumento dos valores de corrente obtidos em relação ao aumento dos valores desses dois parâmetros é um resultado esperado. No estudo de variação da amplitude (

Figura 13C), a maior resposta de corrente resultante foi obtida em 100 mV.

Ao final, selecionou-se os valores que proporcionaram o melhor perfil voltamétrico associado a maior intensidade de corrente, sendo que em todos os casos, o valor escolhido coincidiu com o melhor perfil do voltamograma e com a maior intensidade de corrente. Todos os parâmetros otimizados para a aplicação da metodologia, bem como os valores estudados estão resumidos na

Tabela 1.

Figura 13 - Dependência da corrente resultante com a variação da (A) frequência ($a = 80$ mV e $\Delta E_s = 3$ mV); (B) incremento ($a = 80$ mV e $f = 60$ Hz) e (C) amplitude ($f = 60$ Hz e $\Delta E_s = 4$ mV) para quercetina $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0).



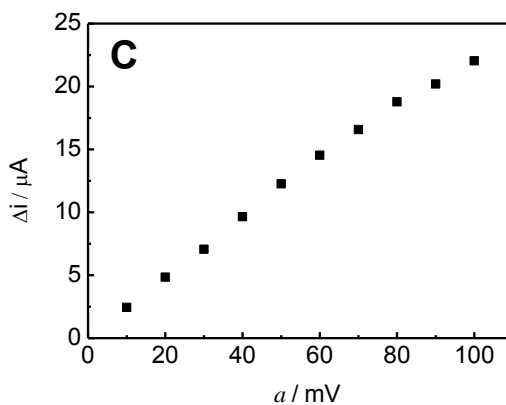
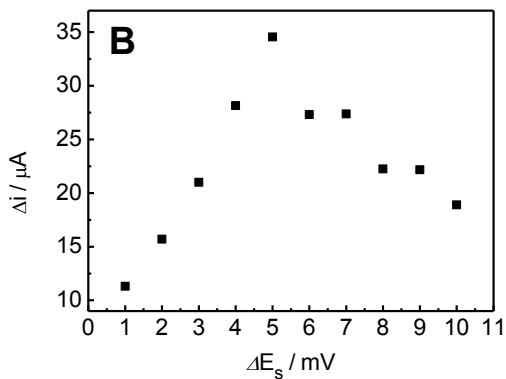


Tabela 1 - Otimização dos parâmetros para a determinação de quercetina.

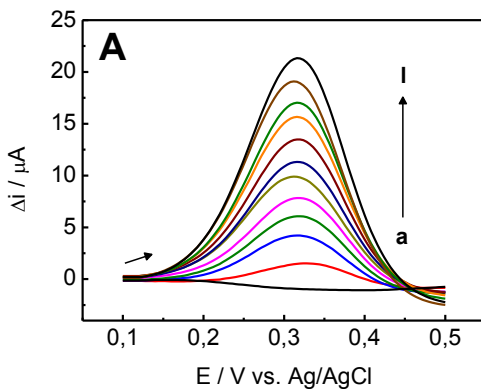
| Parâmetro | Intervalo estudado | Valor selecionado |
|-----------------------------|--|-------------------|
| Proporção PVP | 5 - 40 % | 5% |
| Eletrólito/ pH | B-R (2,0 - 12,0) Fosfato (2,0 - 3,0) Acetato (4,0 - 5,0) | Acetato/ 5,0 |
| Frequência (f) | 10 - 100 Hz | 60 Hz |
| Amplitude (a) | 10 - 100 mV | 100 mV |
| Incremento (ΔE_s) | 1 - 10 mV | 4 mV |

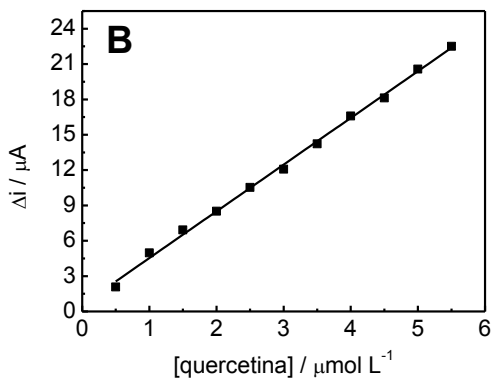
5.1.5 Curva de calibração

Empregando as condições experimentais otimizadas (

Tabela 1), a curva de calibração foi obtida mediante seguidas adições de alíquotas de solução padrão de quercetina à solução do eletrólito suporte. A Figura 14A mostra os voltamogramas de onda quadrada para sucessivas adições de quercetina. É observado um pico bem definido em +0,31 V, cuja corrente resultante aumenta proporcionalmente com o aumento da concentração de quercetina. A curva de calibração (Figura 14B) apresentou boa linearidade no intervalo de concentração de 0,5 a 5,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com coeficiente de correlação da reta de 0,998.

Figura 14 - (A) Voltamogramas de onda quadrada para (a) branco, (b) quercetina 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (c) 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (d) 1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (e) 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (f) 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (g) 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (h) 3,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (i) 4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (j) 4,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (k) 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (l) 5,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1} (pH 5,0), $f = 60$ Hz; $a = 100$ mV e $\Delta E_s = 4$ mV; (B) Curva de calibração para a quercetina.





As características analíticas extraídas da curva de calibração são mostradas na Tabela 2. A curva de calibração pode ser expressa de acordo com a equação $i/\mu\text{A} = 0,57 + 3,96 [\text{quercetina}]/\mu\text{mol L}^{-1}$. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados de acordo com as seguintes equações:

$$\text{LD} = 3,3 \frac{\text{DP}}{a} \quad (\text{Equação 1})$$

$$\text{LQ} = 10 \frac{\text{DP}}{a} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde DP é o desvio padrão do coeficiente linear e a é o coeficiente angular da reta. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram de $0,17 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,52 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 2 - Características analíticas da curva de calibração da quercetina.

| Parâmetro | Valor |
|--|----------------------|
| Potencial de pico (V) | 0,31 |
| Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | 0,5 a 5,5 |
| Coefficiente de correlação (R^2) | 0,998 |
| Coefficiente angular ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$) | 3,96 |
| Desvio padrão do coeficiente angular ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$) | $6,1 \times 10^{-2}$ |
| Coefficiente linear (μA) | 0,570 |
| Desvio padrão do coeficiente linear (μA) | 0,208 |
| LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | 0,17 |
| LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | 0,52 |
| Repetibilidade de Δi (<i>intradia</i>) (%) ^{a,b} | 2,68 |
| Repetibilidade de Δi (<i>interdia</i>) (%) ^{a,b} | 2,05 |

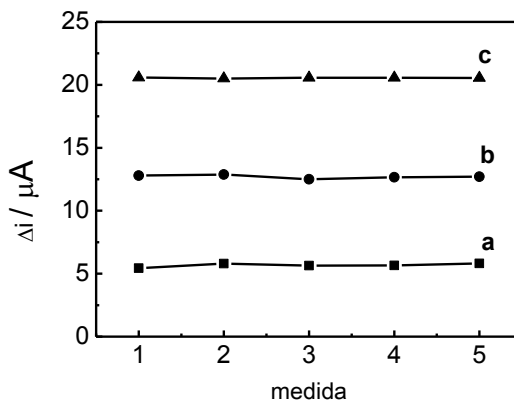
^a Desvio padrão relativo.

^b $n = 5$.

5.1.6 Repetibilidade intra e inter dia e estabilidade do eletrodo

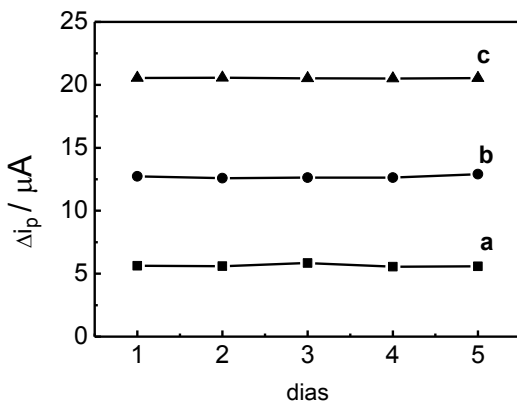
A repetibilidade *intra dia* do CPE/PVP foi avaliada medindo as correntes de pico nos voltamogramas de onda quadrada cinco vezes seguidas utilizando o mesmo eletrodo, sendo a superfície renovada após cada medida. Efetuou-se as medidas em três diferentes concentrações de quercetina, a saber: $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, em solução tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,0). Como pode ser observado na Figura 15, as correntes de pico sofreram pequena variação durante as medidas. O desvio padrão relativo para as medidas ($n = 5$) variou de 0,1% (para o ponto de maior concentração) até 2,7% (para o ponto de menor concentração).

Figura 15 - Respostas de Δi para medidas sucessivas de diferentes concentrações de quercetina (a) $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (b) $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (c) $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0) sobre o CPE/PVP; $f = 60 \text{ Hz}$; $a = 100 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$.



Para avaliar a repetibilidade *inter dia* repetiu-se o mesmo procedimento em cinco dias seguidos, utilizando o mesmo eletrodo. As correntes de pico para as medidas realizadas em diferentes dias mostraram-se muito similares, conforme mostrado na Figura 16. Obteve-se um desvio padrão relativo ($n = 5$) que variou de 0,1% (para o ponto de maior concentração) a 2,1% (para o ponto de menor concentração).

Figura 16 - Respostas de Δi_p para medidas *inter dia* de diferentes concentrações de quercetina (a) $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (b) $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (c) $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0) sobre o CPE/PVP; $f = 60 \text{ Hz}$; $a = 100 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$.



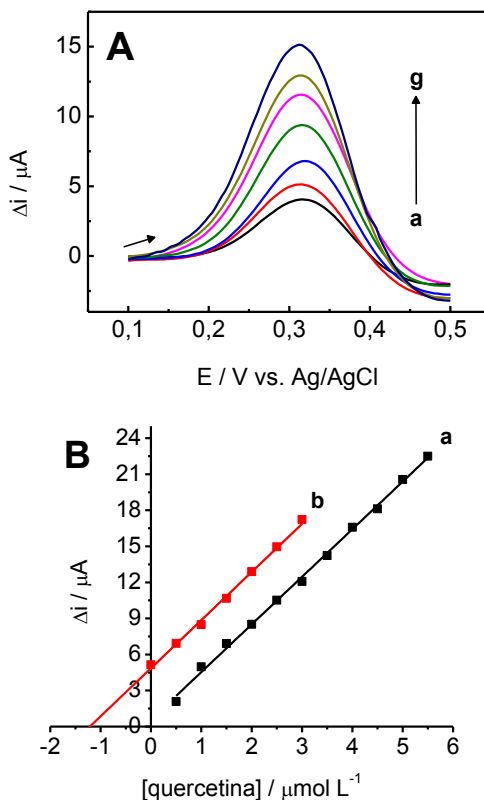
Com relação à estabilidade do sensor, avaliou-se a resposta do mesmo medindo-se as correntes de pico em intervalos de tempo de 7 dias, durante um período de 60 dias, sendo que a resposta manteve-se superior a 90% da corrente resultante obtida na medida do primeiro dia. Os resultados obtidos indicam que o eletrodo proposto apresenta excelente repetibilidade na determinação eletroanalítica de quercetina e se mantém estável por um longo período de tempo.

5.1.7 Determinação eletroanalítica em amostra farmacêutica

A determinação eletroanalítica da quercetina e os estudos de adição e recuperação foram realizados por adição de alíquotas de solução padrão de quercetina em uma solução do produto farmacêutico. A solução do produto foi preparada pela sua solubilização em etanol e posterior diluição a uma concentração inserida na faixa de trabalho da curva de calibração. Os voltamogramas obtidos (Figura 17A) mostraram picos bem definidos em $+0,31 \text{ V}$, cujas correntes de pico aumentaram linearmente com o aumento da concentração de quercetina. A Figura 17B, mostra as curvas de calibração (curva a) e de adição de padrão (curva b) para a amostra estudada.

Figura 17 - (A) Voltamogramas de onda quadrada para (a) amostra, (b - g) adições sucessivas de quercetina $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão acetato $0,1$

mol L^{-1} (pH 5,0), $f = 60 \text{ Hz}$; $a = 100 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$; (B) (a) Curva de calibração para a quercetina e (b) curva de adição de padrão.



A determinação foi feita em triplicata e convertendo o valor de concentração de quercetina na amostra, calculado pelo método de adição de padrão, para a massa (em gramas) de quercetina presente na amostra, obteve-se o valor de 213 mg/cápsula, o qual condiz com o valor especificado no rótulo do produto (200 mg/cápsula).

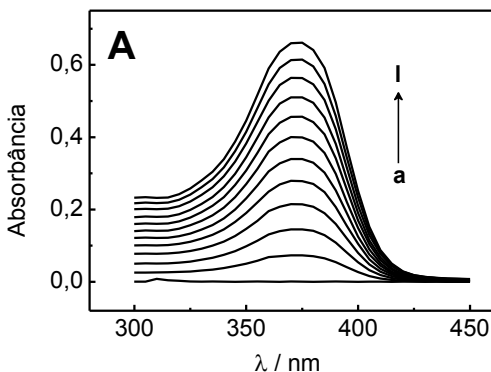
5.1.8 Método comparativo

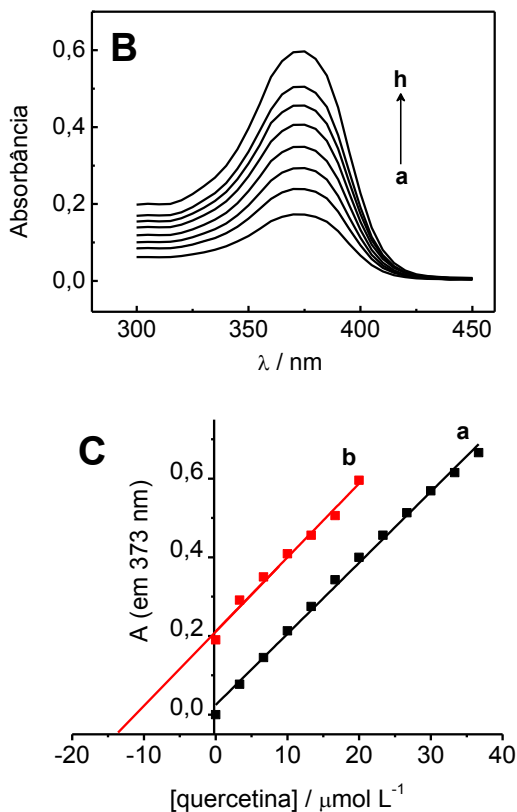
Com o objetivo de avaliar a exatidão do método proposto, a amostra contendo quercetina foi analisada também por meio da técnica UV-vis.

Inicialmente obteve-se uma curva de calibração com sucessivas adições de solução padrão de quercetina. Os espectros de absorvância

obtidos para as adições são mostrados na Figura 18A. Em seguida, utilizou-se o método de adição de padrão para determinar a concentração de quercetina na amostra. Sucessivas adições de solução padrão de quercetina foram feitas sobre a amostra e os espectros de absorvância são apresentados na Figura 18B. As curvas de calibração e de adição de padrão para o método de UV-vis são apresentadas na Figura 18C. Observou-se que a leitura da amostra não sofreu efeito de interferentes da matriz, uma vez que o coeficiente angular das duas curvas apresentaram valores próximos. O valor de quercetina encontrado pelo método comparativo na amostra farmacêutica foi de 211 mg/cápsula.

Figura 18 - (A) Espectros de absorção no UV-vis para (a) etanol, solução de quercetina (b) $3,3 \mu\text{mol L}^{-1}$, (c) $6,6 \mu\text{mol L}^{-1}$, (d) $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (e) $13,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (f) $16,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (g) $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (h) $23,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (i) $26,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (j) $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (k) $33,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (l) $36,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; (B) Espectros de absorção no UV-vis para (a) amostra, (b-h) adições sucessivas de quercetina $3,3 \mu\text{mol L}^{-1}$; (C) (a) Curva de calibração para a quercetina e (b) curva de adição de padrão.





A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos para a determinação da quercetina utilizando o CPE/PVP e o UV-vis. As médias para três determinações ($n = 3$) por ambas as técnicas são muito próximas dos valores declarados pelo fabricante. O desvio padrão relativo (RSD) das três determinações da amostra foi de 2,51% para as medidas com o CPE/PVP e de 2,08%, utilizando o método comparativo (UV-vis). O erro relativo entre o valor rotulado e o método de UV-vis foi de 5,50%, enquanto que para o método proposto o erro relativo foi de 6,50%. O erro relativo entre o método proposto e o método comparativo foi inferior a 1%.

Tabela 3 - Determinação de quercetina em preparação farmacêutica.

| Método | UV | CPE/PVP |
|------------------------------------|------|---------|
| Valor rotulado (mg) | 200 | 200 |
| Valor encontrado (mg) ^a | 211 | 213 |
| RSD (%) ^a | 2,08 | 2,51 |
| Er ₁ (%) ^b | 5,5 | 6,50 |
| Er ₂ (%) ^c | --- | 0,95 |
| t _{valor} ^d | 3,22 | 3,12 |
| F _{valor} ^e | 1,46 | 1,46 |

^a n=3.

^b Er₁ = erro relativo entre o valor obtido pelo método proposto e o valor rotulado.

^c Er₂ = erro relativo entre os valores obtidos pelo método proposto e o método comparativo

^d t_{teórico} = 4,30.

^e F_{teórico} = 19.

5.1.9 Seletividade, precisão e exatidão

A seletividade (ausência de interferentes) do método utilizando o sensor CPE/PVP, foi avaliada comparando o coeficiente angular da curva de adição de padrão ($4,05 \mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$) com o coeficiente angular da curva de calibração ($3,96 \mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$). Os valores muito próximos indicam que não houve interferência dos componentes da matriz na medida da amostra.

Ensaio de adição e recuperação foram realizados para investigar a exatidão do método proposto. Seis adições de solução padrão de quercetina foram feitas sobre a amostra e obteve-se recuperações entre 96,86% e 102,59%. Estes resultados demonstram uma boa exatidão do método proposto.

Para avaliar a confiabilidade dos dados obtidos, é necessário comparar os resultados fornecidos pelo método proposto, os fornecidos pelo método comparativo e os valores fornecidos pelo fabricante do produto. Dois dos testes mais utilizados para a comparação dos resultados são: (a) o teste t de Student (*teste t*) e (b) teste para análise de variância (*teste F*). Neste caso, o teste t foi utilizado para comparar os resultados obtidos pelos dois métodos com o valor do rótulo (aceito como valor real). No nível de confiança de 95% para todos os resultados, foi calculado um valor de t inferior ao valor de t teórico (4,30), indicando que não houve diferenças

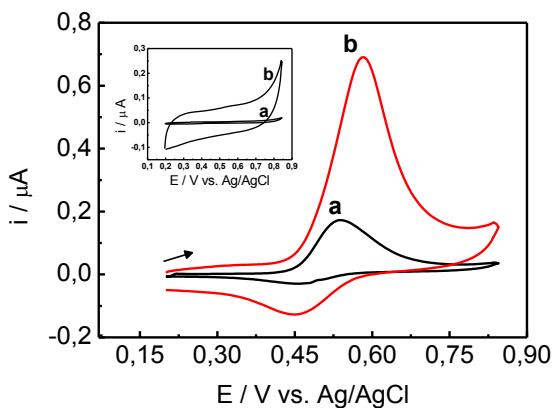
significativas entre os resultados fornecidos pelos dois métodos e o valor fornecido pelo fabricante (aceito como valor verdadeiro). A concordância entre os dados fornecidos pelo método proposto e os fornecidos pelo método comparativo foi verificada pela aplicação do teste F. Os valores de F para a determinação da quercetina na amostra farmacêutica foram menores que o valor de F teórico (19; para o nível de confiança de 95%), indicando que não há diferença significativa nos dados fornecidos por ambos os métodos. Tais resultados indicam que o método proposto apresenta boa exatidão e precisão e pode ser aplicado na determinação de quercetina em amostras farmacêuticas.

5.2 Estudos com o canferol

5.2.1 Comportamento voltamétrico do canferol sobre o CPE/PVP

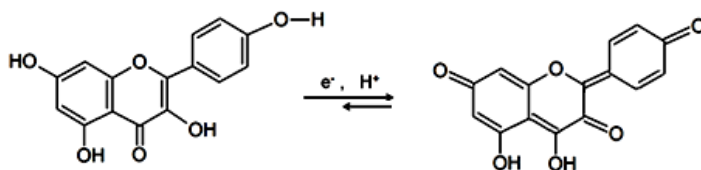
A Figura 19 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para o canferol $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0) feitos sobre o CPE/PVP. Os voltamogramas foram obtidos entre +0,2 a +0,8 V. O perfil voltamétrico do canferol nestas condições apresentou um pico de oxidação bem definido em +0,54 V sobre o CPE e +0,58 V sobre o CPE/PVP. Um pequeno sinal de redução foi observado em +0,44 V e +0,46 V para o CPE e o CPE/PVP, respectivamente, caracterizando assim a quase-reversibilidade da reação. Em intervalos de potenciais diferentes do citado anteriormente (dados não mostrados) e na ausência de canferol (Figura 19 - inserção) nenhum pico redox foi observado. Sendo assim, fixou-se para os próximos estudos o intervalo de potencial usado nessas medidas iniciais.

Figura 19 – Voltamogramas cíclicos sobre o CPE (a) e o CPE/PVP (b) na ausência (inserção) e na presença de canferol $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0), $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



O pico em +0,58 V é atribuído à oxidação do grupo hidroxila localizado na posição 4^o do anel B, em um processo que envolve 1 elétron e 1 próton, conduzindo a formação do radical fenoxila (JIAN-BO *et al.*, 2009). O mecanismo de tal reação está representado na Figura 20. Este pico foi usado como sinal analítico para a determinação de canferol e de compostos fenólicos totais como será demonstrado posteriormente.

Figura 20 - Mecanismo de oxi-redução do canferol



5.2.2 Otimização das condições experimentais

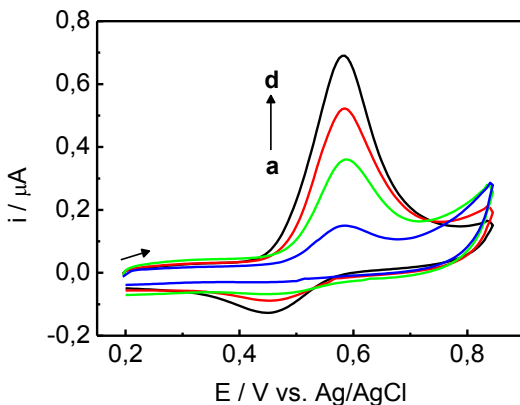
A fim de otimizar a resposta do sensor para a determinação do canferol, alguns parâmetros experimentais foram avaliados: porcentagem de PVP e pH e composição do eletrólito suporte.

5.2.2.1 Proporção de agente modificador

Os CPEs foram preparados de forma semelhante à descrita na seção 5.1.3.1 deste trabalho. Neste caso a proporção do polímero foi investigada no intervalo de 5 a 30% (m/m).

A Figura 21 mostra os voltamogramas cíclicos para CPE com diferentes proporções de PVP. Observou-se que o aumento na quantidade de PVP não provocou aumento do sinal analítico, mas em quantidades maiores de PVP (acima de 5%) os perfis voltamétricos apresentaram menores valores de i_{pa} e i_{pc} . Assim, a proporção de PVP escolhida para a construção do sensor foi de 5% (m/m). Esse valor coincide com o otimizado no estudo da quercetina, indicando certa concordância entre os resultados obtidos.

Figura 21 - Voltamogramas cíclicos para canferol $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0) sobre o CPE/PVP; (a - d) = 30, 20, 10, 5% de PVP, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



5.2.2.2 pH e natureza do eletrólito suporte

Os valores de pH investigados neste estudo variaram no intervalo de 2,0 a 12,0 utilizando solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com pHs ajustados com soluções de HCl ou NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Observou-se que os melhores sinais analíticos foram obtidos em pHs ácidos, semelhante ao resultado obtido para a quercetina e para outros analitos com estrutura química análoga (FRANZOI; SPINELLI; VIEIRA, 2008). Os voltamogramas apresentados na Figura 22A são referentes aos pHs 2,0 a 6,0 e os da Figura 22B aos pHs 7,0 a 10,0. Em valores de pH maiores que 10,0 nenhum sinal redox foi observado. Os valores de E_{po} apresentaram deslocamento para valores menos positivos com o aumento do pH (Figura 23A), sendo que o coeficiente angular da reta ($64,3 \text{ mV}$) está bem próximo do valor característico de processos que envolvem o mesmo número de prótons e elétrons ($59,2 \text{ mV}$). As medidas foram realizadas em triplicata e o melhor sinal de corrente de pico anódico foi obtido em pH 3,0, conforme mostra o gráfico da Figura 23B. Este valor foi selecionado para o estudo a seguir, que é referente à natureza do eletrólito suporte.

Figura 22 - Voltamogramas cíclicos para canferol $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sobre o CPE/PVP. (A) (a) pH 2,0, (b) pH 3,0, (c) pH 4,0, (d) pH 5,0 e (e) pH 6,0; (B) (a) pH 7,0, (b) pH 8,0, (c) pH 9,0 e (d) pH 10,0, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

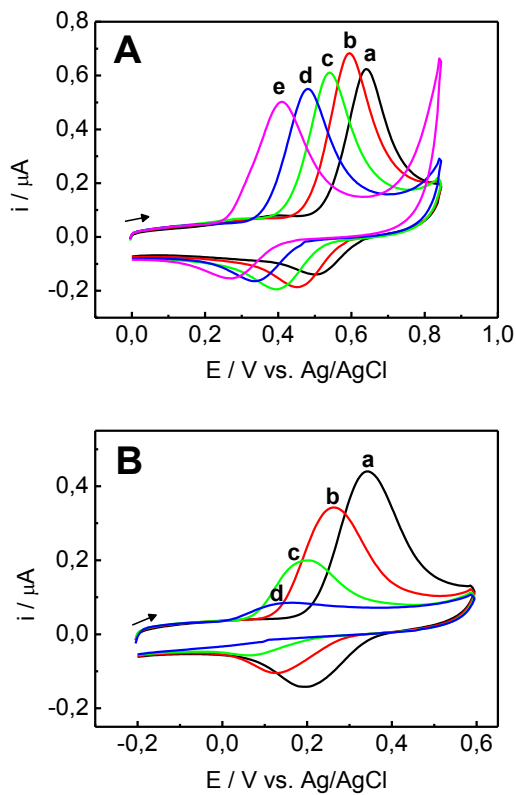
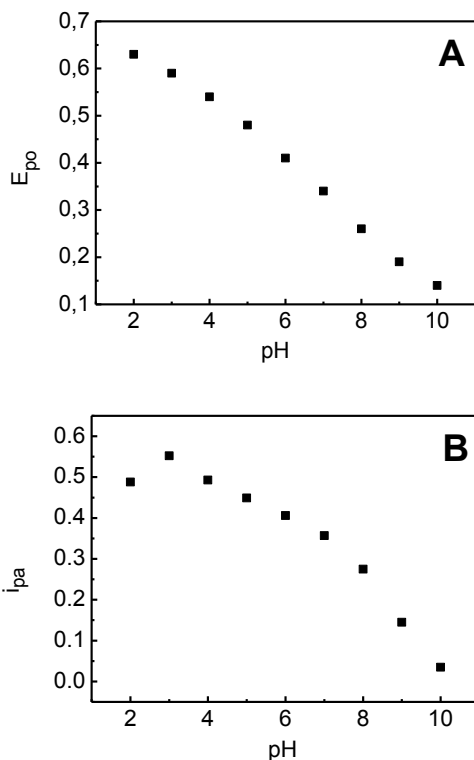
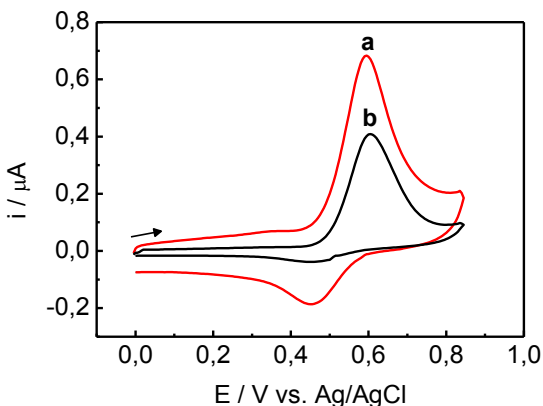


Figura 23 - Variação (A) do potencial de pico de oxidação e (B) da corrente de pico anódico em função do pH do eletrólito suporte.



Para avaliar a influência da natureza do eletrólito suporte na resposta do sensor, avaliou-se medidas de CV em duas soluções tampão, cuja capacidade tamponante é válida em pH 3,0: solução tampão fosfato e solução tampão B-R, ambas com concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 24 mostra os voltamogramas obtidos nos dois eletrólitos propostos. A melhor resposta de corrente de pico, bem como de perfil voltamétrico foi obtida em solução tampão B-R, solução esta que foi utilizada para o desenvolvimento da metodologia. Nesta solução, observou-se também um aumento na reversibilidade da reação, expressa por um pico de redução, não observado na solução tampão fosfato. Este resultado contribui também para a escolha do eletrólito, uma vez que pode ser explorado posteriormente para obter um melhor sinal analítico utilizando a técnica de SWV.

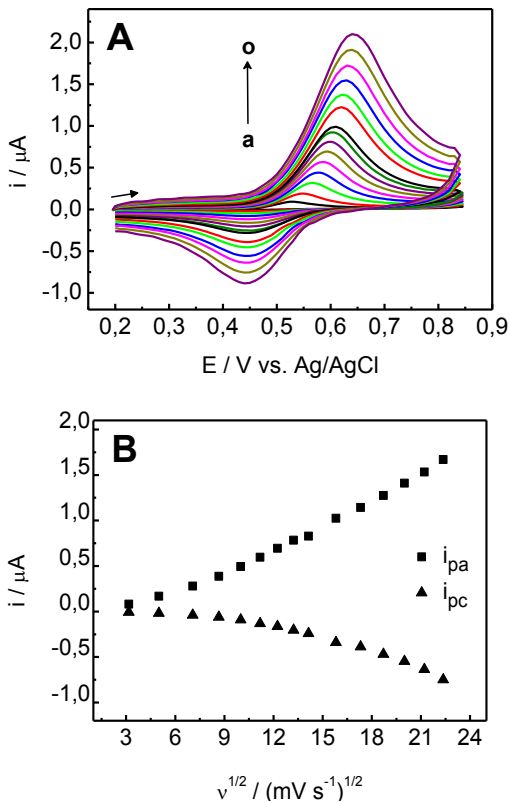
Figura 24 - Voltamogramas cíclicos para canferol $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em (a) tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0) e (b) tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0), $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$

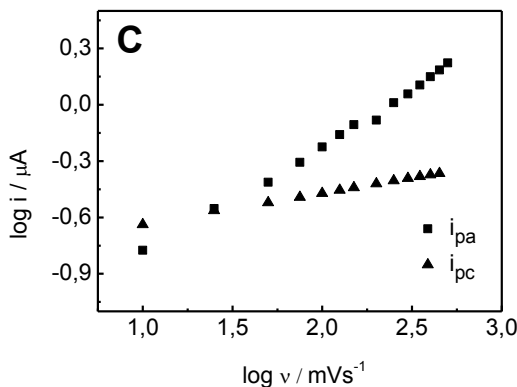


5.2.3 Estudo da velocidade de varredura

Os voltamogramas cíclicos da Figura 25A mostram o comportamento eletroquímico do canferol em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0) sobre o CPE/PVP. Os voltamogramas foram obtidos aplicando, inicialmente, uma varredura de potencial no sentido positivo de 0,2 a 0,85 V, seguida de uma varredura no sentido inverso, de 0,85 a 0,2 V, utilizando diferentes velocidades de varredura (10 a 500 mV s^{-1}). Observou-se que com o aumento da velocidade de varredura, há um aumento nas correntes de pico, tanto de oxidação, como de redução. O gráfico da Figura 25B mostra a variação da corrente em função da raiz quadrada da velocidade, sendo que somente em velocidade maiores essa relação é linear. O coeficiente da reta de $\log i_p$ vs. $\log \nu$ para a reação de oxidação (Figura 25C) apresentou valor de 0,58, indicando que esta é controlada por difusão com uma mínima contribuição da adsorção. Para a reação de redução o coeficiente da reta de $\log i_{pc}$ vs. $\log \nu$ apresentou valor de 0,16. Ambos os resultados confirmam que a reação do canferol sobre a superfície do CPE/PVP é controlada por difusão, não sendo necessário tempo de acumulação do analito sobre a superfície do eletrodo para a obtenção de bons resultados.

Figura 25 - (A) Voltamogramas cíclicos para canferol $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0) sobre o CPE/PVP, (a - o) $\nu = 10$ a 500 mV s^{-1} ; (B) gráfico de i vs. $\nu^{1/2}$ e (C) (a) \log de i_{pa} vs. \log de ν e (b) \log de i_{pc} vs. \log de ν .

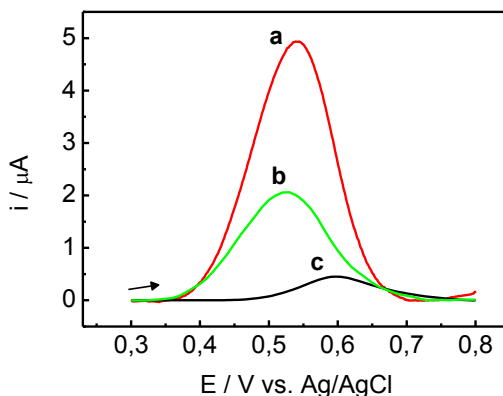




5.2.4 Seleção e otimização da técnica eletroanalítica

Foram avaliadas três técnicas eletroanalíticas diferentes quanto às suas sensibilidades para a análise do canferol: LSV, SWV e DPV. As medidas foram efetuadas sobre o eletrodo modificado usando uma solução de canferol $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0). Os parâmetros das três técnicas foram ajustados para se obter a mesma velocidade de varredura em todas as medidas. A Figura 26 apresenta os três voltamogramas obtidos. Observa-se que, semelhantemente ao estudo com a quercetina, o voltamograma que exibe maior sensibilidade é o resultante da técnica de SWV (curva a). Este apresenta maior sinal de corrente resultante quando comparado aos voltamogramas obtidos pelas outras técnicas. Este resultado já era esperado, uma vez que a DPV e a LSV fornecem somente o valor da corrente de oxidação ou da corrente de redução, dependendo do sentido de variação do potencial, enquanto que a corrente resultante na SWV é a diferença da correntes de oxidação e redução e, neste caso, sendo o processo quase-reversível, a diferença será sempre maior do que os valores de i_{pa} e i_{pc} isolados. Sendo assim, a otimização da metodologia foi direcionada para a utilização da SWV.

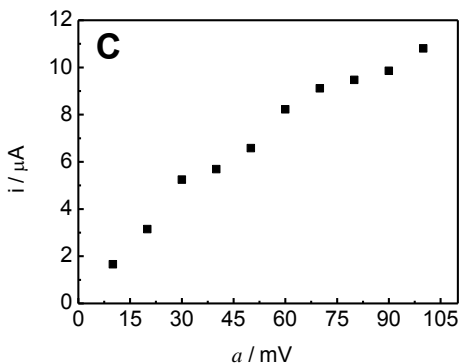
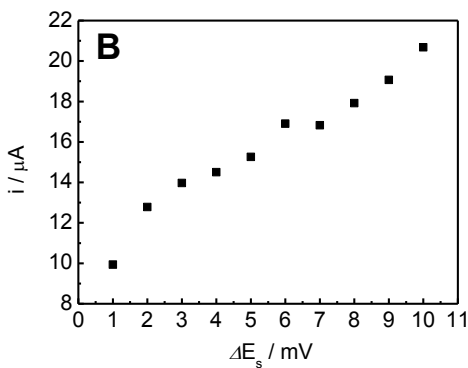
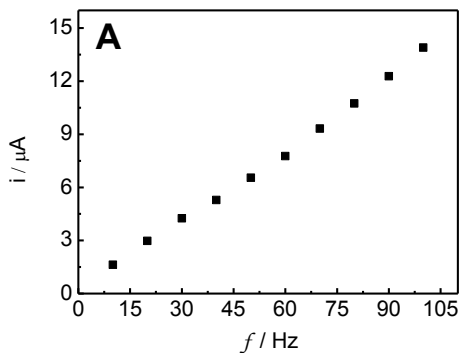
Figura 26 - Voltamogramas para canferol $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0): (a) SWV, (b) DPV e (c) LSV, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



5.2.4.1 Otimização dos parâmetros da SWV

O efeito dos parâmetros da SWV (frequência, amplitude e incremento) foi investigado utilizando $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de canferol em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0). Para todas as medidas, avaliou-se simultaneamente as melhores respostas de corrente resultante e o melhor perfil dos voltamogramas. A Figura 27A mostra a variação da corrente resultante com o aumento da frequência. Os maiores valores foram obtidos utilizando $f = 100 \text{ Hz}$, valor este que foi utilizado nos experimentos posteriores. O incremento de potencial foi estudado num intervalo de 1 a 10 mV, sendo que a corrente de pico apresentou um significativo aumento em função do aumento do incremento (Figura 27B). O valor escolhido foi de 3 mV, em razão do melhor perfil voltamétrico, associado a uma boa resposta de corrente. Com relação a amplitude, avaliou-se a resposta do eletrodo num intervalo de 10 a 100 mV (Figura 27C), e observou-se um aumento proporcional da corrente resultante em função do aumento da amplitude, sendo que para estudos posteriores optou-se por utilizar $a = 100 \text{ mV}$ pelo maior valor de corrente que esta condição proporcionou.

Figura 27 - Dependência da corrente resultante com a variação da (A) frequência ($a = 60$ mV e $\Delta E_s = 3$ mV); (B) incremento ($a = 60$ mV e $f = 100$ Hz) e (C) amplitude ($f = 100$ Hz e $\Delta E_s = 3$ mV) para canferol $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0).



A Tabela 4 resume os intervalos de todos os parâmetros experimentais otimizados.

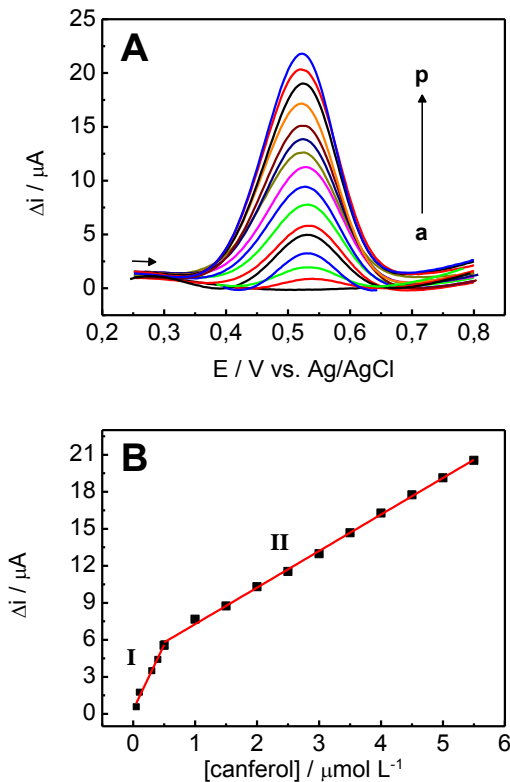
Tabela 4 - Otimização dos parâmetros experimentais para a determinação de canferol.

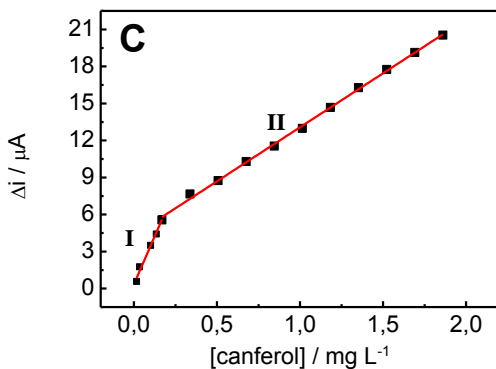
| Parâmetro | Intervalo estudado | Valor selecionado |
|-----------------------------|-------------------------------------|--------------------------|
| Proporção PVP | 5 - 30 % | 5% |
| Eletrólito/ pH | B-R/ (2,0 - 12,0) Fosfato/ (3,0) | B-R/ 3,0 |
| Frequência (<i>f</i>) | 10 - 100 Hz | 100 Hz |
| Amplitude (<i>a</i>) | 10 - 100 mV | 100 mV |
| Incremento (ΔE_s) | 1 - 10 mV | 3 mV |

5.2.5 Curva de calibração

Empregando as condições experimentais otimizadas (Tabela 4), a curva de calibração para o canferol foi obtida realizando sucessivas adições de alíquotas de solução padrão de canferol à solução do eletrólito suporte. Na Figura 28A são apresentados os voltamogramas de onda quadrada para as diferentes concentrações de canferol. Foi observado um pico bem definido em +0,52 V, cuja corrente resultante é proporcional à concentração de canferol. A curva de calibração (Figura 28B) apresentou duas faixas lineares: a primeira (de maior coeficiente angular, faixa I) no intervalo de 0,05 a 0,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e a segunda (com menor coeficiente angular, faixa II) de 0,50 a 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 28 - (A) Voltamogramas de onda quadrada para (a) branco, (b) canferol $0,05 \mu\text{mol L}^{-1}$, (c) $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, (d) $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$, (e) $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$, (f) $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, (g) $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (h) $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, (i) $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (j) $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, (k) $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (l) $3,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, (m) $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (n) $4,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, (o) $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (p) $5,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0), $f = 100 \text{ Hz}$; $a = 100 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$; (B) Curva de calibração para o canferol, em mol L^{-1} e (C) Curva de calibração para o canferol, em mg L^{-1} .





As características analíticas extraídas da curva de calibração são mostradas na Tabela 5. A curva de calibração referente à primeira faixa linear pode ser expressa pela equação $i/\mu A = 0,42 + 10,8 [canferol]/\mu mol L^{-1}$. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados de acordo com as equações descritas na seção 5.1.5, utilizando a faixa linear I. Os valores obtidos para LD e LQ foram de 45,0 e 138,0 $nmol L^{-1}$, respectivamente.

Tabela 5 - Características analíticas da curva de calibração para o canferol.

| Parâmetro | Faixa I | Faixa II |
|---|-------------|----------------------|
| Potencial de pico (V) | 0,52 | |
| Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | 0,05 a 0,50 | 0,50 a 6,0 |
| Coefficiente de correlação (R^2) | 0,980 | 0,996 |
| Coefficiente angular ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$) | 10,80 | 3,09 |
| Desvio padrão do coeficiente angular ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$) | 0,50 | $5,8 \times 10^{-2}$ |
| Coefficiente linear (μA) | 0,42 | 4,15 |
| Desvio padrão do coeficiente linear (μA) | 0,15 | 0,21 |
| LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | 0,04 | 0,22 |
| LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | 0,13 | 0,67 |
| Repetibilidade de Δi (<i>intradia</i>) (%) ^{a,b} | 3,32 | --- |
| Repetibilidade de Δi (<i>interdia</i>) (%) ^{a,b} | 3,68 | --- |

^a Desvio padrão relativo.

^b $n = 5$.

5.2.6 Repetibilidade *intra* e *inter dia*

A precisão da metodologia proposta foi avaliada pelos ensaios de repetibilidade *intra dia* e *inter dia*. A repetibilidade *intra dia* para a determinação de canferol foi avaliada medindo as correntes de pico nos voltamogramas de onda quadrada cinco vezes seguidas com soluções diferentes, utilizando o mesmo eletrodo. Efetuou-se as medidas em três diferentes concentrações de canferol: $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$, $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão B-R ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3,0). O desvio padrão relativo para as medidas ($n = 5$) variou de 2,1% (para o ponto de maior concentração) até 4,3% (para o ponto de menor concentração).

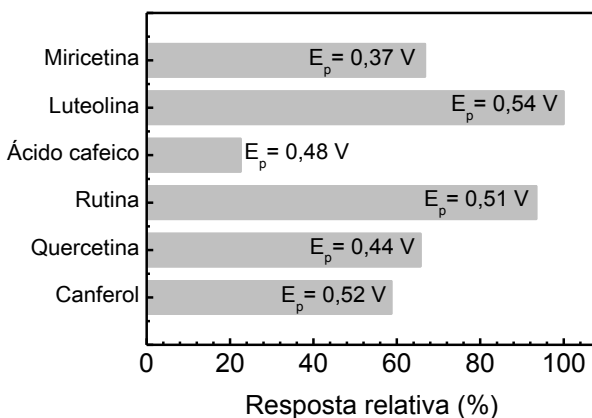
Para avaliar a repetibilidade *inter dia* repetiu-se o mesmo procedimento em cinco dias seguidos. As correntes de pico para as medidas realizadas em diferentes dias mostraram-se muito similares. Obteve-se um desvio padrão relativo ($n = 5$) que variou de 2,7% (para o ponto de maior concentração) a 5,7% (para o ponto de menor concentração).

5.2.7 Seletividade do método

Realizou-se o estudo de outros compostos fenólicos presentes em elevadas concentrações nas amostras em estudo e que poderiam ser interferentes na determinação do canferol. Foram eles: miricetina, luteolina, ácido cafeico, ácido ascórbico, rutina e quercetina. Todos os analitos foram usados em solução etanólica na concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Exceto o ácido ascórbico, todos os outros compostos orgânicos apresentaram sinal sobre o CPE/PVP no intervalo de potencial de 0,1 a 0,7 V, indicando que a metodologia proposta não é seletiva ao canferol. No gráfico da Figura 29, são apresentadas as respostas relativas para os analitos testados (em %), bem como o potencial de pico para cada um quando analisado isoladamente. Observou-se que o sensor apresenta maior sensibilidade para luteolina e rutina.

Figura 29 - Respostas relativas para possíveis interferentes na determinação do canferol.



Devido a falta de seletividade do sensor, optou-se por realizar a determinação de compostos fenólicos totais, uma vez que todos os compostos desta classe são eletroativos em potenciais muito próximos. Para isso, utilizou-se a curva de calibração do canferol e o método de calibração externa. Os resultados foram expressos em mg equivalente de canferol (EC)/g de planta *in natura*.

5.2.8 Determinação de compostos fenólicos totais em amostras vegetais

Para a determinação voltamétrica dos compostos fenólicos nas amostras vegetais adicionou-se à célula eletroquímica $100 \mu\text{L}$ das soluções

de cada amostra (chicória, brócolis, couve e espinafre) e em seguida efetuou-se medidas de SWV no intervalo de potencial de 0,35 a 0,7 V. Os voltamogramas obtidos são apresentados na Figura 30.

As determinações foram feitas em triplicata, sendo que as concentrações de compostos fenólicos totais foram calculadas pelo método de calibração externa, utilizando a curva de calibração para o canferol. A concentração final, portanto, foi expressa em mg equivalente de canferol (EC)/g de planta *in natura*. Os valores de compostos fenólicos totais obtidos para cada amostra, bem como o desvio padrão para cada medida, são mostrados na Tabela 6. O vegetal que apresentou maior teor de compostos fenólicos foi o espinafre (0,32 mg g⁻¹), seguido da couve (0,29 mg g⁻¹), do brócolis (0,21 mg g⁻¹) e por fim, com menor concentração, a chicória (0,08 mg g⁻¹).

Figura 30 - Voltamogramas de onda quadrada para as amostras de (a) chicória, (b) brócolis, (c) couve e (d) espinafre em solução tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ (pH 3,0), $f = 100$ Hz; $a = 100$ mV e $\Delta E_s = 3$ mV.

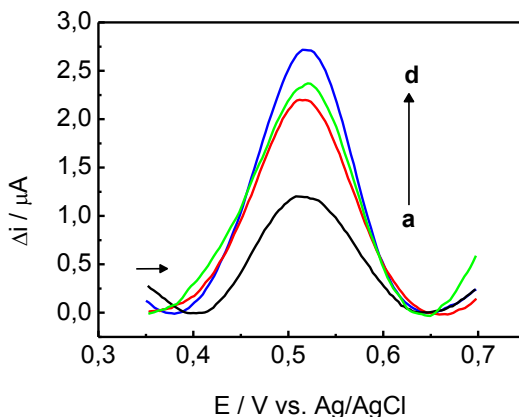


Tabela 6 - Teor de compostos fenólicos totais em amostras vegetais (mg/g de planta *in natura*).

| Amostra | CPE/PVP | FC |
|-----------|-------------|-------------|
| Espinafre | 0,32 ± 0,03 | 3,37 ± 0,03 |
| Brócolis | 0,21 ± 0,03 | 2,44 ± 0,01 |
| Couve | 0,29 ± 0,02 | 3,08 ± 0,02 |
| Chicória | 0,08 ± 0,01 | 0,88 ± 0,01 |

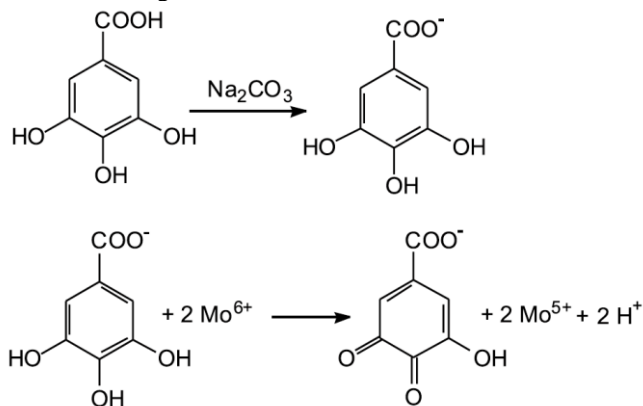
5.2.9 Método comparativo

O método comparativo usado para a determinação de fenóis totais nas amostras vegetais foi o método de Folin-Ciocalteu. A quantificação de compostos fenólicos pode ser realizada por meio de uma variedade de métodos; todavia, o que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu (RFC) é o mais empregado (ABDILLE *et al.*, 2005; BANERJEE; DASGRUPTA; DE, 2005; DASTMALCHI *et al.*, 2007).

O RFC consiste de mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstíco, na qual o molibdênio se encontra no estado de oxidação (VI) (cor amarela no complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados complexos molibdênio-tungstênio azuis $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^4]$, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 (V) e 6 (VI) e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras que, não necessariamente, precisam ter natureza fenólica.

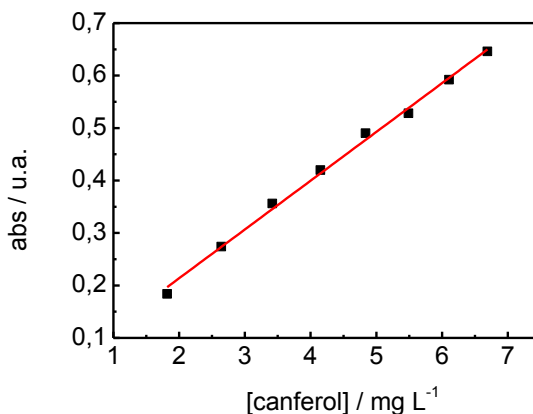
A Figura 31 mostra a desprotonação dos compostos fenólicos (no exemplo, o padrão ácido gálico) em meio alcalino, gerando os ânions fenolatos. A partir daí, ocorre uma reação de oxirredução entre o ânion fenolato e o reagente de Folin, na qual, segundo Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999), o molibdênio, componente do reagente de Folin, sofre redução e o meio reacional muda de coloração amarela para azul. Na realidade, o RFC, popularmente reconhecido como o teste para medir o conteúdo total de fenóis, mede a capacidade redutora das amostras, mas isto não é expresso no nome. Outro ponto fraco do método é que ocorre superestimação do conteúdo fenólico, em larga extensão (DE OLIVEIRA *et al.*, 2009; ESCARPA; GONZÁLEZ, 2001). Vários interferentes não fenólicos são conhecidos, entre eles, o ácido ascórbico. Em trabalho recente (DE OLIVEIRA *et al.*, 2009), verificou-se que a adição de ácido ascórbico a ácido gálico em diferentes proporções (0,1:1,0; 0,5:1,0; 1,0:1,0; 2,0:1,0) provocou o aumento de absorbância, revelando interferência de cerca de 20%, mas, somente quando a razão ascorbato/galato ≥ 1 . Por outro lado, em vista de processos de extração não eficientes, heterosídeos (éteres ou ésteres) podem não ser avaliados, levando a valores subestimados de conteúdo total de fenóis (SONI *et al.*, 2006).

Figura 31 - Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.



A curva de calibração para o método de FC (Figura 32) foi construída com soluções de canferol na faixa de concentração de 1,8 a 6,7 mg L^{-1} , cujas absorvâncias foram medidas em 765 nm. As concentrações nas amostras foram calculadas pelo método de padrão externo.

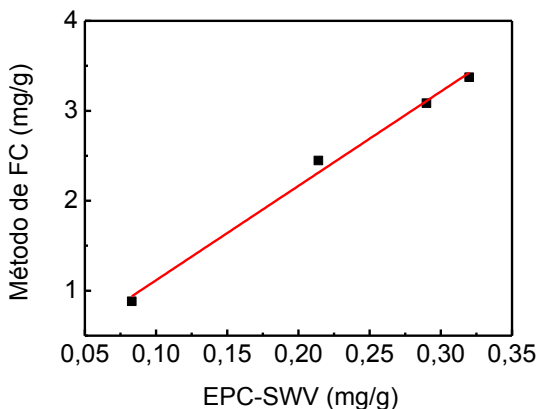
Figura 32 - Curva de calibração para a determinação de compostos fenólicos totais.



A concentração de compostos fenólicos totais obtida para cada amostra está apresentada na Tabela 6. Observou-se que os valores foram todos muito superiores aos determinados pela metodologia empregando o CPE/PVP. No entanto, observou-se uma correlação entre os valores obtidos

com os dois métodos, indicando certa exatidão dos resultados obtidos. O gráfico do valor obtido pelo método proposto vs. o obtido pelo método comparativo (Figura 33) exibe um perfil linear, indicando correlação entre eles. Dessa forma, conclui-se que a metodologia proposta pode ser utilizada para a quantificação de compostos fenólicos totais em amostras vegetais, utilizando um fator de correção (igual a 10) para os resultados.

Figura 33 - Correlação entre a concentração de compostos fenólicos totais obtida pelos métodos de FC e CPE/PVP.



A Tabela 7 exibe os valores de compostos fenólicos totais nas amostras estudadas utilizando o fator de correção e o desvio padrão para cada medida. Observa-se que, deste modo, os valores são bastante semelhantes aos obtidos pelo método colorimétrico.

A concordância entre os resultados fornecidos pelo método CPE/PVP e os fornecidos pelo método de Folin-Ciocalteu foi verificada pela aplicação do teste F. Os valores de F para a determinação de compostos fenólicos totais foi menor que o valor de F teórico (19; para o nível de confiança de 95%), para todas as amostras, indicando que não há diferença significativa nos resultados fornecidos pelos dois métodos. Tais resultados indicam que o método proposto apresenta boa precisão e pode ser aplicado na determinação de compostos fenólicos totais em amostras vegetais.

Tabela 7 - Teor de compostos fenólicos totais em amostras vegetais (mg/g de planta *in natura*), utilizando o fator de correção.

| Amostra | CPE/PVP | FC |
|----------------|----------------|-------------|
| Espinafre | 3,2 ± 0,03 | 3,37 ± 0,03 |
| Brócolis | 2,1 ± 0,03 | 2,44 ± 0,01 |
| Couve | 2,9 ± 0,02 | 3,08 ± 0,02 |
| Chicória | 0,8 ± 0,01 | 0,88 ± 0,01 |

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste trabalho, um eletrodo de pasta de carbono modificado com PVP, já descrito na literatura, foi aplicado na determinação eletroanalítica de flavonóides, visando propor uma metodologia simples, segura, de baixo custo e com geração mínima de resíduos. Um eletrodo semelhante, à base de PVP, foi utilizado por outros pesquisadores para a determinação de rutina. No entanto, os resultados indicam que o mecanismo de reação da rutina sobre o eletrodo é controlado por adsorção e assim, para obtenção de bons resultados, o trabalho descreve uma metodologia em que é necessário um tempo de acumulação de 10 min.

Sobre este mesmo eletrodo, voltamogramas cíclicos da quercetina apresentaram três picos de oxidação localizados em +0,32, +0,78 e +1,04 V. Em condições favoráveis, a reação é quase-reversível e o processo é controlado por difusão, sem que seja necessária etapa de pré-concentração. A curva de calibração obtida para a quercetina foi linear na faixa de concentração de 0,5 a 5,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,998$). Os limites de detecção e quantificação foram de 0,17 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,52 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. O sensor foi aplicado na determinação de quercetina em cápsulas. A exatidão dos resultados fornecidos pelo sensor foi avaliada por comparação com os resultados obtidos pela técnica UV-vis e concluiu-se que não há diferença significativa entre os resultados obtidos pelos dois métodos.

No estudo do comportamento eletroquímico do canferol, os voltamogramas cíclicos apresentaram apenas um pico de oxidação em +0,58 V e um sinal de redução em +0,46 V. Em condições favoráveis, a reação é quase-reversível e o processo também é controlado por difusão. A curva de calibração para o canferol apresentou duas faixas lineares nos intervalos de concentração de 0,05 a 0,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e de 0,50 a 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,980$). Utilizando a faixa de maior sensibilidade, os limites de detecção e quantificação foram de 45,0 nmol L^{-1} e 138,0 nmol L^{-1} , respectivamente. O sensor foi aplicado para a determinação eletroanalítica de compostos fenólicos por voltametria de onda-quadrada em amostras vegetais. Os teores de compostos fenólicos totais foram expressos em mg equivalente de canferol (EC)/g de planta em natura. O vegetal que apresentou maior teor de compostos fenólicos foi o espinafre (3,2 mg g^{-1}), seguido da couve (2,9 mg g^{-1}), do brócolis (2,1 mg g^{-1}) e por fim, com menor concentração, a chicória (0,8 mg g^{-1}). A exatidão dos resultados fornecidos pelo sensor foi avaliada por comparação com os resultados obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu e conclui-se que a metodologia proposta pode ser utilizada para a quantificação de compostos fenólicos totais em amostras vegetais, utilizando um fator de correção igual a 10.

Com os resultados obtidos pode-se concluir que sensor proposto é uma potencial metodologia para análise de formulações farmacêuticas e de

matrizes vegetais, funcionando por difusão, não havendo necessidade de etapa de pré-concentração e diminuindo assim o tempo das análises. Como perspectivas futuras para este trabalho, este eletrodo poderá ser aplicado no estudo eletroquímico de outros flavonóides e/ou outras classes de compostos, bem como a determinação eletroanalítica destes em diversos tipos de matrizes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDILLE, M. D.; SINGH, R. P.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JENA, B. S. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, v. 90, p. 891-896, 2005.

ACKLAND, M. L.; VAN DE WAARSENBURG, S.; JONES, R. Synergistic Antiproliferative Action of the Flavonols Quercetin and Kaempferol in Cultured Human Cancer Cell Lines. **In vivo**, v. 19, p. 69-76, 2005.

ADAMS, R. N. Carbon paste electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 30, p. 1576, 1958.

ADEGOKE, G.O.; KUMAR, M.V.; KRISHNA, A.G.G.; VARADARAJ, M.C.; SAMBAIAH, K. & LOKESH, B.R. "Antioxidants and lipid oxidation in foods - A critical appraisal". **J. Food Science Technology International**, v. 35, p. 283-298, 1998.

AHERNE, S.A.; O'BRIEN, N. M. Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism. **Nutrition**, v. 18, p. 75-81, 2002.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006.

BANERJEE, A.; DASGRUPTA, N.; DE, B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chemistry**, v. 90, p. 727-733, 2005.

BORNEMAN, Z., GOKMEN, V., NIJHUIS, H. H. Selective removal of polyphenols and brown colour in apple juices using PES/PVP membranes in a single ultrafiltration process. **Separation and Purification Technology**, v. 22-23, p. 53- 61, 2001.

BRETT, A. M. O.; GHICA, M. E., Electrochemical oxidation of quercetin. **Electroanalysis**, v. 15, p. 1745-1750, 2003.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v. 74, p. 2157-2184, 2004.

CALDERÓN-MONTAÑO, J. M.; BURGOS-MORÓN, E.; PÉREZ-GUERRERO C.; LÓPEZ-LÁZARO, M. A Review on the Dietary

Flavonoid Kaempferol. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 298-344, 2011.

CAMPANELLA, L.; BEONE, T.; SAMMARTINO, M. P.; TOMASSETTI, M. Determination of phenol in wastes and water using an enzyme sensor. **Analyst**, v. 118, p. 979-986, 1993.

CAO, Y.; ZHANG, X.; FANG, Y.; YE, J. Determination of active ingredients of *apocynum venetum* by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Mikrochimica Acta**, v. 137, p. 57-62, 2001.

CAO, Y.; CHU, Q.; FANG, Y.; YE, J. Analysis of flavonoids in *Ginkgo biloba* L. and its phytopharmaceuticals by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**, v. 374, p. 294-299, 2002.

CHEN, G.; ZHANG, H.; YE, J. Determination of rutin and quercetin in plants by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 423, p. 69-76, 2000.

CHEN, Z.; ZHANG, L.; CHEN, G. Microwave-assisted extraction followed by capillary electrophoresis-ampereometric detection for the determination of antioxidant constituents in *Folium Eriobotryae*. **Journal of Chromatography A**, v. 1193, p. 178-181, 2008A.

CHEN, Z.; ZHANG, L.; CHEN, G. Simultaneous determination of flavones and phenolic acids in the leaves of *Ricinus communis* Linn. By capillary electrophoresis with amperometric detection. **Journal of Chromatography B**, v. 863, p. 101-106, 2008B.

CRESPILHO, F. N.; REZENDE, M. O. O. Eletrodos de pasta de carbono modificados com ácidos húmicos: estudo e determinação de metais em meio aquoso. **Química Nova**, v. 27, p. 964-969, 2007.

DASTMALCHI, K.; DORMAN, H.; KOSAR, M.; HILTUNEN, R. Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a water-soluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract. **LWT-Food Science And Technology**, v. 40, p. 239-248, 2007.

DE OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; DE BARROS, M. P.; MANO, C. M.; GOULART, M. O. F. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract

powders of tropical fruit residues. **Food Chemistry**, v. 115, p. 469-475, 2009.

DE SOUZA, K. C. B.; SCHAPOVAL, E. E. S.; BASSANI, V. L. LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3-O-methylquercetin in *Achyrocline satureioides* preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 771-777, 2002.

DUPONT, M. S.; DAY A. J.; BENNETT, R. N.; MELLON, F. A.; KROON, P. A. Absorption of kaempferol from endive, a source of kaempferol-3-glucuronide, in humans. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 58, p. 947-954, 2004.

ESCARPA, A.; GONZÁLEZ, M. C. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 427, p. 119-127, 2001.

FERNANDES, S. C.; OSÓRIO, R. E.-M. B.; ANJOS, A.; NEVES, A.; MICKE, G. A.; VIEIRA, I. C. Determination of catechin in green tea using a catechol oxidase biomimetic sensor. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 1215-1223, 2008.

FRANZOI, A. C.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I. C., Rutin determination in pharmaceutical formulations using a carbon paste electrode modified with poly(vinylpyrrolidone). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 973-977, 2008.

FRANZOI, A. C.; PERALTA, R. A.; NEVES, A.; VIEIRA, I. C. Biomimetic sensor based on MnIII/MnII complex as manganese peroxidase mimetic for determination of rutin. **Talanta**, v. 78, p. 221-226, 2009.

FRANZOI, A. C.; BRONDANI, D.; ZAPP, E.; MOCCELINI, S. K.; FERNANDES, S. C.; VIEIRA, I. C.; DUPONT, J. Incorporação de líquidos iônicos e nanopartículas metálicas na construção de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, v. 34, p. 1042-1050, 2011.

FREIRE, R. S. Efluente de indústria papeleira: processos alternativos de remediação e emprego de novas metodologias eletroanalíticas para determinação de compostos fenólicos. **Tese de Doutorado**, UNICAMP - Campinas, 2002.

HALLIWELL, B. "Antioxidants in human health and disease". **Annual Review of Nutrition**, v.16, p. 33-50, 1996.

HASSAN, H. N. A.; BARSOUM, B. N.; HABIB, I. H. I. Simultaneous spectrophotometric determination of rutin, quercetin and ascorbic acid in drugs using a Kalman Filter approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 20, p. 315-320, 1999.

HAVSTEEN, B.H. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, p. 1141-1148, 1983.

HE, J.-B.; LIN, X.-Q.; PAN, J. Multi-wall carbon nanotube paste electrode for adsorptive stripping determination of quercetin: a comparison with graphite paste electrode via voltammetry and chronopotentiometry. **Electroanalysis**, v. 17, p. 1681-1686, 2005.

HE, Q.; DANG, X.; HU, C.; HU, S. The effect of cetyltrimethyl ammonium bromide on the electrochemical determination of thyroxine. **Colloids and Surface B**, v. 35, p. 93-98, 2004.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572-584, 2002.

HENDRICKSON, H. P.; SAHAFAYEN, M.; BELL, M. A.; KAUFMAN, A. D; HADWIGER, M. E.; LUNTE, C. Relationship of flavonoid oxidation potential and effect on rat hepatic microsomal metabolism of benzene and phenol. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, v. 12, p 335-341, 1994.

HOFFMANN-RIBANI, R.; HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. **Journal Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 263-268, 2009.

HOTTA, H.; SAKAMOTO, H.; NAGANO, S.; OSAKAI, T.; TSUJINO, Y., Unusually large numbers of electrons for the oxidation of polyphenolic antioxidants. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1526, p. 159-167, 2001.

HUBER, L. S.; RODRIGUES-AMAYA, D. B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, p. 97-108, 2008.

HUBER, L. S.; HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Quantitative variation in Brazilian vegetable sources of flavonols and flavones. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1278-1282, 2009.

JANEIRO, P.; BRETT, A. M. O. Catechin electrochemical oxidation mechanisms. **Analytica Chimica Acta**, v. 518, 2004, p. 109-115, 2004.

JIAN-BO, H.; SHENG-JIE Y.; JIA-QI D.; XIN-RAN H.; YAN W. Voltammetric and spectral characterization of two flavonols for assay-dependent antioxidant capacity. **Bioelectrochemistry**, v. 75, p. 110-116, 2009.

JIN, J.-H.; KIM, H.; JUNG, S. Electrochemical selectivity enhancement by using monosuccinyl β -cyclodextrin as a dopant for multi-wall carbon nanotube-modified glassy carbon electrode in simultaneous determination of quercetin and rutin. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1739-1744, 2009.

JORGENSEN, L. V.; CORNETT, C.; JUSTESEN, U.; SKIBSTED, L. H.; DRAGSTED, L. O., Two-electron electrochemical oxidation of quercetin and kaempferol changes only the flavonoid C-ring. **Free Radical Research**, v. 29, p. 339-350, 1998.

KALCHER, K.; KAUFFMANN, J.-M.; WANG, J.; ŠVANCARA, I.; VYTRÁS, K.; NEUHOLD, C.; YANG, Z. Sensors based on carbon paste in electrochemical analysis: A review with particular emphasis on the period 1990-1993. **Electroanalysis**, v.7, p. 5-22, 1995.

KANATT, S.R.; CHANDER, R. & SHARMA, A. "Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat". **Food Chemistry**, v. 100, p. 451-458, 2007.

KIM, J-D.; LIU, L.; GUO, W.; MEYDANI, M. Chemical Structure of Flavonols in Relation to Modulation of Angiogenesis and Immune-endothelial Cell Adhesion. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, p. 165-176, 2006.

KORKINA, L. G.; AFANAS'EV, I. B. Antioxidant and Chelating Properties of Flavonoids. **Advances in Pharmacology**, v. 38, p. 151-163, 1996.

KOWALSKI, J., SAMOJEDNY, A., PAUL M. PIETSZ, G., WILCZOK, T. Effect of kaempferol on the production and gene expression of monocyte

chemoattractant protein-1 in J774.2 macrophages. **Pharmacological Reports**, v. 57, p. 107-112, 2005.

KUMAR, A.; MALIK, A. K.; TEWARY, D. K. A new method for determination of myricetin and quercetin using solid phase microextraction–high performance liquid chromatography–ultra violet/visible system in grapes, vegetables and red wine samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 631, p. 177-181, 2009.

LEE, K. M.; LEE, K. W.; JUNG, S. K.; LEE, E. J.; HEO, Y.; BODE, A. M.; LUBET, R. A.; LEE, H. J.; DONG, Z. Kaempferol inhibits UVB-induced COX-2 expression by suppressing Src kinase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, p. 2042-2049, 2010.

LEE, S. J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K. G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum*) and thyme leaves (*Thymes vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131-137, 2005.

LEMANSKA, K.; SZYMUSIAK, H.; TYRAKOWSKA, B.; ZIELINSKI, R.; SOFFERS, A. E. M. F.; RIETJENS, I. M. C. M. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 869-881, 2001.

LIMTRAKUL, P.; KHANTAMAT, O.; PINTHA, K. Inhibition of P-Glycoprotein Function and Expression by Kaempferol and Quercetin. **Journal of Chemotherapy**, Number 1, p. 86-95, 2005.

LIN, X.-Q.; HE, J.-B.; ZHA, Z.-G. Simultaneous determination of quercetin and rutin at a multi-wall carbon-nanotube paste electrodes by reversing differential pulse voltammetry. **Sensors and Actuators B**, v. 119, p. 608-614, 2006.

MAGNUSZEWSKA, J.; KROGULEC, T. Application of hot platinum microelectrodes for determination of flavonoids in flow injection analysis and capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 786, p. 39-46, 2013.

MEDVIDOVIC-KOSANOVIC, M.; SERUGA, M.; JAKOBEK, L.; NOVAK, I. Electrochemical and Antioxidant Properties of (+)-Catechin, Quercetin and Rutin. **Croatica Chimica Acta**, v. 83, p. 197-207, 2010.

MELO E. A.; GUERRA, N.B. "Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presente em alimentos". **Boletim SBCTA.**, v. 36, p. 1-11, 2002.

MIEAN, K. H.; MOHAMED, S. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3106-3112, 2001.

MOSES, P. R.; MURRAY, R. W. Chemically modified tin oxide electrode. **Analytical Chemistry**, v. 47, p. 1882-1886, 1975.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145-171, 2001.

MUTI, M.; GENÇDAĞ, K.; NACAĞ, F. M.; ASLAN, A. Electrochemical polymerized 5-amino-2-mercapto-1,3,4-thiadiazole modified single use sensors for detection of quercetin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 106, p. 181-186, 2013.

OLIVEIRA, A. C.; MASCARO, L. H. Evaluation of Carbon Nanotube Paste Electrode Modified With Copper Microparticles and Its Application to Determination of Quercetin. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 6, p. 804-818, 2011.

ONG, K. C.; KHOO, H. E. Insulinomimetic effects of myricetin on lipogenesis and glucose transport in rat adipocytes but not glucose transporter translocation. **Biochemical Pharmacology**, v. 51, p. 423-429, 1996.

ONG, K. C.; KHOO, H. E. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. **Life Sciences**, v. 67, p. 1695-1705, 2000.

PEJIĆ, N.; KUNTIĆ, V.; VUJIĆ, Z.; MIĆIĆ, S. Direct spectrophotometric determination of quercetin in the presence of ascorbic acid. **II FÁrmaco**, v. 59, p. 21-24, 2004.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações analíticas. **Química Nova**, v. 25, p. 1012-1021, 2002.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, p. 1995-2018, 1998.

PETROVICK, P. R.; KNORST, M. T. In vitro Release Testing in the Stability Evaluation of an Ointment Containing a Medicinal Plant Extract. **Pharmaceutical Research**, v. 10, Suppl., p. S-35, 1993.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PUSCH, J.; BRONDANI, D.; LUZA, L.; DUPONT, J.; VIEIRA, I. C. Pt-Pd bimetallic nanoparticles dispersed in an ionic liquid and peroxidase immobilized on nanoclay applied in the development of a biosensor. **Analyst**, v 138, p. 4898-4906, 2013.

RAMOS, S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, p. 427-442, 2007.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, J.; PAGANGA, G., Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 152-159, 1997.

RUPP, E. B.; ZUMAN, P.; SESTAKOVA, I.; HORAK, V. Polarographic determination of some pesticides: application to a study of their adsorption on lignin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 2016-2021, 1992.

SADIK, C. D.; SIES, H.; SCHEWE, T. Inhibition of 15-lipoxygenases by Flavonoids: Structure-activity Relations and Mode of Action. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 773-781, 2003.

SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, F.; CASTELLI, F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, p. 481-486, 1995.

SÁNCHEZ-MORENO, S.; LAURRAURI, J.A. & CALIXITO-SAURA, F. "Free radical scavenger capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grapes juices and related polyphenolic constituents". **Food Research International**, v. 36, p. 407-412, 1999.

SATPATI, A. K.; SAHOO, S.; DEY, M. K.; REDDY, A. V. R.; MUKHERJEE, T. Electrochemical and spectroelectrochemical investigations of quercetin on unmodified and DNA-modified carbon

paste electrode and its determination using voltammetry. **Analytical Methods**, v. 3, p. 1344-1350, 2011.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ª edição. Ed. UFSC, 2001.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p.144-158, 1965.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. S. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SKOOG, D. A.; et al. Tradução de M. T Grassi. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª Edição. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2006.

SONI, M. G.; BURDOCK, G. A.; CHRISTIAN, M. S.; BITLE, C. M.; CREA, R. Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 903-915, 2006.

SOUZA, D. de; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A.; Voltametria de Onda Quadrada. Primeira Parte: Aspectos Teóricos. **Química Nova**, v. 26, p. 81-89, 2003.

SOUZA, D. de; CODOGNOTO, L.; MALAGUTTI, A. R.; TOLEDO, R. A.; PEDROSA, V. A.; OLIVEIRA, R. T. S.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Voltametria de Onda Quadrada. Segunda Parte: Aplicações. **Química Nova**, v.27, p. 790-979, 2004.

SOUZA, M. F. B., Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Química Nova**, v. 20, p. 191-195, 1997.

SUN, G.; WANG, W. & WUA, J. "Pulse radiolysis study of the formation and the reactivity of baicalin radical anion, and in comparison with rutin, quercetin and acrylate ester radical anions in ethanol". **Radiation Physics and Chemistry**, v. 76, p. 951-959, 2007.

SUN, S.; ZHANG, M.; LI, Y.; HE, X. A Molecularly Imprinted Polymer with Incorporated Graphene Oxide for Electrochemical Determination of Quercetin. **Sensors**, v. 13, p. 5493-5506, 2013.

ŠVANCARA, I.; SCHACHL, K. Testing of unmodified carbon paste electrodes. **Chemické Listy**, v. 93, p. 490-499, 1999.

ŠVANCARA, I.; VYTRÁS, K.; BAREK, J.; ZIMA, J., Carbon paste electrodes in modern electroanalysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, p. 311-345, 2001.

ŠVANCARA, I.; VYTRÁS, K.; KALCHER, K.; WALCARIUS, A.; WANG, J. Carbon paste electrodes in facts, numbers, and notes: a review on the occasion of the 50-years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis. **Electroanalysis**, v. 21, p. 7-28, 2009A.

ŠVANCARA, I.; WALCARIUS, A.; KALCHER, K.; VYTRÁS, K. Carbon paste electrodes in the new millennium. **Central European Journal of Chemistry**, v. 7, p. 598-656, 2009B.

TIMBOLA, A. K.; SZPOGANICZ, B.; BRANCO, A.; PIZZOLATTI, M. G.; MONACHE, F. D. A new flavonol from leaves of *Eugenia jambolana*. **Fitoterapia**, v. 73, p. 174-176, 2002.

TIMBOLA, A. K.; DE SOUZA, C. D.; GIACOMELLI, C.; SPINELLI, A., Electrochemical oxidation of quercetin in hydro-alcoholic solution. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 139-148, 2006.

VESSAL, M.; HEMMATI, M.; VASEI, M. Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. **Comparative Biochemistry and Physiology part C**, v. 135, p. 357-364, 2003.

WANG, M.; ZHANG, D.; TONG, Z.; XU, X.; YANG, X. Voltammetric behavior and the determination of quercetin at a flowerlike Co_3O_4 nanoparticles modified glassy carbon electrode. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 41, p. 189-196, 2011.

WEBBER, C. Avaliação do perfil de penetração cutânea da quercetina. **Dissertação de Mestrado** - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

WITTIG, J.; HERDERICH, M.; GRAEFE, E. U.; VEIT, M. Identification of quercetin glucuronides in human plasma by high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 753, p. 237-243, 2001.

XU, G.-R.; KIM, S. Selective determination of quercetin using carbon nanotube-modified electrodes. **Electroanalysis**, v. 18, p. 1786-1792, 2006.

XU, J.; ZHANG, H.; CHEN, G. Carbon nanotube/polystyrene composite electrode for microchip electrophoretic determination of rutin and quercetin in *Flos Sophorae Immaturus*. **Talanta**, v. 73, p. 932-937, 2007.

YANG, B.; ARAI, K.; KUSU, F. Electrochemical behaviors of quercetin and kaempferol in neutral buffer solution. **Analytical Sciences**, v. 17, p. 987-989, 2001.

YANG, X.; WANG, F.; HU, S. The electrochemical oxidation of troxerutin and its sensitive determination in pharmaceutical dosage forms at PVP modified carbon paste electrode. **Colloids and Surface B**, v. 52, p. 8-13, 2006.

YOLA, M. L.; ATAR, N. A novel voltammetric sensor based on gold nanoparticles involved in p-aminothiophenol functionalized multi-walled carbon nanotubes: Application to the simultaneous determination of quercetin and rutin. **Electrochimica Acta**, v. 119, p. 24-31, 2014.

ZHANG, S.; YANG, X.; COBURN, R. A.; MORRIS, M. E. Structure Activity Relationships and Quantitative Structure Activity Relationships for the Flavonoid-mediated Inhibition of Breast Cancer Resistance Protein. **Biochemical Pharmacology**, v. 70, p. 627-639, 2005.

ZHANG, Y., CHEN, A. Y., LI, M., CHEN, C., & YAO, Q. Ginkgo biloba extract kaempferol inhibits cell proliferation and induces apoptosis in pancreatic cancer cells. **Journal of Surgical Research**, v. 14, p. 17-23, 2008.

ZHU, Q. G.; SUJARI, A. N. A.; AB GHANI, S. Nafion-MWCNT Composite Modified Graphite Paste for the Analysis of Quercetin in Fruits of *Acanthopanax sessiliflorus*, **Sensors & Actuators: B, Chemical**, v. 177, p.103- 110, 2013.