



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE  
E BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE**



**APLICAÇÃO DE SISTEMAS DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA  
COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA PARA DETERMINAÇÃO DE  
SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS**

**GEYSE ADRIANA CORRÊA RIBEIRO**

**São Luís - MA  
Julho/2019**

**GEYSE ADRIANA CORRÊA RIBEIRO**

**APLICAÇÃO DE SISTEMAS DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA  
COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA PARA DETERMINAÇÃO DE  
SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

**Orientador:**

Prof. Dr. Auro Atsushi Tanaka

**Co-orientador:**

Prof. Dr. Iranaldo Santos da Silva

**São Luís - MA  
Julho/2019**

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Ribeiro, Geysa Adriana Corrêa.

Aplicação de sistemas de análise por injeção em batelada com detecção eletroquímica para determinação de substâncias bioativas / Geysa Adriana Corrêa Ribeiro. - 2019.

144 f.

Coorientador(a): Iranaldo Santos da Silva.

Orientador(a): Auro Atsushi Tanaka.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Rede - Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís - MA, 2019.

1. BIA. 2. Eletrodo de carbono vítreo. 3. Eletrodos impressos. 4. Eletroquímica. 5. Substâncias bioativas.  
I. Silva, Iranaldo Santos da. II. Tanaka, Auro Atsushi.  
III. Título.

**GEYSE ADRIANA CORRÊA RIBEIRO**

**APLICAÇÃO DE SISTEMAS DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA  
COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA PARA DETERMINAÇÃO DE  
SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Auro Atsushi Tanaka

**Co-orientador:** Prof. Dr. Iranaldo Santos da Silva

Em: 02 / 07 / 2019

**Banca examinadora**

---

Prof. Dr. Auro Atsushi Tanaka  
Departamento de Química / CCET - UFMA

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Hideko Yamanaka  
Instituto de Química (IQ) / UNESP

---

Prof. Dr. Flávio Santos Damos  
Departamento de Química / CCET – UFMA

---

Prof. Dr. Antônio Carlos Romão Borges  
Departamento de Ciências Fisiológicas / CCBS- UFMA

---

Roberto Batista de Lima  
Departamento de Química / CCET – UFMA

**São Luís - MA  
Julho/2019**

*"Posso todas as coisas naquele que me fortalece!"*

*Filipenses, 4:13*

*"Bem-aventurado o homem que encontra a sabedoria,  
e que adquirir o conhecimento, pois a sabedoria é muito mais  
proveitosa que a prata, e o lucro que ela proporciona é maior  
que o acúmulo de ouro fino..."*

*Provérbios 3:13 e 14.*

*"É melhor tentar e falhar, que se preocupar em ver a vida  
passar.*

*É melhor tentar, ainda que em vão, que se sentar fazendo  
nada até o final.*

*Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa  
me esconder.*

*Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver".*

*Martin Luther King*

*Dedico às pessoas, que trabalharam muito para fazerem de mim quem sou hoje e que me ensinaram o valor do trabalho e do estudo.*

*Com muito amor...*

*Às minhas mães Maria Aparecida Corrêa e Raimunda Correia;*

*Ao meu amado marido Jeanderson Ribeiro e minha preciosa filha Yasmin Ribeiro, dádivas em minha vida;*

*Ao meu querido irmão Pablo de Jesus, padrasto Pedro Reis e amado pai Antônio.*

## AGRADECIMENTO

Somente ao final desta grande jornada, que é o trabalho de tese, conseguimos perceber que nos muitos momentos de dificuldade, onde o desapontamento e o cansaço imperam, quando achamos que a carga é pesada demais para carregar, Deus, em sua infinita sabedoria, nos ampara através da ajuda de pessoas, que colaboram conosco mesmo sem saber. Seja com uma opinião, um sorriso, ou até mesmo com o silêncio nas horas de desabafo, elas não têm ideia de como foram importantes. Externamente minha mais profunda gratidão a todos que contribuíram para a elaboração deste trabalho e particularmente:

À Deus, por ter me concedido o dom da vida, por me amparar nos momentos difíceis, por dar-me força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho correto nas horas incertas e me permitiu a realização desta conquista.

À Universidade Federal do Maranhão e ao Programa de Pós Graduação em Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, pela oportunidade de formação e capacitação profissional.

A Central Analítica de Química da Universidade Federal do Maranhão por ter me concedido as condições necessárias à realização deste trabalho.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Auro Atsushi Tanaka que me acolheu e me proporcionou a oportunidade de realizar este trabalho e o meu co-orientador Prof. Dr. Iranaldo Santos da Silva, ambos meus “pais científicos”, por toda confiança depositada, amizade, orientação, dedicação, paciência, motivação e instrução ao longo desse trabalho.

À minha mãe Maria Aparecida a quem eu tenho uma grande admiração e uma infindável dívida de gratidão por ter investido na minha educação, nunca ter desistido de mim, apoio e auxílio em todos os momentos da minha vida e, principalmente, por cuidar diariamente com muito amor da minha filha para que eu pudesse desenvolver este trabalho.

Ao meu maior tesouro, razão de toda minha persistência e luta constante, minha filha Yasmin Aparecida a quem amo incondicionalmente.

Ao meu amado marido Jeanderson Ribeiro pelo o amor, dedicação, carinho, companheirismo, compreensão e paciência, pois em sua sabedoria soube usar as palavras certas nos momentos mais difíceis.

A toda minha família, em especial minha segunda mãe Raimunda, meu irmão Pablo, meu padrasto Pedro, meu pai Antônio, minhas primas Giselle, Ellyane Betânia e Evanna e primo Gilvan, pelo apoio sentimental, amor incondicionais e incentivos.

À professora Dr.<sup>a</sup> Cláudia Quintino da Rocha e a sua aluna Jessyane Ferreira pela amizade construída, incentivo, apoio, sugestões e as amostras de extratos gentilmente cedidos.

Aos professores Dr. Roberto Batista de Lima, Dr. Flávio Santos Damos, Dr.<sup>a</sup> Rita de Cássia Silva Luz, Dr.<sup>a</sup> Luiza Maria Ferreira Dantas e Dr.<sup>a</sup> Ana Clécia Santos de Alcântara por toda contribuição, apoio, sugestão, compreensão, amizade e sábias palavras nos momentos árduos.

Aos colegas do grupo de pesquisa em Eletroquímica (LELQ) pela paciência quando tiveram que me ensinar, pela parceria, pelo auxílio na hora do desânimo e principalmente pelos momentos felizes compartilhados no cafezinho e confraternizações. Em especial aos meus caros amigos e companheiros Paulina, Raynmaria, Elizaura, Nayane, Allan, Wiliam Veloso, Herbeth, Bruno, Wemerson e Patrick, que tornaram meus dias no laboratório mais felizes, saibam que estarei sempre torcendo pelo sucesso pessoal e profissional de vocês.

Aos amigos do grupo Bionanos por todo apoio e ajuda em especial a Jeovan, Gabriel, Welton e Mayara pelo auxílio e apoio nos momentos de dificuldades.

Aos colegas de trabalho Anderson, Hudson, Nayara, Paulo Henrique, Edla, Nilma e Beckilene pela amizade, apoio e auxílio.

A todos os colegas de trabalho da escola Vivente Maia em especial a gestora Bernadeth de Lourdes, a gestora adjunta Geórgia e as coordenadoras Viviane e Bethe pela compreensão dos momentos de ausência, pela amizade e incentivo.

A minha querida bolsista Rafaela Serejo pela amizade, imensa ajuda, colaboração e auxílio nos períodos necessários.

Aos meus amigos Jimmy, Núbia Fernanda, Cristiane, Aline Freitas, Rafaela Dovera, Soliana, Lucinete, Jôselina, Alessandro, Helen, Harley e Carla Daniele por todos os momentos de descontração e dificuldades que juntas vivenciamos, o qual sempre pude contar com o companheirismo, incentivo e carinho. Obrigada pela inestimável amizade que permanecerá sempre em meu coração.

Há muito mais a quem agradecer...

A todos aqueles que, embora não nomeados aqui, me brindaram com seus inestimáveis apoios em momentos distintos e por suas presenças (ou ausências) afetivas inesquecíveis. O meu carinho e reconhecimento! Todos vocês são co-autores deste trabalho e da realização deste sonho.

RIBEIRO, Geysa Adriana Corrêa. **Aplicação de sistemas de análise por injeção em batelada com detecção eletroquímica para determinação de substâncias bioativas**. 2019. 144 f. Tese de Doutorado em Biotecnologia - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

## RESUMO

A grande procura da humanidade por meios que favoreçam uma vida longa e saudável tem impulsionado pesquisas por novas substâncias capazes de satisfazer tais necessidades. Entre estas substâncias, destacam-se os compostos bioativos, os quais que apresentam diversas funções biológicas, tais como: ação antioxidante, anti-inflamatória, protetor contra micro-organismos patogênicos, inibidor do processo de carcinogênese, proteção contra a incidência de raios ultravioleta, entre outras. Tais compostos, uma vez presentes na natureza ou em vários produtos utilizados no cotidiano, demandam desafios direcionados ao desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação de suas concentrações. A maioria das técnicas reportadas na literatura dependem de etapas iniciais de preparação das amostras que demandam muito tempo, utilizam grande quantidade de reagentes (solventes) e os equipamentos associados são de custos elevados o que torna caro o custo final das análises. Portanto, se faz necessário desenvolver técnicas rápidas, baratas e mais sensíveis. Neste sentido, as técnicas eletroquímicas surgem como alternativas viáveis e promissoras. Assim, o presente trabalho apresenta métodos simples, rápidos e de baixo custo para determinação das substâncias bioativas catequina e quercetina utilizando a técnica de análise por injeção em batelada com detecção amperométrica convencional (BIA-AC) fazendo uso de eletrodos de carbono impresso (ECI), e empregando um eletrodo de carbono vítreo (ECV) com um sistema BIA com detecção amperométrica de pulsos múltiplos (BIA-MPA). O método proposto BIA-MPA é baseado na aplicação de três potenciais de pulso (potencial de oxidação, de limpeza e de condicionamento) vs  $\text{Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ , evitando a passivação por produtos de oxidação e permitindo a quantificação. Os métodos propostos apresentaram resultados satisfatórios. O BIA-MPA apresentou um intervalo linear de 20 a 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $R = 0,999$ ), com limite de detecção (LD) de 0,03  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e limite de quantificação (LQ) 0,10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  que possibilitou a determinação de catequina em amostras de chá verde e extratos de plantas medicinais. A repetibilidade do método para injeções sucessivas de catequina a 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $n = 30$ ) apresentou um desvio padrão relativo (DPR) de 0,85%. Já o método BIA-AC na determinação da catequina, mostrou um intervalo linear de 1 a 150  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $R = 0,999$ ), com LD e LQ de 0,021 e 0,070  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e, a estabilidade do método foi avaliada com injeções

sucessivas de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de catequina, apresentando um DPR = 1,03% ( $n = 30$ ). Ambos os métodos apresentaram taxa de amostragem de 120 injeções por hora. Adicionalmente, a determinação da quercetina usando o método BIA-MPA mostrou-se preciso (DPR de 0,74%;  $n = 30$ ), rápido ( $72 \text{ injeções h}^{-1}$ ) com baixos LD ( $0,004 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e LQ ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), e utilizando o método BIA-AC também se mostrou preciso (DPR de 1,06%;  $n = 30$ ) e rápido ( $120 \text{ injeções h}^{-1}$ ), com LD de  $0,027 \mu\text{mol L}^{-1}$  e LQ de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Ambos os métodos, apresentaram intervalo linear de 10 a  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Aplicações destas metodologias na determinação de quercetina em amostras de extratos das folhas das plantas medicinais apresentaram resultados consistentes com os obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com nível de confiança de 95%. Os métodos propostos apresentaram resultados favoráveis como: baixo custo operacional, procedimento simples de preparo das amostras (somente dissolução e diluição), boa frequência analítica, alta precisão, baixo consumo de reagente e amostras e, conseqüentemente, geração de pequena quantidade de resíduos por análise. Adicionalmente, as características de portabilidade dos sistemas BIA, permitem serem aplicados em análises no campo.

**Palavras-chave:** Substâncias bioativas. BIA. Eletrodos impressos. Eletrodo de carbono vítreo. Eletroquímica.

RIBEIRO, Geysel Adriana Corrêa. **Application of batch injection analysis systems with electrochemical detection for the determination of bioactive substances**. 2019. 145 f. PhD Thesis in Biotechnology - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

### ABSTRACT

The great demand of humanity for means that favor a long and healthy life has spurred research for new substances capable of meeting such needs. Among these substances are bioactive compounds that have several biological functions, such as antioxidant action, anti-inflammatory, protective against pathogenic microorganisms, inhibitor of the carcinogenesis process, protection against the incidence of ultraviolet rays, among others. Such compounds, once present in nature or in various products used in daily life, demand challenges directed to the development of analytical methodologies to determine their concentrations. Most techniques reported in the literature depend on early sample preparation steps that are time consuming; use a large amount of reagents (solvents) and expensive associated equipment, which increases the final cost of analysis. Therefore, it is necessary to develop fast, cheap and more sensitive techniques. In this sense, electrochemical techniques appear as viable and promising alternatives. Thus, this work presents simple, fast and low cost methods for the determination of catechin and quercetin bioactive substances using the conventional amperometric detection batch injection technique (BIA-AC) using printed carbon electrodes (ECI), and employing a glassy carbon electrode (ECV) with a multi-pulse amperometric detection BIA (BIA-MPA) system. The proposed BIA-MPA method is based on the application of three potential pulses (oxidation, cleaning and conditioning potentials) *vs* Ag / AgCl / KCl<sub>sat</sub>, avoiding passivation by oxidation products and allowing quantification. The proposed methods presented satisfactory results. The BIA-MPA presented a linear range of 20 to 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $R = 0.999$ ), with a detection limit (LD) of 0.03  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and a limit of quantification (LQ) of 0.10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  which made it possible to determine catechin in green tea samples and herbal extracts. The repeatability of the method for successive catechin injections at 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $n = 30$ ) showed a relative standard deviation (RPD) of 0.85%. The BIA-AC method for catechin determination showed a linear range from 1 to 150  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $R = 0.999$ ), with LD and LQ of 0.021 and 0.070  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and the stability of the method was evaluated with successive injections of 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  catechin, presenting a DPR = 1.03% ( $n = 30$ ). Both methods presented a sample rate of 120 injections per hour. In addition, quercetin determination using the BIA-MPA method was accurate (DPR 0.74%;  $n = 30$ ), rapid (72 injections  $\text{h}^{-1}$ ) with low LD (0.004  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) and LQ (10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). The application of BIA-

AC method was also accurate (1.06% DPR;  $n = 30$ ) and fast (120 injections  $\text{h}^{-1}$ ), with LD of  $0.027 \mu\text{mol L}^{-1}$  and LQ of  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Both methods presented linear range from 10 to  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Applications of these methodologies in the determination of quercetin in medicinal plant leaf extract samples showed results consistent with those obtained by high performance liquid chromatography (HPLC), with a 95% confidence level. The proposed methods demonstrated favorable results such as: low operating cost, simple sample preparation procedure (dissolution and dilution only), good analytical frequency, high precision, low reagent and sample consumption and, consequently, the generation of small amounts of residues by analysis. Additionally, the portability characteristics of BIA systems allow them to be applied in field analysis.

**Keywords:** Bioactive substances. BIA. Printed electrodes. Glassy carbon electrode. Electrochemistry..

## LISTA DE FIGURAS

### *Capítulo 2*

- Figura 2.1: Estrutura básica dos flavonóides com os respectivos anéis aromáticos A, B e C. 30
- Figura 2.2: Estrutura molecular da catequina..... 31
- Figura 2.3: Estrutura molecular da quercetina ..... 33
- Figura 2.4: Estrutura molecular da quercitrina. .... 34
- Figura 2.5: Estrutura molecular da rutina..... 36
- Figura 2.6: Sistema convencional para medições eletroquímicas ..... 38
- Figura 2.7: Imagem ilustrativa de um eletrodo de carbono impresso típico com os três eletrodos acoplados: trabalho (ET), referência (ER) e eletro auxiliar (EA)..... 39
- Figura 2.8: (A) Sinal de excitação para a voltametria cíclica e, (B) voltamograma cíclico para um processo redox reversível. .... 41
- Figura 2.9 (A) Perturbação aplicada, variando de  $E_i$  a  $E_f$ . (B) resposta de corrente para um experimento de degrau único de potencial. .... 43
- Figura 2.10: (A) Três degraus aplicados em sequência e (B) respectivos sinais coletados por amperometria de múltiplos pulsos. .... 45
- Figura 2.11: Esquema de uma célula de BIA (A) e as etapas na aquisição do sinal BIA (B). a) eletrodo de trabalho; b) solução eletrolítica; c) ponteira da micropipeta; d) eletrodo de referência; e) eletrodo auxiliar; f) micropipeta ou seringa; g) antes da injeção; h) transporte durante a injeção; i) fim da injeção; j) lavagem do eletrodo de trabalho; k) equilíbrio final... 46

### *Capítulo 6*

- Figura 6.1: Estrutura química da catequina (1), da rutina (2) e da quercitrina (3) ..... 66
- Figura 6.2: Sistema utilizado para medições eletroquímicas: (A) célula para medições voltamétricas; (B) célula para medições sistema BIA; (C) micropipeta eletrônica motorizada; (D) sistema eletroquímico BIA completo. .... 68
- Figura 6.3: Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de carbono vítreo em solução tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,5 na ausência (a) e na presença da catequina ( $94,33 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) (b). Velocidade de varredura de  $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$ ..... 70
- Figura 6.4: Voltamograma hidrodinâmico obtido pelo sistema do BIA com detecção amperométrica para injeções em triplicata de  $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de catequina. Eletrólito suporte: solução tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,5; volume de injeção:  $100 \text{ } \mu\text{L}$ , potenciais variáveis ( $0,00 - 1,50 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ )..... 71
- Figura 6.5: (A) Dados de repetibilidade e (B) respectivos valores de correntes obtidos a partir de sucessivas injeções de catequina  $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $n=30$ ) usando amperometria. Eletrólito de

suporte: solução tampão acetato de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,5); volume de injeção:  $100 \text{ }\mu\text{L}$ ; taxa de injeção:  $76,92 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$ ; potencial:  $+0,4 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ ..... 72

Figura 6.6: (A) Dados de repetibilidade e (B) respectivos valores de correntes obtidos a partir de sucessivas injeções de catequina  $50 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $n=30$ ) usando amperometria BIA- MPA. Eletrólito de suporte:  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de solução tampão acetato (pH 4,5); injeção volume:  $100 \text{ }\mu\text{L}$ ; taxa de injeção:  $76,92 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$ ; potenciais:  $+0,40 \text{ V}$ ,  $+1,40 \text{ V}$  e  $0,00 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ . ..... 73

Figura 6.7: (A) Efeitos da taxa de injeção da micropipeta automática ( $27,72 - 76,92 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$ ) e (B) volume de injeção ( $20-200 \text{ }\mu\text{L}$ ) usando o sistema BIA com detecção amperométrica para injeções em triplicadas de catequina  $50 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ . Eletrólito de suporte: solução tampão de acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,5); volume de injeção:  $100 \text{ }\mu\text{L}$ ; potenciais:  $+0,40 \text{ V}$ ,  $+1,40 \text{ V}$  e  $0,00 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ ,  $+1,40 \text{ V}$  e  $0,00 \text{ V vs. Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ . ..... 74

Figura 6.8: Amperogramas obtidos para injeções em triplicatas ( $n = 3$ ) intercalado soluções contendo  $10$  (a) e  $50$  (b)  $\mu\text{Mol L}^{-1}$  catequina volume de injeção:  $100 \text{ }\mu\text{L}$ ; taxa de injeção:  $76,92 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$ ; potenciais:  $+0,40 \text{ V}$ ,  $+1,40 \text{ V}$  e  $0,00 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ . ..... 74

Figura 6.9: (A) Amperogramas obtidos a partir de injeções em triplicata de soluções contendo concentrações crescentes de catequina ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) (a = 20; b = 30; c = 40; d = 50; e = 60; f = 80; g = 100), amostras de chá verde (h e i) e amostras de chá verde enriquecidas com catequina (j, k e l). Eletrólito de suporte:  $0,1 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  de solução tampão acetato (pH 4,5); volume de injeção:  $100 \text{ }\mu\text{L}$ ; taxa de injeção:  $76,92 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$ ; potenciais:  $+0,40 \text{ V}$ ,  $+1,40 \text{ V}$  e  $0,00 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ . (B). Respectiva curva de calibração ( $R = 0,999$ ). ..... 75

Figura 6.10: Cromatograma da solução padrão catequina (A) e amostra de chá verde (B) por detector de UV,  $270 \text{ nm}$ . ..... 78

## Capítulo 7

Figura 7.1: Estrutura química da catequina. .... 84

Figura 7.2: Sistema utilizado para medições eletroquímicas: (A) partes da célula BIA; (B) célula BIA para ECI com micropipeta automática motorizada; (C) sistema eletroquímico BIA completo. .... 88

Figura 7.3: Voltamogramas cíclicos obtidos com o ECI em tampão acetato de sódio a  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,5) na ausência (a) e presença (b) de  $100 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  de catequina ( $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$ ). A inserção B mostra o comportamento reversível da catequina no ECI em uma janela de potencial mais estreita. .... 90

Figura 7.4: Voltamograma hidrodinâmico obtido pela plotagem dos valores médios das correntes de pico para injeções em triplicata ( $n = 3$ ) de  $50 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  de catequina, em função do potencial aplicado no sistema BIA. Solução tampão de suporte de eletrólito:  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de acetato de sódio (pH 4,5); volume de injeção:  $100 \text{ }\mu\text{L}$ ; faixa de potencial:  $0,0-1,5 \text{ V}$ . ..... 91

Figura 7.5: Otimização dos parâmetros BIA: parâmetros amperométricos e dados de pico de corrente para (A) diferentes volumes de injeção ( $20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180$  e  $200 \text{ }\mu\text{L}$ ) e (B) diferentes taxas de velocidade de dispensa da micropipeta programável ( $27,72, 45,45$  e  $76,92 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$ ). Eletrólito suporte:  $0,1 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  de acetato de sódio (pH 4,5); potencial:  $+0,30 \text{ V vs PRE}$ . A inserção mostra os sinais amperométricos do BIA para ambas Figuras... 92

Figura 7.6: Amperogramas e dados de corrente de pico obtidos no estudo da repetibilidade com sucessivas injeções ( $n = 30$ ) de catequina a  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  no sistema BIA. Solução de eletrólito suporte: tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de (pH 4,5); volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ ; velocidade de injeção:  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$ ; potencial:  $+0,3 \text{ V vs ERP}$ . ..... 93

Figura 7.7: Amperogramas e dados de correntes de pico obtidos na reprodutibilidade estudo usando (A) diferentes ECIs e injeções em triplicado ( $n = 3$ ), e (B) um ECI em diferentes dias de análise, com dez injeções por dia ( $n = 10$ ). Eletrólito suporte: solução tampão acetato sódio (pH 4,5)  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ ; velocidade de injeção:  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$ ; potencial:  $+0,3 \text{ V vs ERP}$ . A inserção mostra os sinais amperométricos do BIA. .... 94

Figura 7.8: Registros amperométricos obtidos a partir de injeções em triplicatas de soluções contendo concentrações de catequina ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ): a = 1; b = 10; c = 30; d = 50; e = 70; f = 90; g = 110; h = 130; i = 15; amostras de extratos RM (j), AB-MG (k) e LO (l) e amostras do extrato RM enriquecidas com catequina ( $m_1$ ,  $m_2$  e  $m_3$ ). Eletrólito suporte solução tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,5; volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ ; velocidade de injeção:  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$ ; potencial  $+0,3 \text{ V vs ERP}$ . ..... 95

Figura 7.9: Cromatogramas registrados para solução padrão de catequina (a) e extratos vegetais RM (b), AB-MG (c) e LO (d). Detector UV  $\lambda = 280 \text{ nm}$ , coluna AQUA RP C18... 96

## Capítulo 8

Figura 8.1: Estrutura química dos flavonóides: (1) Quercetina, (2) Rutina e (3) Catequina. Os grupos OH estão presentes nos anéis A, B e C. .... 105

Figura 8.2: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de carbono vítreo (ECV) e (B) eletrodo de carbono impresso (ECI) em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  água/etanol (80/20), pH 6,0 na ausência (1) e na presença da quercetina  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  (2). Velocidade de varredura de  $v=0,05 \text{ V.s}^{-1}$ . ..... 109

Figura 8.3: Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos no sistema do BIA com detecção amperométrica para injeções em triplicata ( $n=3$ ) de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de quercetina em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,0 água/etanol (80/20), volume de injeção  $100 \mu\text{L}$ . (A) ECV; (B) ECI; potenciais variáveis entre  $-0,10$  e  $1,00 \text{ V}$ . ..... 111

Figura 8.4: Dados de repetibilidade com os respectivos valores de correntes obtidos a partir de sucessivas injeções de quercetina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $n=30$ ) em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,0 água/etanol (80/20), volume de injeção  $100 \mu\text{L}$ . (A) ECV em  $+0,30 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ ; (B) ECI em  $+0,20 \text{ V vs Ag (ERP)}$ . ..... 112

Figura 8.5: Dados de repetibilidade com os respectivos valores de correntes obtidos a partir de sucessivas injeções de quercetina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $n=30$ ) usando o ECV com BIA-MPA em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,0 água/etanol (80/20); potencial de oxidação  $+0,30 \text{ V}$ , limpeza  $+1,30 \text{ V}$  e condicionamento  $0,00 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ . ..... 113

Figura 8.6: Avaliação da taxa de distribuição da micropipeta programável ( $27,72$ ;  $45,45$  e  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$ ) para injeções em triplicata ( $n=3$ ) de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de quercetina em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,0 água/etanol (80/20), volume de injeção  $100 \mu\text{L}$ . (A) BIA-MPA usando o ECV com potencial de oxidação  $+0,30 \text{ V}$ , limpeza  $+1,30 \text{ V}$  e condicionamento  $0,00 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$  e (B) BIA-AD usando o ECI em  $+0,20 \text{ V vs Ag (ERP)}$ . ..... 114

Figura 8.7: Avaliação do volume de injeção (10 - 200  $\mu\text{L}$ ) obtidos pelo sistema BIA com detecção amperométrica para injeções em triplicata ( $n=3$ ) de 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de quercetina em solução tampão fosfato 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  pH 6,0 água/etanol (80/20), volume de injeção 100  $\mu\text{L}$ , taxa de injeção 76,92  $\mu\text{L s}^{-1}$ . (A) BIA-MPA usando o ECV no potencial de oxidação + 0,3 V, limpeza + 1,3 V e condicionamento 0 V vs Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub> e (B) BIA-AC usando o ECI no potencial + 0,2 V vs Ag (ERP). ..... 114

Figura 8.8: Gráfico do estudo de reprodutibilidade inter-dias. (A) BIA-MPA usando o ECV no potencial + 0,3 V vs Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub>; (B) BIA-AD usando o ECI no potencial + 0,2 V vs Ag (ERP). ..... 115

Figura 8.9: Amperogramas obtidos a partir de injeções em triplicatas de soluções contendo concentrações crescentes de quercetina ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ): a = 10; b = 30; c = 50; d = 70; e = 90; f = 110; g = 130; h = 150; amostras de extratos BU (i), VG (j) e AB-MA (k) e amostras do extrato VG enriquecidas com quercetina ( $l_1$ ,  $l_2$  e  $l_3$ ). Eletrólito suporte solução tampão fosfato 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  pH 6,0 água/etanol (80/20), taxa de injeção 76,92  $\mu\text{L s}^{-1}$ , volume de injeção 100  $\mu\text{L}$ . (A) BIA-MPA usando o ECV no potencial de oxidação + 0,3 V, limpeza + 1,3 V e condicionamento 0 V vs Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub>; (B) Respectiva curva de calibração; (C) BIA-AC usando o eletrodo de ECI no potencial + 0,2 V vs Ag (ERP); (D) Respectiva curva de calibração. .... 117

Figura 8.10: Cromatogramas da solução padrão quercetina (A) e das amostras dos extratos vegetais BU (B), VG (C), AB-MA (D) (detector UV  $\lambda=245$  nm). ..... 118

## Capítulo 9

Figura 9.1: Amperogramas obtidos pelo sistema do BIA-MPA com ECV para dez ( $n=10$ ) injeções de 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de catequina em solução tampão acetato 0,1  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 4,5, volume de injeção 100  $\mu\text{L}$ , velocidade de injeção da micropipeta programável 76,92  $\mu\text{L s}^{-1}$  e 0,1 s como tempo de pulso aplicado. (A) potenciais 0,4 V (potencial de oxidação), 1,2 V (potencial de limpeza) e 0,0 V (potencial de condicionamento) vs Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub>, DPR= 8,28%; (B) potenciais 0,4 V (potencial de oxidação), 1,3 V (potencial de limpeza) e 0,0 V (potencial de condicionamento) vs Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub>, DPR= 7,11%; (C) potenciais 0,4 V (potencial de oxidação), 1,4 V (potencial de limpeza) e 0,0 V (potencial de condicionamento) vs Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub>, DPR= 0,82%; e (D) potenciais 0,4 V (potencial de oxidação), 1,5 V (potencial de limpeza) e 0,0 V (potencial de condicionamento) vs Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub>. DPR= 0,80%. ..... 125

Figura 9.2: Amperogramas obtidos pelo sistema do BIA-MPA com ECV para 10 injeções de 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de catequina em solução tampão acetato 0,1  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 4,5, volume de injeção 100  $\mu\text{L}$ , velocidade de injeção da micropipeta programável 76,92  $\mu\text{L s}^{-1}$  e 0,1 s como tempo de pulso aplicado. (A) potenciais + 0,4 V e 0 V vs Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub>, média das correntes 6,06  $\pm$  0,83  $\mu\text{A}$ , DPR= 13,67%; (B) potenciais + 0,4 V e 1,4 V vs Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub>, média das correntes 0,84  $\pm$  0,63  $\mu\text{A}$  DPR= 75,10%. ..... 126

Figura 9.3: Amperograma obtido pelo sistema BIA-MPA com ECV para injeções em triplicatas ( $n=3$ ) contendo concentrações de 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ : (a) catequina, (b) quercitrina, (c) rutina. Condições: solução tampão acetato 0,1  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 4,5; volume de injeção: 100  $\mu\text{L}$ , velocidade de injeção da micropipeta programável 76,92  $\mu\text{L s}^{-1}$  e 0,1 s como tempo de pulso aplicado nos potenciais + 0,4 V, + 1,4 V e 0,0 V vs Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub>. ..... 126

Figura 9.4: Amperograma obtido pelo sistema BIA-MPA com ECV para injeções em triplicatas ( $n=3$ ) de soluções contendo concentrações de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de catequina e diferentes concentrações de quercitrina: (a) catequina; (b) catequina e quercitrina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (c) catequina e quercitrina  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (d) catequina e quercitrina  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (e) catequina e quercitrina  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (f) catequina e quercitrina  $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (g) catequina e quercitrina  $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (h) catequina e quercitrina  $350 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (i) catequina e quercitrina  $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (j) catequina e quercitrina  $450 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (k) catequina e quercitrina  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (l) catequina e quercitrina  $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições: solução tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,5; volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ ; velocidade de injeção da micropipeta programável  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$  e  $0,1 \text{ s}$  como tempo de pulso aplicado nos potenciais  $0,4 \text{ V}$ ,  $1,4 \text{ V}$  e  $0,0 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ . ..... 127

Figura 9.5: Amperograma obtido pelo sistema BIA-MPA com ECV para injeções em triplicatas ( $n=3$ ) de soluções contendo concentrações de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de catequina e diferentes concentrações de rutina: (a) catequina; (b) catequina e rutina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (c) catequina e rutina  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (d) catequina e rutina  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (e) catequina e rutina  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (f) catequina e rutina  $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (g) catequina e rutina  $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (h) catequina e rutina  $350 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (i) catequina e rutina  $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (j) catequina e rutina  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições: solução tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,5; volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção da micropipeta programável  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$  e  $0,1 \text{ s}$  como tempo de pulso aplicado nos potenciais  $0,4 \text{ V}$ ,  $1,4 \text{ V}$  e  $0,0 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ . ..... 128

Figura 9.6: Cromatogramas registrados para amostra de chá verde (A), da solução padrão de catequina (B) e da solução de misturas de padrões (C) (catequina (1), quercitrina (2) e rutina (3)) por detector de UV,  $270 \text{ nm}$ . ..... 129

Figura 9.7: Amperograma obtido pelo sistema BIA com eletrodo de carbono impresso para injeções em triplicatas ( $n=3$ ) contendo concentrações de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ : (a) catequina, (b) quercitrina e (c) rutina. Condições: Eletrólito suporte solução tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,5, volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção da micropipeta programável  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$  e potencial  $0,3 \text{ V vs ERP}$ . ..... 130

Figura 9.8: Amperograma obtido pelo sistema BIA-AC com eletrodo de ECI para injeções em triplicatas ( $n=3$ ) de soluções contendo concentrações de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de catequina e diferentes concentrações de quercetina: (a) catequina; (b) catequina e quercetina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (c) catequina e quercetina  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (d) catequina e quercetina  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições: Eletrólito suporte solução tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,5, volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção da micropipeta programável  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$  e potencial  $0,3 \text{ V vs ERP}$ . ..... 131

Figura 9.9: Amperograma obtido pelo sistema BIA-AC com eletrodo de ECI para injeções em triplicatas ( $n=3$ ) de soluções contendo concentrações de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de catequina e diferentes concentrações de rutina: (a) catequina; (b) catequina e rutina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (c) catequina e rutina  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (d) catequina e rutina  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (e) catequina e rutina  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  e catequina e rutina  $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições: Eletrólito suporte solução tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,5, volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção da micropipeta programável  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$  e potencial  $0,3 \text{ V vs ERP}$ . ..... 132

Figura 9.10: Cromatogramas registrados para solução dos extratos vegetais LP (A), RM (B) e AB-MG (C), da solução padrão de catequina (D) e da solução de misturas de padrões (E) (catequina (1), quercetina (2) e rutina (3)) por detector de UV,  $280 \text{ nm}$ . ..... 133

Figura 9.11: Amperogramas obtidos pelo sistema do BIA-MPA com ECV para dez (n=10) injeções de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de quercetina em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,0 água/etanol (80/20), volume de injeção  $100 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção da micropipeta programável  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$  e  $0,1 \text{ s}$  como tempo de pulso aplicado. (A) potenciais + 0,3 V (potencial de oxidação), + 1,1 V (potencial de limpeza) e 0,0 V (potencial de condicionamento) vs Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub>, DPR= 8,19%; (B) potenciais + 0,3 V (potencial de oxidação), + 1,2 V (potencial de limpeza) e 0,0 V (potencial de condicionamento) vs Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub>, DPR= 7,63%; (C) potenciais + 0,3 V (potencial de oxidação), + 1,3 V (potencial de limpeza) e 0,0 V (potencial de condicionamento) vs Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub>, 3,0 M, DPR= 0,70%; e (D) potenciais 0,3 V (potencial de oxidação), + 1,4 V (potencial de limpeza) e 0,0 V (potencial de condicionamento) vs Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub> DPR= 0,65%. ..... 134

Figura 9.12: Amperograma obtido pelo sistema BIA-MPA com ECV para injeções em triplicatas (n=3) contendo concentrações de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ : (a) quercetina, (b) rutina, (c) catequina. Eletrólito suporte solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,0 água/etanol (80/20); volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção da micropipeta programável  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$  e  $0,1 \text{ s}$  como tempo de pulso aplicado nos potenciais + 0,3 V, + 1,3 V e 0,0 V vs Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub>. ..... 135

Figura 9.13: Amperograma obtido pelo sistema BIA-MPA com ECV para injeções em triplicatas (n=3) de soluções contendo concentrações de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de quercetina e diferentes concentrações de rutina: (a) quercetina; (b) quercetina e rutina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (c) quercetina e rutina  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (d) quercetina e rutina  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (e) quercetina e rutina  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (f) quercetina e rutina  $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (g) quercetina e rutina  $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Eletrólito suporte solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,0 água/etanol (80/20); volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção da micropipeta programável  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$  e  $0,1 \text{ s}$  como tempo de pulso aplicado nos potenciais 0,3 V, 1,3 V e 0,0 V vs Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub>. ..... 136

Figura 9.14: Amperograma obtido pelo sistema BIA-MPA com ECV para injeções em triplicatas (n=3) de soluções contendo concentrações de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de quercetina e diferentes concentrações de catequina: (a) quercetina; (b) quercetina e catequina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (c) quercetina e catequina  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (d) quercetina e catequina  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (e) quercetina e catequina  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Eletrólito suporte solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,0 água/etanol (80/20); volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção da micropipeta programável  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$  e  $0,1 \text{ s}$  como tempo de pulso aplicado nos potenciais + 0,3 V, + 1,3 V e 0,0 V vs Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub>. ..... 137

Figura 9.15: Amperograma obtido pelo sistema BIA-AC com ECI para injeções em triplicatas (n=3) contendo concentrações de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ : (a) quercetina, (b) rutina, (c) catequina. Condições: Eletrólito suporte solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,0 água/etanol (80/20); volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção da micropipeta programável  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$  e potencial 0,2 V vs ERP. .... 138

Figura 9.16: Amperograma obtido pelo sistema BIA-AC com o ECI para injeções em triplicatas (n=3) de soluções contendo concentrações de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de quercetina e diferentes concentrações de rutina: (a) quercetina; (b) quercetina e rutina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (c) quercetina e rutina  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (d) quercetina e rutina  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (e) quercetina e rutina  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições: Eletrólito suporte solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,0 água/etanol (80/20); volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção da micropipeta programável  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$  e 0,2 V vs Ag (ERP). .... 139

Figura 9.17: Amperograma obtido pelo sistema BIA-AC com o ECI para injeções em triplicatas (n=3) de soluções contendo concentrações de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de quercetina e diferentes concentrações de catequina: (a) quercetina; (b) quercetina e catequina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (c) quercetina e catequina  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (d) quercetina e catequina  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições: Eletrólito suporte solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,0 água/etanol (80/20); volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção da micropipeta programável  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$  e potencial  $0,2 \text{ V vs ERP}$ ..... 140

Figura 9.18: Cromatogramas registrados para solução dos extratos vegetais BU (A), VG (B) e AB-MA (C), da solução padrão de quercetina (D) e da solução de misturas de padrões (E) (catequina (1), quercetina (2) e rutina (3)) por detector de UV, 245 nm. .... 141

## LISTA DE TABELAS

### *Capítulo 6*

Tabela 6.1: Comparação do desempenho analítico do método proposto com alguns métodos da literatura para determinação de catequinas..... 76

Tabela 6.2: Recuperações de padrões de catequina adicionados em amostras de chá verde... 77

### *Capítulo 7*

Tabela 7.1: Concentrações de catequina nas amostras de extrato vegetal (n = 3), obtidas usando o sistema BIA e HPLC-UV / Vis..... 96

Tabela 7.2: Comparação das características analíticas do método proposto com outros métodos reportados na literatura para a determinação de catequina..... 97

Tabela 7.3: Valores de recuperação obtidos pela análise no método BIA após fortificação com amostra padrão de catequina ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )..... 98

### *Capítulo 8*

Tabela 8.1: Parâmetros experimentais obtidos pelo voltamograma hidrodinâmico da quercetina com o ECV (resultados médios para injeções em triplicata de uma solução padrão de quercetina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). ..... 110

Tabela 8.2: Características analíticas obtidas pelos métodos BIA-MPA e BIA-AC para determinação de quercetina. .... 117

Tabela 8.3: Comparação dos resultados obtidos para determinação de quercetina por BIA-MPA, BIA-AC e HPLC (resultado médio, n = 3). ..... 118

Tabela 8.4: Valores de recuperação obtidos pela análise em BIA-MPA e BIA-AC após fortificação com amostra padrão de quercetina ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). ..... 119

### *Capítulo 9*

Tabela 9.1: Efeito dos interferentes quercitrina e rutina na determinação da catequina. .... 127

Tabela 9.2: Efeito da quercitrina em diferentes concentrações na determinação da catequina. .... 128

Tabela 9.3: Efeito da rutina em diferentes concentrações na determinação da catequina. .... 129

Tabela 9.4: Efeito dos interferentes quercetina e rutina na determinação da catequina (ECI). .... 130

Tabela 9.5: Efeito da rutina em diferentes concentrações na determinação da catequina (C-SPE). .... 131

Tabela 9.6: Efeito da rutina em diferentes concentrações na determinação da catequina (C-SPE). .... 132

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>AC</b>	Amperometria convencional
<b>MPA</b>	Amperometria de múltiplos pulsos (do inglês <i>multiple pulsed amperometric detection</i> )
<b>BR</b>	Tampão Britton-Robinson
<b>BIA</b>	Análise por injeção em batelada (do inglês <i>batch injection analysis</i> )
<b>ECV</b>	Eletrodo de Carbono Vítreo
<b>ECI</b>	Eletrodo Carbono Impresso
<b>DPR</b>	Desvio padrão relativo
<b>EA</b>	Eletrodo Auxiliar
<b>ER</b>	Eletrodo de Referência
<b>EPR</b>	Eletrodo referência de prata
<b>ET</b>	Eletrodo de Trabalho
<b>Epa</b>	Potencial de pico anódico
<b>Epc</b>	Potencial de pico catódico
<b>AB-MA</b>	<i>Arrabidaea brachypoda</i> , coletada no Maranhão
<b>AB-MG</b>	<i>Arrabidaea brachypoda</i> , coletada em Minas Gerais
<b>BU</b>	<i>Brunfelsia uniflora</i>
<b>VG</b>	<i>Vismia guianensis</i>
<b>LO</b>	<i>Lippia origanoides</i>
<b>RM</b>	<i>Rhizophora mangle</i>
<b>FIA</b>	Análise por Injeção em Fluxo (do inglês <i>flow injection analysis</i> )
<b>HPLC</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>high-performance liquid chromatography</i> )
<b>LD</b>	Limite de detecção
<b>LQ</b>	Limite de quantificação
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>VC</b>	Voltametria cíclica
<b>VOQ</b>	Voltametria de onda quadrada
<b>VPD</b>	Voltametria pulso diferencial

## SUMÁRIO

*Capítulo 1*

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
----------------------------	-----------

*Capítulo 2*

<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1. Substâncias Bioativas.....</b>	<b>29</b>
2.1.1. Catequina.....	31
2.1.2. Quercetina .....	32
2.1.3. Quercitrina.....	34
2.1.4. Rutina .....	35
<b>2.2. Métodos eletroanalíticos.....</b>	<b>37</b>
2.2.1. Técnicas voltamétricas .....	40
2.2.2. Técnicas amperométricas .....	42
<b>2.3 Análise por injeção em batelada (BIA).....</b>	<b>45</b>

*Capítulo 3*

<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>51</b>
<b>3.1. Objetivo geral.....</b>	<b>51</b>
<b>3.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>51</b>

*Capítulo 4*

<b>4. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>53</b>
------------------------------	-----------

*Capítulo 5*

<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>55</b>
--	-----------

*Capítulo 6*

<b>6. MÉTODO DE ANÁLISE RÁPIDO, DIRETO E SENSÍVEL PARA DETERMINAÇÃO DE CATEQUINA EM CHÁ VERDE USANDO ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA COM AMPEROMETRIA DE PULSOS MÚLTIPLOS (BIA- MPA).....</b>	<b>64</b>
<b>6.1. Introdução .....</b>	<b>64</b>

<b>6.2. Parte Experimental .....</b>	<b>67</b>
6.2.1. <i>Reagentes, soluções e amostras .....</i>	67
6.2.2. <i>Instrumentação e equipamentos.....</i>	67
6.2.3. <i>Análise por HPLC.....</i>	69
6.2.4. <i>Preparação da amostra.....</i>	69
<b>6.3. Resultados e Discussão .....</b>	<b>69</b>
6.3.1. <i>Comportamento voltamétrico da catequina sobre o eletrodo de carbono vítreo .....</i>	69
6.3.2. <i>Otimização do potencial aplicado .....</i>	70
6.3.3. <i>Análise por injeção em batelada (BIA) com detecção amperométrica.....</i>	71
6.3.4. <i>Aplicações analíticas.....</i>	74
6.3.5. <i>Avaliação de precisão, recuperação e interferências .....</i>	77
<b>6.4. Conclusão.....</b>	<b>78</b>
<b>6.5. Referências .....</b>	<b>78</b>

## *Capítulo 7*

<b>7. DETERMINAÇÃO DE CATEQUINA EM EXTRATOS DE PLANTAS BIOATIVAS USANDO ELETRODOS DE CARBONO IMPRESSOS EM UM SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA (BIA) .....</b>	<b>83</b>
<b>7.1 Introdução .....</b>	<b>83</b>
<b>7.2 Experimental .....</b>	<b>86</b>
7.2.1 <i>Reagentes e Soluções.....</i>	86
7.2.2 <i>Instrumentação e equipamentos.....</i>	87
7.2.3 <i>Preparação de amostra .....</i>	88
<b>7.3 Resultados e discussões .....</b>	<b>89</b>
7.3.1 <i>Voltametria cíclica .....</i>	89
7.3.2 <i>Voltametria Hidrodinâmica.....</i>	90
7.3.3 <i>Método BIA com detecção amperométrica.....</i>	91
7.3.4 <i>Aplicações analíticas.....</i>	94
7.3.5 <i>Avaliação da precisão e seletividade do método BIA .....</i>	95
<b>7.4 Conclusão .....</b>	<b>98</b>
<b>7.5 Referências .....</b>	<b>99</b>

## *Capítulo 8*

<b>8. DETERMINAÇÃO RÁPIDA, SIMPLES E PRECISA DE QUERCETINA EM EXTRATOS VEGETAIS POR AMPEROMETRIA ASSOCIADA A ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA (BIA) .....</b>	<b>104</b>
<b>8.1. Introdução .....</b>	<b>104</b>
<b>8.2. Parte Experimental .....</b>	<b>106</b>
8.2.1. <i>Materiais e Reagentes .....</i>	106
8.2.2. <i>Instrumentação.....</i>	107
8.2.3. <i>Preparo das amostras.....</i>	108
<b>8.3. Resultados e Discussão .....</b>	<b>108</b>
8.3.1. <i>Comportamento Voltamétrico da Quercetina sobre o eletrodo de carbono vítreo (ECV) e o eletrodo de carbono impresso (ECI).....</i>	108
8.3.2. <i>Otimização dos Parâmetros para o sistema BIA.....</i>	111
8.3.3. <i>Aplicações Analíticas .....</i>	116
<b>8.4. Conclusão.....</b>	<b>119</b>
<b>8.5. Referências .....</b>	<b>120</b>

## *Capítulo 9*

<b>9. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>123</b>
<b>APÊNDICE A - RESULTADOS PRELIMINARES NO ESTUDO DA CATEQUINA</b>	<b>125</b>
<b>A.1. Avaliação do potencial de limpeza do ECV .....</b>	<b>125</b>
<b>A.2. Avaliação da utilização de dois potenciais no sistema BIA-MPA.....</b>	<b>126</b>
<b>A.3. Avaliação de interferentes (BIA-MPA) .....</b>	<b>126</b>
<b>A.4. Avaliação de interferentes por HPLC na determinação de catequina em chá verde .....</b>	<b>129</b>
<b>A.5. Avaliação de interferentes na determinação de catequina (BIA-AC) .....</b>	<b>130</b>
<b>A.6. Avaliação de interferentes por HPLC na determinação de catequina em extratos de plantas medicinais.....</b>	<b>133</b>
<b>APÊNDICE B - RESULTADOS PRELIMINARES NO ESTUDO DA QUERCETINA.....</b>	<b>134</b>
<b>B.1. Avaliação do potencial de limpeza do ECV .....</b>	<b>134</b>
<b>B.2. Avaliação de interferentes (BIA-MPA).....</b>	<b>135</b>
<b>B.3. Avaliação de interferentes na determinação da quercetina (BIA-AC).....</b>	<b>138</b>

<b>B.4. Avaliação de interferentes por HPLC na determinação de quercetina em extratos de plantas medicinais.....</b>	<b>141</b>
<b>APÊNDICE C - PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO DE REALIZAÇÃO DO DOUTORADO .....</b>	<b>142</b>
<b>C.1. Artigos publicados em periódicos indexados.....</b>	<b>142</b>
<b>C.2. Livros publicados .....</b>	<b>142</b>
<b>C.3. Artigos em fase de submissão e correções .....</b>	<b>142</b>
<b>C.4. Resumos Publicados em Congressos.....</b>	<b>142</b>

---

---

*Capítulo 1*



*Introdução*

---

---

## 1. INTRODUÇÃO

---

A crescente prevalência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como câncer, doenças cardiovasculares e inflamatórias, tem levado ao aumento do interesse no consumo de alimentos ricos em substâncias bioativas, que promovem benefícios a saúde e contribuem para o bem-estar do consumidor (BAHRI et al., 2019). E, segundo Patil e colaboradores (2009) substâncias bioativas são, principalmente, os metabólitos secundários, presentes no reino vegetal e animal que são vitais para a manutenção da saúde humana. Essas substâncias podem ser encontradas em várias partes das plantas, tais como: folhas, caule, flor, fruta e raiz (ALARA et al., 2019), sendo responsáveis pelo crescimento, reprodução e defesa natural das plantas. Neste grupo de metabólitos, estão envolvidos compostos nitrogenados, como: alcaloides, aminas, aminoácidos, glicosídeos, glicosinolatos e lectinas e não nitrogenados, como os terpenoides, saponinas, flavonóides, antocianinas, taninos, ácidos fenólicos, lignanas, ligninas e poliacetilenos (AZMIR et al., 2013; BRAZ-FILHO, 2010).

Desde os primórdios da história da humanidade há relatos mostrando que o homem sempre utilizou plantas na cura de doenças. Entretanto, foi apenas no início do século XIX que Sertürner isolou a morfina do ópio, sendo esta considerada a primeira substância bioativa (PARTINGTON, 1989). A partir deste fato, cresceu consideravelmente o interesse no isolamento de novos compostos naturais apresentando bioatividade. Muitos destes compostos têm a capacidade de alterar reações químicas e enzimáticas podendo, portanto, desempenhar diversos papéis em benefício da saúde humana (ALARA et al., 2019).

Dentre as substâncias bioativas, aquelas com ação antioxidante, como as vitaminas e os compostos fenólicos, têm atraído grande interesse por seus efeitos comprovados na proteção contra o estresse oxidativo (BAHRI et al., 2019; PEREZ-JIMENEZ & SAURA-CALIXTO, 2006; D'ANDREA, 2015). As substâncias antioxidantes são moléculas que desaceleram ou previnem reações oxidativas por participarem da etapa de terminação da cadeia de reações oxidativas. Desta forma, os antioxidantes são capazes de prevenir ou retardar os efeitos deletérios da oxidação, inibindo o efeito da lipoperoxidação, sequestrando radicais livres e/ou quelando íons metálicos. Eles protegem o organismo de espécies reativas de oxigênio que podem levar a doenças como o câncer e doenças cardiovasculares (EBUN & SANTOSH, 2011).

A análise para determinação de substâncias bioativas é complexa e longa, já que geralmente os compostos presentes em menor proporção na planta são os que apresentam melhores efeitos biológicos (BAHRI et al., 2019). A estratégia mais utilizada para desenvolver os procedimentos analíticos na determinação desses compostos tem sido

## INTRODUÇÃO

---

facilitada pela aplicação de metodologias compreendendo etapas de extração e pré-concentração, eliminação de interferentes, detecção e quantificação dos analitos. Neste contexto, a maioria das metodologias analíticas reportadas na literatura para determinação de substâncias bioativas é baseada em métodos cromatográficos (BARBA et al., 2006; VIÑAS et al., 2008), espectrofotométricos (BARBA et al., 2006; BISWAS et al., 2011) e eletroforese capilar (PIOVEZAN et al., 2013; BALLUS et al., 2012; PERES et al., 2011). Todavia, análises com estas técnicas comentadas anteriormente, na maioria das vezes apresentam inconvenientes frente a outras ferramentas analíticas, tais como: elevado custo na aquisição dos equipamentos e serviços de manutenção, utilização de reagentes de alto custo onerando as análises de rotina, baixa frequência analítica devido aos maçante e recorrentes tratamentos de amostras, complexidade de operação requerendo mão-de-obra qualificada, além da geração de resíduos exigindo controle mais complexo e dispendioso dos efluentes para que não haja impacto ambiental (BACKES et al., 2017; GHOLIVAND et al., 2012).

Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos mais rápidas, de baixo custo e com menos geração de resíduos que possibilitem sanar ou ainda diminuir as problemáticas citadas acima (GIMENES et al., 2015). Entre as alternativas possíveis, os métodos eletroanalíticos surgem como alternativa promissora, por apresentarem vantagens como: baixos limites de detecção e quantificação, a possibilidade de miniaturização do sistema de detecção, custos de instrumentação e análise reduzidos, além de boa seletividade, exigindo apenas processos de dissolução e diluição no preparo das amostras (GIMENES et al., 2015; QUINTINO & ANGNES, 2004; BARSAN et al., 2011). Todavia, as técnicas eletroanalíticas, podem apresentar problemas associados à reprodutibilidade entre as análises, o que dificulta sua aceitação pelas indústrias e órgãos regulamentadores. Por outro lado, a utilização dessas técnicas associadas a sistemas de fluxo podem contornar este inconveniente, tornando-se ainda mais interessantes e promissores em análise de rotina e no controle de qualidade de indústrias (BACKES et al., 2017; DOS SANTOES et al., 2009).

Deste modo, a injeção em fluxo associada a um sistema de detecção eletroquímica vem adquirido grande importância, pois tem apresentado ótimos resultados em determinações de matrizes complexas biológicas, ambientais e fármacos conforme já descrito na literatura (BACKES et al., 2017; PEREIRA et al., 2016 a; PEREIRA et al., 2016b; SHAIDAROVA et al., 2016; GIMENES et al., 2015; QUINTINO & ANGNES, 2004, JOHNSON et al., 1986).

A técnica de Análise por Injeção em Fluxo, denominada de FIA (do inglês: *Flow Injection Analysis*) é muito utilizada em análises de água, de produtos farmacêuticos e no controle de processos industriais garantindo maior precisão do que operações manuais como

## INTRODUÇÃO

---

surgiu em 1957 (SKEGGS, 1957), a qual resultou nos atuais auto-analisadores. Contudo, a técnica de FIA proposta por RUZICKA e HANSEN em 1975 e, STEWART em 1976, baseia-se na injeção de pequenas quantidades da amostra em solução, dentro de um percurso analítico contendo um reagente adequado. Após a injeção, a amostra é transportada até o detector por um fluxo carregador não segmentado, que pode ser o próprio reagente ou uma solução quimicamente inerte, onde o sinal analítico é detectado e registrado.

Uma outra técnica inovadora, a qual representa uma maneira alternativa de realizar testes rápidos em substituição ao FIA, é a análise por injeção em batelada (BIA, do inglês, *Batch Injection Analysis*) que foi proposta pela primeira vez por Wang e Taha (1991). A técnica conta com uma micropipeta ou uma seringa para fazer as injeções dos pequenos volumes do padrão ou do analito que se deseja determinar diretamente sobre a superfície do eletrodo de trabalho (configuração *wall-jet*) que permanece imerso em um grande volume de eletrólito de suporte, de maneira que ao se injetar a amostra sejam imediatamente diluídos após a obtenção do sinal transiente, possibilitando assim, diversas injeções consecutivas (BACKES et al., 2017). A técnica de BIA mantém as características analíticas do sistema FIA e apresenta vantagens com relação a menor geração de volume de resíduos e não dispõe a necessidade da utilização de injetores e bombas (QUINTINO & ANGNES, 2004).

A metodologia BIA é versátil e promissora para o estudo de processos tecnológicos em uma variedade de campos de pesquisa, e tem sido escolhida por suas vantagens como rapidez de análise, simplicidade do sistema, sensibilidade, repetibilidade, possibilidade de se trabalhar com baixos volumes de reagentes e amostras e manipulação mínima da amostra (diluição no eletrólito). Além de permitir a construção de dispositivos simples, portáteis e que possibilitam o monitoramento rápido diretamente no campo (SHAI DAROVA et al., 2016; GIMENES et al., 2015; QUINTINO & ANGNES, 2004).

Do exposto acima, a presente Tese visa o desenvolvimento, otimização e aplicação de procedimentos eletroanalíticos para determinação das substâncias bioativas catequina e quercetina utilizando a técnica de análise por injeção em batelada (BIA) com detecção eletroquímica associando o uso de eletrodo de carbono vítreo e eletrodo de carbono impresso.

---

---

*Capítulo 2*



*Referencial Teórico*

---

---

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

---

### 2.1. Substâncias Bioativas

Por milhares de anos produtos de origem vegetal, animal e mineral foram as principais fontes de recursos terapêuticos disponíveis ao homem. Nas últimas décadas o ser humano tem manifestado um interesse crescente pelo seu bem-estar e qualidade de vida, motivando a comunidade científica a procurar e identificar substâncias, naturais ou sintéticas, potencialmente benéficas para o organismo (GURIB-FAKIM, 2006; FARAH & DONANGELO, 2006).

Pesquisas por novas substâncias naturais bioativas têm aumentado significativamente nos últimos anos e os seus diversos benefícios à saúde cada vez mais elucidados e disseminados (NEWMAN & CRAGG, 2012; HE et al., 2006). Em todo o mundo e principalmente no Brasil, que possui sua economia fortemente baseada no agronegócio de origem vegetal, são geradas grandes quantidades de subprodutos (MARAIS et al., 2006) que, apesar de considerados sérios problemas ambientais por seu descarte ao meio ambiente, podem servir em muitos dos casos, como fontes ricas de diversas substâncias bioativas (RUBILAR et al., 2007).

Dentre as substâncias bioativas, os compostos fenólicos têm recebido atenção da comunidade científica por seus numerosos efeitos biológicos, como sequestro de espécies reativas de oxigênio, modulação da atividade de algumas enzimas específicas, inibição da proliferação celular, bem como por seu potencial como agente antibiótico, antialérgico e anti-inflamatório (HORST & LAJOLO, 2009). Além disso, são efetivos doadores de hidrogênio e essa capacidade antioxidante é dependente do número e da posição dos grupamentos hidroxilas e sua conjugação (PATIL et al., 2009; NEWMAN & CRAGG, 2012).

Os compostos fenólicos ou polifenóis podem ser definidos quimicamente como substâncias que possuem pelo menos um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxila (EBUN & SANTOSH, 2011; MARAIS et al., 2006). Estes são comumente encontrados nos frutos e hortaliças, nas formas livre e associada a polissacarídeos de parede celular através de ligação de hidrogênio entre os grupos hidroxilas dos compostos fenólicos e os átomos de oxigênio dos açúcares dos polissacarídeos (PINELO et al., 2006; PÉREZ-JIMÉNEZ & SAURA-CALIXTO, 2006; KUSKOSKI & ASUERO, 2005).

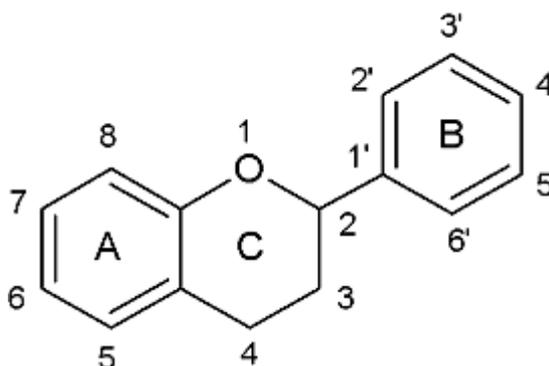
Com base no número de anéis de fenol e na maneira pela qual esses anéis ligam-se uns aos outros, os polifenóis podem ser classificados em dois grandes grupos: não

## REFERENCIAL TEÓRICO

-flavonóides e os flavonóides. O grupo dos não-flavonóides inclui, entre outras classes, os ácidos fenólicos e os estilbenos. Os flavonóides constituem o grupo mais abundante que engloba diferentes subclasses de compostos tais como flavons, flavonas, flavanonas, catequinas, isoflavonas, antocianidinas, di-hidroflavonóis e chalconas (D'ANDREA, 2015; EBUN & SANTOSH, 2011).

Os flavonóides são pigmentos naturais que apresentam milhares de substâncias derivadas de plantas, frutas, verduras, sementes e flores que compartilham um esqueleto comum de fenilcromano. Sua estrutura básica consiste de dois anéis aromáticos interligados via cadeia heterocíclica do pirano, que apresentam 15 átomos de carbono distribuídos em 3 anéis denominados A, B e C (Figura 2.1) (D'ANDREA, 2015; MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ et al, 2010; MARAIS et al., 2006). Conforme o estado de oxidação e o perfil de substituições do anel C (pirano), permite várias estruturas de diferentes substituições (PATEL et al., 2018; D'ANDREA, 2015; EBUN & SANTOSH, 2011).

**Figura 2.1:** Estrutura básica dos flavonóides com os respectivos anéis aromáticos A, B e C.



Fonte: Autora do trabalho.

A atenção nos flavonóides tem se expandido nas últimas décadas após a publicação de estudos epidemiológicos mostrando uma conexão direta entre a ingestão de flavonóis, sendo reduzida a ocorrência e taxa de mortalidade de distúrbios cardíacos e doenças relacionadas ao câncer (PATEL et al., 2018; D'ANDREA, 2015; EBUN & SANTOSH, 2011).

Na natureza existe uma elevada variedade flavonóides que apresentam uma grande diversidade estrutural que estão presentes em diversos alimentos dentre estes destacam-se: catequina, quercetina, quercitrina e rutina que tem atraído interesse de diversos pesquisadores nas suas determinações e quantificações devido as diversas funções benéficas

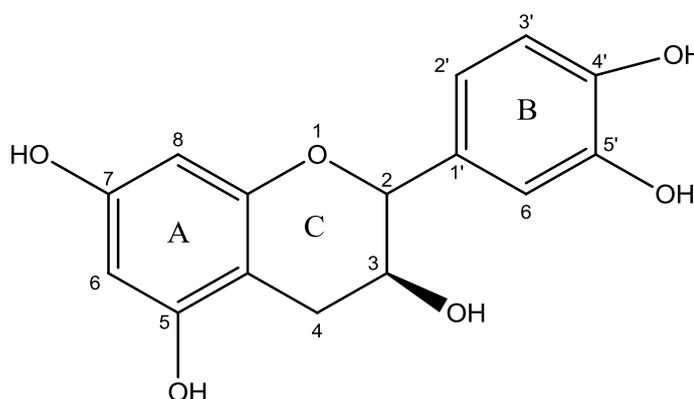
## REFERENCIAL TEÓRICO

que desempenham no organismo humano (NEWMAN & CRAGG et al., 2012; MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ, 2010; TIEPPO et al., 2007; MAITI et al., 2005).

### 2.1.1. Catequina

A catequina ((2R,3S)-2-(3,4-di-hidroxifenil)-3,4-di-hidro-2H-cromeno-3,5,7-triol), é um fitonutriente que pertence à família dos flavanóides e são constituídas por um anel floroglucinol (A), um anel catecol (B), um anel pirânico (C) e apresenta hidroxilas ligadas aos carbonos 3, 5, 7, 4' e 5' (Figura 2.2) (MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ et al., 2010). Possui centros quirais, dos quais resultam 4 isômeros: (+), (-)-catequina e (+), (-) epicatequina. Na natureza os isômeros mais abundantes são a (+)-catequina e a (-)-epicatequina. São amplamente distribuídas em plantas, frutas e bebidas, incluindo chá verde, chá preto, vinho tinto, maçãs e chocolate (BARANOWSKA et al., 2018; PATEL et al., 2018; NAPOLITANO et al., 2014).

**Figura 2.2: Estrutura molecular da catequina**



Fonte: Autora do trabalho.

A molécula da catequina (Figura 2.2) apresenta importantes componentes estruturais que estão relacionados com sua atividade antioxidante. Um deles é a presença do grupo catecol (anel B), responsável pela formação de radical fenoxil estáveis após a doação do átomo de hidrogênio (MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ et al., 2010; DUFRESNE & FARNWORTH, 2001).

A literatura apresenta diversos estudos que mostram os benefícios do consumo contínuo da catequina e enfatizam a importância de suas determinações, como o trabalho realizado por Dufresne e Farnworth (2001) estudaram que o consumo contínuo de chás verde e preto, que apresentam como componentes majoritários as catequinas, auxiliam na prevenção e tratamento de diversas doenças crônico-degenerativas, incluindo o câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, a prevenção de dano ao DNA, devido à oxidação e à melhoria do

## REFERENCIAL TEÓRICO

---

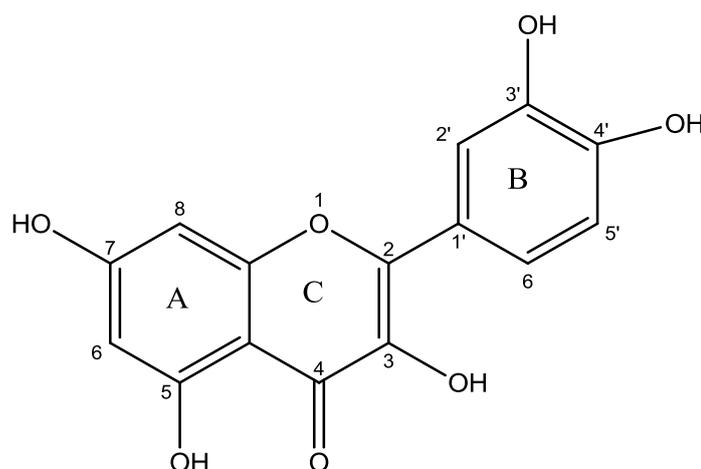
fluxo sanguíneo e da função hepática. Youdim e Joseph (2001) demonstraram que as catequinas protegem os neurônios e células hepáticas contra os danos dos radicais livres gerados durante isquemia.

Mandel e colaboradores (2006) estudaram o uso da catequina como ação anti-inflamatórias, prevenção de doenças neurológicas e atividades quelantes eliminadoras de radicais livres. Singh e Katiyar (2011) investigaram o uso da catequina como inibidora da radiação ultra-violeta que causa câncer na pele e reduz o nível de colesterol por inibir a peroxidação das lipoproteínas. Baranowska et al. (2018a) avaliaram o potencial da atividade antioxidante das catequinas e concluíram que doses em concentrações adequadas de catequinas mantêm o status redox celular e doses excessivas podem desregular o organismo e se tornar prejudicial. Li et al (2019) que realizaram estudos *in vivo* contra melanoma metastático com base em nanocomplexos de metal lantanídeo samário ( $\text{Sm}^{3+}$ ) e catequinas, e os resultados revelaram que a administração dos nanocomplexos satisfazem um tratamento do melanoma em estágio avançado, sendo observado a diminuição do volume do tumor e a metástase do melanoma.

### 2.1.2. Quercetina

A substância bioativa quercetina (3,3', 4', 5,7-penta-hidroxi-flavona) pertence à classe dos flavonóis que apresenta mais de 4000 compostos fenólicos vegetais disponíveis, cujo isolamento e reconhecimento biológico foram descritos pela primeira vez por Szent-Gyorgyi (1936). É um dos flavonóis dietéticos mais abundantes encontrados em frutas (principalmente cítricas), vegetais de folhas verdes, em sementes, trigo mourisco, nozes, flores, cascas, brócolis, azeite, maçãs, cebolas, chá verde, uvas vermelhas, vinho, cerejas escuras e bagas, como mirtilos (PATEL et al., 2018; MI et al., 2010; WANG et al., 2012). Contém em sua estrutura (Figura 2.3), grupos hidroxílicos e fenólicos, possui uma ligação dupla entre os carbonos 2 e 3, substituintes hidroxilas nos carbonos 3, 5, 7, 3', 4' e grupo cetona na posição 4. Estes grupos garantem a quercetina uma ação antioxidante com importante potencial terapêutico, devido à sua capacidade de eliminação de radicais livres especificamente o superóxido e hidroxila, considerados espécies reativas do oxigênio de grande reatividade (WANG et al., 2012; GAVELOVÁ et al., 2008; MAITI et al., 2005).

Figura 2.3: Estrutura molecular da quercetina



Fonte: Autora do trabalho.

Devido as diversas propriedades benéficas que o consumo da quercetina proporciona, podendo-se destacar a prevenção de osteoporose, certos tipos de melanoma, doenças pulmonares e cardíacas, e ainda contra o envelhecimento precoce (MI et al., 2010; TIEPPO et al., 2007; TOKYOL et al., 2006), várias pesquisas têm sido realizadas com o intuito de comprovar tais efeitos farmacológicos, bem como possíveis propriedades toxicológicas deste flavonóide (MI et al., 2010).

Erden e Kahrman (2000) estudaram a ação da quercetina em bloquear a peroxidação lipídica celular por meio da depuração dos radicais livres e/ou quelação dos metais de transição presentes no meio. Foi observado que a administração de uma solução contendo quercetina induziu a diminuição dos níveis de malondialdeído, um dos produtos gerados durante a peroxidação lipídica em ratos que foram submetidos à radiação ultravioleta. Concomitantemente foi verificado a potencialização na atividade de enzimas antioxidantes e catálise no fígado.

Tan e colaboradores (2003) evidenciaram que a quercetina inibiu a proliferação, migração e formação *in vitro* do tubo de células endoteliais, além de promover atividade antiangiogênica *in vivo*. Tais resultados sugerem que o constante consumo de alimentos ricos em quercetina pode ser benéfico na prevenção e controle de alguns tipos de câncer.

Patel et al. (2018) apresentaram em seu artigo de revisão estudos com a utilização da quercetina no tratamento como agente anti-inflamatório (CHUN et al., 2008), redutor da pressão arterial (EDWARDS et al., 2007), ação cardioprotetora (protege contra a aterosclerose, estresse oxidativo, cardiotoxicidade, disfunção das células endoteliais, insuficiência cardíaca) testados tanto *ex vivo* quanto *in vivo* (BONDONNO et al., 2015),

## REFERENCIAL TEÓRICO

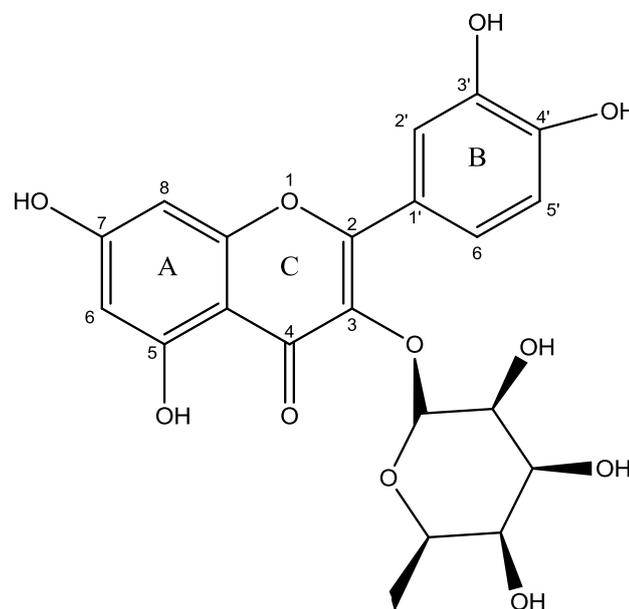
inibe a acumulação de gordura na maturação de células de gordura humana e, simultaneamente, desencadeia a apoptose (destruição programada) em células de gordura existente (AHN et al., 2008); previne distúrbios neurodegenerativos (como doença de Alzheimer e Parkinson) (CHOI et al., 2012). Yan, et al. (2019) também avaliaram o efeito neuroprotetor nas células expostas à privação de oxigênio. O estudo resultou na melhoria do dano celular neuronal na anoxia cerebral.

É importante ressaltar que a quercetina é considerada um dos bioflavonóides mais utilizados no tratamento de distúrbios metabólicos e inflamatórios, sendo pouco solúvel em água quente, bastante solúvel em álcool e lipídios e é insolúvel em água fria que resulta na fraca absorção limitando seu potencial na aplicação clínica (WANG et al., 2012).

### 2.1.3. Quercitrina

A quercitrina (quercetina-3-O-ramnosídeo) (Figura 2.4) é um glicosídeo de cor amarela formado a partir do flavonoide quercetina e da desoxirribose, açúcar ramnose, e pode ser obtido a partir do chá do trigo mourisco e da casca de diferentes espécies de carvalhos (FABJAN, et.al, 2003).

**Figura 2.4:** Estrutura molecular da quercitrina.



Fonte: Autora do trabalho.

Na literatura contém estudos enfatizando os efeitos biológicos com uso da quercitrina como o estudo proposto por Gomez-Florit et. al. (2016) que propuseram um implante dentário utilizando nanopartículas de quercitrina e titânio, observaram com o estudo, que diminuiu a adesão bacteriana, enquanto aumentou a adesão de fibroblastos

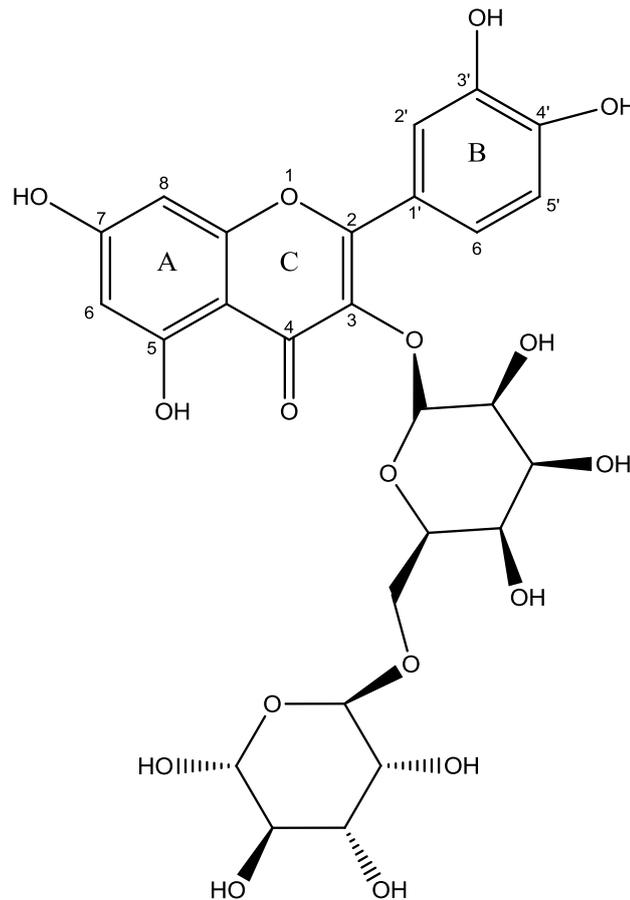
gingivais humanos. Além disso, o estudo demonstrou aumento nos níveis de colágeno e reduziu a inibição de enzimas, tais resultados sugerem que as superfícies dos implantes poderiam melhorar o desempenho dos implantes dentários, integração de tecidos duros e moles ao redor do implante, aumentando a vida útil e diminuindo o risco de periimplantite que se apresenta como a principal causa de falência de implante de coroa oral com uma prevalência na ordem de 10% para os implantes e 20% para os implantes pacientes até 5-10 anos após a colocação do implante (MOMBELLI et al., 2012).

Satué e colaboradores (2013) estudaram o uso da quercitrina como regeneração óssea e os resultados demonstraram efeitos benéficos no metabolismo ósseo se mostrando um potente estimulador da diferenciação dos osteoblastos. Dönder et al. (2018) realizaram estudos com ratos avaliando a ação da quercitrina como antiinflamatória e protetora da mucosa intestinal, o tratamento com quercitrina pode ser usado como alternativa de tratamento na doença inflamatória intestinal, devido a sua eficácia na prevenção da translocação bacteriana e na supressão do processo de colite. Afirmam ainda, que a quercitrina funciona como um antioxidante contra lesões cutâneas induzidas UVB.

#### *2.1.4.. Rutina*

O composto bioativo rutina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavone-3-rhamnoglucoside) pertencente também à classe dos flavonóides possui como estrutura básica, uma molécula de quercetina, ligada a duas moléculas de glicose, sendo elas respectivamente, uma glicose e uma ramnose substituintes na posição 3 do anel pirano (Figura 2.5) (KHALIFA et al., 1983). E, assim como a catequina, a quercetina, quercitrina e demais flavonóides, a rutina pode ser encontrada em diversos alimentos presentes em nosso cotidiano como em frutas, vegetais, chás, maçãs, feijão, tomate, plantas em geral, entre outros (NEWMAN & CRAGG et al., 2012; LIN et al., 2018).

Figura 2.5: Estrutura molecular da rutina



Fonte: Autora do trabalho.

A rutina tem sido estudada por vários autores, que buscam elucidar suas possíveis ações e funcionalidades (dessa forma, é possível encontrar na literatura alguns estudos em que a atua de forma benéfica no combate, prevenção ou melhora de doenças) como podemos citar o trabalho de Guardia et al. (2001) apresentaram um estudo em ratos, avaliando a ação anti-inflamatória da rutina e obteve ótimo efeito, quando testada no tratamento de artrite em modelo experimental, com redução de até 100% nas lesões observadas.

Abdel-Raheem (2010) estudou o efeito gastroprotetivo para úlceras e lesões gástricas, afirmando que o consumo contínuo da rutina inibe a infiltração de neutrófilos e modula a produção de óxido nítrico na mucosa gástrica. Hao et al. (2012) estudaram os efeitos preventivos da rutina no desenvolvimento de nefropatia diabética experimental em ratos e concluíram que a rutina diminuiu significativamente os níveis de glicose no sangue e a intensidade do estresse oxidativo. Lin et al. (2018) apresentam em seu estudo que o consumo contínuo da rutina diminuiu significativamente a possibilidade de infarto, atenua a disfunção cardíaca e regula positivamente os sistemas antioxidantes no coração, apresentando potencial para o tratamento do estresse oxidativo e doenças miocárdicas.

Diante dos diversos benefícios que o consumo dos flavonóides apresentam, é de suma importância o desenvolvimento de técnicas para suas determinações e quantificações, pois o consumo excessivo destes acarretam em desequilíbrio ao organismo, se tornando prejudicial (LIN et al., 2018; BARANOWSKA et al., 2018; PATEL et al., 2018). Dentre as alternativas possíveis para determinação e quantificação de substâncias bioativas, encontram-se os métodos eletroanalíticos.

## **2.2. Métodos eletroanalíticos**

A eletroanalítica compreende um grupo de métodos analíticos baseados na propriedade elétricas e químicas de um analito em solução (BARSAN et al., 2015; DAGO et al., 2015; XU et al., 2015). Estes métodos possibilitam o estabelecimento de relações diretas entre a concentração do analito e alguma propriedade elétrica e química como corrente, potencial, condutividade, resistência ou carga, que são utilizadas no desenvolvimento de metodologias analíticas com aplicações nos seguimentos farmacêutico, biotecnológico, alimentício, de combustível, ambiental, etc (CUNHA et al., 2013; FELIX & ANGNES, 2010; DOS SANTOES et al., 2009; QUINTINO & ANGNES, 2004).

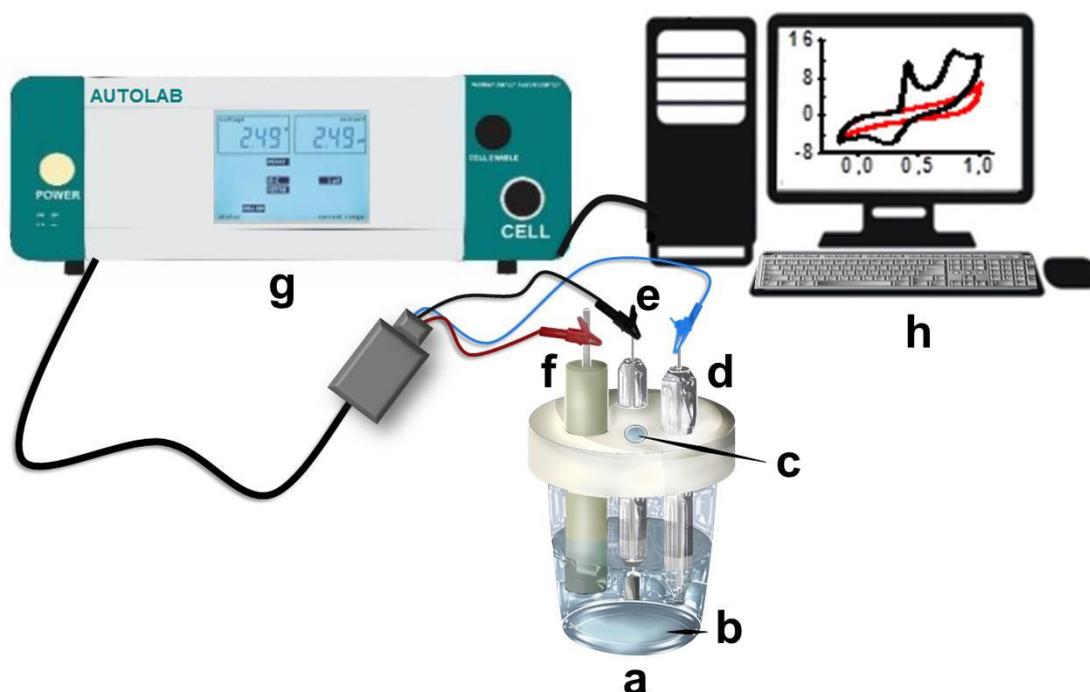
A literatura contém diversos estudos que utilizaram os métodos eletroanalíticos para determinação de substâncias bioativas como pode ser citado o trabalho realizado por Oliveira et al. (2016a) que usaram detecção amperométrica para determinação da astaxantina em amostras de salmão, empregando um eletrodo de carbono vítreo para a oxidação eletroquímica do composto bioativo. TANG et al. (2019), que usaram a voltametria de pulso diferencial para desenvolver uma metodologia sensível e seletiva empregando o eletrodo de grafeno modificado com nanopartículas de ouro para a determinação de luteolina em cascas de amendoim. SHI et al. (2019) desenvolveram uma metodologia utilizando a voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial para detecção do ácido caféico, empregando eletrodos de carbono vítreo modificados com nanocristais de PtCu. .

Dentre as vantagens da utilização das técnicas eletroanalíticas podemos citar o menor consumo de reagentes e de resíduos gerados, quando comparada a outras técnicas, pois o analito interage diretamente com a superfície do eletrodo. Além disso, a aparelhagem é relativamente barata em relação a outras técnicas instrumentais, e há a disponibilidade utilizar instrumentos portáteis, extremamente úteis para aplicações em campo (DAGO et al., 2015; BARSAN et al., 2015; QUINTINO & ANGNES, 2004).

## REFERENCIAL TEÓRICO

Para a realização das medidas eletroquímicas é necessário o uso de um sistema eletroquímico semelhante ao descrito na Figura 2.6 que inclui uma célula eletroquímica (a), na qual é inserida, por um orifício (c) na tampa da célula, uma solução de eletrólito suporte (b), contendo ou não o analito, bem como um conjunto de eletrodos, sendo estes: eletrodo de referência (ER) (d), eletrodo auxiliar (EA) (e) e eletrodo de trabalho (ET) (f). Estes componentes são conectados a um potenciostato (g) o qual permanece interfaceado a um computador e equipado com o software adequado, que realiza o controle das variáveis da técnica eletroquímica e registra os resultados obtidos (BACKES et al., 2017; MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ et al, 2010; QUINTINO; ANGNES, 2004).

**Figura 2.6: Sistema convencional para medições eletroquímicas**



Fonte: Autora do trabalho.

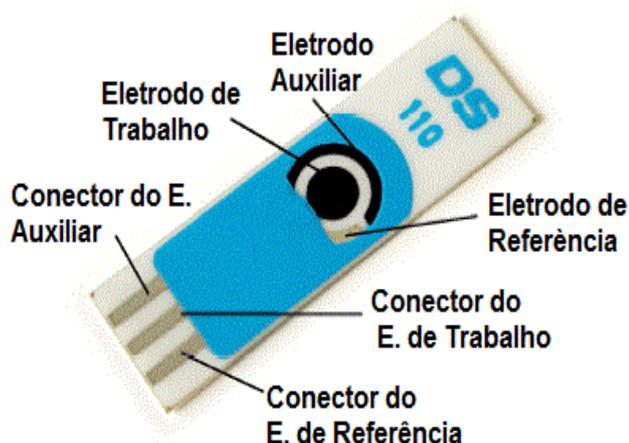
As medidas eletroquímicas contam com uma grande variedade de eletrodos de trabalho incluindo eletrodos de pasta de carbono, de carbono vítreo, grafite, mercúrio, ouro, cobre, entre outros, que podem ser utilizados com ou sem modificações em suas superfícies (LASCHI et al., 2006; NASCIMENTO & ANGNES, 2008; MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ et al., 2010). Dentre estes, o uso do carbono vítreo como eletrodo de trabalho tem atraído interesse da comunidade acadêmica, pois este apresenta características como baixa corrente residual sobre uma faixa de potencial em meio aquoso, em solventes orgânicos e inorgânicos, baixa porosidade e a alta sensibilidade (OLIVEIRA et al., 2016a).

## REFERENCIAL TEÓRICO

A literatura apresenta autores que estudaram o eletrodo de carbono vítreo para determinar diferentes compostos (ou analitos). Medvidović-Kosanović et al. (2010) estudaram as propriedades eletroquímicas da catequina, quercetina e rutina. Ferreira et al. (2012) estudaram a determinação de ciclopirox em amostras farmacêuticas. Oliveira e colaboradores (2016b) estudaram o sistema eletroquímico com detecção amperométrica para determinação do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). Shaidarova et al. (2016) eletrodepositaram óxido de ferro e irídio na superfície do eletrodo de carbono vítreo e mostraram a atividade catalítica para a oxidação da cafeína.

Outro eletrodo que vem se destacando é o chamado eletrodo impresso (do inglês "*screen-printed electrode*") por apresentar características desejáveis que combina a facilidade de montagem com uma ótima relação de custo-benefício, além da possibilidade de serem descartáveis, pequenos, portáteis e de fácil operação (BACKES et al., 2017; DAGO et al., 2015; MISCORIA et al., 2014). Estes eletrodos consistem basicamente em um filme depositado sobre um suporte inerte, pelo método conhecido por "*silk-screen*", coberto por uma segunda camada de material isolante elétrico, que é responsável pela definição de uma área de contato elétrico interligado a área superficial ativa do eletrodo em outra extremidade, porém recoberta superficialmente (Figura 2.7) (NASCIMENTO & ANGNES, 2008).

**Figura 2.7:** Imagem ilustrativa de um eletrodo de carbono impresso típico com os três eletrodos acoplados: trabalho (ET), referência (ER) e eletro auxiliar (EA).



Fonte: dropsens.com.

Os eletrodos impressos são dispositivos que apresentam alta sensibilidade, estabilidade, precisão, resposta rápida, facilidade de uso e robustez (NASCIMENTO & ANGNES, 2008), por isso, na literatura, são encontrados muitos estudos que utilizam estes

eletrodos com e sem modificações em suas superfícies para diversas aplicações, tais como: eletrodo impresso a base de ouro para detecção de metais pesados (LASCHI et al., 2006) e detecção de cromo IV (MISCORIA et al., 2014); determinação rápida e simples de citrato de sildenafil (viagra e genéricos) utilizando eletrodos de carbono impressos (BACKES et al., 2017); eletrodo impresso com superfície modificada com nanotubos de carbono e grafeno para determinação de fitoquelantinas em plantas (DAGO et al., 2015), entre outros.

A otimização da metodologia para utilização das técnicas eletroquímicas deve buscar melhor desempenho, levando em consideração parâmetros como, sensibilidade e reprodutibilidade do sinal obtido. Tratando-se de técnicas para o propósito de determinação de diversos compostos, o sinal analítico deve fornecer baixos desvios, apresentando uma alta versatilidade de aplicações tanto utilizando eletrodos convencionais quanto na forma de eletrodos impressos (DAGO et al., 2015; NASCIMENTO & ANGNES, 2008).

Dentre as técnicas eletroquímicas mais utilizadas, destacam-se a voltametria linear (VL), a voltametria cíclica (VC), as voltametrias de pulso (onda quadrada - VOQ, pulso diferencial - VPD), a amperometria (potencial constante) e a amperometria de múltiplos pulsos (MPA) (do inglês *multiple amperometric detection*). Nas seções posteriores será dada ênfase apenas às técnicas eletroquímicas (voltamétricas e amperométricas) que foram empregadas nesta tese.

### 2.2.1. Técnicas voltamétricas

As técnicas voltamétricas compreendem um grupo de métodos eletroquímicos nos quais as informações sobre o analito são obtidas por meio de medidas de correntes em função do potencial aplicado e em condições que estimulam a polarização de um eletrodo de trabalho (SKOOG et al., 2002). É aplicada uma diferença de potencial no ET em relação ao ER. Como resposta a esta perturbação, a corrente flui entre o ET e EA, sendo então registrada. Em função do tempo, o potencial aplicado pode ser constante (amperometria) ou variável (voltametrias), e o incremento de potencial pode ser linear (VL e VC) ou pulsado (VOQ e VPD) (WANG, 2000; BRETT & BRETT, 1993).

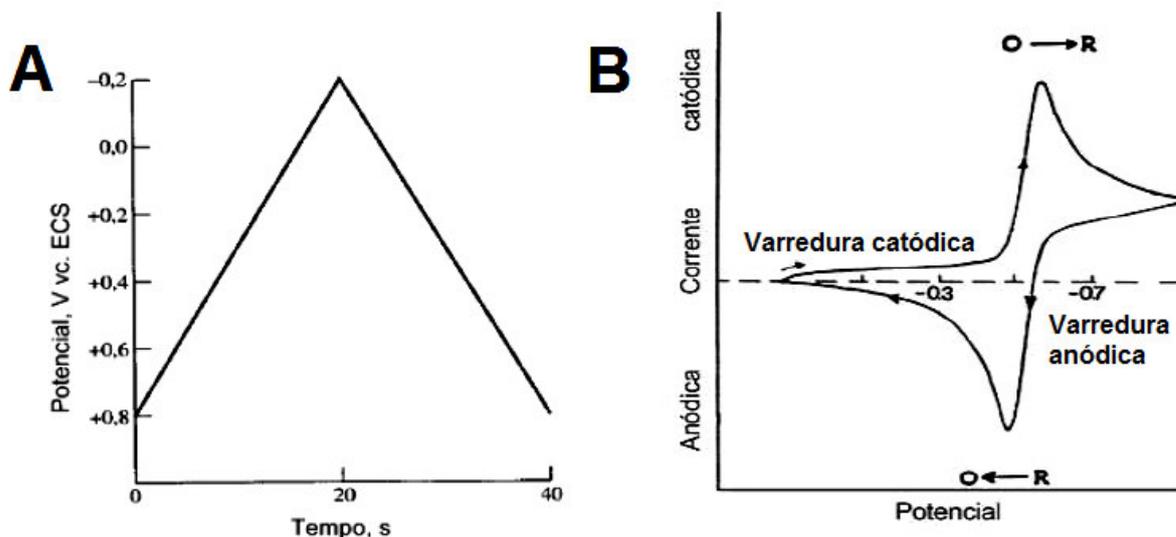
Historicamente, o campo da voltametria foi o que mais se desenvolveu, a partir da polarografia, que é um tipo particular de voltametria, a qual foi proposta pelo químico tchecoslovaco Jaroslav Heyrovsky no início dos anos 1920 (Skoog, 2002). A polarografia que é ainda um ramo importante da voltametria, difere dos outros tipos de voltametria porque o microeletrodo tem a forma de um eletrodo gotejante de mercúrio (SKOOG, 2002; WANG, 2000), a sua importância deve-se às suas propriedades especiais deste tipo de eletrodo como

## REFERENCIAL TEÓRICO

em particular, a fácil restauração do eletrodo e o largo alcance na faixa de potenciais catódicos (WANG, 2000).

A voltametria cíclica é uma das técnicas eletroquímicas mais empregadas na caracterização de um processo eletródico. Nela registra-se a resposta da corrente de um eletrodo estacionário em uma solução eletrolítica quando este é excitado por uma onda triangular de potencial. O potencial varia linearmente em uma direção até um dado valor, então, a direção da varredura é invertida e o potencial volta ao valor inicial aplicado, como mostra a Figura 2.8A. Os potenciais nos quais ocorre a reversão são chamados potenciais de inversão. O intervalo de potenciais de inversão escolhido para um dado experimento é aquele no qual ocorre a oxidação ou a redução controlada por difusão de um ou mais analitos. A direção da varredura inicial pode ser tanto negativa como positiva, dependendo da composição da amostra (SKOOG et al., 2002). Dependendo da informação requerida, pode ser utilizado um ciclo único ou múltiplos ciclos. O voltamograma é a representação da corrente produzida em relação ao potencial aplicado como mostra a Figura 2.8 (WANG, 2000). Na prática, utilizam-se velocidades de varredura que variam desde  $10 \text{ mV s}^{-1}$  até  $10 \text{ kV s}^{-1}$ , sendo mais comum trabalhar entre  $20$  e  $200 \text{ mV s}^{-1}$  (BRETT & BRETT, 1993; SKOOG et al., 2002; WANG, 2000).

Figura 2.8: (A) Sinal de excitação para a voltametria cíclica e, (B) voltamograma cíclico para um processo redox reversível.



Fonte: WANG, 2000.

A Figura 2.8B mostra a resposta esperada para um par redox reversível durante um único ciclo de potencial. Inicialmente considera-se que somente a espécie oxidada (O) está presente. Uma varredura de potencial na direção negativa é escolhida para o primeiro

meio ciclo, começando em um valor onde não ocorre redução. Conforme o potencial aplicado se aproxima do potencial padrão ( $E^{\circ}$ ) característico para o processo redox, a corrente catódica começa a aumentar, até que um pico é alcançado. Após atravessar a região de potencial em que ocorre o processo de redução, a direção da varredura do potencial é invertida (WANG, 2000; BRETT & BRETT, 1993). Para uma reação reversível de eletrodo, as correntes de pico catódico e anódico são aproximadamente iguais em valor absoluto, mas de sinais opostos e a diferença entre os potenciais de pico é  $0,059V/n$  para  $25^{\circ}C$ , onde  $n$  é o número de elétrons envolvidos na semi-reação (SKOOG et al., 2002).

Os parâmetros mais importantes para uma voltametria cíclica compreendem os potenciais de pico catódico e anódico ( $E_{p_c}$  e  $E_{p_a}$ ), as correntes de pico catódica e anódica ( $I_{p_c}$  e  $I_{p_a}$ ) e os potenciais de meia onda ( $E_{1/2}$ ). A análise da dependência do potencial e da corrente de pico com a variação da velocidade de varredura, com a concentração da substância eletroativa e a partir da adição de eletrófilos, nucleófilos ou prótons, é a base de testes diagnósticos, que permitem obter informações importantes, como a reversibilidade e irreversibilidade do processo de transferência eletrônica, a variação da presença de reações químicas acopladas, de adsorção e de fenômenos catalíticos, além de se poder caracterizar o fenômeno que controla a corrente de pico, ou seja, a difusão, migração ou convecção (WANG, 2000, SKOOG et al., 2002).

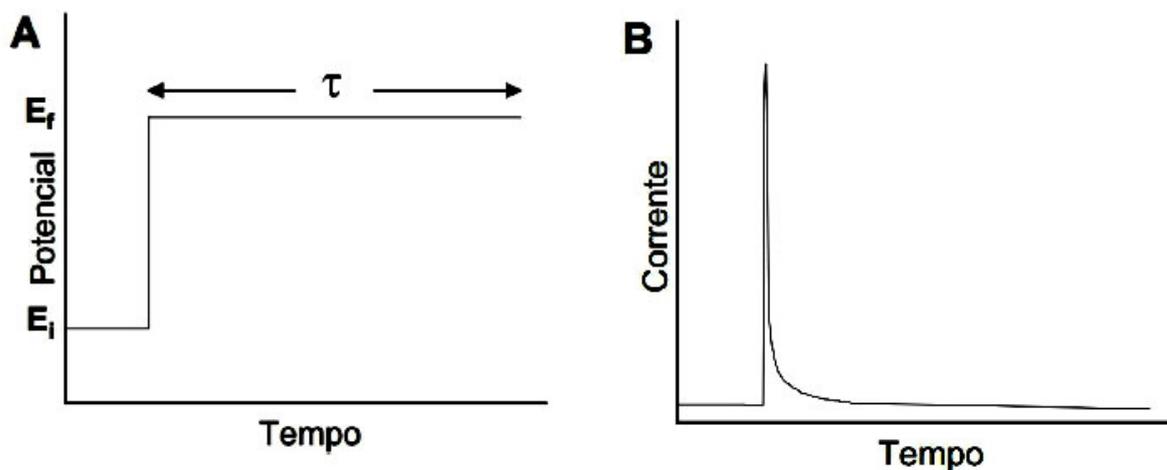
### 2.2.2. Técnicas amperométricas

Outra técnica eletroanalítica bastante utilizada para estudar reações de eletrodo e suas velocidades em sistemas de fluxo é a amperometria. Esta técnica é normalmente empregada para complementar a voltametria cíclica na análise de mecanismos eletroquímicos. A amperometria consiste em se aplicar um potencial fixo e constante, definido de acordo com potenciais de oxidação/redução de diferentes analitos, com resposta obtida de corrente coletada em relação ao tempo, correlacionados com concentração em técnicas analíticas (BRETT et al., 1994; DOS SANTOS et al., 2008; PEREIRA et al., 2016a). A amperometria ocorre sob duas formas: a potencial constante, amperometria convencional (AC) ou múltiplos potenciais (MPA) que permite a aplicação de degraus pulsos de potencial seguidos no mesmo ET.

A AC baseia-se na aplicação de um único degrau de potencial (Figura 2.9A), produzindo-se uma corrente que decai com o tempo (Figura 2.9B), apresenta elevada sensibilidade, pois permite a aquisição de correntes bem baixas, e, portanto, a detecção de baixas concentrações, devido a quase total ausência de corrente capacitiva.

## REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 2.9 (A) Perturbação aplicada, variando de  $E_i$  a  $E_f$ . (B) resposta de corrente para um experimento de degrau único de potencial.



Fonte: QUINTINO, 2003.

A técnica de AC, assim como as demais técnicas amperométricas, apresenta limitação quanto a estabilidade do sinal eletroquímico em função do tempo quando determinados compostos são analisados, comprometendo a repetibilidade da resposta e a reprodutibilidade dos resultados da análise (DOS SANTOS et al., 2011). A estabilidade do sinal eletroquímico é dependente da taxa de transferência de carga (elétrons) entre o eletrodo e a espécie eletroativa (presente na interface eletrodo-solução), que por sua vez depende das condições da superfície do eletrodo (SKOOG, 2002; DOS SANTOS et al., 2011; JOHNSON et al., 1986). A superfície do eletrodo pode ser modificada gradativamente durante o experimento, dependendo do tipo de composto que está envolvido no processo eletroquímico (BRETT et al., 1994; DOS SANTOS et al., 2008). Quando uma espécie eletroativa e/ou produto de reação adsorve ou eletropolimeriza na superfície do eletrodo de modo irreversível ou quase irreversível, pode ocorrer uma contaminação e/ou passivação do eletrodo (DOS SANTOS et al., 2011). Este problema pode ser verificado, por exemplo, na determinação eletroquímica de flavonoides e seus derivados (GALLI et al., 2006). A passivação e/ou contaminação da superfície do eletrodo pode afetar a taxa de transferência de carga entre o eletrodo e o analito, assim como produzir sinais eletroquímicos devido aos produtos adsorvidos, que interferem no sinal eletroquímico de interesse (DOS SANTOS et al., 2011).

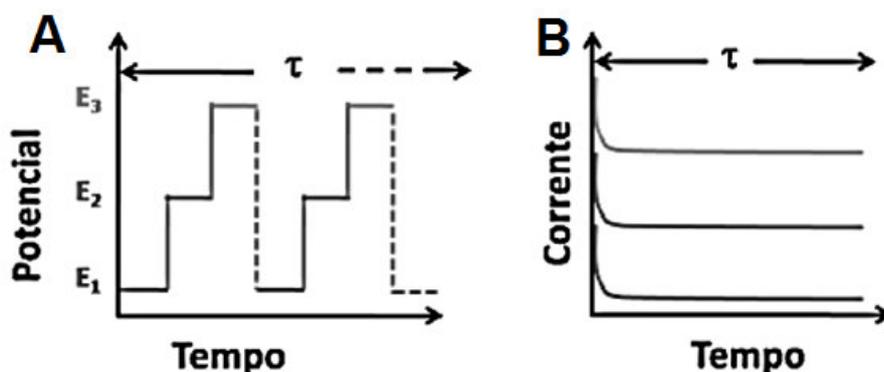
Outra limitação, que vale ressaltar, da técnica AC é a impossibilidade da determinação simultânea de compostos eletroativos com potenciais redox distintos em determinadas condições experimentais usando um único eletrodo de trabalho. Quando a diferença de potencial envolvida em ambos os processos eletroquímicos é suficientemente

grande, superior a 0,1 V, é possível contornar esta limitação realizando-se medidas do sinal amperométrico em potenciais distintos ( $E_1$  e  $E_2$ ) sequencialmente (SKOOG, 2002; DOS SANTOS et al., 2011). Na injeção da primeira alíquota da amostra e aplicando o potencial  $E_1$ , somente uma das espécies é reduzida ou oxidada, sendo o sinal amperométrico proporcional à concentração desta espécie. Em seguida, com a injeção de uma segunda alíquota da mesma amostra e aplicação do potencial  $E_2$ , ambas as espécies sofrem processo de oxidação ou redução (DOS SANTOS et al., 2011). O sinal amperométrico diferencial corresponderá à concentração da segunda espécie. Além disto, essa análise pode ser realizada simultaneamente utilizando-se uma célula eletroquímica em fluxo com dois eletrodos de trabalho em paralelo, um fixado no potencial  $E_1$  e outro em  $E_2$  (PAIXÃO et al., 2003). Entretanto, cabe ressaltar que nestes casos, um bipotenciostato ou multipotenciostato são exigidos para controlar o potencial de cada eletrodo de trabalho, o que aumenta a complexidade (e conseqüentemente o custo) da instrumentação requerida para realização da medida. Ademais, os softwares (atualmente disponíveis) não permitem que se utilize mais de um potencial simultaneamente, visto que a mesma não pode ser programada no transcorrer do experimento (DOS SANTOS et al., 2011).

Como já mencionado, outra forma de detecção amperométrica pode ser implementada no modo pulsado, na qual pulsos de potenciais são aplicados ao eletrodo de trabalho sequencialmente e continuamente em função do tempo. Esse modo de detecção é conhecido na literatura como amperometria de múltiplos potenciais (MPA).

A MPA é uma técnica disponibilizada, segundo nosso conhecimento, pelo software GPES que controla os potenciostatos comercializados pela empresa Metrohm/AutoLab (Eco Chemie) e permite a aplicação de até 10 pulsos de potenciais com a possibilidade de aquisição da corrente em função do tempo em cada pulso de potencial (o que corresponde à aquisição de 10 amperogramas distintos "sequencialmente"). Na Figura 2.10A é apresentado um esquema no qual são aplicados três pulsos de potencial ( $E_1$ ,  $E_2$ ,  $E_3$ ) em sequência sobre o ET, durante um certo período de tempo, como resposta a MPA fornece três amperogramas distintos, cada qual correspondendo a um pulso aplicado (Figura 2.10B).

Figura 2.10: (A) Três degraus aplicados em sequência e (B) respectivos sinais coletados por amperometria de múltiplos pulsos.



Fonte: Adaptado de DOS SANTOS et al., 2011.

A MPA contorna de forma simples as limitações da AC em relação à realizar determinação simultânea e ainda, a estabilidade do sinal eletroquímico em função do tempo, visto que em sistemas em fluxo, permite que a resposta do eletrodo apresente estabilidade por um período de tempo maior devido a possibilidade de utilização de um potencial para a periódica limpeza eletroquímica realizada durante o experimento, evitando ou diminuindo a contaminação da superfície do eletrodo (OLIVEIRA et al., 2016a; DOS SANTOS et al., 2008; DOS SANTOS et al., 2011).

A amperometria é uma técnica é muito utilizada em eletroanálise, principalmente em aplicações envolvendo titulações amperométricas, sensores e medições em fluxo com a finalidade de melhorar o desempenho dos métodos analíticos sendo empregados em diversas áreas, e quando associada a métodos de análise como FIA e BIA, esta técnica, torna-se ainda mais atraente em eletroanalítica (BACKES et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2016b).

### 2.3 Análise por injeção em batelada (BIA)

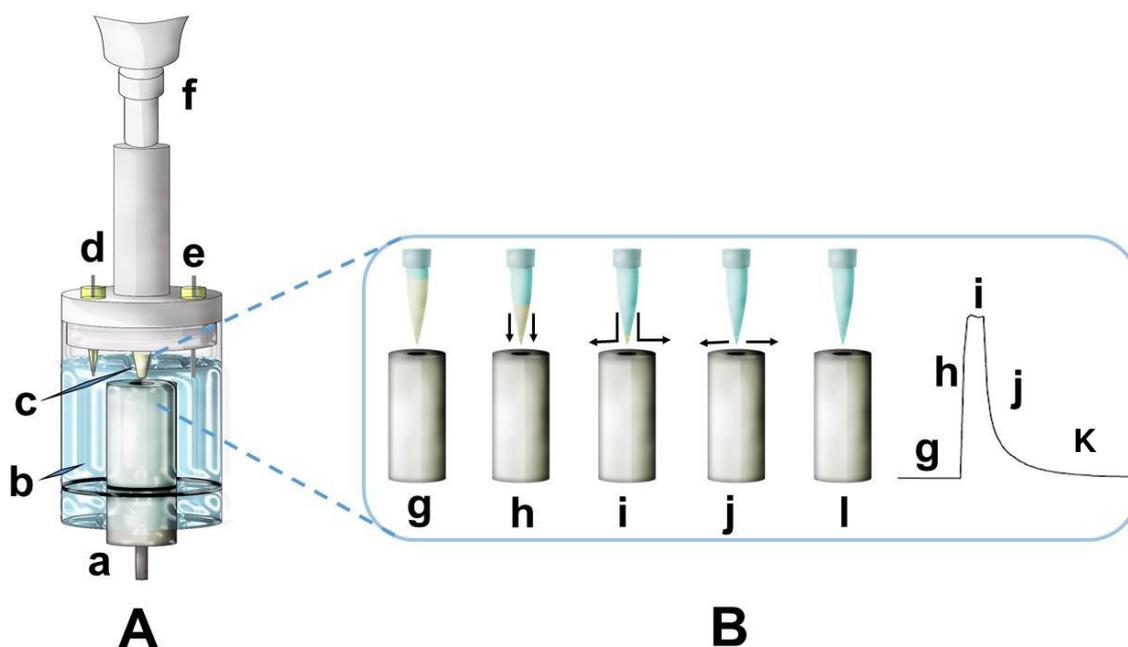
Na química analítica as análises em campo se tornaram essenciais em virtude da procura por respostas rápidas, redução do custo e por inconvenientes relacionados ao deslocamento das amostras para os laboratórios. Todavia, se faz necessário o desenvolvimento de sistemas que apresentem elevada velocidade, menor custo nas análises, precisão e exatidão (TORMIN et al., 2014, QUINTINO & ANGNES, 2004). Os métodos baseados em análise em fluxo FIA e BIA, são comumente utilizados por proporcionar tais

## REFERENCIAL TEÓRICO

qualidades, além de apresentarem uma boa sensibilidade e seletividade (FELIX & ANGNES, 2010).

A Análise por Injeção em Batelada (BIA) foi uma técnica proposta por Wang e Taha em 1991 que consiste na injeção de pequenos volumes, do analito ou padrão a ser analisado, com o auxílio de uma micropipeta ou seringa simples, diretamente sobre a superfície do ET totalmente imerso em um grande volume de solução eletrolítica, dessa forma, a amostra, ao entrar em contato com a superfície do ET, gera um sinal transiente que é proporcional a concentração do analito ou padrão em questão (WANG & TAHA, 1991; QUINTINO & ANGNES, 2004; OLIVEIRA et al., 2016b). Na Figura 2.11 é apresentado o diagrama esquemático de uma célula BIA convencional (A) e o diagrama de etapas na aquisição do sinal BIA (B) (QUINTINO & ANGNES, 2004).

**Figura 2.11:** Esquema de uma célula de BIA (A) e as etapas na aquisição do sinal BIA (B). a) eletrodo de trabalho; b) solução eletrolítica; c) ponteira da micropipeta; d) eletrodo de referência; e) eletrodo auxiliar; f) micropipeta ou seringa; g) antes da injeção; h) transporte durante a injeção; i) fim da injeção; j) lavagem do eletrodo de trabalho; k) equilíbrio final.



Fonte: Autora do trabalho.

São observadas as seguintes etapas de aquisição do sinal BIA (QUINTINO & ANGNES, 2004):

(g) Antes da injeção: a corrente medida permanece constante ao longo do tempo, devido apenas a corrente capacitiva do eletrólito, ausência de transferência de elétrons na interface eletrodo/solução;

(h) Transporte do analito durante a injeção: aumento significativo da corrente faradáica, devido à reação redox do analito, oxidação ou redução, que é transportado mecanicamente pela micropipeta automática até a superfície do eletrodo de trabalho;

(i) Final da injeção do analito: obtenção de uma corrente máxima, platô de corrente faradáica, valor é constante durante um curto intervalo de tempo;

(j) Lavagem do eletrodo de trabalho: diminuição acentuada da corrente devido ao fim da injeção mecânica da micropipeta automática. Este evento é promovido devido à mudança do transporte mecânico para o difusional, no qual a amostra é diluída no eletrólito ( $\approx 1000$  vezes).

(k) Equilíbrio final: após a diluição completa do analito no eletrólito a concentração do analito é pequena e uniforme em toda a célula BIA, restabelecendo praticamente o mesmo equilíbrio existente antes da injeção. O alcance deste equilíbrio pode ser acelerado pela convecção criada por um agitador inserido na célula BIA.

Inicialmente, os volumes de solução eletrolítica, dentro da célula, utilizados nesta técnica, variavam entre 250 a 700 mL (WANG & TAHA, 1991; QUINTINO & ANGNES, 2004). No entanto, estudos têm demonstrado que podem ser realizados experimentos BIA com células de menores volumes, em que o volume de eletrólito suporte é suficiente para proporcionar a diluição do analito ou padrão, após obtido o sinal transiente, mantendo as mesmas características atraentes das células de grandes volumes. Além disso, proporcionam o desenvolvimento de sistemas portáteis miniaturizados e evitam o desperdício de reagentes (TORMIN et al., 2014; QUINTINO & ANGNES, 2004; OLIVEIRA et al., 2016b). Em 2004, Quintino e Angnes realizaram um trabalho, no qual foi utilizada uma célula BIA com capacidade de 40 mL de eletrólito suporte, sendo todas as determinações realizadas sem agitação, obtendo bons resultados de repetibilidade e baixos valores de desvio padrão. Adicionalmente sugerem que a utilização de uma micropipeta eletrônica na etapa de injeção, que aumenta a precisão da análise, em comparação com o uso de seringas ou micropipetas convencionais.

Na literatura são encontrados trabalhos que empregam o sistema BIA com detecção amperométrica para determinações, com análises individuais e simultâneas, em amostras de substâncias bioativas e farmacêuticas como pode ser citado o trabalho de Ferreira et al. (2012) que estudaram a determinação de ciclopirox em amostras farmacêuticas usando o eletrodo de carbono vítreo com a técnica de AC acoplada tanto ao sistema FIA quanto ao BIA. As análises em BIA proporcionaram uma maior sensibilidade ( $0,091 \mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1}$ ), limite de detecção  $0,147 \mu\text{mol}^{-1}$ , excelente frequência analítica (300 injeções por hora - sem

## REFERENCIAL TEÓRICO

---

considerar o tempo necessário para preenchimento da pipeta com solução, ou seja, uma frequência analítica teórica). As faixas lineares de trabalho obtidas no sistema BIA foram de 2,0 a 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Apresentou valores de DPR entre 1,8 e 4,8 % para soluções de 100 e 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de ciclopirox, respectivamente.

Cunha e colaboradores (2013) desenvolveram um método analítico rápido para determinação de hidroquinona em formulações farmacêuticas usando o sistema BIA com detecção de MPA empregando um eletrodo de diamante dopado com boro. O método mostrou boa repetibilidade (DPR de 0,45%,  $n = 20$ ), faixa linear (10 a 2000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $R = 0,9999$ ), baixo limite de detecção (0,016  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e valores de recuperação satisfatórios (91 - 96%). A precisão do método foi avaliada por análises comparativas usando cromatografia líquida de alta performance.

Gimenes et al. (2015) descrevem um método eletroquímico para a determinação simultânea de captopril e hidroclorotiazida usando um eletrodo de diamante dopado com boro associado ao sistema BIA com detecção MPA. O método BIA proposto requer uma manipulação mínima da amostra e a determinação simultânea é conseguida com um único passo de injeção de 150  $\mu\text{L}$  de uma solução com a amostra. Os resultados obtidos com o método BIA foram comparados com os obtidos por eletroforese capilar onde apresentaram resultados semelhantes (95% de nível de confiança). O sistema BIA apresenta vantagens quanto à simplicidade na determinação, mínima geração de resíduos, além do baixo custo e alta frequência de análise (100 injeções por hora). O método BIA apresentou boa sensibilidade e alta precisão (Desvio padrão relativo (DPR)  $< 1,6\%$ ).

Oliveira e colaboradores (2016b) estudaram o sistema BIA com detecção amperométrica usando o eletrodo de carbono vítreo com detecção amperométrica convencional para determinação do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). O método forneceu 180 injeções por hora, altamente preciso (DPR 0,7%), sensível e seletivo. Comparando o método BIA com espectrofotometria UV, os resultados foram concordantes em amostras reais (plantas e chá), todavia na espectrofotometria é afetado pela cor ou turbidez das amostras o que afeta nos resultados, já o método BIA não é afetado.

Pereira et al. (2016b) estudaram o sistema BIA com detecção MPA na determinação do sulfametoxazol, trimetoprim e fenazopiridina, em eletrodo de diamante dopado com boro. O método proposto mostrou ser simples, robusto, boa precisão (DPR 3,5%,  $n = 15$ ), alta frequência analítica (até 70 injeções por hora) e geração de pequeno volume de resíduos por análise. Os resultados obtidos com o método BIA proposto foram

comparados com os obtidos pelo HPLC e apresentaram resultados semelhantes (nível de confiança de 95%).

Shaidarova et al. (2016) apresentaram um sistema BIA com detecção amperométrica convencional na determinação da cafeína usando um eletrodo de carbono vítreo modificado com irídio e rutênio. Nas condições otimizadas pelo sistema BIA foram obtidas 180 injeções de amostras por hora e o sinal analítico foi linearmente dependente da concentração de cafeína. Foram obtidos resultados satisfatórios para a determinação da cafeína em comprimidos, soluções para injeção de benzoato de cafeína-sódio e comprimidos de coffetamin onde a cafeína foi quantificada com alta sensibilidade numa vasta gama de concentrações. Uma vantagem do sistema BIA observada pelos autores foi que método apresenta benefícios sobre outros métodos de fluxo como a diminuição do consumo de solventes e a falta de uma bomba e tubos de conexão. O método desenvolvido poderia ser usado para determinar a cafeína em drogas.

Oliveira e colaboradores (2016a) realizaram um estudo sobre a oxidação eletroquímica da astaxantina usando um eletrodo de carbono vítreo no sistema BIA com detecção de MPA. O método proposto apresentou 240 injeções por hora, baixo DPR (desvio padrão relativo) (2,4%) e fora testado em amostras de salmão que obteve valores de recuperação entre 83 e 97% atestando a precisão do método.

Backes e colaboradores (2017), descreveram dois procedimentos analíticos, um sistema BIA e um sistema FIA (análise por injeção em fluxo), com detecção amperométrica convencional, para a determinação do Citrato de Sildenafil (SC) em medicamentos para disfunção erétil (Viagra<sup>®</sup> e genéricos). A técnica eletroquímica escolhida foi a amperometria utilizando um eletrodo de carbono impresso comercial da Dropsens<sup>®</sup> (CI) para ambos os sistemas FIA e BIA em tampão Britton-Robinson (pH 2). O SC apresentou um pico anódico irreversível em + 1,0 V, o qual foi avaliado em cinco diferentes eletrodos de trabalho de CI não modificado selecionando o melhor eletrodo de trabalho, proporcionando boa sensibilidade, precisão e baixo custo. A detecção amperométrica do SC para dois métodos propostos foi realizada em + 1,1 V. As melhores condições para a determinação de SC por sistemas hidrodinâmicos foram obtidas através de volumes de injeção de 50 e 150  $\mu\text{L}$  a vazões de 100 e 75  $\mu\text{L s}^{-1}$ , para BIA e FIA, respectivamente. Nestas condições, o sistema BIA mostrou melhor sensibilidade (0,188  $\mu\text{A}$ ) e frequência analítica teórica (360  $\text{h}^{-1}$ ) para determinação do SC.

---

---

## *Capítulo 3*



## *Objetivos*

---

---

### 3. OBJETIVOS

---

#### 3.1. Objetivo geral

Desenvolver, otimizar e aplicar procedimentos eletroanalíticos para determinação das substâncias bioativas catequina e quercetina utilizando a técnica de análise por injeção em batelada (BIA) com detecção eletroquímica.

#### 3.2. Objetivos específicos

Para o cumprimento do objetivo geral, têm-se como objetivos específicos:

- Estudar as propriedades redox das substâncias bioativas catequina e quercetina sobre as superfícies dos eletrodos de trabalho de carbono vítreo e de carbono impresso;
- Verificar a influência da composição, concentração e pH do eletrólito suporte na resposta analítica dos eletrodos para a determinação de substâncias bioativas (catequina e quercetina);
- Avaliar a resposta das substâncias bioativas (catequina e quercetina) em sistema de análise por injeção em batelada (BIA) utilizando os eletrodos de trabalho de carbono vítreo e de carbono impresso;
- Otimizar as condições experimentais para o sistema BIA como a velocidade, volume de injeção e repetibilidade do método;
- Avaliar a influência de possíveis interferentes (rutina e quercitrina) nas respostas do método proposto;
- Aplicar os métodos propostos na determinação de catequina e quercetina em amostras de extratos plantas e/ou chás.

---

---

*Capítulo 4*



*Justificativa*

---

---

#### 4. JUSTIFICATIVA

---

Em 2008, cerca de 72% das mortes no Brasil foram atribuídas às doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como doenças renais, cardiovasculares, artrite, catarata, respiratórias, diabetes, parkinson, alzheimer, câncer, patologias relacionadas ao processo de envelhecimento, disfunções cognitivas entre outras, e este percentual só vem aumentando ao longo dos anos (SILVA-JUNIOR, 2009). A incidência de morte por tais doenças pode ser minimizada pelo uso prévio de substâncias bioativas presentes em determinados alimentos, chás, plantas e frutas (BARANOWSKA et al., 2018a; PATEL et al., 2018; LIN et al., 2018).

O consumo de substâncias bioativas, como catequina e quercetina, promovem diversos benefícios à saúde inclusive na prevenção das DCNT (YAN, et al., 2019; BARANOWSKA et al., 2018a; PATEL et al., 2018) e muitos estudos têm sido conduzidos para as suas determinações. Entretanto, a maioria das técnicas reportadas na literatura para a determinação de substâncias bioativas são baseadas em metodologias cromatográficas (BARBA et al., 2006; VIÑAS et al., 2008), espectrofotométricas (BARBA et al., 2006; BISWAS et al., 2011) e eletroforese capilar (PIOVEZAN et al., 2013; BALLUS et al., 2012) que, na maioria das vezes, necessitam de alto investimento (aquisição, operação e manutenção do equipamento) e uso de reagentes (solventes) de custo elevado (alta pureza).

Assim, há uma necessidade crescente de desenvolver novas estratégias de análise para a determinação e quantificação dessas substâncias bioativas e que sejam tão eficientes como as técnicas citadas anteriormente, bem como, supere suas desvantagens. O sucesso de novas metodologias pode permitir que menores investimentos viabilizem o controle de qualidade com custos de aquisição, operação e manutenção consideravelmente inferiores. Neste sentido, a associação de técnicas eletroquímicas (com o uso de eletrodos de custo relativamente baixos como o eletrodo de carbono vítreo e impresso) com sistemas de análises por injeção em fluxo ou em batelada, apresentam-se como alternativas promissoras.

Especificamente, o sistema BIA com detecção eletroquímica é simples, basta acoplar a um potenciostato, o notebook (ou computador) e os eletrodos. O sistema fornece informações qualitativas e quantitativas eliminando a etapa preparo de amostra (a diluição é realizada no próprio eletrólito), a determinação é obtida com uma única etapa de injeção e podem ser portáteis o que garante rápidos resultados, sendo muito vantajosos sob os pontos de vista temporal e econômico, além de apresentarem elevada seletividade e sensibilidade nas determinações, elevada frequência analítica, consumo mínimo de reagentes e amostras e, conseqüentemente com geração de resíduos em menor volume.

---

*Capítulo 5*



*Referências  
Bibliográficas*

---

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABDEL-RAHEEM, I. T. Gastroprotective effect of rutin against indomethacin-induced ulcers in rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 107, n. 3, p. 742-750, 2010.

AHN, J.; LEE, H.; KIM, S.; PARK, J.; HA, T. The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 373, n. 4, p. 545-549, 2008.

ALARA, O. R.; ABDURAHMAN, N. H.; UKAEGBU, C. I.; KABBASHI, N. A. Extraction and characterization of bioactive compounds in *Vernonia amygdalina* leaf ethanolic extract comparing Soxhlet and microwave-assisted extraction techniques. **Journal of Saibah University for Science**, v. 13, n. 1, p. 414-422, 2019.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426-436, 2013.

BACKES, R. S.; GUEDES, T. J., DOS SANTOS, W. T.; DA SILVA, R. A. Determinação rápida e simples de citrato de sildenafil (Viagra® e genéricos) empregando eletrodo impresso de carbono em sistemas FIA e BIA com detecção amperométrica. **Química Nova**, v. 40, n. 7, p. 752-759, 2017.

BAHRI, A.; HENRIQUET, C.; PUGNIÈRE, M.; MARCHESSEAU, S.; CHEVALIER-LUCIA, D. Binding analysis between monomeric  $\beta$ -casein and hydrophobic bioactive compounds investigated by surface plasmon resonance and fluorescence spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 286, n. 1, p. 289-296, 2019.

BALLUS, C. A.; MEINHART, A. D.; DE OLIVEIRA, R. G.; GODOY, H. T. Optimization of capillary zone electrophoresis separation and on-line preconcentration of 16 phenolic compounds from wines produced in South America. **Food research international**, v. 45, n.1, p. 136-144, 2012.

BARANOWSKA, M.; SULIBORSKA, K.; CHRZANOWSKI, W.; KUSZNIEREWICZ, B.; NAMIEŚNIK, J.; BARTOSZEK, A. The relationship between standard reduction potentials of catechins and biological activities involved in redox control. **Redox Biology**, v. 17, p. 355-366, 2018.

BARBA, A. I. O.; HURTADO, M. C.; MATA, M. C. S.; RUIZ, V. F.; TEJADA, M. L. S. de. Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and b-carotene in vegetables. **Food Chemistry**, v. 95, n. 2, p. 328-336, 2006.

BARSAN, M.M.; GHICA, M.E.; BRET, C.M. A. Electrochemical sensors and biosensors based on redox polymer/ carbon nanotube modified electrodes: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 881, p. 1-23, 2015.

BISWAS, A. K.; SAHOO, J.; CHATLI, M. K. A simple UV-Vis spectrophotometric method for determination of b-carotene content in raw carrot, sweet potato and supplemented chicken meat nuggets. **Food Science and Technology**, v. 44, n. 8, p. 1809-1813, 2011

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- .CHOI, G. N.; KIM, J. H.; KWAK, J. H.; JEONG, C. H.; JEONG, H. R.; LEE, U.; HEO, H. J. Effect of quercetin on learning and memory performance in ICR mice under neurotoxic trimethyltin exposure. **Food Chemistry**, v. 132, n. 2, p. 1019-1024, 2012.
- CHUN, O. K.; CHUNG, S. J.; CLAYCOMBE, K. J.; SONG, W. O. Serum C-reactive protein concentrations are inversely associated with dietary flavonoid intake in US adults. **The journal of nutrition**, v. 138, n. 4, p. 753-760, 2008.
- BONDONNO, N. P.; BONDONNO, C. P.; HODGSON, J. M.; WARD, N. C.; CROFT, K. D. The efficacy of quercetin in cardiovascular health. **Current Nutrition Reports**, v. 4, n. 4, p. 290-303, 2015.
- BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.
- BRETT A. M; BRETT, C. M. A. **Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações**. New York: Oxford University press, 1993.
- BRETT, C. M. A.; OLIVEIRA, B. A. M; COSTEL, M. L. Amperometric and voltammetric detection in batch injection analysis. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 19, p. 3145-3150, 1994.
- CUNHA, R. R.; TORMIN, T. F.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Determinação rápida de hidroquinona usando análise por injeção em batelada (BIA) com detecção amperométrica. **Química nova**, v. 36, n. 5, p. 663-668, 2013.
- DAGO, À.; JAVIER, C. A.; DÍAZ-CRUZ, J. M.; ESTEBAN, M. Carbon nanotubes and graphene modified screen-printed carbon electrodes as sensitive sensors for the determination of phytochelatins in plants using liquid chromatography with amperometric detection. **Journal of Chromatography**, v. 1409, p. 210-217, 2015.
- D'ANDREA, G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications?. **Fitoterapia**, v. 106, p. 256-271, 2015.
- DÖNDER, Y.; ARIKAN, T. B.; BAYKAN, M.; AKYÜZ, M.; ÖZ, A. B. Effects of quercitrin on bacterial translocation in a rat model of experimental colitis. **Asian Journal of Surgery**, v. 41, n. 6, p. 543-550, 2018.
- DOS SANTOS, W. T. P.; DE ALMEIDA, E. G. N.; FERREIRA, H. E. A.; GIMENES, D. T.; RICHTER, E. M. Simultaneous flow injection analysis of paracetamol and ascorbic acid with multiple pulse amperometric detection. **Electroanalysis**, v. 20, n.17, p. 1878-1883, 2008.
- DOS SANTOS, W. T. P.; GIMENES, D. T.; DE ALMEIDA, E. G. N.; EIRAS, S. D.; ALBUQUERQUE, Y. D. T.; RICHTER, E. M. Simple flow injection amperometric system for simultaneous determination of dipyrone and paracetamol in pharmaceutical formulations. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, v. 20, n.7, p. 1249-1255, 2009.
- DOS SANTOS, W. T. P.; GIMENES, D. T.; RICHTER, E. M.; Angnes, L. Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos: Potencialidades e aplicações. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1753-1761, 2011.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

DROPSSENS. Disponível em:

<[http://www.dropsens.com/en/screen\\_printed\\_electrodes\\_pag.html](http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html)>. Acesso em 30 de junho de 2018.

DUFRESNE, C. J.; FARNWORTH, E. R. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, n. 7, p. 404-421, 2001.

EBUN, O.; SANTOSH, K. Effect of domestic cooking on the polyphenolic content and antioxidant capacity of plantain (*Musa paradisiaca*). **World Journal of Dairy & Food Sciences**, v. 6, n. 2, p. 189-194, 2011.

EDWARDS, R. L.; LYON, T.; LITWIN, S. E.; RABOVSKY, A.; SYMONS, J. D.; JALILI, T. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 11, p. 2405-2411, 2007.

ERDEN INAL, M.; KAHRAMAN, A. The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet a induced oxidative stress in rats. **Toxicology**, v. 154, n. 1- 3, p. 21-29, 2000.

FABJAN, N.; RODE, J.; KOSIR, I. J.; WANG, Z.; ZHANG, Z.; KREFT, I. Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum Gaertn.*) as a source of dietary rutin and quercitrin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 22, p. 6452-6455, 2003.

FARAH, A.; DONANGELO, C.M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 23-36, 2006.

FELIX, F. S.; ANGNES, L. Fast and Accurate Analysis of Drugs Using Amperometry Associated With Flow Injection Analysis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 12, p. 4784-4804, 2010.

FERREIRA, L.; FELIX, F. S.; ANGNES, L. Fast determination of ciclopirox in pharmaceutical products by amperometry in flow and batch injection systems. **Electroanalysis**, v. 24, n. 4, p. 961-966, 2012.

GALLI, A.; DE SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105, 2006.

GAVELOVÁ, M.; HLADÍKOVÁ, J.; VILDOVÁ, L.; NOVOTNÁ, R.; VONDRÁČEK, J.; KRČMÁR, P.; MACHALA, M.; SKÁLOVÁ, L. Reduction of doxorubicin and oracin and induction of carbonyl reductase in human breast carcinoma MCF-7 cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 176, n. 1, p. 9-18, 2008.

GHOLIVAND, M. B.; TORKASHVAND, M.; MALEKZADEH, G. Fabrication of an electrochemical sensor based on computationally designed molecularly imprinted polymers for determination of cyanazine in food samples, **Analytica Chimica Acta**, v. 713, p. 36-44, 2012.

GIMENES, D.T.; MARRA, M.C.; DE FREITAS, J.M.; MUNOZ; R.A. A.; RICHTER, E. M. Simultaneous determination of captopril and hydrochlorothiazide onboron-doped diamond

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

electrode by batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection. **Sensors and Actuators B**, v. 212, n. 3, p. 411–418, 2015.

GOMEZ-FLORIT, M.; PACHA-OLIVENZA, M. A.; FERNÁNDEZ-CALDERÓN, M. C.; CÓRDOBA, A.; GONZÁLEZ-MARTÍN, M. L.; MONJO, M.; RAMIS, J. M. Quercitrin-nanocoated titanium surfaces favour gingival cells against oral bacteria. **Scientific Reports**, v. 6, p. 22444, 2016.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A. E.; JUAREZ, A. O.; PELZER, L. E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **Il Farmaco**, v. 56, n. 9, p. 683-687, 2001.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1–93, 2006.

HAO, H. H.; SHAO, Z. M.; TANG, D. Q.; LU, Q.; CHEN, X.; YIN, X. X.; Wu, J.; Chen, H. Preventive effects of rutin on the development of experimental diabetic nephropathy in rats. **Life Sciences**, v. 91, n. 19-20, p. 959-967, 2012.

HE, Q.; LV, Y.; YAO, K. Effects of tea polyphenols on the activities of  $\alpha$ -amylase, pepsin, trypsin and lipase. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1178–1182, 2006.

HORST, M.A.; LAJOLO, F.M. Biodisponibilidade de compostos bioativos de alimentos. In: COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 3. ed. São Paulo: Manole, p. 772–807, 2009.

JOHNSON, D. C.; WEBER, S. G.; BOND, A. M.; WIGHTMAN, R. M.; SHOUP, R. E.; KRULL, I. S. Electroanalytical voltammetry in flowing solutions. **Analytica Chimica Acta**, v. 180, p. 187-250, 1986.

KHALIFA, T. I.; MUHTADI, F. J.; HASSAN, M. M. Rutin. **Analytical Profiles of Drug Substances**, v. 12, p. 623-681, 1983. ISSN 0099-5428.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Food Science and Technology**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LASCHI, S.; PALCHETTI, I.; MASCINI, M. Gold-based screen-printed sensor for detection of trace lead. **Sens. Actuators B**, v. 114, n. 1, p. 460–465, 2006.

LI, K.; XIAO, G.; RICHARDSON, J. J.; TARDY, B. L.; EJIMA, H.; HUANG, W.; GUO, J.; LIAO, X.; SHI, B. Targeted therapy against metastatic melanoma based on self-assembled metal-phenolic nanocomplexes comprised of green tea catechin. **Advanced Science**, v.6, p. 1801688, 2019.

LIN, Q.; CHEN, X. Y.; ZHANG, J.; YUAN, Y. L.; ZHAO, W.; WEI, B. Upregulation of SIRT1 contributes to the cardioprotective effect of Rutin against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 46, p. 227-236, 2018.

MAITI, K.; MUKHERJEE, K.; GANTAIT, A.; AHAMED, H. N.; SAHA, B. P.; MUKHERJEE, P. K. Enhanced therapeutic benefit of quercetin-phospholipid complex in

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats: a comparative study. **Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics**, v. 4, n. 2, p. 84- 90, 2005.

MANDEL, S. A.; AVRAMOVICH-TIROSH; Y.; REZNICHENKO, L.; ZHENG, H.; WEINREB, O.; AMIT, T.; YOUDIM, M. B. Multifunctional activities of green tea catechins in neuroprotection. **Neurosignals**, v. 14, n. 1-2, p. 46-60, 2005.

MARAIS, J.P.; DEAVOURS, B., DIXON, R.A.; FERREIRA, D. The stereochemistry of flavonoids. In: GROTEWOLD E. (Ed.). **The Science of Flavonoids**. Ohio: Springer, p. 1-46, 2006.

MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ, M.; ŠERUGA, M.; JAKOBEK, L.; NOVAK, I. Electrochemical and antioxidant properties of (+)-catechin, quercetin and rutin. **Croatica Chemica Acta**, v. 83, n. 2, p. 197-207, 2010.

MI, Y.; ZHANG, C.; LI, C. M.; TANEDA, S.; WATANABE, G.; SUZUKI, A. K.; TAYA, K. Protective effect of quercetin on the reproductive toxicity of 4-nitrophenol in diesel exhaust particles on male embryonic chickens. **Journal of Reproduction and Development**, v. 56, n. 2, p. 195-199, 2010.

MISCORIA, S. A.; J. A. C. Q. C.; MAEDER, T.; NEGRI, R. M. Screen-printed electrodes for electroanalytical sensing, of chromium VI in strong acid media, **Sensors and Actuators**, v. 195, p. 294-302, 2014.

MOMBELLI, A.; MÜLLER, N.; CIONCA, N. The epidemiology of peri-implantitis. **Clinical Oral Implants Research**, v. 23, p. 67-76, 2012.

NAPOLITANO, J. G.; GÖDECKE, T.; LANKIN, D. C.; JAKI, B. U.; MCALPINE, J. B.; CHEN, S. N.; PAULI, G. F. Orthogonal analytical methods for botanical standardization: determination of green tea catechins by qNMR and LC-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 93, p. 59-67, 2014.

NASCIMENTO, V. B.; ANGNES, L. Eletrodo fabricados por "silk-screen". **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 614-629, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 30 years from 1981-2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

OLIVEIRA, G. K. F.; TORMIN, T. F.; MONTES, R. H. O.; RICHTER, E. M.; MUÇOZ, R. A. A Electrochemical oxidation of astaxanthin on glassy carbon electrode and its amperometric determination using batch injection analysis (BIA). **Electroanalysis**, v. 28, n. 9, p. 2143 - 2148, 2016a.

OLIVEIRA, G. K. F.; TORMIN, T. F.; SOUSA, R. M. F.; OLIVEIRA, A., MORAIS, S. A. L.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Batch-injection analysis with amperometric detection of the DPPH radical for evaluation of antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 192, p. 691-697, 2016b.

PATEL, R. V.; MISTRY, B. M.; SHINDE, S. K.; SYED, R.; SINGH, V.; SHIN, H. S. Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent. **European journal of medicinal chemistry**, v. 155, p. 889-904, 2018.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

PATIL, B. S.; JAYAPRAKASHA, G. K.; MURTHY, K. N. C.; VIKRAM, A. Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities, and challenges. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8142–8160, 2009.

PARTINGTON, J. R. A short history of chemistry. **New York: Dover Publications**, 220, 1989.

PAIXÃO, T. R.; MATOS, R. C.; BERTOTTI, M. Development of a dual-band amperometric detector for determination of ascorbic acid and glucose. **Electroanalysis**, v. 15, n. 23-24, p. 1884-1889, 2003.

PEREIRA, L. N. S.; SILVA, I. S.; ARAÚJO, T. P.; TANAKA, A. A.; ANGNES, L. Fast quantification of  $\alpha$ -lipoic acid in biological samples and dietary supplements using batch injection analysis with amperometric detection. **Talanta**, v. 154, p. 249–254, 2016a.

PEREIRA, P. F.; SILVA, W. P.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. A simple and fast batch injection analysis method for simultaneous determination of phenazopyridine, sulfamethoxazole, and trimethoprim on boron-doped diamond electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 766, p. 87–93, 2016b.

PERES, R. G.; TONIN, F. G.; TAVARES, M. F.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Determination of catechins in green tea infusions by reduced flow micellar electrokinetic chromatography. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 651-655, 2011.

PEREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, n. 7, p. 791-800, 2006.

PINELO, M.; ARNOUS, A.; MEYER, A.S. Upgrading of grape skins significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 11, p. 579-590, 2006.

PIOVEZAN, M.; GARCÍA-SECO, D.; MICKE, G. A.; GUTIÉRREZ-MAÑERO, J.; RAMOS-SOLANO, B. Method development for determination of (+)-catechin and (–)-epicatechin by micellar electrokinetic chromatography: Annual characterization of field grown blackberries. **Electrophoresis**, v. 34, n. 15, p. 2251-2258, 2013.

QUINTINO M. S. M., ANGNES L. Batch injection analysis: An almost unexplored powerful tool. **Electroanalysis**, v. 16, n. 7, p. 513-523, 2004.

QUINTINO, M. S. M., Desenvolvimento de sensores eletroquímicos associados a batch injection analysis (BIA) para aplicações analíticas, in Instituto de Química. 2003, USP: São Paulo.

RUBILAR, M.; PINELO, M.; SHENE, C.; SINEIRO, J.; NUNEZ, M. J. Separation and HPLC-MS identification of phenolic antioxidants from agricultural residues: almond hulls and grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 25, p. 10101–10109, 2007.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

RUZICKA, J.; HANSEN, E. H.; Flow Injection Analysis. Part I: A new concept of fast continuous flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 78, p. 145, 1975.

RUSZNYÁK, S.; SZENT-GYORGYI, A.. Vitamin P: flavonols as vitamins. **Nature**, v. 138, 1936.

SATUÉ, M.; DEL MAR ARRIERO, M.; MONJO, M.; RAMIS, J. M. Quercitrin and taxifolin stimulate osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells and inhibit osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 86, n. 10, p. 1476-1486, 2013.

SHAIDAROVA, L. G.; CHELNOKOVA, I. A.; DEGTEVA, M. A.; MAKHMUTOVA, G. F.; LEKSINA, Y. A.; GEDMINA, A. V.; BUDNIKOV, G. K. Amperometric detection under batch-injection analysis conditions of caffeine on an electrode modified by mixed-valence iridium and ruthenium oxides. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 49, n. 10, p. 49-52, 2016.

SHI, Y.; XU, H.; GU, Z.; WANG, C; DU, Y. Sensitive detection of caffeic acid with trifurcate PtCu nanocrystals modified glassy carbon electrode. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 567, p. 27-31, 2019.

SILVA-JUNIOR, J. B. As doenças transmissíveis no Brasil: tendências e novos desafios para o Sistema Único de Saúde. In: Ministério da Saúde, ed. Saúde Brasil 2008: 20 anos de Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2009.

SINGH, T.; KATIYAR, S. K. Green tea catechins reduce invasive potential of human melanoma cells by targeting COX-2, PGE2 receptors and epithelial-to-mesenchymal transition. **PloS one**, v. 6, n. 10, p. 25224, 2011.

STEWART, K. K.; BEECHER, G. R.; HARE, P. E.; Rapid analysis of discrete samples: The use of nonsegmented, continuous flow. **Analytical Biochemistry**, v. 10, p. 167, 1976.

SKEGGS, L. T.; An automatic method for colorimetric analysis. **American Journal of Chemistry Pathology**, v. 38, p. 311, 1957.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, p. 836, 2002.

TAN, W. F.; LIN, L. P.; LI, M. H.; ZHANG, Y. X.; TONG, Y. G.; XIAO, D.; DING, J. Quercetin, a dietary-derived flavonoid, possesses antiangiogenic potential. **European Journal of Pharmacology**, v. 459, n. 2-3, p. 255-262, 2003.

TANG, J.; HUANG, R.; ZHENG, S.; JIANG, S.; YU, H.; LI, Z.; WANG, J. A sensitive and selective electrochemical sensor based on graphene quantum dots/gold nanoparticles nanocomposite modified electrode for the determination of luteolin in peanut hulls. **Microchemical Journal**, v. 145, p. 899-907, 2019.

TIEPPO, J.; VERCELINO, R.; DIAS, A. S.; VAZ, M. S.; SILVEIRA, T. R.; MARRONI, C. A.; Marroni, N. P.; Henriques, J.A.P; PICADA, J. N. Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 7, p. 1140-1146, 2007.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

TOKYOL, C.; YILMAZ, S.; KAHRAMAN, A.; CAKAR, H.; POLAT, C. The effects of desferrioxamine and quercetin on liver injury induced by hepatic ischaemia-reperfusion in rats. **Acta Chirurgica Belgica**, v. 106, n. 1, p. 68-72, 2006.

TORMIN, T. F.; CUNHA, R. R.; DA SILVA, R. A. B.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Combination of screen-printed electrodes and batch injection analysis: a simple, robust, high-throughput, and portable electrochemical system. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 202, p. 93-98, 2014.

VIÑAS, P.; CAMPILLO, N.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA M. A comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction coupled to liquid chromatography for the rapid analysis of resveratrol isomers in wines, musts and fruit juices. **Analytica Chimica Acta**, v. 611, p. 119–125, 2008.

WANG, G.; WANG, J. J.; YANG, G. Y.; DU, S. M.; ZENG, N.; LI, D. S.; LI, R. M., CHEN, J. Y. FENG, J. B.; YUAN, S. H.; YE, F. Effects of quercetin nanoliposomes on C6 glioma cells through induction of type III programmed cell death. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 271-280, 2012.

WANG, J. Analytical electrochemistry. 2. ed. New York: Wiley-VCH, p. 222, 2000.

WANG, J.; TAHA, Z. Batch injection analysis. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 1053-1056, 1991.

XU, J.; XU, S.; FENG, S.; HAO, Y.; WANG, J. Electrochemical sensor for detecting both oxidizing and reducing compounds based on poly (ethyleneimine)/phosphotungstic acid multilayer film modified electrode. **Electrochimica Acta**, v. 174, p. 706–711, 2015.

YAN, R.; TIAN, H.; DU, Z. Quercetin protects PC-12 cells against hypoxia injury by down-regulation of miR-122. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 22, n. 4, p. 391-398, 2019.

YIN, Y.; LI, W.; FILHO, Y. O.; SUN, L.; LU, J.; KIM, D.; WANG, X.; YAO, H.; WANG, L.; SHKUMAR, P. P.; HITRON, A.J. Quercitrina protege a pele dos danos oxidativos induzidos por UVB. **Toxicologia e farmacologia aplicada**, v. 269, n. 2, p. 89-99, 2013.

YOUUDIM, K. A; JOSEPH, J. A. A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: a multiplicity of effects. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, n. 6, p. 583-594, 2001.

---

---

## *Capítulo 6*



*Método de análise rápido,  
direto e sensível para  
determinação de catequina  
em chá verde por análise de  
injeção em batelada com  
amperometria de múltiplo  
pulso (BIA-AMP)*

---

---

## 6. MÉTODO DE ANÁLISE RÁPIDO, DIRETO E SENSÍVEL PARA DETERMINAÇÃO DE CATEQUINA EM CHÁ VERDE USANDO ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA COM AMPEROMETRIA DE PULSOS MÚLTIPLOS (BIA- MPA)\*

### Resumo

Os compostos bioativos apresentam várias atividades biológicas que promovem a saúde. Entre esses, aqueles com propriedades antioxidantes, como as vitaminas e os compostos fenólicos, têm despertado grande interesse pelos seus efeitos comprovados na proteção contra o estresse oxidativo decorrente de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e radicais livres e/ou espécies reativas resultante do metabolismo de oxigênio. Neste sentido, este trabalho descreve a determinação do composto bioativo catequina por oxidação eletroquímica utilizando análise por injeção em batelada (BIA) com detecção amperométrica de pulsos múltiplos (MPA), empregando um eletrodo de carbono vítreo (ECV) não modificado em solução tampão acetato (pH 4,5). O método proposto é baseado na aplicação de potenciais de pulso múltiplos de + 0,4 V (potencial de oxidação), + 1,4 V (potencial de limpeza) e 0,0 V (potencial de condicionamento) vs Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub>, evitando a passivação por produtos de oxidação e permitindo a quantificação da catequina. Nestas condições, a repetibilidade do método para injeções sucessivas de catequina a 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (n = 30) apresentou DPR 0,85% e a taxa de amostragem de 120 injeções por hora. A resposta amperométrica apresentou um intervalo linear para soluções contendo catequina de 20 a 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (R = 0,999), com limite de detecção de 0,03  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e limite de quantificação de 0,10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Além disso, o método proposto mostrou-se rápido e sensível para determinação de catequina em amostras de chá verde e os resultados foram comparáveis àqueles obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com nível de confiança de 95%.

### 6.1. Introdução

Os compostos bioativos possuem várias atividades biológicas benéficas para a saúde. Entre esses, aqueles com propriedades antioxidantes, como vitaminas e compostos

\*Publicado no periódico Analytical Methods, 2018, 10, 2034-2040.

**ARTIGO 1**

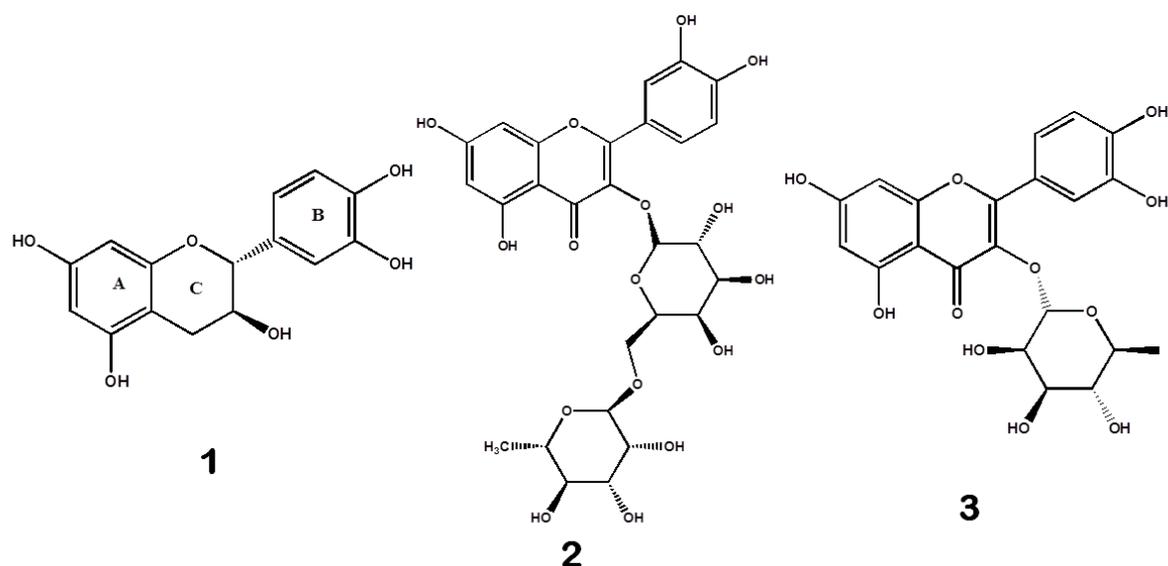
fenólicos, têm atraído grande interesse devido aos seus efeitos comprovados na proteção contra o estresse oxidativo (PEREZ-JIMENEZ & SAURA-CALIXTO, 2006). As substâncias antioxidantes são moléculas que podem retardar ou impedir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) *in vivo* e *in vitro*, agindo nos estágios finais da cadeia de reações oxidativas. Conseqüentemente, os antioxidantes são capazes de prevenir ou retardar os efeitos deletérios da oxidação, inibindo o efeito da lipoperoxidação, sequestrando os radicais livres e os íons metálicos quelantes. Eles protegem o organismo contra espécies reativas de oxigênio que podem levar a doenças como câncer e doenças cardiovasculares (MENDOZA-WILSON & GLOSSMAN-MITNIK, 2006; MAKRIS et al., 2007).

Os antioxidantes naturais de extratos vegetais vêm ganhando grande atenção, devido ao interesse dos consumidores, pois contêm diversas substâncias ativas, como ácido ascórbico, carotenoides e compostos fenólicos, que atuam na captura e neutralização de espécies oxidantes como o radical hidroxila (OH•) e, desta forma, podem contribuir para a proteção contra o dano oxidativo (PEREZ-JIMENEZ & SAURA-CALIXTO, 2006).

As catequinas, que são compostos fenólicos pertencentes à classe flavonóides, possuem propriedades que podem ser benéficas em problemas de saúde como diabetes, doenças cardíacas, infecções virais, inflamações e doenças degenerativas. Elas podem ajudar na prevenção do envelhecimento precoce e podem inibir o crescimento de células cancerígenas, enquanto ao mesmo tempo protegem as células saudáveis (SVOBODA et al., 2015; NOVAK et al., 2010; JANEIRO & BRETT, 2004). Como pode ser visto na Figura 6.1, as catequinas consistem de um grupo floroglucinol (A), um grupo pirânico (B) e um grupo catecol (B). Eles têm dois centros quirais, resultando em quatro isômeros: (+) - catequina, (-) - catequina, (+) - epicatequina e (-) - epicatequina. Na natureza, os isômeros mais abundantes são (+) - catequina e (-) - epicatequina (MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ et al., 2010), que são amplamente distribuídos em plantas, frutas e bebidas, incluindo chá verde, chá preto, vinho tinto, maçãs e chocolate (MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ et al., 2010; PIRES et al., 2017; MÜLLER et al., 2016).

A maioria dos métodos analíticos relatados na literatura para a determinação de catequina e outros compostos orgânicos em plantas medicinais são baseados em técnicas cromatográficas (SVOBODA & NOVAKOVA et al., 2015; WANG et al., 2017; EL-HADY & ALBISHRI, 2014) e eletroforese capilar (PIOVEZAN et al., 2013; BALLUS et al., 2012; PERES et al., 2011). No entanto, essas análises são demoradas, caras e trabalhosas. Além disso, a aplicabilidade desses métodos em extratos vegetais pode ser limitada pela complexidade da matriz.

Figura 6.1: Estrutura química da catequina (1), da rutina (2) e da quercitrina (3)



Fonte: Autora do trabalho.

As técnicas eletroquímicas oferecem vantagens consideráveis na análise de substâncias bioativas e em amostras farmacêuticas (MIYANO et al., 2014). Em comparação com outras técnicas, as vantagens de seu uso para a determinação de compostos fenólicos (como catequinas) incluem um tempo de resposta rápido, baixo limite de detecção e custo relativamente baixo (OLIVEIRA et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2016; SILVA et al., 2016). Devido às fortes características de adsorção do processo de oxidação da catequina no ECV (CASTAIGNÈDE et al., 2003; VESTERGAARD et al., 2005), a maioria dos métodos eletroquímicos relatados para a determinação de catequinas empregaram eletrodos quimicamente modificados (YANG et al., 2009; FERNANDES et al., 2008; EL-HADY & EL-MAAL, 2008; MANASA et al., 2017; PANG et al., 2017; YAO et al., 2015; EL-HADY, 2007; WU et al., 2005). Recentemente, demonstrou-se que as análises eletroquímicas podem ser realizadas usando eletrodos não modificados, em vez de modificados, com as vantagens de serem mais robustos, menos caros, mais fáceis de substituir e não necessitarem de nenhuma preparação além do polimento (AREIAS et al., 2016a; AREIAS et al., 2016b). A estratégia para superar o problema de bloqueio da superfície do eletrodo foi acoplar um sistema de injeção em batelada com detecção eletroquímica baseada na técnica de amperometria de múltiplo pulso (BIA – MPA). Esse método combina as características desejáveis dos sistemas em fluxo, como o baixo custo dos componentes do sistema, alta frequência analítica, redução do consumo de reagentes e amostras e baixa geração de resíduos, com os atraentes recursos analíticos das técnicas de MPA, incluindo alta sensibilidade e efeitos reduzidos de

## ARTIGO 1

---

contaminação do eletrodo de trabalho e corrente capacitiva desprezível (permitindo a detecção de baixas concentrações), tornando o método mais robusto (SANTOS et al., 2017).

No presente trabalho, um método simples, rápido, seletivo e preciso para a detecção de catequina em amostras de chá verde é apresentado. As vantagens de usar um eletrodo de carbono vítreo (ECV) associado a um sistema BIA –MPA permitiu a determinação de catequina com alta seletividade, superando o problema de envenenamento do eletrodo. O método foi validado em termos de faixa linear, repetibilidade, limites de detecção e quantificação, e os resultados com o método proposto foram comparados com os obtidos de análises realizadas usando HPLC.

### 6.2. Parte Experimental

#### 6.2.1. Reagentes, soluções e amostras

Todos os reagentes foram de grau analítico e utilizados sem qualquer purificação. As soluções aquosas foram preparadas usando água purificada (resistividade  $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) num sistema Milli-Q Direct (Millipore, Bedford, EUA). O cloreto de potássio foi adquirido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Acetato de sódio anidro, ácido acético e metanol foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A catequina ((+) - catequina,  $\geq 98\%$  pureza) foi obtida da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

Solução tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,5) foi utilizado como eletrólito de suporte em todos os experimentos, a menos que especificado de outra forma. Soluções stock de catequina em metanol foram preparadas semanalmente e mantidas em um refrigerador, onde a solução foi estável por pelo menos 1 mês. Soluções de trabalho foram preparadas por diluição até a concentração desejada com o eletrólito suporte.

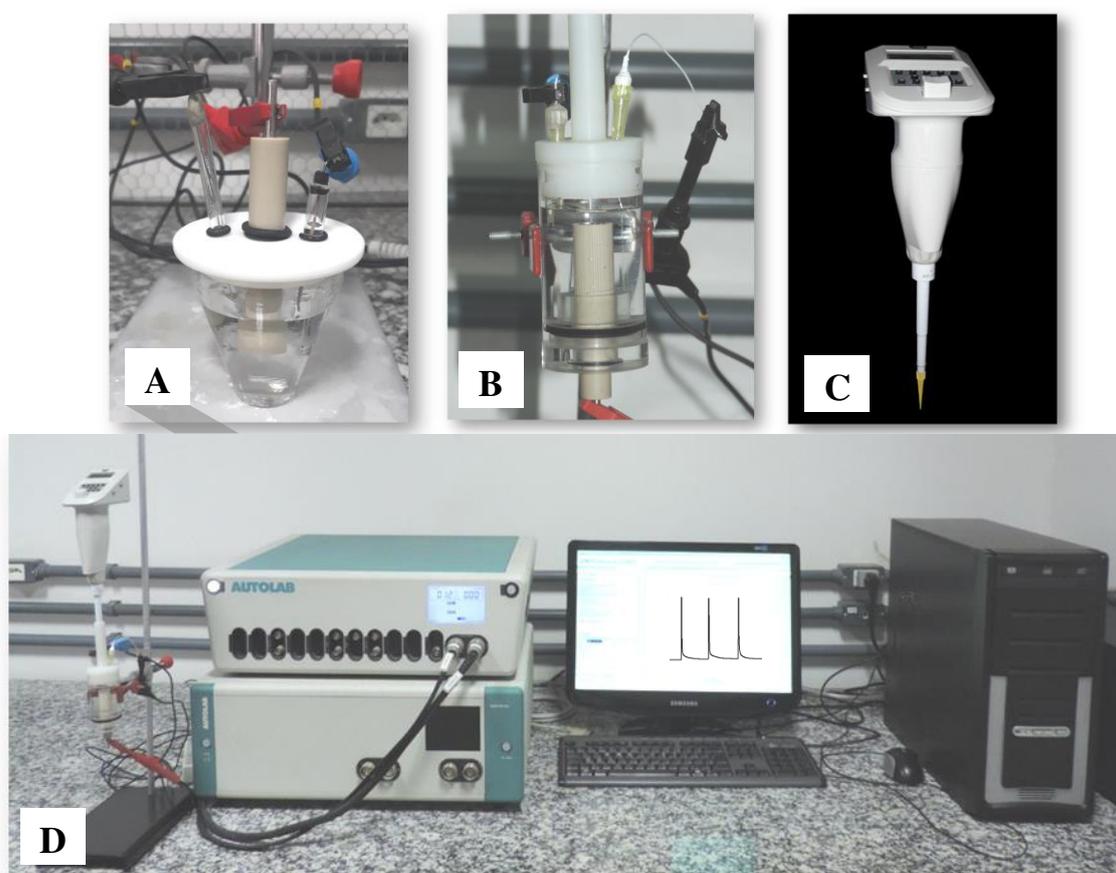
#### 6.2.2. Instrumentação e equipamentos

As análises eletroquímicas foram realizadas utilizando um potenciostato Autolab PGSTAT302N (Eco Chemie B.V., Utrecht, Holanda) (Figura 6.2D). As medidas voltamétricas e amperométricas foram conduzidas utilizando um sistema de três eletrodos: um eletrodo de trabalho de carbono vítreo (5,0 mm de diâmetro), um eletrodo de referência Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub> e um fio de platina como eletrodo auxiliar (Figura 6.2A). Uma micropipeta eletrônica motorizada (EDP1-Plus, Rainin Instruments) foi usada para injetar os padrões e as soluções das amostras (Figura 6.2C). A célula BIA usada para todas as medições

**ARTIGO 1**

amperométricas foi uma célula construída no laboratório, como descrito anteriormente na literatura (Figura 6.2B) (DOS SANTOS et al., 2016). A célula consiste em um cilindro de acrílico (40 mL de volume) com fundo e tampa construídos em Teflon<sup>®</sup> e encaixados firmemente dentro do cilindro. Um orifício foi perfurado no centro da parte inferior, permitindo o posicionamento preciso do eletrodo de trabalho no centro da célula. Dois anéis de vedação do tipo O-ring foram posicionados dentro deste orifício para evitar vazamentos da solução da célula. Três orifícios foram perfurados na tampa, sendo um central para uma instalação precisa da micropipeta sempre na mesma posição. Os outros dois orifícios, nas laterais do orifício central, permitiam a inserção dos eletrodos de referência e auxiliares. A ponta da pipeta foi mantida a uma distância fixa de 2 mm do eletrodo de trabalho, movendo-se o último para a posição desejada (a posição da pipeta foi mantida inalterada) (Figura 6.2). Um orifício lateral foi perfurado no lado da célula para permitir a drenagem do excesso de solução.

**Figura 6.2:** Sistema utilizado para medições eletroquímicas: (A) célula para medições voltamétricas; (B) célula para medições sistema BIA; (C) micropipeta eletrônica motorizada; (D) sistema eletroquímico BIA completo.



Fonte: Autora do trabalho.

### 6.2.3. Análise por HPLC

Os resultados obtidos com o método BIA – MPA foram comparados com aqueles obtidos por HPLC usando um sistema Shimadzu consistindo de um módulo de distribuição de solvente com uma bomba de pistão duplo, um detector UV-VIS ( $\lambda = 280$  nm), e uma coluna AQUA RP C18 (150 mm  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu$ m). Os solventes de eluição foram 0,02% de ácido fórmico em água (eluente A) e 0,02% de ácido fórmico em metanol (eluente B), a uma taxa de 1 mL min<sup>-1</sup>, empregando um gradiente de 0% a 100% de B em 60 min e tempo adicional de 60 min a 70 min com 100% de B para limpeza do sistema. A coluna foi mantida a temperatura ambiente e o volume de injeção da amostra foi de 10  $\mu$ L. Os dados foram coletados e processados usando o software Shimadzu LC Solution v. 1.25.

### 6.2.4. Preparação da amostra

Amostras de chá verde foram compradas em um supermercado local e o chá foi preparado por infusão, extraindo aproximadamente 1 g do chá em 100 mL água deionizada Milli-Q a 80 °C durante cerca de 1 h. A solução foi então filtrada em algodão, para evitar adsorção de espécies bioativas no papel de filtro, e analisada no mesmo dia. Para a injeção no sistema HPLC-UV / Vis, as amostras de extrato foram filtradas em um filtro de nylon (tamanho de poro de 0,22  $\mu$ m).

## 6.3. Resultados e Discussão

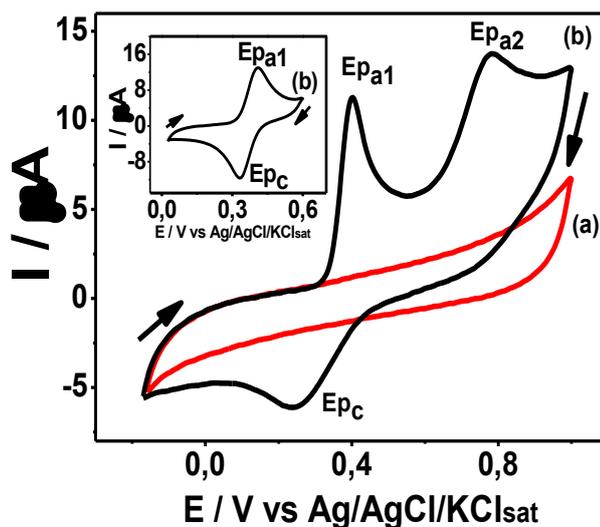
### 6.3.1. Comportamento voltamétrico da catequina sobre o eletrodo de carbono vítreo

O comportamento eletroquímico da catequina é bem conhecido e foi caracterizado em estudos anteriores utilizando diferentes substratos (MASOUM et al., 2014; MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ et al., 2010; YANG et al., 2009; JANEIRO e BREATT, 2004). A Figura 6.3 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo de carbono vítreo em solução tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 4,5, na ausência (a) e na presença de 94,33  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> de catequina (b). O voltamograma cíclico da catequina mostrou dois picos de oxidação associados ao catecol (pico 1) e grupo floroglucinol (pico 2) presentes na molécula (NOVAK et al., 2010; JANEIRO & BRETT, 2004; MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ et al., 2010), sendo um pico reversível ( $E_{pa1} = + 0,400$  V e  $E_{pc} = + 0,240$  V), e um pico de oxidação irreversível ( $E_{pa2} = + 0,779$  V). A corrente de pico  $E_{pa1}$  é muito elevada quando comparado

## ARTIGO 1

com a corrente do pico  $Ep_{a2}$  e que está de acordo com o aumento da atividade de eliminação de radicais correspondente à oxidação da porção catecol (JANEIRO & BREATT, 2004; MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ et al., 2010). A figura inserida mostra a faixa de varredura em potenciais menores evidenciando o perfil redox do composto catequina.

**Figura 6.3:** Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de carbono vítreo em solução tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,5 na ausência (a) e na presença da catequina ( $94,33 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) (b). Velocidade de varredura de  $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$ .

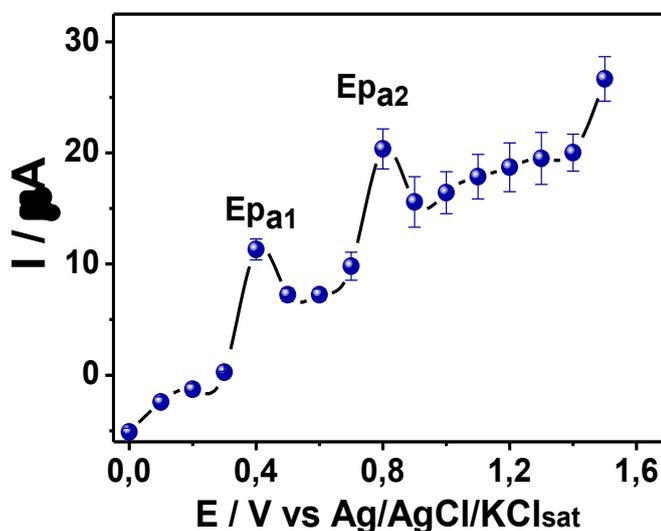


Fonte: Autora do trabalho.

### 6.3.2. Otimização do potencial aplicado

A voltametria hidrodinâmica foi empregada para investigar a faixa de potencial de trabalho para a oxidação eletroquímica da catequina, no sistema BIA com detecção amperométrica. O voltamograma hidrodinâmico foi obtido com aplicação de dezesseis potenciais sobre o eletrodo de trabalho, no intervalo de 0,00 a 1,50 V (em experimentos individuais) e com injeções (em triplicata) de uma solução padrão de  $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de catequina. A Figura 6.4 mostra o voltamograma hidrodinâmico resultante com as correntes médias ( $n=3$ ) obtidas em função dos potenciais aplicados para cada registro amperométrico. É importante notar que, para obtenção dos valores de corrente em cada potencial na Figura 6.3, foi necessário polimento do eletrodo antes de cada análise, uma vez que a catequina causa desativação do eletrodo por processo de adsorção de produtos de oxidação (MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ et al., 2010).

Figura 6.4: Voltamograma hidrodinâmico obtido pelo sistema do BIA com detecção amperométrica para injeções em triplicata de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de catequina. Eletrólito suporte: solução tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,5; volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ , potenciais variáveis ( $0,00 - 1,50 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ ).



Fonte: Autora do trabalho.

A oxidação eletroquímica da catequina sob condições hidrodinâmicas resultara em dois picos anódicos, o primeiro ( $E_{pa1}$ ) em  $+ 0,40 \text{ V}$  e o segundo ( $E_{pa2}$ ) em  $+ 0,80 \text{ V}$ , em boa concordância com os dados obtidos sob condições estacionárias. Com base neste voltamograma hidrodinâmico, e para evitar a interferência de espécies eletroativas que podem estar presentes na amostra matriz, o potencial de  $+ 0,40 \text{ V}$  foi selecionado para medições amperométricas posteriores.

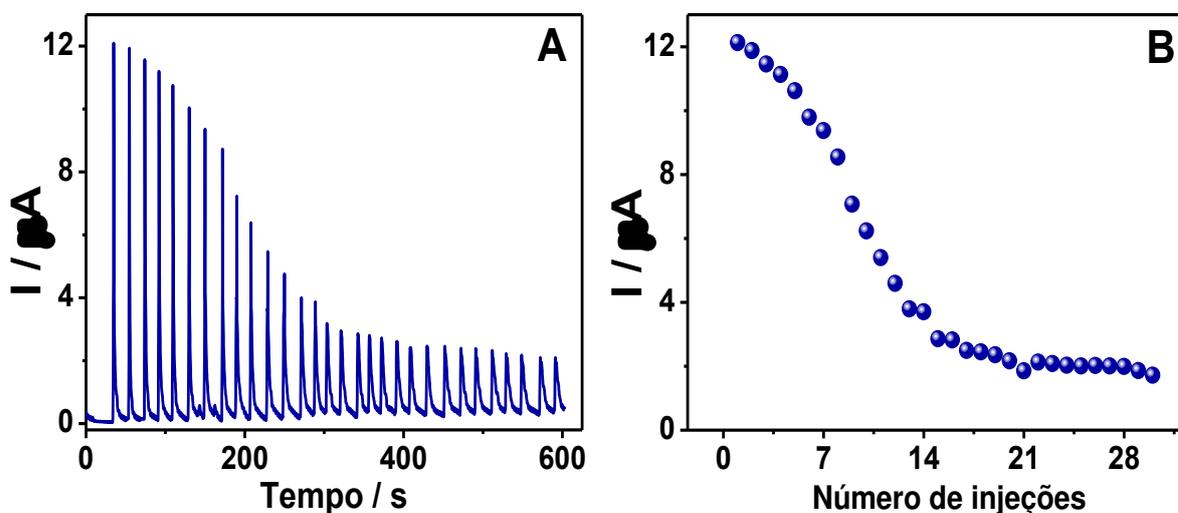
### 6.3.3. Análise por injeção em batelada (BIA) com detecção amperométrica

A oxidação de compostos fenólicos, como a catequina, é acompanhada de um processo de polimerização na superfície do eletrodo de carbono vítreo, devido a formação de radical fenóxilo (JANEIRO & BREATT, 2004). Consequentemente, a (+) - catequina adsorve fortemente na superfície do eletrodo e seus subprodutos da oxidação final adsorvem sobre a superfície do eletrodo, como demonstrado pela diminuição do pico 1 de oxidação da (+) - catequina durante repetidos ciclos. Portanto, um estudo de repetibilidade foi conduzido para avaliar a resposta do método BIA na oxidação da catequina a um potencial constante de  $+ 0,40 \text{ V}$  (Figura 6.5). Este teste foi realizado utilizando uma série de 30 injeções de uma solução de catequina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração. O primeiro sinal registrado foi considerado como 100%. A corrente produzida na primeira injeção da solução de catequina

## ARTIGO 1

foi em torno de  $12,13 \mu\text{A}$ , enquanto na trigésima injeção produziu uma corrente de  $1,72 \mu\text{A}$ , ou seja, uma diminuição de 75% do sinal. A diminuição nos valores de corrente para sucessivas injeções mostrou que a oxidação da catequina produz um grave efeito de desativação da superfície ativa do eletrodo por produtos de oxidação da catequina (Figura 6.5) impossibilitando a detecção amperométrica convencional sobre o eletrodo de carbono vítreo.

**Figura 6.5:** (A) Dados de repetibilidade e (B) respectivos valores de correntes obtidos a partir de sucessivas injeções de catequina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $n=30$ ) usando amperometria. Eletrólito de suporte: solução tampão acetato de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,5); volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ ; taxa de injeção:  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$ ; potencial:  $+0,4 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ .



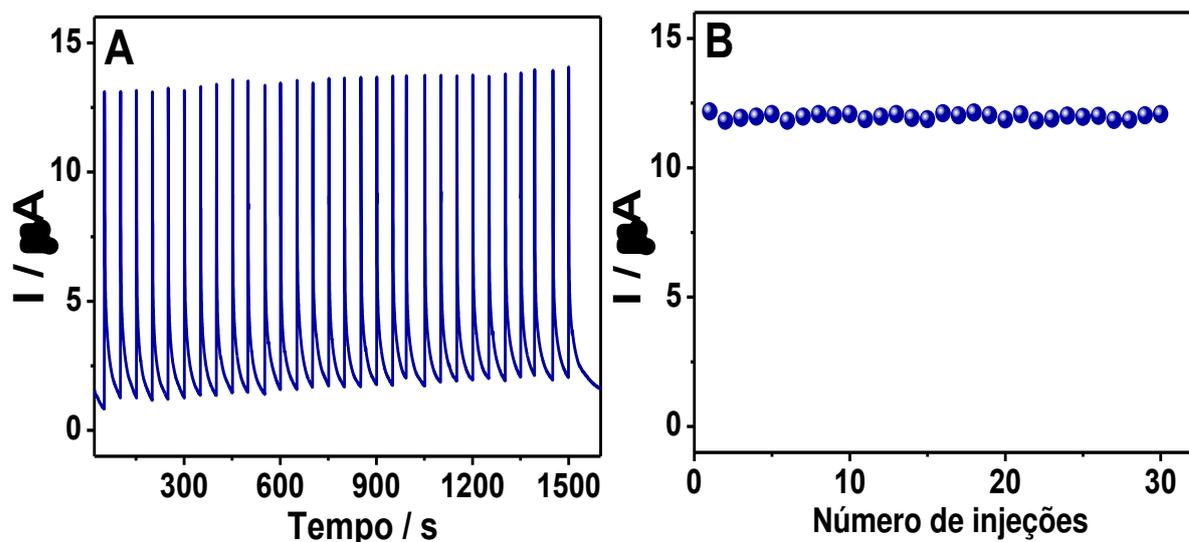
Fonte: Autora do trabalho.

A técnica amperometria de pulsos múltiplos (MPA) foi empregada, a fim de superar a baixa estabilidade do sinal eletroquímico ao longo do tempo. Neste método, uma sequência de pulsos de potenciais foi aplicada sobre o eletrodo de trabalho (LOURENÇÃO et al., 2015; MEDEIROS et al., 2010), envolvendo potenciais para determinação, limpeza e condicionamento. Para isso, experimentos da otimização destes parâmetros foram realizados (Apêndices A.1 e A.2), e a sequência de três pulsos de potencial estabelecida foi:  $+0,40 \text{ V}$  (potencial de determinação),  $+1,40 \text{ V}$  (potencial de limpeza) e  $0,0 \text{ V}$  (potencial de condicionamento) vs  $\text{Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ , usando  $0,1 \text{ s}$  como tempo de pulso aplicado. Para avaliar a precisão do método BIA na determinação da catequina, uma série de 30 injeções de uma solução contendo  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de catequina foi realizada e os resultados (Figura 6.6) mostraram excelente repetibilidade dos picos iniciais, com um valor de corrente aproximadamente constante com DPR de  $0,85\%$  ( $n = 30$ ), permitindo a viabilidade do uso do BIA – MPA com um ECV não modificado para determinação de catequinas, sem adsorver na superfície do ECV pelos produtos de oxidação da catequina. Um procedimento semelhante foi

## ARTIGO 1

relatado na literatura para determinação de nimesulida usando um eletrodo pirolítico de grafite (DA SILVA et al., 2013).

**Figura 6.6:** (A) Dados de repetibilidade e (B) respectivos valores de correntes obtidos a partir de sucessivas injeções de catequina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $n=30$ ) usando amperometria BIA- MPA. Eletrólito de suporte:  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de solução tampão acetato (pH 4,5); injeção volume:  $100 \mu\text{L}$ ; taxa de injeção:  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$ ; potenciais:  $+0,40 \text{ V}$ ,  $+1,40 \text{ V}$  e  $0,00 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl sat}$ .

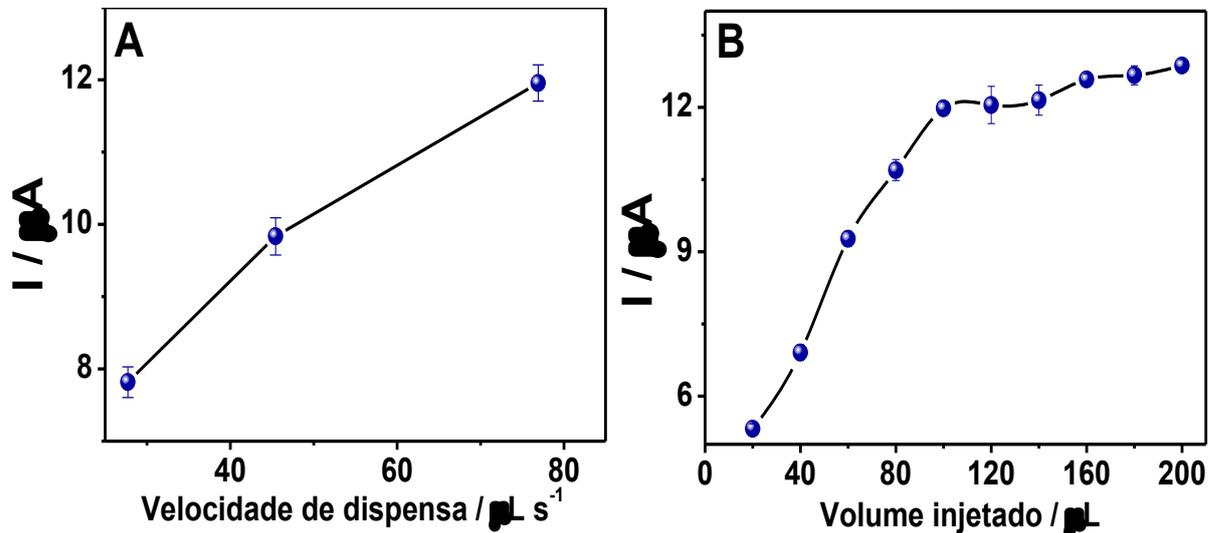


Fonte: Autora do trabalho.

A otimização do método BIA associado a detecção amperométrica para a determinação da catequina foi avaliada considerando a influência da velocidade de injeção da micropipeta programável e o volume injetado. As Figura 6.7A e Figura 6.7B mostram os efeitos da velocidade de dispensa do método BIA proposto ( $27,72 - 76,92 \mu\text{L s}^{-1}$ ) e o volume de injeção ( $20-200 \mu\text{L}$ ), respectivamente. O sinal aumenta progressivamente à medida que a velocidade de injeção da micropipeta vai aumentando, com a melhor resposta amperométrica obtidas em  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$ , este que foi selecionado para os experimentos subsequentes. Para todas as velocidades de dispensa avaliadas, o DPR ficou abaixo de  $0,2\%$ . No caso do volume de injeção, o sinal aumentou substancialmente até  $100 \mu\text{L}$ , enquanto acima deste valor não houve aumento significativo na resposta amperométrica. Devido ao reprodutivo sinal analítico e baixo DPR obtido para o volume de injeção de  $100 \mu\text{L}$  (Figura 6.7B), este volume foi selecionado para as demais medições. Os valores de DPR obtidos para a série de injeções foram  $2,92\%$  e  $0,99\%$  para soluções de catequina  $10$  e  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente (Figura 6.8). Após o início da injeção, apenas  $30 \text{ s}$  foram necessários para que o sinal atingisse o valor máximo e depois diminuir para  $5\%$ , resultando em uma frequência teórica de  $120$  injeções por hora (sem considerar o tempo necessário para encher a pipeta).

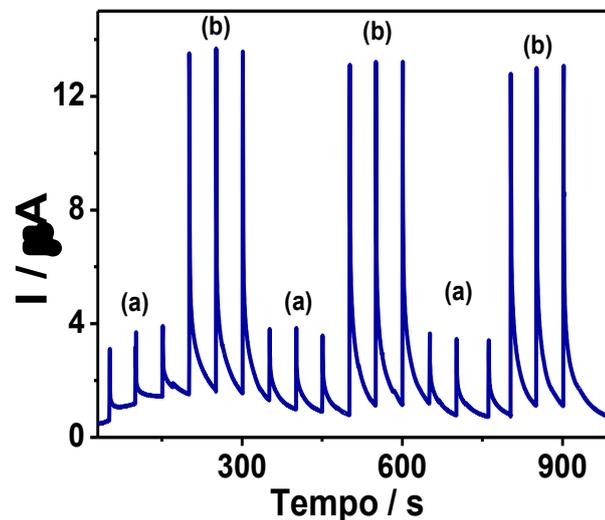
## ARTIGO 1

Figura 6.7: (A) Efeitos da taxa de injeção da micropipeta automática ( $27,72 - 76,92 \mu\text{L s}^{-1}$ ) e (B) volume de injeção ( $20-200 \mu\text{L}$ ) usando o sistema BIA com detecção amperométrica para injeções em triplicadas de catequina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Eletrólito de suporte: solução tampão de acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,5); volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ ; potenciais:  $+ 0,40 \text{ V}$ ,  $+ 1,40 \text{ V}$  e  $0,00 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl sat}$ ,  $+ 1,40 \text{ V}$  e  $0,00 \text{ V vs. Ag/AgCl/KCl sat}$ .



Fonte: Autora do trabalho.

Figura 6.8: Amperogramas obtidos para injeções em triplicatas ( $n = 3$ ) intercalado soluções contendo 10 (a) e 50 (b)  $\mu\text{Mol L}^{-1}$  catequina volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ ; taxa de injeção:  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$ ; potenciais:  $+ 0,40 \text{ V}$ ,  $+ 1,40 \text{ V}$  e  $0,00 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl sat}$ .



Fonte: Autora do trabalho.

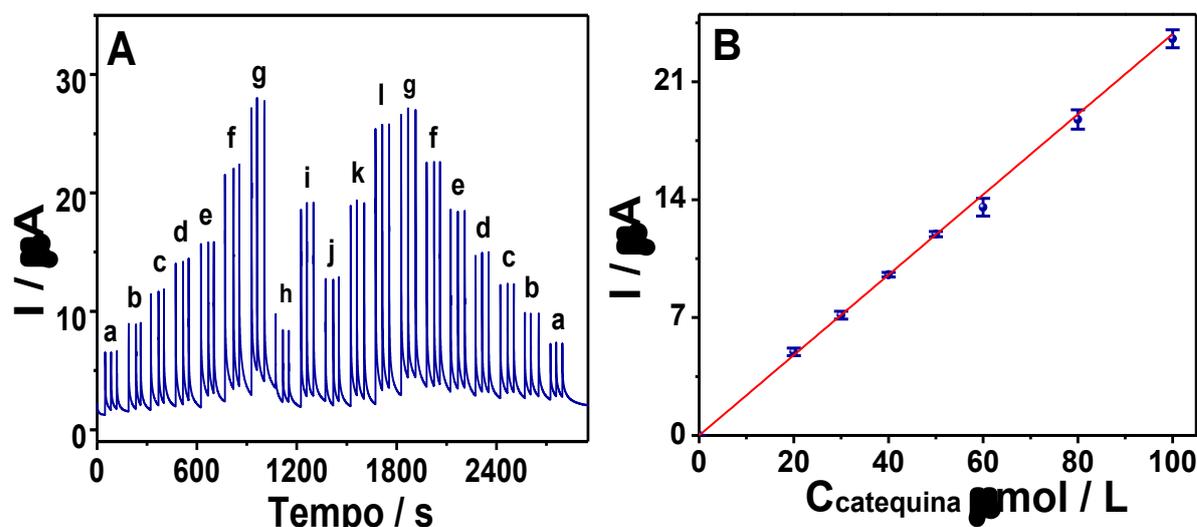
#### 6.3.4. Aplicações analíticas

O desempenho da metodologia proposta usando a técnica de amperometria de múltiplos pulsos foi avaliado com amostras de padrão de catequina e de chá verde. A Figura

## ARTIGO 1

6.9A mostra as respostas obtidas para MPA em um potencial de + 0,40 V, para injeções em triplicatas e usando concentrações de catequina na faixa de 20 a 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . As soluções foram injetadas em concentrações crescentes de catequina, a fim de identificar qualquer efeito de memória, e foram intercaladas com injeções triplicadas de amostras de chá verde em duas concentrações distintas e amostras de chá verde enriquecidas com padrão de catequina. As análises das curvas analíticas obtidas (Figura 6.9B) mostraram uma resposta linear, na faixa de 20 - 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , descrita pela equação:  $I_p (\mu\text{A}) = 0,05979 + 0,24045 \times C_{\text{Catechin}} (\mu\text{mol L}^{-1})$  ( $R = 0,999$ ). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram de 0,03 e 0,10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , baseados nas equações  $3 \times S_b/m$  e  $10 \times S_b/m$ , respectivamente, onde  $S_b$  representa o desvio padrão do sinal em branco e  $m$  a inclinação da curva de calibração ( $n=7$ ). O amplo intervalo linear do método amperométrico, combinado com sua alta sensibilidade, permite a análise de amostras contendo diferentes concentrações de catequina. Na Tabela 6.1 são apresentados os resultados obtidos em diferentes estudos reportados na literatura e comparados com os obtidos neste trabalho, foi demonstrado que o uso de um ECV em associação com o método BIA-MPA apresenta excelente resultado para a quantificação da catequina. Como mostrado na Tabela 6.1, os valores de LD e LQ foram tão bons quanto os obtidos pela maioria dos trabalhos reportados na literatura.

**Figura 6.9:** (A) Amperogramas obtidos a partir de injeções em triplicata de soluções contendo concentrações crescentes de catequina ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) (a = 20; b = 30; c = 40; d = 50; e = 60; f = 80; g = 100), amostras de chá verde (h e i) e amostras de chá verde enriquecidas com catequina (j, k e l). Eletrólito de suporte: 0,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de solução tampão acetato (pH 4,5); volume de injeção: 100  $\mu\text{L}$ ; taxa de injeção: 76,92  $\mu\text{L s}^{-1}$ ; potenciais: + 0,40 V, + 1,40 V e 0,00 V vs Ag/AgCl/KClsat. (B). Respectiva curva de calibração ( $R = 0,999$ ).



Fonte: Autora do trabalho.

## ARTIGO 1

Tabela 6.1: Comparação do desempenho analítico do método proposto com alguns métodos da literatura para determinação de catequinas.

Eletrodo	Eletrólito	Técnica	Sensibilidade $\mu\text{A} / (\mu\text{mol L}^{-1})$	Faixa linear $\mu\text{mol L}^{-1}$	LD $\mu\text{mol L}^{-1}$	LQ $\mu\text{mol L}^{-1}$	Ref.
GCE	Hidroalcoólico (pH 3,6)	DPV	0,025	10 - 600	-	-	CASTAIGNÈDE et al., 2003
SWNTs-CTAB/GCE	PBS (pH 7)	DPV	$2,34 \times 10^3$	$0,372 - 2,38 \times 10^{-3}$	$1,12 \times 10^{-4}$	-	YANG et al., 2009
Complexo de cobre	Tapão fosfato (pH 7,5)	SWV	0,057	4,95 - 32,7	0,28	0,35	FERNANDES et al., 2003
CD/CPE	fosfato/tampão borato (pH 7,4)	SWV	ND	8,61 - 241	4,651	11,885	EL-HADY et al., 2008
PMB/CPE	(pH 7)	DPV	66,8 0,031	0,001 - 0.1 1,0 - 1000	$4,9 \times 10^{-3}$	$14 \times 10^{-3}$	MANASA et al., 2017
N-Gr/GCE	PBS (pH 7)	DPV	0,44 2,11	0 - 10 10 - 30	0,088	-	PANG et al., 2017
f-SWCNTs/PEDOTM/GCE	PBS (pH 7)	CV	4,049	0,039 - 40,84	0,013	-	YAO et al., 2015
$\beta$ -CD/CPE	Tampão Britton-Robinson (pH 2,20)	SWV	0,101	0,344 - 24,8	$4,13 \times 10^{-4}$	$3,79 \times 10^{-3}$	EL-HADY, 2007
	Tampão Britton-Robinson (pH 4,40)	DPV	0,106	$6,901 \times 10^{-3} - 14,469$	$1,03 \times 10^{-3}$	$9,65 \times 10^{-3}$	
Ru(bpy) <sub>3</sub> <sup>3+</sup> /BDD	Solução NaNO <sub>3</sub> (pH 12)	CV	$2,25 \times 10^{-5}$	10 - 800	0,121	-	WU et al., 2005
GCE	Tampão acetato (pH 4,5)	BIA-MPA	0,060	20 - 100	0,03	0,10	<b>Este Trabalho</b>

GCE: eletrodo de carbono vítreo; CPE: eletrodo de pasta de carbono; CV: voltametria cíclica; DPV: voltametria de pulso diferencial; SWNTs - CTAB / GCE: nanotubos de carbono de parede simples - eletrodos de carbono vítreo modificados com brometo de cetil-metil- -etilamônio; PBS: solução salina tamponada com fosfato; SWV: voltametria de onda quadrada; CA: cronoamperometria; DPCV: voltametria catódica de pulso diferencial; CD: ciclodextrina;  $\beta$ -CD:  $\beta$ -ciclodextrina; PMB: poli (azul de metileno); DPV: voltametria de pulso diferencial; N-Gr / GCE: eletrodo de carbono vítreo modificado com grafeno dopado com N (N-Gr); ND: não discriminado.

### 6.3.5. Avaliação de precisão, recuperação e interferências

Avaliações de interferências, recuperação e precisão foram realizadas para demonstrar a robustez do método e validar seu uso. A seletividade do método para a determinação da catequina no chá verde foi investigada considerando possíveis interferências de dois compostos (quercetrina e rutina), que têm estruturas moleculares semelhantes às da catequina. Experimentos (Apêndice A.3) usando uma solução padrão de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de catequina na presença dos interferentes na solução padrão com proporções 1: 1, 1: 5 e 1:10. Os sinais registrados para estas soluções foram comparados com os obtidos para a solução padrão na ausência de quaisquer interferentes. Tanto quercitrina quanto rutina não mostraram interferência significativa até a proporção de concentração de 1: 5. Em proporções de 1:10, somente a interferência da rutina foi observada (assumindo um limite de tolerância correspondendo a um erro relativo de  $\pm 5\%$ ).

A precisão do método foi avaliada por meio de experimentos de adição e recuperação empregando uma amostra de chá verde contendo catequina em três concentrações diferentes. Os valores de recuperação (média de três análises) variaram de 98 a 99% (Tabela 6.2), demonstrando uma boa precisão do método proposto e que não há interferências de matriz. A precisão da técnica também foi confirmada por comparação dos resultados obtidos pelo método BIA-MPA com HPLC. A quantificação da catequina por HPLC foi realizada por padronização das áreas, baseada na equação  $[\text{Amostra}] \text{ g mL}^{-1} = \text{Área padrão} \times [\text{padrão g mL}^{-1}] / \text{área da amostra}$ . Os cromatogramas para a solução padrão de catequina e amostra de chá verde são mostrados na Figura 6.10. As concentrações de catequina encontradas nas amostras de chá verde foram  $7,1 \times 10^{-3}$  e  $7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  pelo método proposto e por HPLC, respectivamente, mostrando que não foram significativamente diferentes (a 95% nível de confiança) e pode-se concluir que o método proposto não sofre qualquer interferência de matriz da amostra de chá verde, confirmando a viabilidade da técnica na determinação de catequina em amostras reais.

**Tabela 6.2: Recuperações de padrões de catequina adicionados em amostras de chá verde.**

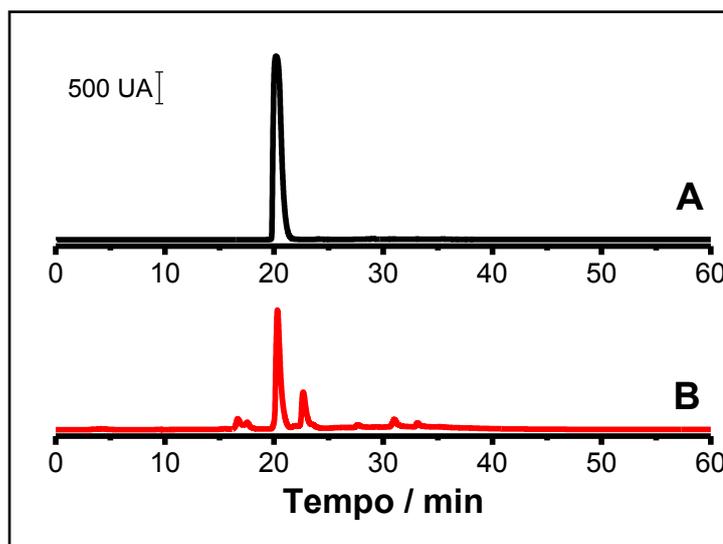
Amostra	Catequina ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )		Recuperado (%)
	Adicionado	Encontrado	
Chá verde	25,0	$24,5 \pm 0,4$	98,0
	50,0	$49,3 \pm 0,6$	98,6
	75,0	$74,3 \pm 0,7$	99,0

n = 3; nível de confiança 95%.

Fonte: Autora do trabalho.

**ARTIGO 1**

Figura 6.10: Cromatograma da solução padrão catequina (A) e amostra de chá verde (B) por detector de UV, 270 nm.



Fonte: Autora do trabalho.

#### 6.4. Conclusão

Este trabalho descreveu, pela primeira vez, a determinação de catequina por BIA com detecção amperométrica de múltiplos pulsos, usando um eletrodo de carbono vítreo não modificado. Problemas de desativação da superfície do eletrodo foram superadas simplesmente com aplicação de uma sequência de pulsos de potenciais, que garantiram limpeza e estabilidade da resposta do eletrodo. O método BIA-MPA mostrou excelente detecção, sensibilidade e seletividade. Outras características favoráveis incluíram a preparação da amostra (requerendo apenas extração em uma placa aquecedora e diluição no eletrólito), alta frequência analítica (120 injeções por horas), baixo custo operacional e baixos limites de detecção e quantificação ( $0,03$  e  $0,10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente). Além disso, o método proposto mostrou-se rápido e sensível para a determinação de catequina em amostras de chá verde com os resultados estatisticamente iguais aos obtidos por HPLC, com um nível de confiança de 95%.

#### 6.5. Referências

AREIAS, M. C. C.; SHIMIZU, K.; COMPTON, R. G. Voltammetric detection of captopril using copper (II) and an unmodified glassy carbon electrode. *Electroanalysis*, v. 28, n. 7, p. 1524-1529, 2016a.

AREIAS, M. C. C.; SHIMIZU, K.; COMPTON, R. G. Voltammetric detection of glutathione:

**ARTIGO 1**

an adsorptive stripping voltammetry approach. **Analyst**, v. 141, n. 10, p. 2904-2910, 2016b.

BALLUS, C. A.; MEINHART, A. D.; DE OLIVEIRA, R. G.; GODOY, H. T. Optimization of capillary zone electrophoresis separation and on-line preconcentration of 16 phenolic compounds from wines produced in South America. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 136-144, 2012.

CASTAIGNÈDE, V.; DURLIAT, H.; COMTAT, M. Amperometric and potentiometric determination of catechin as model of polyphenols in wines. **Analytical Letters**, v. 36, n. 9, p. 1707-1720, 2003.

DOS SANTOS PEREIRA, L. N.; DA SILVA, I. S.; ARAÚJO, T. P., TANAKA, A. A.; ANGNES, L. Fast quantification of  $\alpha$ -lipoic acid in biological samples and dietary supplements using batch injection analysis with amperometric detection. **Talanta**, v. 154, p. 249-254, 2016.

EL-HADY, D. A.; ALBISHRI, H. M. Alkyl imidazolium ionic liquid based sweeping-micellar electrokinetic chromatography for simultaneous determination of seven teacatechins in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 969, p. 224-229, 2014.

EL-HADY, D. A. Selective and sensitive hydroxypropyl-beta-cyclodextrin based sensor for simple monitoring of (+)-catechin in some commercial drinks and biological fluids, **Analytica Chimica Acta**, v. 593, n. 2, p. 178-187, 2007.

EL-HADY, D.; EL-MAALI, N. Selective square wave voltammetric determination of (+)-catechin in commercial tea samples using beta-cyclodextrin modified carbon paste electrode. **Microchimica Acta**, v. 161, n. 1-2, p. 225-231, 2008.

DA SILVA, I. S.; CAPOVILLA, B.; FREITAS, K. H. G.; ANGNES, L. Strategies to avoid electrode fouling for nimesulide detection using unmodified electrodes. **Analytical Methods**, v. 5, n. 14, p. 3546-3551, 2013.

FERNANDES, S. C.; OSORIO, R. E. M.; DOS ANJOS, A.; NEVES, A.; MICKE, G. A.; VIEIRA, I. C. Determination of catechin in green tea using a catechol oxidase biomimetic sensor, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 6, p. 1215-1223, 2008.

JANEIRO, P.; BRETT, A. M. O. Catechin electrochemical oxidation mechanisms. **Analytica Chimica Acta**, v. 518, n. 1-2, p. 109-115, 2004.

LOURENÇÃO, B. C.; MEDEIROS, R. A.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous determination of antihypertensive drugs by flow injection analysis using multiple pulse amperometric detection with a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 754, p. 154-159, 2015.

MANASA, G.; MASCARENHAS, R. J.; SATPATI, A. K.; D'SOUZA, O. J.; DHASON, A. Facile preparation of poly (methylene blue) modified carbon paste electrode for the detection and quantification of catechin. **Materials Science and Engineering: C**, v. 73, p. 552-561, 2017.

MASOUM, S.; BEHPOUR, M.; AZIMI, F.; MOTAGHEDIFARD, M. H. Potentiality of chemometric approaches for the determination of (+)-catechin in green tea leaves at the

**ARTIGO 1**

surface of multiwalled carbon nanotube paste electrode. **Sensors and Actuators B**, v. 193, p. 582–591, 2014.

MAKRIS, D. P.; BOSKOU, G.; ANDRIKOPOULOS, N. K. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n.2, p. 125-132, 2007.

MEDEIROS, R. A.; LOURENÇO, B. C.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Simple flow injection analysis system for simultaneous determination of phenolic antioxidants with multiple pulse amperometric detection at a boron-doped diamond electrode. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 20, p. 8658-8663, 2010.

MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ, M.; ŠERUGA, M.; JAKOBEK, L.; NOVAK, I. Electrochemical and Antioxidant Properties of (+)-Catechin, Quercetin and Rutin. **Croatica Chemica Acta**, v. 83, n. 2, p. 197–207, 2010.

MENDOZA-WILSON, A. M.; GLOSSMAN-MITNIK, D. Theoretical study of the molecular properties and chemical reactivity of (+)-catechin and (–)-epicatechin related to their antioxidant ability. **Journal of Molecular Structure**, v. 761, n. 1-3, p. 97-106, 2006.

MIYANO, D. M.; LIMA, T.; SIMÕES, F. R.; LA-SCALEA, M. A.; OLIVEIRA, H. P.; CODOGNOTO, L. Electrochemical study of simple coumarin and its determination in aqueous infusion of *Mikania glomerata*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 3, p. 602-609, 2014.

MÜLLER, L. S.; DA SILVEIRA, G. D.; DAL PRÁ, V.; LAMEIRA, O.; VIANA, C.; MACHADO DE CARVALHO, L. Investigation of phenolic antioxidants as chemical markers in extracts of *Connarus perrottetii* var., *Angustifolius Radlk* by capillary zone electrophoresis. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 39, n. 1, p. 13-20, 2016.

NOVAK, I.; ŠERUGA, M.; KOMORSKY-LOVRIC, Š. Characterisation of catechins in green and black teas using square-wave voltammetry and RP-HPLC-ECD. **Food Chemistry**, v.122, n. 4, p.1283–1289, 2010.

OLIVEIRA, G. K. F.; TORMIN, T. F.; MONTES, R. H. de O.; RICHTER, E. M.; MUÇOZ, R. A. A. Electrochemical Oxidation of astaxanthin on glassy carbon electrode and its amperometric determination using batch injection analysis (BIA). **Electroanalysis**, v. 28, n. 9, p. 2143 – 2148, 2016.

PANG, J.; WU, X.; LI, A.; LIU, X.; LI, M. Detection of catechin in Chinese green teas at N-doped carbon-modified electrode. **Ionics**, v. 23, n. 7, p. 1889-1895, 2017.

PERES, R. G.; TONIN, F. G.; TAVARES, M. F.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Determination of catechins in green tea infusions by reduced flow micellar electrokinetic chromatography. **Food chemistry**, v. 127, n. 2, p. 651-655, 2011.

PEREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, n. 7, p. 791-800, 2006.

**ARTIGO 1**

PIOVEZAN, M.; GARCÍA-SECO, D.; MICKE, G. A.; GUTIÉRREZ-MAÑERO, J.; RAMOS-SOLANO, B. Method development for determination of (+)-catechin and (-)-epicatechin by micellar electrokinetic chromatography: Annual characterization of field grown blackberries. **Electrophoresis**, v. 34, n. 15, p. 2251-2258, 2013.

PIRES, F. B.; DOLWITSCH, C. B.; DAL PRÁ, V.; FACCIN, H.; MONEGO, D. L.; DE CARVALHO, L. M.; VIANA, C.; LAMEIRA, O.; LIMA, F. O.; BRESSAN, L.; DA ROSA, M. B. Qualitative and quantitative analysis of the phenolic content of *Connarus var. angustifolius*, *Cecropia obtusa*, *Cecropia palmata* and *Mansoa alliacea* based on HPLC-DAD and UHPLC-ESI-MS/MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 426-433, 2017.

SANTOS, A. M.; SILVA, T. A.; VICENTINI, F. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Flow injection analysis system with electrochemical detection for the simultaneous determination of nanomolar levels of acetaminophen and codeine. **Arabian Journal of Chemistry**, DOI 10.1016/j.arabjc.2017.04.012(In Press), 2017.

SILVA, A. A.; SILVA, L. A. J.; MUNOZ, R. A. A.; OLIVEIRA, A. C.; RICHTER, E. M. Determination of amlodipine and atenolol by batch injection analysis with amperometric detection on boron-doped diamond electrode. **Electroanalysis**, v. 28, n. 7, p. 1455 – 1461, 2016.

SVOBODA, P.; VLCKOVÁ, H.; NOVÁKOVÁ, L. Development and validation of UHPLC-MS/MS method for determination of eight naturally occurring catechin derivatives in various tea samples and the role of matrix effects. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 114, p. 62–70, 2015.

VESTERGAARD, M.; KERMAN, K.; TAMIYA, E. An electrochemical approach for detecting copper-chelating properties of flavonoids using disposable pencil graphite electrodes: possible implications in copper-mediated illnesses. **Analytica Chimica Acta**, v. 538, n. 1-2, p. 273-281, 2005.

WANG, K.; CHEN, Q.; LIN, Y.; Yu, S.; LIN, H.; HUANG, J.; LIU, Z. Separation of catechins and O-methylated (-)-epigallocatechin gallate using polyamide thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 1017–1018, p. 221–225, 2017.

WU, J.; WANG, H.; FU, L.; CHEN, Z.; JIANG, J.; SHEN, G.; YU, R. Detection of catechin based on its electrochemical autoxidation. **Talanta**, v. 65, n. 2, p. 511-517, 2005.

YANG, L. J.; TANG, C.; XIONG, H. Y.; ZHANG, X. H.; WANG, S. F. Electrochemical properties of catechin at a single-walled carbon nanotubes cetyltrimethylammonium bromide modified electrode, **Ionics**, v. 75, p. 158–162, 2009.

YAO, Y.; ZHANG, L.; WEN, Y.; WANG, Z.; ZHANG, H.; HU, D. F.; XU, J. K.; DUAN, X. M. Voltammetric determination of catechin using single-walled carbon nanotubes/poly(hydroxymethylated-3, 4-ethylenedioxythiophene) composite modified electrode. **Ionics**, v. 2, n. 10, p. 2927-2936, 2015.

---

---

## *Capítulo 7*



*Determinação de catequina em extratos de plantas bioativas usando eletrodos de carbono impressos em um sistema de análise por injeção em batelada (BIA)*

---

---

## 7. DETERMINAÇÃO DE CATEQUINA EM EXTRATOS DE PLANTAS BIOATIVAS USANDO ELETRODOS DE CARBONO IMPRESSOS EM UM SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA (BIA) \*

### Resumo

Este trabalho apresenta um estudo analítico para determinação de catequina, extraída das plantas brasileiras *Rhizophora mangle*, *Arrabidaea brachypoda* e *Lippia origanoides* vs., usando eletrodos de carbono impressos (ECI) acoplados a um sistema de análise por injeção em batelada (BIA). Experimentos preliminares de voltametria cíclica em solução tampão acetato (pH 4,5) contendo catequina revelaram processos redox reversíveis, com potenciais de pico anódico e catódico localizados em  $\sim 0,16$  V e  $\sim 0,10$  V vs. Ag / AgCl, respectivamente, e um pico irreversível em  $\sim 0,49$  V. Em condições otimizadas, a repetibilidade para determinação amperométrica da catequina, realizada a + 0,30 V com o ECI no sistema BIA, usando injeções sucessivas de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de catequina, foi RSD = 1,03% (n = 30). A amostragem (R = 0,999), com limites de detecção e quantificação de 0,021 e  $0,070 \mu\text{mol L}^{-1}$ . A taxa de amostragem de 120 injeções por hora. A resposta amperométrica mostrou um intervalo linear de 1 a  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. A aplicação da metodologia proposta para a determinação de catequina em extratos de plantas medicinais forneceu resultados quantitativos semelhantes aos obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com nível de confiança de  $\sim 95\%$ .

### 7.1 Introdução

As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, das quais derivam diversos medicamentos comercializados em todo o mundo. O estudo químico e farmacológico de plantas medicinais permitiu a produção de vários compostos com propriedades valiosas, como os fenóis e polifenóis. Em baixas concentrações, em relação à de um substrato oxidável, essas substâncias podem retardar ou impedir a oxidação deste substrato, além de prevenir o câncer e vários outros tipos de doenças (NEWMAN & CRAGG, 2012).

A determinação do conteúdo fenólico total das matrizes vegetais é uma tarefa complexa, devido a uma série de fatores, incluindo a grande variedade de compostos

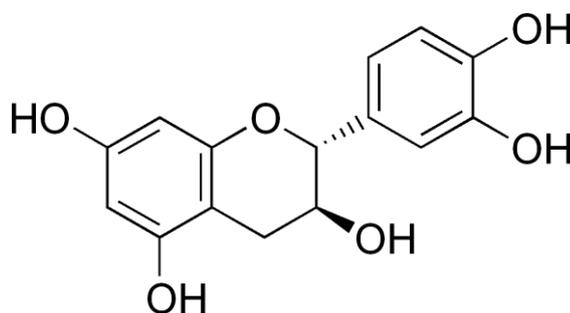
\*Publicado no periódico *Microchemical Journal*, 2019, 146, 1249-1254.

**ARTIGO 2**

fenólicos, a complexidade química da matriz, a presença de interferentes, e a dificuldade de extrair os compostos da matriz. Como ainda não é possível determinar a concentração exata de compostos fenólicos, uma estimativa da concentração total é utilizada, conhecida como índice de polifenóis totais.

Entre os vários compostos fenólicos, a catequina (Figura 7.1) é notável por sua presença em muitos produtos alimentícios, incluindo plantas, frutas (maçãs, mirtilos, groselhas, sementes de uva, kiwi e morangos), chá verde e preto, vinho tinto, cerveja, licor de cacau, entre outros (AHMAD et al., 2019; EL-HADY & EL-MAALI, 2008; CLEMENT, 2009). Estudos de catequina realizados *in vitro* (AHMAD et al., 2019; BARANOWSKA et al., 2018; LIU et al., 2018) e *in vivo* (LIU et al., 2018; YUAN et al., 2018) demonstraram seus efeitos benéficos, incluindo a proteção contra doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) e atividade antioxidante, anticarcinogênica, anti-inflamatória, antiaterogênica e hipoglicêmica, além de atividades antibacterianas e antivirais. Essas propriedades são empregadas na prevenção e tratamento de várias doenças (AHMAD et al., 2019; CLEMENT, 2009; BARANOWSKA et al., 2018; LIU et al., 2018; YUAN et al., 2018; GRZESIK et al., 2018).

**Figura 7.1: Estrutura química da catequina.**



Fonte: Autora do trabalho.

O conteúdo de catequina de amostras bioativas é geralmente determinado usando métodos como espectrofotometria (ROGGIA et al., 2016; AHMADI et al., 2018; SUN, et al., 2014), cromatografia (FERREIRA-NUNES et al., 2018; MOREIRA et al., 2018; FERNANDO & SOYSA, 2016) e eletroforese capilar (MÜLLER et al., 2016; PIOVEZAN et al., 2013; ARCARI et al., 2013). Essas técnicas fornecem boa sensibilidade, mas exigem instrumentos sofisticados e caros, procedimentos demorados de preparação e análise de amostras, e reagentes de alta pureza. Além disso, eles podem gerar grandes volumes de resíduos que são frequentemente tóxicos. Portanto, o desenvolvimento de métodos alternativos para monitorar a catequina é de considerável importância nas indústrias farmacêutica e alimentícia, onde é necessário estabelecer a autenticidade dos materiais

## ARTIGO 2

---

vegetais, a fim de evitar quaisquer riscos associados ao uso de fitoterápicos, como por exemplo, as concentrações de catequina podem estar abaixo dos níveis considerados ativos, ou níveis suficientemente altos para serem considerados tóxicos.

No Brasil, muitas espécies de plantas ricas em catequinas foram investigadas, com resultados biológicos promissores. Entre essas espécies podem ser destacadas *Rhizophora mangle*, *Arrabidaea brachypoda* e *Lippia organoides*.

*Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae) é uma das espécies mais proeminentes nos ecossistemas manguezais brasileiros. Na medicina tradicional da América Latina, a *R. mangle* é utilizada no tratamento da angina, asma, dor, diarreia, úlceras, inflamação, tumores, convulsões e diabetes (KANDIL et al., 2004; NEBULA et al., 2013). Compostos polifenólicos como proantocianidinas (PAs), consistem em emoligômeros e polímeros com unidades de flavan-3-ol (catequina), são os compostos abundantes no gênero *Rhizophora* (HE et al., 2008).

*Arrabidaea brachypoda*, uma planta nativa brasileira conhecida localmente como “Cervejinha do campo”, é popularmente usada para tratar cálculos renais e artrite e tem apresentado atividade anti-inflamatória significativa em trabalhos experimentais (DA ROCHA et al., 2014; DA ROCHA et al., 2011). Nós recentemente demonstramos a atividade *in vitro* e *in vivo* de anti-Trypanosoma cruzi do extrato aquoso de etanol das raízes de *Arrabidaea brachypoda* e sua fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (DA ROCHA et al., 2011). Estudos fitoquímicos indicaram que o gênero *Arrabidaea* é uma fonte de glicosilxantonas, fenilpropanóides, flavonóides, antocianidinas, alantoínas, flavonóides diméricos e triterpenos (GONZÁLEZ et al., 2000; MARTIN et al., 2008; DA ROCHA et al., 2017).

A espécie *Lippia organoide* é indicada para uso contra doenças respiratórias como gripe, bronquite, tosse e asma; como um carminativo no tratamento de distúrbios gastrointestinais, incluindo o estômago dor, náusea e indigestão; e como anti-séptico para a boca, garganta e feridas. Esta espécie também é usada na culinária como tempero, bem como para aguçar o apetite. As agliconas flavonóides são os principais fitoquímicos encontrados em *L. organoides*, incluindo os flavanones naringenin (nas formas ceto e enol), eriodictiol e hesperetina, oisoflavonas dihidroglicita e 3'-hidroxi-irilonona e catequina (STASHENKO et al., 2010).

Essas três espécies de plantas citadas anteriormente são usadas na medicina tradicional brasileira, compondo-se catequina e seus derivados. Todos os estudos realizados com estas espécies para identificar este polifenol foram fundamentados em cromatografia acoplada à detecção ultravioleta e espectrometria de massa, entre outras técnicas de

caracterização e quantificação. Este manuscrito descreve a primeira aplicação analítica de eletrodos impressos em um sistema de análise por injeção em batelada (BIA) para determinação de catequina em extratos dessas três plantas medicinais. O sistema BIA com detecção eletroquímica é simples e portátil, composto por uma célula eletroquímica contendo os eletrodos conectados a um potenciostato e interligado a um notebook (ou computador). O sistema fornece informações qualitativas e quantitativas, com a eliminação do estágio de preparação da amostra, a diluição é realizada no próprio eletrólito. A determinação é realizada com uma única etapa de injeção, resultando em resultados rápidos de baixo custo. A metodologia apresenta alta seletividade e sensibilidade, alto rendimento de amostragem, consumo mínimo de reagentes e amostras, e pequenos volumes de resíduos (DOS SANTOS PEREIRA et al., 2016; RIBEIRO, et al., 2018; CAETANO et al., 2018; ROCHA et al., 2018; STEFANO et al., 2017; CORREA et al., 2018). Em resumo, este trabalho apresenta um método simples, rápido, seletivo e sensível para a determinação da catequina que é uma substância bioativa presente em matrizes complexas de extratos vegetais. A grande vantagem da metodologia é a utilização de eletrodos impressos comerciais de custo relativamente baixos, não modificados, acoplados a um sistema de análise por injeção em batelada. Detecção amperométrica permite a determinação de catequina com alta seletividade, sem adsorção de produtos de oxidação na superfície do eletrodo (que pode ser reutilizado para várias análises). Estudos anteriores relataram que os polifenóis podem polimerizar e adsorver na superfície dos eletrodos, diminuindo assim a área ativa do eletrodo (RIBEIRO, et al., 2018; CAETANO et al., 2018; ROCHA et al., 2018; STEFANO et al., 2017; CORREA et al., 2018; MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ et al., 2010). O método foi validado em termos de linearidade, repetibilidade, reprodutibilidade, limite de detecção, e limite de quantificação, e a precisão foi confirmada pelo método de adição e recuperação. A metodologia proposta foi aplicada para a determinação de catequina em três grupos de extratos hidroetanólicos obtidos das folhas das espécies *Rhizophora mangle*, *Arrabidaea brachypoda* e *Lippia origanoides*, e foi comparado com análises realizadas por cromatografia líquida de alta performance.

## 7.2 Experimental

### 7.2.1 Reagentes e Soluções

As soluções aquosas foram preparadas usando água de um sistema de purificação Milli-Q Direct 8. O cloreto de potássio foi adquirido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Os

## ARTIGO 2

---

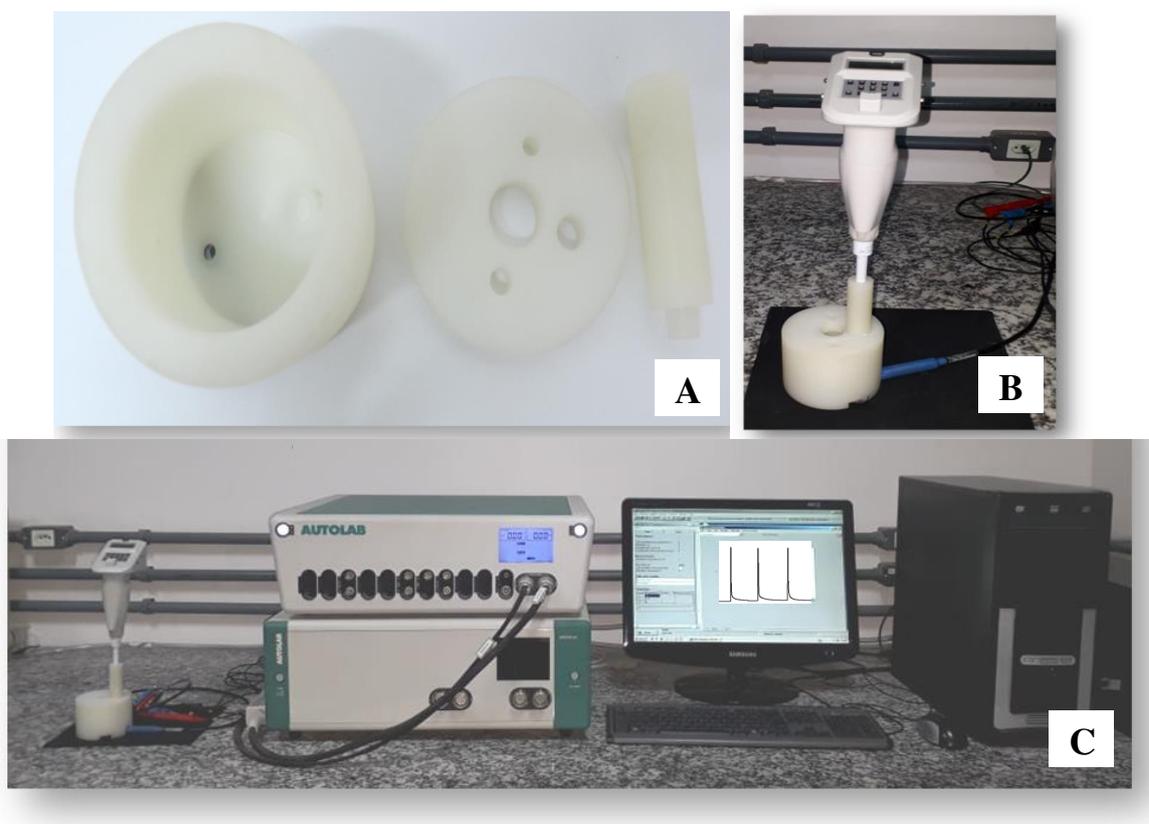
reagentes acetato de sódio anidro, ácido acético e metanol foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). O padrão de Catequina ((+) - catequina, pureza  $\geq 98\%$ ) foi obtida da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Com base em trabalhos anteriores (RIBEIRO, et al., 2018; CAETANO et al., 2018; ROCHA et al., 2018; STEFANO et al., 2017; CORREA et al., 2018; MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ et al., 2010), todas as experiências foram realizadas utilizando tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,5) como eletrólito de suporte, a menos que especificado de outra forma. Soluções estoque de catequina foram preparadas semanalmente em metanol e mantidas em geladeira, onde a solução se mostrou estável por pelo menos 1 mês (RIBEIRO, et al., 2018; CAETANO et al., 2018; ROCHA et al., 2018; STEFANO et al., 2017; CORREA et al., 2018; MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ et al., 2010). Soluções de trabalho foram preparadas por diluição até a concentração desejada com o eletrólito de suporte.

### 7.2.2 Instrumentação e equipamentos

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando um potenciostato Autolab PGSTAT-302 N (Eco Chemie B.V., Utrecht, Holanda). Experimentos voltamétricos e amperométricos empregaram Eletrodos de carbono impresso da DropSens® (ref. C110) (ECI) (Figura 7.2C). Os três eletrodos encontravam-se no mesmo substrato de cerâmica (dimensões  $3,4 \times 1,0 \times 0,05 \text{ cm}$ ), com um disco de carbono de aproximadamente  $0,4 \text{ cm}$  diâmetro depositado no centro como o eletrodo de trabalho (ET), junto com um eletrodo auxiliar de carbono (EA) e um eletrodo pseudo-referência de prata (ERP). Uma micropipeta automática (Modelo LTS 200, Mettler Toledo, São Paulo, Brasil) (Figura 7.2B) foi usada para injetar a catequina no sistema eletroquímico. A célula BIA empregada nas medições eletroquímicas, foi construída especificamente para uso com ECI, como descrito anteriormente (STEFANO et al., 2017; CORREA et al., 2018; MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ et al., 2010; TORMIN et al., 2014). A célula consiste em um cilindro de  $100 \text{ mL}$  de Teflon® (diâmetro interno =  $8 \text{ cm}$  e comprimento =  $6 \text{ cm}$ ), com uma tampa de Teflon® bem presa ao topo. Uma abertura central ( $\sim 0,5 \text{ cm}$  de diâmetro) na tampa permitiu a inserção da ponta da micropipeta, que foi mantida sempre na mesma posição, a uma distância fixa de  $\sim 0,2 \text{ cm}$  do eletrodo de trabalho. O ECI foi posicionado no lado inferior da célula (ao lado da parede), em frente a micropipeta, e um o-ring foi colocado na superfície do ECI para delimitar a região dos três eletrodos e evitar o vazamento da solução (Figura 7.2A).

## ARTIGO 2

Figura 7.2: Sistema utilizado para medições eletroquímicas: (A) partes da célula BIA; (B) célula BIA para ECI com micropipeta automatizada motorizada; (C) sistema eletroquímico BIA completo.



Fonte: Autora do trabalho.

Os resultados obtidos com o método BIA foram comparados com aqueles obtidos por HPLC usando um sistema Shimadzu consistindo em um módulo de propulsão de solvente com uma bomba de duplo pistão, um detector UV-Vis ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ) e uma coluna AQUA RP C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 mm). Os solventes de eluição foram água com 0,02% de ácido fórmico (eluente A) e metanol com 0,02% de ácido fórmico (eluente B), bombeados a uma taxa de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , empregando um gradiente de 0% até 100% B em 50 min e tempo adicional para limpeza do sistema de 50 min a 60 min com 100% B. A coluna foi mantida à temperatura ambiente e o volume de injeção da amostra foi de  $10 \mu\text{L}$ . A coleta e o processamento de dados foram realizados utilizando o software LC Solution v. 1.25 (Shimadzu).

### 7.2.3 Preparação de amostra

As plantas *Lippia origanoides* (LO), *Rhizophora mangle* (RM) e *Arrabidaea brachypoda* (AB-MG) foram coletados no município de João Pinheiro-MG ( $17^{\circ}44'45''\text{S}$  e

## ARTIGO 2

---

46°10'43"W). Todos os extratos foram obtidos das folhas das plantas (1000 g), que foram secas a 50° C em estufa (Quimis, Q317M) por 72 h, seguido de moagem em um moinho de facas (MARCONI, modelo MA 580). O pó obtido foi extraído por percolação exaustiva com água-etanol 70% à temperatura ambiente. Após a extração, o líquido foi evaporado em rota vapor Fisatom 802, sob pressão reduzida, a uma temperatura inferior a 40° C. O extrato foi transferido para frascos de vidro e foi então liofilizado (K105 Líotop) para remoção do solvente (DA ROCHA et al., 2017). Antes da injeção de cada extrato no sistema HPLC-UV / Vis, as amostras foram diluídas em metanol / água (80/20) e filtrada através de um filtro de nylon com 0,22 µm.

### 7.3 Resultados e discussões

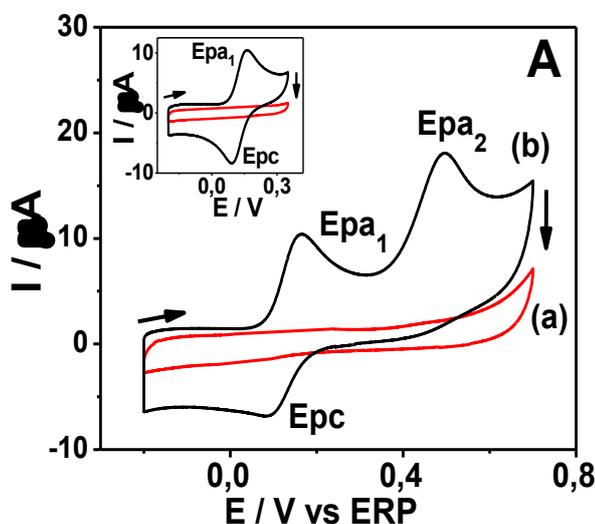
#### 7.3.1 Voltametria cíclica

O comportamento eletroquímico da catequina, em estado estacionário foi avaliado aplicando a voltametria cíclica usando o ECI em tampão acetato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 4,5. Os resultados são apresentados na Figura 7.3, e o voltamograma cíclico integral mostra dois processos associados aos centros de oxidação presentes na molécula de catequina que ocorre nos potenciais de pico (Ep) de  $E_{pa1} = 0,16$  V e  $E_{pa2} = 0,49$  V. Obtendo-se, a primeira onda anódica reversível, com um potencial de pico de redução de  $E_{pc} = 0,10$  V, como mostrado na Figura 7.3, que mostra o perfil voltamétrico obtido, sendo este semelhante ao relatado anteriormente sobre a superfícies do ECV (RIBEIRO et al., 2018). O gráfico inserido, mostraram os resultados alcançados em regiões de potenciais menores entre - 0,20 V e 0,40 V.

O mecanismo de oxidação eletroquímica da catequina sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo, usando diferentes técnicas eletroquímicas, investigado por Janeiro e Brett (2004), foi constatado que o mecanismo de oxidação da catequina é dependente do pH e ocorre de acordo com estágios bem definidos envolvendo o grupo catecol. A reação de oxidação do catecol (3,4-di-hidroxila) ocorre em potenciais positivos muito baixos e é caracterizada por um processo reversível (ver inserção da Figura 7.3). Portanto, um processo de oxidação envolvendo dois prótons e dois elétrons nos primeiros potenciais de pico para a formação de orto-quinona (MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ et al., 2010; JANEIRO & BRETT, 2004).

## ARTIGO 2

Figura 7.3: Voltamogramas cíclicos obtidos com o ECI em tampão acetato de sódio a  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,5) na ausência (a) e presença (b) de  $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de catequina ( $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$ ). A inserção B mostra o comportamento reversível da catequina no ECI em uma janela de potencial mais estreita.



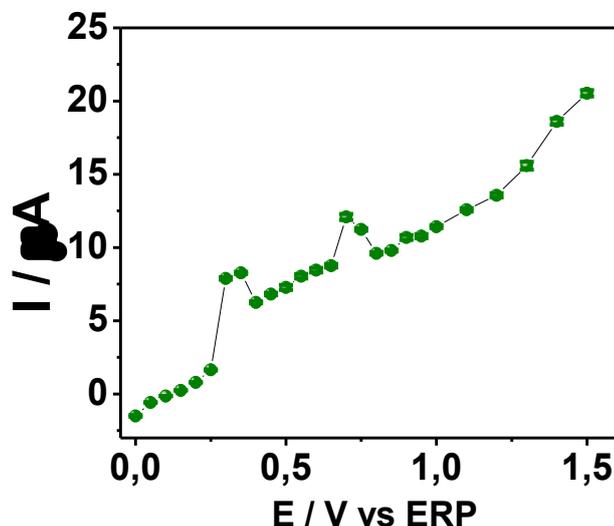
Fonte: Autora do trabalho.

### 7.3.2 Voltametria Hidrodinâmica

A resposta eletroquímica da catequina também foi investigada sob condições hidrodinâmicas com detecção amperométrica. Um conjunto de experimentos foi conduzido com uma solução padrão de  $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  injetada (em triplicata) na célula BIA preenchida com  $0,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de solução tampão de acetato de sódio (pH 4,5). Este estudo foi realizado aplicando-se vinte e seis potenciais diferentes, variando de  $0,00 \text{ V}$  a  $+1,50 \text{ V vs ERP}$  sobre o ECI em função do tempo. Cada potencial foi avaliado como um experimento individual e o eletrodo impresso foi trocado para garantir a precisão dos resultados, uma vez que os produtos de oxidação da catequina poderiam se adsorver na superfície do eletrodo, causando sérios problemas de adsorção na superfície do eletrodo (RIBEIRO et al., 2018). A corrente em cada potencial foi monitorada continuamente através de injeções em triplicatas de  $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  catequina (Figura 7.4) utilizando uma micropipeta automática. Como apresentado nos experimentos de voltametria cíclica, dois picos de oxidação também foram observados no voltamograma hidrodinâmico. Vale ressaltar que o comportamento observado esteve de acordo com o obtido na voltametria cíclica com o uso do mesmo eletrólito suporte utilizando o ECI (Figura 7.3). Com base nestes resultados, o potencial de  $+0,30 \text{ V}$  foi selecionado para os demais estudos no sistema BIA, a fim de aplicar um menor potencial obtido e evitar a oxidação de outros possíveis compostos fenólicos presentes nas matrizes complexas.

## ARTIGO 2

Figura 7.4: Voltamograma hidrodinâmico obtido pela plotagem dos valores médios das correntes de pico para injeções em triplicata ( $n = 3$ ) de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de catequina, em função do potencial aplicado no sistema BIA. Solução tampão de suporte de eletrólito:  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de acetato de sódio (pH 4,5); volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ ; faixa de potencial:  $0,0$ – $1,5 \text{ V}$ .



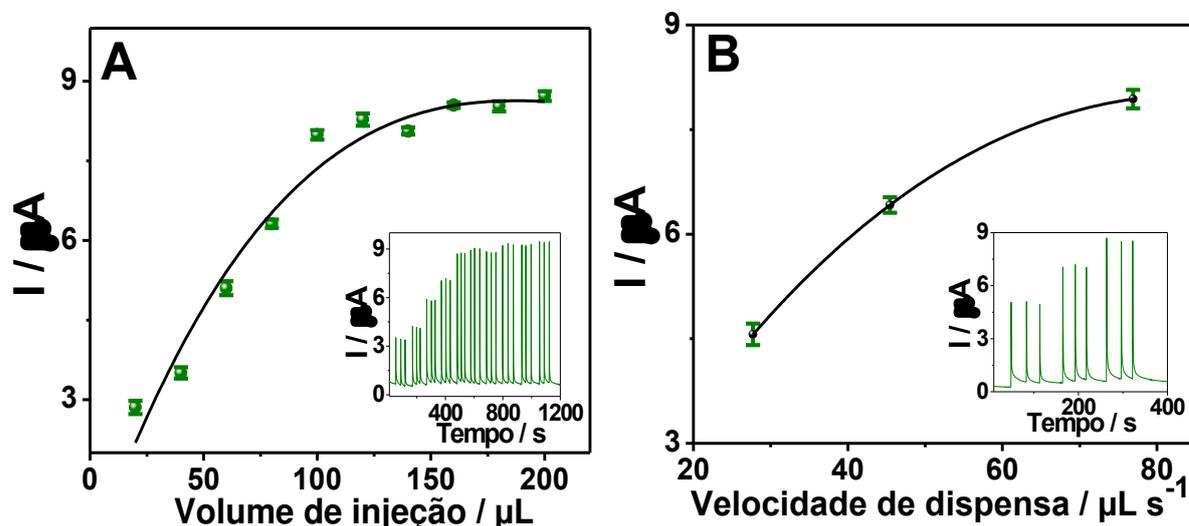
Fonte: Autora do trabalho.

### 7.3.3 Método BIA com detecção amperométrica

A fim de otimizar os parâmetros do método BIA com detecção amperométrica convencional para a determinação da catequina, investigou-se os efeitos do volume da amostra e da velocidade de dispensa, com o objetivo de melhorar a resposta em termos de sensibilidade e taxa de amostragem. Os efeitos dos volumes de injeção foram investigados na faixa de  $20$  a  $200 \mu\text{L}$  e a velocidade de dispensa dispôs de um conjunto de três velocidades distintas ( $27,72$ ,  $45,45$  e  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$ ), ambos estudos são mostrados na Figura 7.5. Para o estudo do volume de injeção, a corrente de oxidação aumentou para volumes de até  $100 \mu\text{L}$  (experimentos realizados a  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de catequina). A injeção de  $100 \mu\text{L}$  resultou em um alto sinal analítico para catequina, com baixo desvio padrão relativo ( $\text{RSD} = 0,71\%$ ,  $n = 3$ ) (Figura 7.5A). Portanto, este volume foi selecionado para os demais experimentos. Na faixa de velocidades de dispensa empregadas, as correntes de oxidação da catequina aumentaram à medida que a taxa de velocidade aumentou, o que era o esperado, com base na teoria de configuração “*wall-jet*” que consiste em uma forma de injeção da amostra perpendicularmente sobre a superfície do eletrodo (BRETT et al., 1995). A corrente de pico mais alta e a menor DPR ( $0,66\%$ ) foram obtidas usando uma velocidade de injeção de  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$  (Figura 7.5B), que foi, portanto, selecionada como a melhor taxa de velocidade de dispensa.

## ARTIGO 2

Figura 7.5: Otimização dos parâmetros BIA: parâmetros amperométricos e dados de pico de corrente para (A) diferentes volumes de injeção (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 e 200  $\mu\text{L}$ ) e (B) diferentes taxas de velocidade de dispensa da micropipeta programável (27,72, 45,45 e 76,92  $\mu\text{L s}^{-1}$ ). Eletrólito suporte: 0,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de acetato de sódio (pH 4,5); potencial: +0,30 V vs PRE. A inserção mostra os sinais amperométricos do BIA para ambas Figuras.

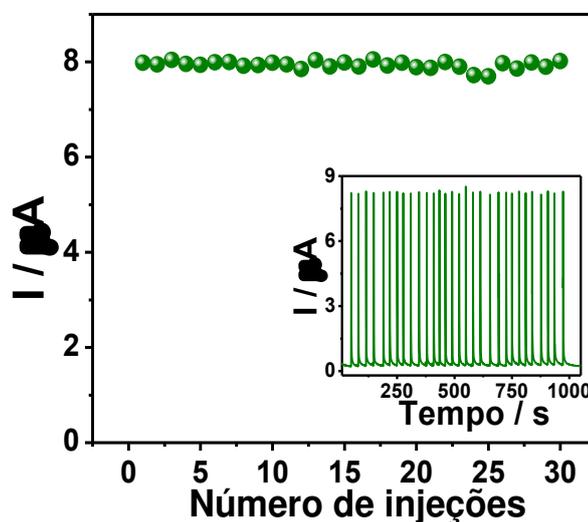


Fonte: Autora do trabalho.

A estabilidade da resposta do sistema BIA sobre o ECI foi avaliada em um estudo de repetibilidade realizado sob condições otimizadas (Figura 7.6). Uma série de 30 injeções sucessivas de soluções contendo 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de catequina resultaram em um valor DPR de 1,03% ( $n = 30$ ), o que poderia ser considerado baixo quando comparado a outros estudos que empregam sistemas BIA com detecção amperométrica (DOS SANTOS PEREIRA et al., 2016; CAETANO et al., 2018; STEFANO et al., 2017; CORREA et al., 2018). O estudo apresentou amostragem de pelo menos 120 injeções por hora, desconsiderando o tempo para reabastecer a ponta da micropipeta com uma nova solução de amostra. O baixo valor DPR demonstrou que o método BIA usando o ECI apresenta alta precisão e estabilidade, sem efeito de memória e interferência de subprodutos da oxidação na superfície do eletrodo. Este resultado é de grande importância porque permite a reutilização do ECI para várias injeções.

## ARTIGO 2

Figura 7.6: Amperogramas e dados de corrente de pico obtidos no estudo da repetibilidade com sucessivas injeções ( $n = 30$ ) de catequina a  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  no sistema BIA. Solução de eletrólito suporte: tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de (pH 4,5); volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ ; velocidade de injeção:  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$ ; potencial:  $+0,3 \text{ V vs ERP}$ .

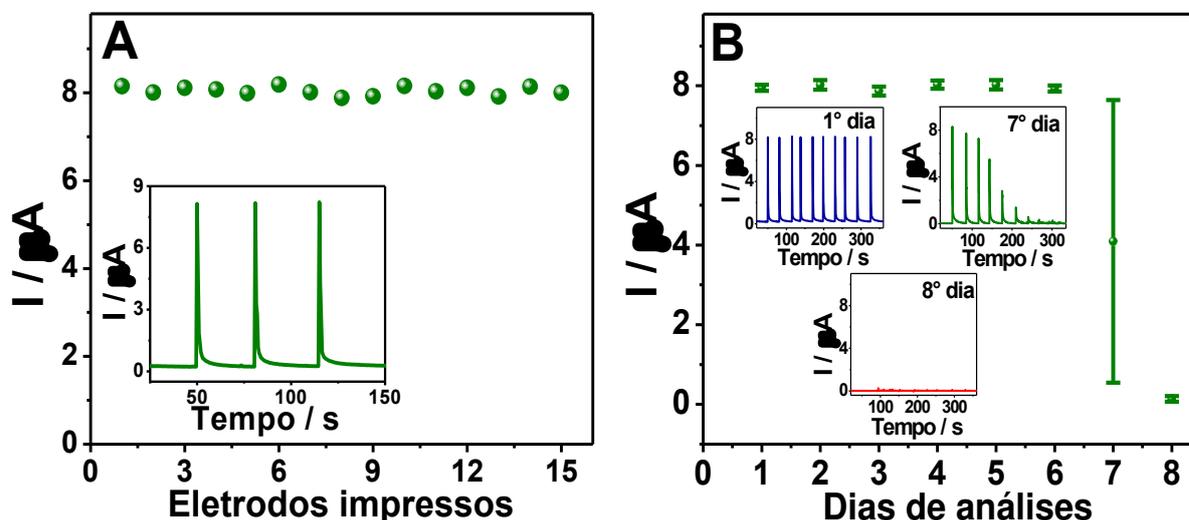


Fonte: Autora do trabalho.

A reprodutibilidade do sistema BIA e a estabilidade a longo prazo dos eletrodos de trabalho em dias diferentes de análises também foram avaliadas por duas metodologias distintas. Primeiramente, selecionou-se quinze ECIs comerciais da DropSens® e foram injetados em triplicata ( $n = 3$ ), sob as condições otimizadas do método BIA (Figura 7.7A), alíquotas  $100 \mu\text{L}$  da solução padrão de catequina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Os resultados obtidos para os diferentes ECIs apresentaram sinais de correntes de pico equivalentes e baixa DPR (1,40%), indicando boa reprodutibilidade da resposta e confirmando a otimização satisfatória do método proposto. Posteriormente, na Figura 7.7B estão dispostos os resultados para os experimentos realizados em oito dias consecutivos de análises, utilizando o mesmo ECI sob as condições otimizadas, onde cada ponto corresponde a mediana para dez injeções ( $n = 10$ ) de catequina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Os resultados demonstraram boa reprodutibilidade e baixos valores de DPR ( $<1,3\%$ ) por até 6 dias de análises consecutivas, com sinais de correntes de pico equivalentes. No sétimo dia, houve uma diminuição da corrente de pico, enquanto no oitavo dia, o eletrodo não apresentou sinais analíticos significativos acima do ruído de fundo. Estes resultados indicam que o ECI poderia ser usado por até 6 dias de análise, considerando um erro relativo máximo de 5%.

## ARTIGO 2

Figura 7.7: Amperogramas e dados de correntes de pico obtidos na reprodutibilidade estudo usando (A) diferentes ECIs e injeções em triplicado ( $n = 3$ ), e (B) um ECI em diferentes dias de análise, com dez injeções por dia ( $n = 10$ ). Eletrólito suporte: solução tampão acetato sódio (pH 4,5)  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ ; velocidade de injeção:  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$ ; potencial:  $+0,3 \text{ V vs ERP}$ . A inserção mostra os sinais amperométricos do BIA.

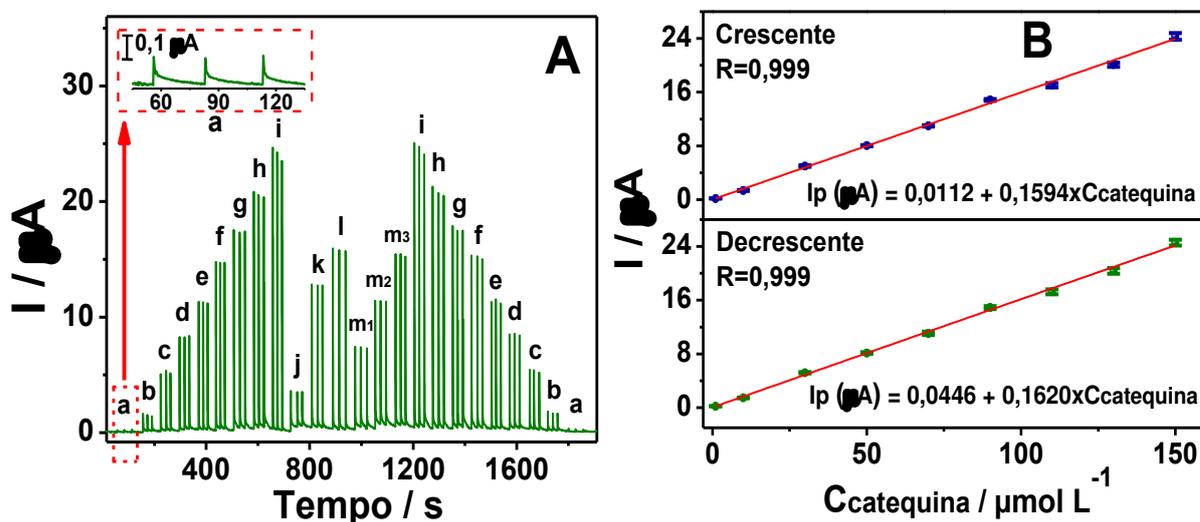


Fonte: Autora do trabalho.

### 7.3.4 Aplicações analíticas

O método BIA proposto usando o ECI foi aplicado para a determinação de catequina em três extratos vegetais diferentes, sob condições otimizadas com respostas amperométricas registradas a  $+0,30 \text{ V}$ , injetando em triplicata um volume de  $100 \mu\text{L}$  (Figura 7.8A). A faixa linear de trabalho foi determinada usando injeções de soluções padrão de catequina em concentrações crescentes e decrescentes entre  $1$  e  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$  (a – i), alternando com injeções em triplicata dos extratos vegetais RM (j), AB-MG (k) e LO (l), assim como o extrato RM enriquecido com diferentes concentrações de solução padrão de catequina ( $m_1$ ,  $m_2$  e  $m_3$ ). Um comportamento linear foi observado nesta faixa de concentração (Figura 7.8B), com bons coeficientes de correlação ( $R = 0,999$ ). As curvas não apresentaram diferenças significativas na inclinação, indicando que não houve efeitos de memória (como aqueles causados pela adsorção de subprodutos da oxidação na superfície do eletrodo) entre as injeções sucessivas, uma vez que não houve diminuição na corrente de pico de oxidação a catequina. Nas condições otimizadas, os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) da catequina foram  $0,021$  e  $0,070 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente ( $\text{LD} = 3 \times \text{Sb} / m$  e  $\text{LQ} = 10 \times \text{Sb} / m$ , onde  $\text{Sb}$  é o desvio padrão do sinal em branco e  $m$  é a inclinação da curva de calibração).

Figura 7.8: Registros amperométricos obtidos a partir de injeções em triplicatas de soluções contendo concentrações de catequina ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ): a = 1; b = 10; c = 30; d = 50; e = 70; f = 90; g = 110; h = 130; i = 15; amostras de extratos RM (j), AB-MG (k) e LO (l) e amostras do extrato RM enriquecidas com catequina ( $m_1$ ,  $m_2$  e  $m_3$ ). Eletrólito suporte solução tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,5; volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ ; velocidade de injeção:  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$ ; potencial + 0,3 V vs ERP.

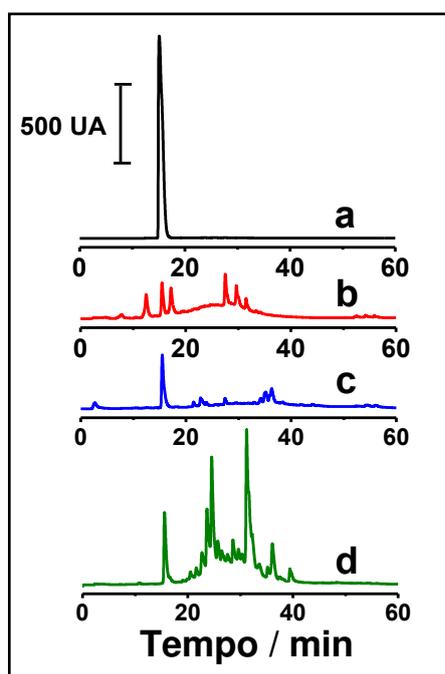


Fonte: Autora do trabalho.

### 7.3.5 Avaliação da precisão e seletividade do método BIA

Para fins comparativos, as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com injeções (em triplicata) de padrões de catequina e dos extratos. Nas condições experimentais empregadas, a catequina apresentou um tempo de retenção de 15,3 min, conforme apresentado na Figura 7.9, que representa o perfil de uma injeção para cada análise. Os resultados obtidos para as três injeções são fornecidos na Tabela 7.1. Foi aplicado o teste  $t$  de Student aos resultados obtidos para cada amostra usando os dois métodos analíticos (BIA e HPLC). Indicaram que não houve diferenças significativas, com os resultados sendo estatisticamente semelhantes (com um nível de confiança de 95%). Esses resultados evidenciaram a equivalência do método BIA, demonstrando a acurácia e confiabilidade da nova técnica para a determinação da catequina.

**Figura 7.9:** Cromatogramas registrados para solução padrão de catequina (a) e extratos vegetais RM (b), AB-MG (c) e LO (d). Detector UV  $\lambda = 280$  nm, coluna AQUA RP C18.



Fonte: Autora do trabalho.

**Tabela 7.1:** Concentrações de catequina nas amostras de extrato vegetal ( $n = 3$ ), obtidas usando o sistema BIA e HPLC-UV / Vis.

Amostras	BIA $\text{mmol L}^{-1}$	HPLC-UV $\text{mmol L}^{-1}$
<b>RM</b>	$25,61 \pm 0,03$	$25,51 \pm 0,11$
<b>AB-MG</b>	$51,92 \pm 0,02$	$51,86 \pm 0,15$
<b>LO</b>	$64,97 \pm 0,02$	$64,87 \pm 0,41$

Fonte: Autora do trabalho.

Uma comparação das características analíticas do método BIA proposto e outros métodos relatados na literatura para a determinação da catequina é fornecida na Tabela 7.2. O método proposto é rápido e alcançou uma taxa de amostragem menor que 100 análises por hora, juntamente com boa sensibilidade e baixos valores LD e LQ. As vantagens dos eletrodos impressos incluem custo relativamente baixo e capacidade de reutilização em várias determinações. Além disso, a portabilidade do sistema BIA permite que seja aplicado em análises de campo.

## ARTIGO 2

Tabela 7.2: Comparação das características analíticas do método proposto com outros métodos reportados na literatura para a determinação de catequina.

Método	RL $\mu\text{mol L}^{-1}$	LD $\mu\text{mol L}^{-1}$	LQ $\mu\text{mol L}^{-1}$	FA $\text{h}^{-1}$	Ref.
HPLC-UV (230 nm)	1,70- 34,40 <sup>a</sup>	0,38 <sup>a</sup>	1,18 <sup>a</sup>	4 <sup>b</sup>	FERREIRA-NUNES, 2018
HPLC-UV (280 nm)	8,61 - 86,12 <sup>a</sup>	0,38 <sup>a</sup>	13,09 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	FERNANDO & SOYSA, 2016
MEC-UV (200 nm)	91,99 – 551,92 <sup>a</sup>	35,73 <sup>a</sup>	108,28 <sup>a</sup>	6 <sup>b</sup>	PIOVEZAN et al., 2013
Espectrofotometria UV (244 nm)	1,38 - 120,60 <sup>a</sup>	1,27 <sup>a</sup>	358,29 <sup>a</sup>	n.m	ROGGIA et al., 2016
Espectrofotometria UV (406 nm)	1,37 - 17,22 <sup>a</sup>	0,24 <sup>a</sup>	1,82 <sup>a</sup>	n.m.	AHMADI et al., 2018
SWV (Dinuclear copper Complex)	4,95 – 32,70 <sup>a</sup>	0,28 <sup>a</sup>	0,35 <sup>a</sup>	n. m.	FERNANDES et al., 2008
SWV (CD/CPE)	8, 61 – 241 <sup>a</sup>	4,65 <sup>a</sup>	11,88 <sup>a</sup>	n.m.	EL-HADY & EL- MAALI, 2008
AMP (GCE)	20,00- 100,00	0,03	0,10	120	RIBEIRO, 2018
<b>AD (C-SPE)</b>	<b>1,00 – 150,00</b>	<b>0.02</b>	<b>0.07</b>	<b>120</b>	<b>Este trabalho</b>

RL: range linear; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; FA: frequência analítica; REF.: referência; HPLC-UV: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta; MEC-UV: cromatografia eletrocínética micelar com detecção ultravioleta; SWV: voltametria de onda quadrada; CD/CEP: eletrodo de pasta de carbono modificado com beta-cilcodextrina; AMP: amperometria de pulsos múltiplos; GCE: eletrodo de carbono vítreo; AD: amperometria direta;; C-SPE: eletrodo de carbono impresso; n.m.: não mencionado

<sup>a</sup>: os valores de concentração foram convertidos para  $\mu\text{mol L}^{-1}$  com base nos dados relatados nos respectivos artigos.

<sup>b</sup>: FA dos métodos HPLC foram obtidos com base no tempo de retenção do analito.

A exatidão do método BIA foi avaliada por meio de ensaios de recuperação realizados com adição de catequina, em três diferentes concentrações do extrato da planta LO (Figura 7.8A).

**Tabela 7.3:** Valores de recuperação obtidos pela análise no método BIA após fortificação com amostra padrão de catequina ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).

Amostra	Catequina ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )		Recuperado (%)
	Adicionado	Encontrado	
RM	25,0	24,6 $\pm$ 0,4	98,5
	50,0	49,7 $\pm$ 0,2	99,4
	75,0	74,2 $\pm$ 0,7	98,9

Fonte: Autora do trabalho.

Os valores de recuperação obtidos, apresentaram-se entre 98,5% e 99,4% (Tabela 3), demonstrando assim que o procedimento analítico proposto não foi afetado por quaisquer interferências significativas decorrentes das matrizes amostrais. A seletividade do método de determinação da catequina foi investigada, considerando possíveis interferências de dois compostos (quercetina e rutina) com estruturas moleculares semelhantes às da catequina. Os experimentos de seletividade foram realizados utilizando uma solução padrão de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de catequina na presença dos interferentes, nas proporções de 1: 1, 1:3 e 1:5. Os sinais registrados para estas soluções foram comparados com os obtidos para a solução padrão na ausência de qualquer interferente. Os resultados (Apêndice A) demonstraram que os sinais analíticos não foram significativamente afetados por nenhum dos interferentes. A quercetina apresentou interferência na proporção de 1: 3, enquanto a interferência da rutina foi observada na proporção de 1: 5 (assumindo um limite de tolerância correspondente a um erro relativo de  $\pm 5\%$ ).

#### 7.4 Conclusão

Os resultados deste trabalho evidenciaram a viabilidade do uso de um sistema BIA com detecção amperométrica direta do ECI para determinar a catequina em matrizes complexas. Os resultados mostraram boa precisão, reprodutibilidade, sensibilidade e seletividade, com possibilidade de reutilização do eletrodo por até seis dias consecutivos, sem perda do sinal analítico ou da desativação do eletrodo, podendo ainda ser realizada uma análise completa com apenas um eletrodo sem perda de sensibilidade do sistema. Além disso, o método apresentou boa taxa de amostragem ( $120 \text{ amostras h}^{-1}$ ), utilizando um volume de amostragem de apenas  $100 \mu\text{L}$ . A nova metodologia permitiu a determinação da catequina em extratos hidroalcoólicos de plantas. Essa técnica pode ser aplicada para controle de processos

## ARTIGO 2

---

nas indústrias farmacêutica e de alimentos, onde resultados rápidos e confiáveis são essenciais para garantir a qualidade do produto.

### 7.5 Referências

AHMAD, M.; MUDGIL, P.; GANI, A.; HAMED, F.; MASOODI, F. A.; MAQSOOD, S. Nano-encapsulation of catechin in starch nanoparticles: Characterization, release behavior and bioactivity retention during simulated in-vitro digestion. **Food chemistry**, v. 270, p. 95-104, 2019.

AHMADI, S.; MOSAVIAN, M. T. H.; HEYDARI, S. Response surface methodology for modelling and determination of catechin in Pistachio green hull using surfactant-based dispersive liquid-liquid microextraction followed by UV-Vis spectrophotometry. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 15, n. 11, p. 2605-2614, 2018.

ARCARI, S. G.; CHAVES, E. S.; VANDERLINDE, R.; ROSIER, J. P.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Brazilian fortified wines: chemical composition, chromatic properties and antioxidant activity. **Food research international**, v. 53, n. 1, p. 164-173, 2013.

BARANOWSKA, M.; SULIBORSKA, K.; CHRZANOWSKI, W.; KUSZNIEREWICZ, B., NAMIEŚNIK, J.; BARTOSZEK, A. The relationship between standard reduction potentials of catechins and biological activities involved in redox control. **Redox biology**, v. 17, p. 355-366, 2018.

BRETT, C. M.; BRETT, A. M. O.; MITOSERIU, L. C. Amperometric batch injection analysis: Theoretical aspects of current transients and comparison with wall-jet electrodes in continuous flow. **Electroanalysis**, v. 7, n. 3, p. 225-229, 1995.

CAETANO, L. P.; LIMA, A. P.; TORMIN, T. F.; RICHTER, E. M.; ESPINDOLA, F. S.; BOTELHO, F. V.; MUNOZ, R. A. Carbon-nanotube Modified Screen-printed Electrode for the Simultaneous Determination of Nitrite and Uric Acid in Biological Fluids Using Batch-injection Amperometric Detection. **Electroanalysis**, v. 30, n. 8, p. 1870-1879, 2018.

CLEMENT, Y. Can green tea do that? A literature review of the clinical evidence. **Preventive medicine**, v. 49, n. 2-3, p. 83-87, 2009.

CORREA, A. L.; GONÇALVES, J. M.; ROSSINI, P. O.; BERNARDES, J. S.; NEVES, C. A.; ARAKI, K.; ANGNES, L. Fast and reliable BIA/amperometric quantification of acetylcysteine using a nanostructured double hydroxide sensor. **Talanta**, v. 186, p. 354-361, 2018.

DA ROCHA, C. Q.; QUEIROZ, E. F.; MEIRA, C. S.; MOREIRA, D. R. M.; SOARES, M. B. P.; MARCOURT, L.; VILEGAS, W.; Wolfender, J. L. Dimeric flavonoids from *Arrabidaea brachypoda* and assessment of their anti-Trypanosoma cruzi activity. **Journal of natural products**, v. 77, n. 6, p. 1345-1350, 2014.

DA ROCHA, C. Q.; DE-FARIA, F. M.; MARCOURT, L.; EBRAHIMI, S. N.; KITANO, B. T.; GHILARDI, A. F.; FERREIRA, A. L.; DE ALMEIDA, A. C. A.; DUNDER, A. R. M.;

## ARTIGO 2

SOUZA-BRITO, M.; HAMBURGER, W.; VILEGAS, E. F. QUEIROZ, J. L.; WOLFENDER, J. L. Gastroprotective effects of hydroethanolic root extract of *Arrabidaea brachypoda*: Evidences of cytoprotection and isolation of unusual glycosylated polyphenols. **Phytochemistry**, v. 135, p. 93-105, 2017.

DA ROCHA, C. Q.; VILELA, F. C.; CAVALCANTE, G. P.; SANTA-CECÍLIA, F. V.; SANTOS-E-SILVA, L.; DOS SANTOS, M. H.; GIUSTI-PAIVA, A. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau roots. **Journal of ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 396-401, 2011.

DOS SANTOS PEREIRA, L. N.; DA SILVA, I. S.; ARAÚJO, T. P.; TANAKA, A. A.; ANGNES, L. Fast quantification of  $\alpha$ -lipoic acid in biological samples and dietary supplements using batch injection analysis with amperometric detection. **Talanta**, v. 154, p. 249-254, 2016.

EL-HADY, D.; EL-MAALI, N. Selective square wave voltammetric determination of (+)-catechin in commercial tea samples using beta-cyclodextrin modified carbon paste electrode. **Microchimica Acta**, v. 161, n. 1-2, p. 225-231, 2008.

FERREIRA-NUNES, R.; ANGELO, T.; DA SILVA, S. M. M.; MAGALHÃES, P. O.; GRATIERI, T.; DA CUNHA-FILHO, M. S. S.; GELFUSO, G. M. Versatile chromatographic method for catechin determination in development of topical formulations containing natural extracts. **Biomedical Chromatography**, v. 32, n. 2, p. e4062, 2018.

FERNANDES, S. C.; OSÓRIO, R. E. H. M. D.; ANJOS, A. D.; NEVES, A.; MICKE, G. A.; VIEIRA, I. C. Determination of catechin in green tea using a catechol oxidase biomimetic sensor. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 6, p. 1215-1223, 2008.

FERNANDO, C. D.; SOYSA, P. Simple isocratic method for simultaneous determination of caffeine and catechins in tea products by HPLC. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 970, 2016.

GONZÁLEZ, B.; SUÁREZ-ROCA, H.; BRAVO, A.; SALAS-AUVERT, R.; AVILA, D. Chemical composition and biological activity of extracts from *Arrabidaea bilabiata*. **Pharmaceutical biology**, v. 38, n. 4, p. 287-290, 2000.

GRZESIK, M.; NAPARŁO, K.; BARTOSZ, G.; SADOWSKA-BARTOSZ, I. Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. **Food chemistry**, v. 241, p. 480-492, 2018.

HE, F.; Pan, Q. H.; Shi, Y.; Duan, C. Q. HE, Fei et al. Biosynthesis and genetic regulation of proanthocyanidins in plants. **Molecules**, v. 13, n. 10, p. 2674-2703, 2008.

JANEIRO, P.; BRETT, A. M. O. Catechin electrochemical oxidation mechanisms. **Analytica chimica acta**, v. 518, n. 1-2, p. 109-115, 2004.

KANDIL, F. E.; GRACE, M. H.; SEIGLER, D. S.; CHEESEMAN, J. M. Polyphenolics in *Rhizophora mangle* L. leaves and their changes during leaf development and senescence. **Trees**, v. 18, n. 5, p. 518-528, 2004.

## ARTIGO 2

LIU, S.; YANG, L.; MU, S.; FU, Q. Epigallocatechin-3-Gallate Ameliorates Glucocorticoid-Induced Osteoporosis of Rats in vivo and in vitro. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, 2018.

MARTIN, F.; HAY, A. E.; CRESSEND, D.; REIST, M.; VIVAS, L.; GUPTA, M. P.; CARRUPT; P. A. ; Hostettmann, K. Antioxidant C-glucosylxanthones from the leaves of *Arrabidaea patellifera*. **Journal of natural products**, v. 71, n. 11, p. 1887-1890, 2008.

MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ, M.; ŠERUGA, M.; JAKOBEK, L.; NOVAK, I. Electrochemical and antioxidant properties of (+)-catechin, quercetin and rutin. **Croatica chemica acta**, v. 83, n. 2, p. 197-207, 2010.

MOREIRA, G. C.; DE SOUZA, F. D. Mixture design and Doehlert matrix for optimization of the ultrasonic assisted extraction of caffeic acid, rutin, catechin and trans-cinnamic acid in *Physalis angulata L.* and determination by HPLC DAD. **Microchemical Journal**, v. 141, p. 247-252, 2018.

MÜLLER, L. S.; DA SILVEIRA, G. D.; DAL PRÁ, V.; LAMEIRA, O.; VIANA, C.; MACHADO DE CARVALHO, L. *Angustifolius Radlk* by capillary zone electrophoresis. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 39, n. 1, p. 13-20, 2016.

NEBULA, M.; HARISANKAR, H. S.; CHANDRAMOHANAKUMAR, N. Metabolites and bioactivities of *Rhizophoraceae mangroves*. **Natural products and bioprospecting**, v. 3, n. 5, p. 207-232, 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

PIOVEZAN, M.; GARCÍA-SECO, D.; MICKE, G. A.; GUTIÉRREZ-MAÑERO, J.; RAMOS-SOLANO. Method development for determination of (+)-catechin and (-)-epicatechin by micellar electrokinetic chromatography: Annual characterization of field grown blackberries. **Electrophoresis**, v. 34, n. 15, p. 2251-2258, 2013.

RIBEIRO, G. A. C.; DA ROCHA, C. Q.; TANAKA, A. A.; DA SILVA, I. S. A fast, direct, and sensitive analysis method for catechin determination in green tea by batch injection analysis with multiple-pulse amperometry (BIA-MPA). **Analytical Methods**, v. 10, n. 17, p. 2034-2040, 2018.

ROCHA, D. P.; SILVA, M. N.; CARDOSO, R. M.; CASTRO, S. V.; TORMIN, T. F.; RICHTER, E. M.; NOSSOL, E.; MUNOZ, R. A. Carbon nanotube/reduced graphene oxide thin-film nanocomposite formed at liquid-liquid interface: characterization and potential electroanalytical applications. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 269, p. 293-303, 2018.

ROGGIA, I.; ZIEGLER, S.; CRUZ, I. B. M.; OURIQUE, A. F.; GOMES, P. A derivative uv spectrophotometric method for the determination of methylxanthines and tannins in guarana bulk (*paullinia cupana*). **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 7, n. 6, 2016.

---

SUN, R.; WANG, Y.; NI, Y.; KOKOT, S. Simultaneous kinetic spectrometric determination of three flavonoid antioxidants in fruit with the aid of chemometrics. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 122, p. 529-535, 2014.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R.; RUÍZ, C. A.; ARIAS, G.; DURÁN, C.; SALGAR, W.; CALA, M. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 1, p. 93-103, 2010.

STEFANO, J. S.; TORMIN, T. F.; DA SILVA, J. P.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. Amperometric determination of omeprazole on screen-printed electrodes using batch injection analysis. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 398-403, 2017.

TORMIN, T. F.; CUNHA, R. R.; DA SILVA, R. A. B.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Combination of screen-printed electrodes and batch injection analysis: a simple, robust, high-throughput, and portable electrochemical system. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 202, p. 93-98, 2014.

YUAN, X.; HE, Y.; ZHOU, G.; LI, X.; FENG, A.; ZHENG, W. Target challenging-cancer drug delivery to gastric cancer tissues with a fucose graft epigallocatechin-3-gallate-gold particles nanocomposite approach. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 183, p. 147-153, 2018.

---

---

## *Capítulo 8*



*Determinação rápida, simples  
e precisa de quercetina em  
extratos vegetais por  
amperometria associada a  
análise por injeção em  
batelada (BIA)*

---

---

## 8. DETERMINAÇÃO RÁPIDA, SIMPLES E PRECISA DE QUERCETINA EM EXTRATOS VEGETAIS POR AMPEROMETRIA ASSOCIADA A ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA (BIA)

### Resumo

Este trabalho apresenta um estudo que consiste na comparação de dois métodos para a determinação de quercetina em matrizes complexas empregando análise por injeção em bateladas (BIA) com detecção amperométrica. Os resultados mostraram a possibilidade da aplicação de metodologias envolvendo um eletrodo de carbono vítreo e amperometria de pulsos múltiplos (BIA-MPA) ou um eletrodo de carbono impresso e amperometria convencional (BIA-AC). Os métodos propostos requerem manipulação mínima da amostra (apenas diluição no eletrólito suporte) e a determinação é obtida com uma única etapa de injeção de 100  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo a amostra. O método BIA-MPA mostrou-se altamente preciso (DPR de 0,74%;  $n = 30$ ), rápido (72 injeções  $\text{h}^{-1}$ ) com baixos limites de detecção (0,004  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e de quantificação (10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). O método BIA-AC também mostrou-se preciso (DPR de 1,06%;  $n = 30$ ), rápido (120 injeções  $\text{h}^{-1}$ ), com limites de detecção de 0,027  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e de quantificação de 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Aplicações destas metodologias na determinação de quercetina em amostras de extratos das folhas das plantas *Brunfelsia uniflora* (BU), *Vismia guianensis* (VG) e *Arrabidaea brachypoda* (AB-MA) apresentaram resultados consistentes com os obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com nível de confiança de 95%.

### 8.1. Introdução

Os flavonóides são compostos polifenóis que representam um dos grupos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural (SHAI DAROVA et al., 2016). São amplamente distribuídos no reino vegetal e encontrados em grande quantidade em frutas e plantas (BALASUNDRAM et al., 2006). Apresentam uma estrutura base (Figura 8.1) constituída por dois anéis aromáticos (A e B) ligados através de um anel pirano (C) (D'ANDREA, 2015; MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ et al., 2010; BALASUNDRAM et al., 2006; TIMBOLA et al., 2006).

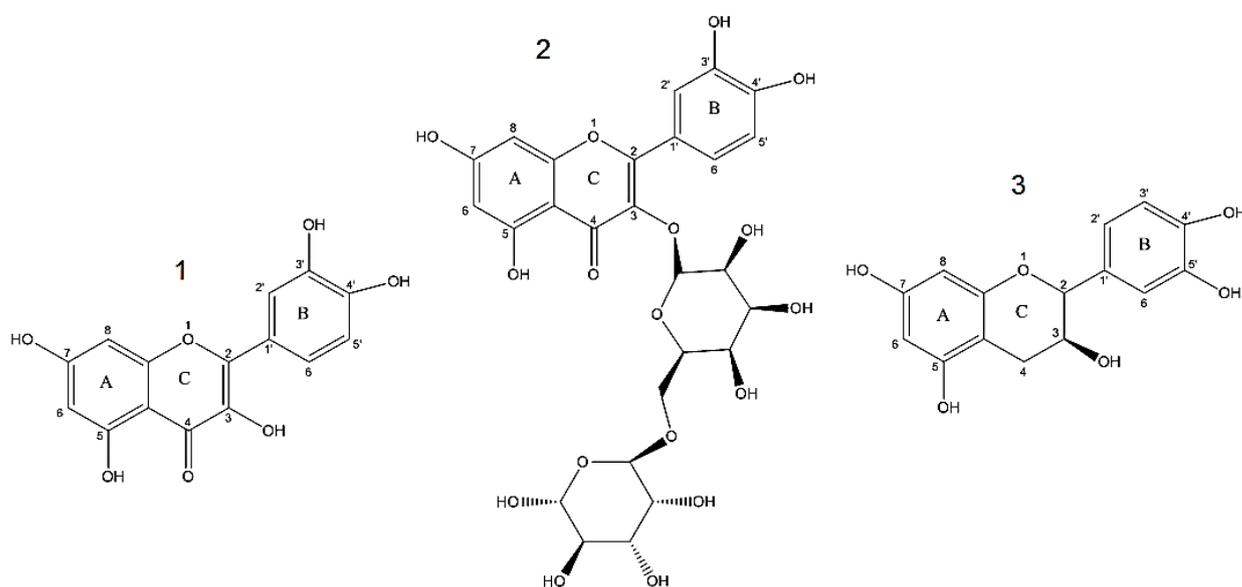
Dentre os compostos fenólicos, a quercetina vem se destacando por ser um dos flavonóides mais presentes na dieta humana, sendo encontrada em grande quantidade nas

### ARTIGO 3

frutas, verduras e chás e detém diversos efeitos farmacológicos, incluindo efeitos contra o envelhecimento, anti-inflamatórios, cardioprotetores, antioxidantes, anticancerígenos e antivirais (WANG et al, 2016; SHAIDAROVA et al., 2016; D'ANDREA, 2015).

A quercetina contém em sua estrutura (Figura 8.1) o grupo floroglucinol no anel A com hidroxilas na posição C-5 e C-7, o grupo catecol no anel B (C-3' e C-4'), o substituinte OH na posição C-3, a carbonila em C-4 e a insaturação entre C-2 e C-3 e o grupo pirânico no anel C (D'ANDREA, 2015; MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ et al, 2010; BRETT & GHICA, 2003).

**Figura 8.1: Estrutura química dos flavonóides: (1) Quercetina, (2) Rutina e (3) Catequina. Os grupos OH estão presentes nos anéis A, B e C.**



Fonte: Autora do trabalho.

A quercetina tem atraído cada vez mais interesse devido principalmente, ao seu potencial antioxidante e a inibição da proliferação de diferentes tipos de células cancerosas (WANG et al, 2016; D'ANDREA, 2015). A maioria das metodologias analíticas reportadas na literatura para a determinação de quercetina são baseadas em métodos espectrofotométricos (WANG et al, 2016) e técnicas cromatográficas (ABDELKAWY et al., 2017) que dependem de etapas iniciais de preparação das amostras e demandam tempo, utilizam grande quantidade de reagentes (solventes) e os equipamentos associados são de custos elevados, tornando muito caro o custo final das análises.

Entre as alternativas possíveis para a quantificação da quercetina, as técnicas eletroquímicas aparecem como viáveis e promissoras, por apresentarem vantagens como

## ARTIGO 3

---

alcance de baixos limites de detecção, possibilidade de especificação dos analitos, alta velocidade de análise, pré-tratamento da amostra desnecessário ou minimizado, baixo custo de análise e versatilidade da técnica (PLIUTA et al., 2018; TORMIN et al., 2014; MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ et al, 2010; TIMBOLA et al., 2006; WANG & TAHA, 1991).

Este trabalho tem como propósito apresentar duas estratégias de análise para a determinação do composto fenólico quercetina em matrizes complexas. Ambos métodos demonstraram ser simples, rápidos, seletivos e com elevada sensibilidade. Além disso, as metodologias apresentam como grande diferencial a vantagem de usar eletrodos de carbono não modificados acoplado a um sistema de análise por injeção em batelada (BIA) com detecção amperométrica convencional (AC) ou amperometria de múltiplos pulso (MPA), de modo a evitar os problemas associados com a passivação destes eletrodos e permitir a determinação da quercetina com alta seletividade, superando o problema de contaminação do eletrodo. O método foi avaliado em termos de linearidade, repetibilidade, reprodutibilidade, detecção e quantificação, e a exatidão do método foi confirmada pelo método de adição e recuperação.

## 8.2. Parte Experimental

### 8.2.1. Materiais e Reagentes

Todos os reagentes foram de grau analítico e utilizados sem purificação prévia. Água deionizada de alta pureza (resistividade  $\leq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) foi obtida a partir de um sistema de purificação de água Milli-Q<sup>®</sup> Direct (Millipore, Bedford, EUA). Suspensão aquosa de alumina 0,30  $\mu\text{m}$  (Micropolishing Material, Buehler Ltda) e cloreto de potássio adquirido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), ácido fosfórico, ácido bórico, ácido acético, hidróxido de sódio e metanol adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Quercetina ( $\geq 95\%$ ) foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). As amostras dos extratos das plantas *Brunfelsia uniflora* (BU), *Vismia guianensis* (VG) e *Arrabidaea brachypoda* (AB-MA) foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Estudos Avançados em Fitomedicamentos (LEAF) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

A quercetina é um sólido amarelo amorfo que tem baixa solubilidade em água, mas é solúvel em soluções aquosas alcalinas, etanol, acetona e acetato de etila (WANG et al, 2016; D'ANDREA, 2015), dessa forma, no presente trabalho, utilizou-se 20% de etanol no eletrólito suporte para garantir a sua solubilidade.

## ARTIGO 3

Uma solução stock padrão de quercetina ( $10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>) foi preparada semanalmente em metanol e mantida em geladeira (a solução foi estável durante pelo menos 1 mês) (MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ, 2010). Esta solução foi diluída na concentração desejada com o eletrólito suporte e utilizada para as medições eletroquímicas.

### 8.2.2. Instrumentação

#### 8.2.2.1. Medidas Eletroquímicas

As análises eletroquímicas foram realizadas utilizando um potenciostato Autolab PGSTAT302N (Eco Chemie B.V., Utrecht, Holanda) interfaceado a um computador e controlado através do software GPES versão 4.0.007. Os voltamogramas e os amperogramas foram registrados utilizando dois sistemas: sendo um primeiro sistema composto por três eletrodos: um eletrodo de trabalho de carbono vítreo (ECV) (~5,0 mm de diâmetro), um eletrodo de referência de Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub> e um eletrodo auxiliar de fio de platina. O outro sistema utilizou eletrodo de carbono impresso (ECI) comercial da Dropsens<sup>®</sup> que contém os contatos elétricos de prata e os três eletrodos no mesmo substrato de cerâmica (dimensões 3,4 × 1,0 × 0,05 cm) apresentando um disco de aproximadamente 4 mm de diâmetro de carbono depositado no seu centro como eletrodo de trabalho, um eletrodo auxiliar de carbono e um eletrodo referência de prata (ERP). Para as injeções da quercetina no sistema eletroquímico foi utilizada uma micropipeta automática Rainin LTS 200 (São Paulo, Brasil). Um sistema de banho ultrassom da Unique (USC-1400) foi utilizado para remoção de possíveis partículas provenientes do processo de polimento que ficam impregnadas na superfície do ECV.

A célula BIA usada para as medições amperométricas com o eletrodo de ECV foi construída de acordo com Ribeiro et al. (2018) consistia de um cilindro de acrílico (~40 mL de volume) com fundo e tampa construídos em Teflon<sup>®</sup> e encaixados firmemente dentro do cilindro. Um orifício foi perfurado no centro da parte inferior, permitindo o posicionamento preciso do eletrodo de trabalho no centro da célula. Um anel de vedação do tipo O-ring foram posicionados dentro deste orifício para evitar vazamentos da solução da célula. Três orifícios foram perfurados na tampa, sendo um central para uma instalação precisa da micropipeta sempre na mesma posição. Os outros dois orifícios, nas laterais do orifício central, permitiam a inserção dos eletrodos de referência e auxiliar. A ponta da pipeta foi mantida a uma distância fixa de ~2 mm do eletrodo de trabalho, movendo-se o último para a posição desejada (a posição da pipeta foi mantida inalterada). Um orifício lateral na célula foi perfurado para permitir a drenagem do excesso de solução.

### ARTIGO 3

A célula usada para as medições amperométricas com o ECI consiste em um cilindro de Teflon<sup>®</sup> (diâmetro interno de ~ 6 cm e altura de ~5,5 cm) e uma tampa também de Teflon<sup>®</sup> firmemente encaixada no topo, com um orifício central (~ 4 mm de diâmetro) para a inserção da ponteira da micropipeta eletrônica mantida sempre na mesma posição a uma distância fixa de ~2 mm do eletrodo de trabalho em oposição à superfície do ECI (RICHTER et al., 2016).

#### 7.2.2.2. Medidas Cromatográficas

Os resultados obtidos com o método BIA-MPA e BIA-AC foram comparados com aqueles obtidos por HPLC usando um sistema Shimadzu Corp consistindo de um módulo de distribuição de solvente com uma bomba de pistão duplo, um detector UV-VIS SPA-10A ( $\lambda = 245$  nm), e uma coluna AQUA RP C18 (150 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m). Os solventes de eluição foram 0,02% de ácido fórmico em água (eluente A) e 0,02% de ácido fórmico em metanol (eluente B), a uma taxa de 1 mL min<sup>-1</sup>, empregando-se um gradiente de 5% a 100% de B em 50 min e tempo adicional para limpeza do sistema de 50 min a 60 min com 100% B. A coluna foi mantida na temperatura ambiente e o volume de injeção de amostra foi de 10  $\mu$ L. Os dados foram coletados e processados usando o software Shimadzu LC Solution v. 1.25.

#### 8.2.3. Preparo das amostras

Os extratos das plantas *Brunfelsia uniflora* (BU) e *Arrabidaea brachypoda* (AB-MA) foram coletadas no município de Carolina-MA (07°20'16"S e 47°28'04"W) e *Vismia guianensis* (VG) foi coletada na cidade de São Luís-MA (03°33'29"S e 43°31'22"W). Todos os extratos foram obtidos a partir das folhas secas (1000 g) e foram extraídas por percolação exaustiva (tempo mínimo de 24 horas), à temperatura ambiente, com etanol-água a 70%. O extrato etanólico bruto foi obtido após filtração e evaporado à secura sob vácuo a aproximadamente 40°C, produzindo aproximadamente 200,0 g de extrato hidroetanólico (DA ROCHA et al., 2017). Antes da injeção de cada extrato no sistema HPLC-UV/Vis, as amostras foram filtradas através de um filtro de nylon com tamanho de poro de 0,22  $\mu$ m.

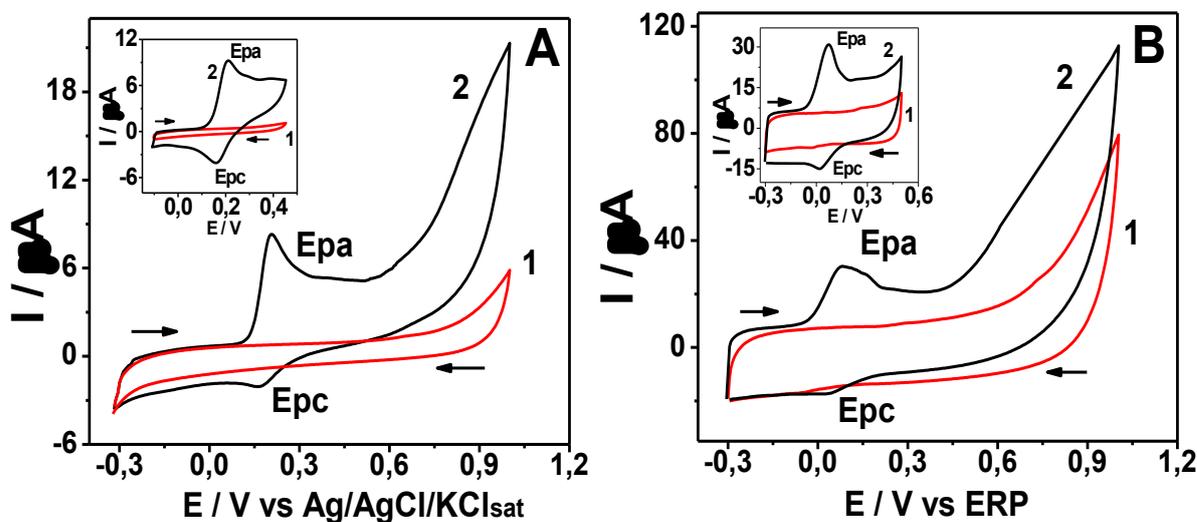
### 8.3. Resultados e Discussão

#### 8.3.1. Comportamento Voltamétrico da Quercetina sobre o eletrodo de carbono vítreo (ECV) e o eletrodo de carbono impresso (ECI)

## ARTIGO 3

Medidas eletroquímicas preliminares utilizando os ECV (Figura 8.2A) e ECI (Figura 8.2B) foram realizadas a fim de investigar o comportamento eletroquímico da quercetina na superfície destes eletrodos. A Figura 8.2 mostra os voltamogramas cíclicos da quercetina ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 6,0) registradas entre  $-0,3 \text{ V}$  e  $+1,0 \text{ V}$  numa velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . Os gráficos inseridos, mostraram os resultados obtidos em regiões de potenciais menores entre  $-0,3 \text{ V}$  e  $0,5 \text{ V}$ .

**Figura 8.2:** (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de carbono vítreo (ECV) e (B) eletrodo de carbono impresso (ECI) em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  água/etanol (80/20), pH 6,0 na ausência (1) e na presença da quercetina  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  (2). Velocidade de varredura de  $v=0,05 \text{ V.s}^{-1}$ .



Fonte: Autora do trabalho.

O perfil geral dos voltamogramas cíclicos mostrados na Figura 8.2 são semelhantes ao relatados na literatura para quercetina (MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ et al., 2010; TIMBOLA et al., 2006; BRETT & GHICA, 2003), com a presença de um pico na região anódica, em  $+0,20 \text{ V}$  ( $E_{pa}$ ) para o ECV e em  $+0,09 \text{ V}$  para o ECI e atribuído à oxidação do substituinte 3', 4'-di-hidroxi no anel B da quercetina (Figura 8.1) (MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ et al., 2010; TIMBOLA et al., 2006). Na região catódica, um pico de menor intensidade, pode ser observado em  $-0,15 \text{ V}$  ( $E_{pc}$ ) para o ECV e em  $-0,03 \text{ V}$  para o ECI, indicando a formação de espécies fortemente adsorvidas por produtos de oxidação na superfície dos eletrodos na varredura catódica de polifenóis (TIMBOLA et al., 2006).

A fim de otimizar a sensibilidade do método e a faixa de potencial de trabalho para a oxidação eletroquímica da quercetina utilizando o sistema BIA com detecção amperométrica, foram avaliados, com o ECV, os parâmetros experimentais pH e composição do eletrólito suporte. Os voltamogramas hidrodinâmicos foram obtidos pela aplicação de doze

**ARTIGO 3**

potenciais no intervalo de - 0,10 a + 1,00 V (em experimentos individuais com polimento antes de cada alteração de potencial) e injeções em triplicatas de uma solução padrão de quercetina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Os resultados estão dispostos na Tabela 8.1.

**Tabela 8.1: Parâmetros experimentais obtidos pelo voltamograma hidrodinâmico da quercetina com o ECV (resultados médios para injeções em triplicata de uma solução padrão de quercetina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).**

Eletrólito	Potencial V	Corrente $\mu\text{A}$	Desvio Padrão Médio %
Tampão Briton Robson pH 2,0	0,40	$3,09 \pm 0,04$	1,75
Tampão Briton Robson pH 4,0	0,35	$4,26 \pm 0,10$	2,45
Tampão Briton Robson pH 6,0	0,30	$6,06 \pm 0,10$	1,96
Tampão Briton Robson pH 7,0	0,20	$7,60 \pm 0,21$	2,03
Tampão Briton Robson pH 8,0	0,15	$4,00 \pm 0,26$	2,54
Tampão Briton Robson pH 10,0	0,10	$3,12 \pm 0,68$	3,16
Tampão acetato pH 3,8	0,35	$3,76 \pm 0,07$	1,93
Tampão acetato pH 4,5	0,30	$4,18 \pm 0,08$	2,04
Tampão acetato pH 5,5	0,25	$5,43 \pm 0,06$	1,87
<b>Tampão Fosfato pH 6,0</b>	<b>0,30</b>	<b><math>8,98 \pm 0,08</math></b>	<b>1,33</b>
Tampão Fosfato pH 8,0	0,15	$4,77 \pm 0,09$	2,91
Tampão Fosfato pH 10,0	0,10	$3,70 \pm 0,05$	1,99

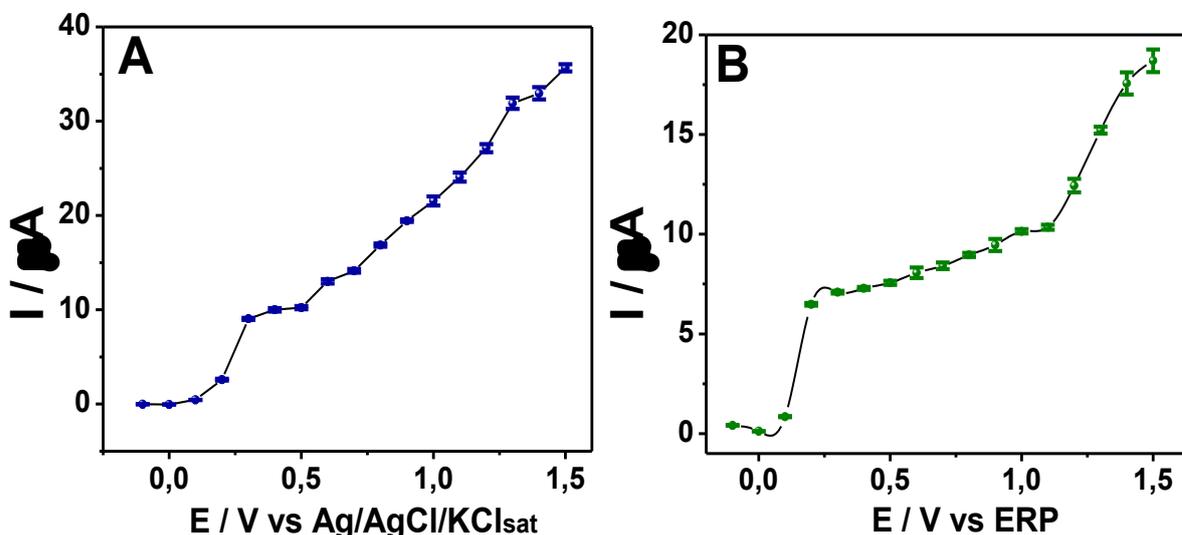
Fonte: Autora do trabalho.

Com base no voltamograma hidrodinâmico e para evitar a interferência de espécies eletroativas que podem estar presentes na matriz da amostra, o potencial de corrente de pico foi escolhido para demais medições eletroquímicas (OLIVEIRA et al., 2016; FREITAS et al., 2016, PEREIRA et al., 2016; RIBEIRO et al., 2018). Além disso, nos eletrólitos estudados, foi escolhido para demais estudos o tampão fosfato pH 6,0, por apresentar maior corrente de pico e menor desvio padrão relativo (DPR 1,33 %) entre as injeções de quercetina ( $n = 3$ ).

A Figura 8.3 mostra os voltamogramas hidrodinâmicos obtidos no tampão fosfato pH 6 sob a superfície do ECV e ECI. O estudo foi realizado na faixa de potencial - 0,10 V até + 1,00 V e os dados da corrente média obtidas nas injeções em triplicata ( $n = 3$ ) de uma solução de quercetina ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) sendo registradas no modo amperométrico em função dos potenciais aplicados para cada registro. É importante salientar que, para cada ponto da Tabela 8.1, foi realizado o polimento antes das análises com o ECV e nas análises com o ECI, inicialmente, foram feitas as trocas do eletrodo impresso, uma vez que a oxidação da quercetina pode resultar na adsorção de subproduto(s) oriundos do processo de oxidação, na superfície do eletrodo.

## ARTIGO 3

Figura 8.3: Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos no sistema do BIA com detecção amperométrica para injeções em triplicata ( $n=3$ ) de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de quercetina em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,0 água/etanol (80/20), volume de injeção  $100 \mu\text{L}$ . (A) ECV; (B) ECI; potenciais variáveis entre  $-0,10$  e  $1,00$  V.



Fonte: Autora do trabalho.

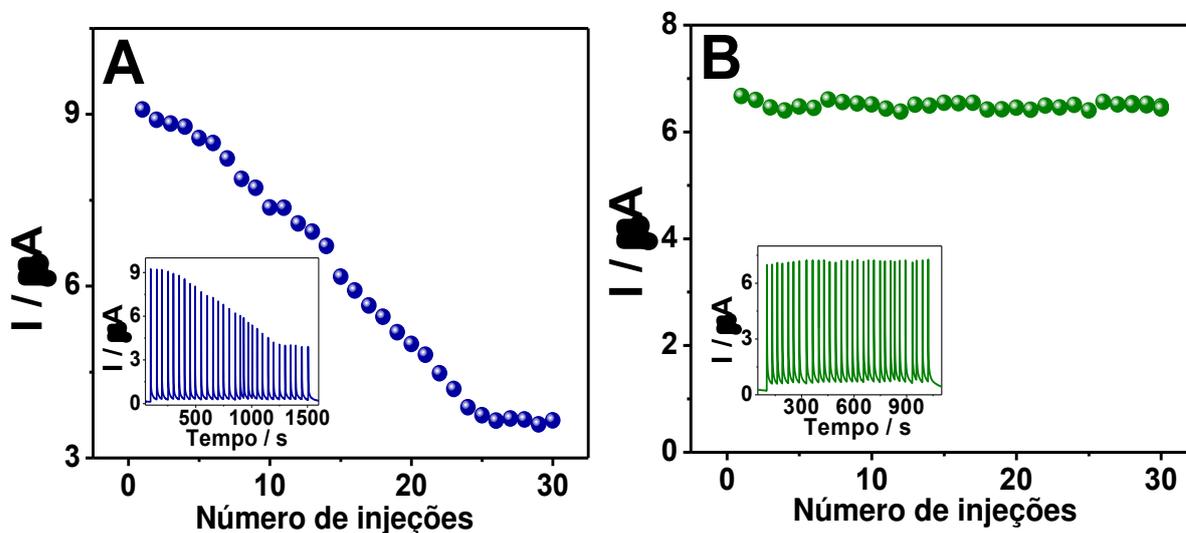
A oxidação eletroquímica da quercetina sob condições hidrodinâmicas apresentou potencial de pico em  $+0,30$  V para o ECV e  $+0,20$  V para o ECI atingindo correntes de  $9,00 \mu\text{A}$  para o ECV e de  $6,48 \mu\text{A}$  para o ECI. Estes potenciais de pico foram selecionados para as demais medições amperométricas, evitando-se assim possíveis interferentes que possam estar presentes em matrizes complexas e que se oxidam em potenciais mais elevados.

### 8.3.2 Otimização dos Parâmetros para o sistema BIA

Um estudo de repetibilidade foi conduzido para avaliar a resposta do método BIA na oxidação da quercetina a um potencial constante de  $+0,30$  V para o ECV (Figura 8.4A) e  $+0,20$  V para o ECI (Figura 8.4B). Este estudo foi realizado utilizando uma série de 30 injeções de uma solução contendo  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  quercetina. O resultado obtido para repetibilidade usando o ECI (Figura 8.4B) produziu uma corrente, na primeira injeção de quercetina, de  $6,67 \mu\text{A}$  e de  $6,50 \mu\text{A}$  na trigésima. O valor DPR foi de  $1,06 \%$  o que é considerado ótimo quando comparável com os dados obtidos por outros métodos BIA (BACKES et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2016; GIMENES et al., 2015) e um baixo valor de DPR registrado assegura injeções precisas fornecidas pela micropipeta programável associada ao sistema BIA.

## ARTIGO 3

Figura 8.4: Dados de repetibilidade com os respectivos valores de correntes obtidos a partir de sucessivas injeções de quercetina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $n=30$ ) em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,0 água/etanol (80/20), volume de injeção  $100 \mu\text{L}$ . (A) ECV em  $+ 0,30 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ ; (B) ECI em  $+ 0,20 \text{ V vs Ag}$  (ERP).

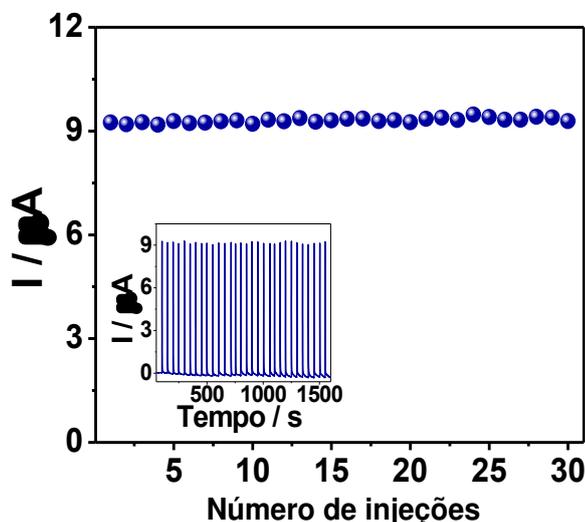


Fonte: Autora do trabalho.

Em contrapartida, o resultado obtido para repetibilidade usando o ECV (Figura 8.4A) produziu uma corrente, na primeira injeção de quercetina de  $9,08 \mu\text{A}$  e na trigésima injeção uma corrente de  $3,66 \mu\text{A}$ , resultando num DPR de 32,62%, que quando comparado a dados obtidos por outros métodos BIA (OLIVEIRA et al., 2016; GIMENES et al., 2015) é considerado alto para a análise. Tal resultado mostra que houve passivação na superfície do ECV, devido à formação de subprodutos de oxidação (MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ et al., 2010; TIMBOLA et al., 2006; BRETT & GHICA, 2003). Em resumo, a quercetina adsorve na superfície do ECV, com a diminuição do pico de oxidação durante as injeções, e impossibilitando, a determinação de quercetina por amperometria convencional (BIA-AC) sobre o ECV. Para evitar esta problemática foi investigada a técnica de amperometria de múltiplos pulsos (BIA-MPA), a fim de evitar a diminuição no sinal analítico e garantir a estabilidade do sinal ao longo do tempo. Este método, requer uma sequência de três etapas, que são geralmente realizadas em um potencial de determinação, um potencial de limpeza e um de condicionamento (GIMENES et al., 2015). Assim, para evitar a passivação do ECV foram realizados estudos (Apêndice B.1) com a utilização de três potenciais:  $+ 0,30 \text{ V}$  (potencial de oxidação),  $+ 1,30 \text{ V}$  (potencial de limpeza) e  $0,00 \text{ V}$  (condicionamento) vs  $\text{Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ , usando  $0,1 \text{ s}$  como tempo de pulso aplicado (Figura 8.5) na avaliação da precisão do método BIA-MPA.

## ARTIGO 3

Figura 8.5: Dados de repetibilidade com os respectivos valores de correntes obtidos a partir de sucessivas injeções de quercetina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $n=30$ ) usando o ECV com BIA-MPA em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,0 água/etanol (80/20); potencial de oxidação + 0,30 V, limpeza + 1,30 V e condicionamento  $0,00 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ .



Fonte: Autora do trabalho.

Os resultados mostraram uma excelente repetibilidade das correntes de picos, com um valor de DPR de apenas 0,74% para  $n = 30$ . A precisão das correntes obtidas demonstrou que o uso de BIA-MPA com um ECV apresenta excelentes resultados para a determinação de quercetina, sem registrar adsorção do(s) seu(s) produto(s) de oxidação. Resultados semelhantes foram relatados na determinação de captopril e hidroclorotiazida sobre o eletrodo de diamante dopado com boro utilizando o método BIA-MPA (GIMENES et al., 2015) e relatados por Ribeiro et al. (2018), que utilizaram o método BIA-MPA com um eletrodo de ECV não modificado na determinação de catequina em amostras de chá verde.

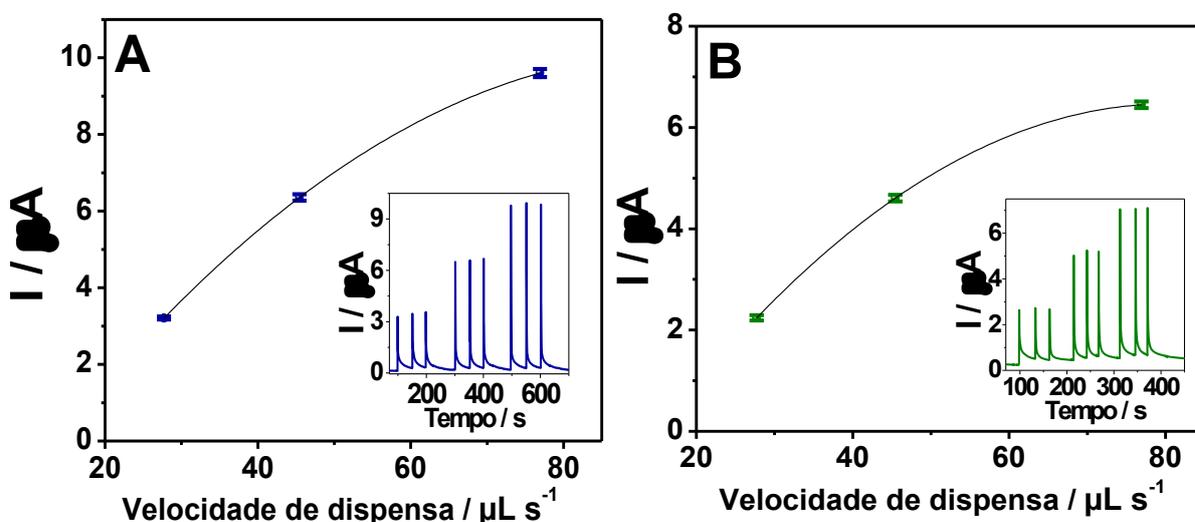
Em continuidade, para otimização dos parâmetros BIA, foram conduzidos estudos de velocidade de dispensa da micropipeta programável (Figura 8.6) e o volume injetado (Figura 8.7) foram investigados afim de se obter as melhores respostas em função da sensibilidade e de frequência analítica. Os estudos foram conduzidos injetando-se uma solução em triplicada de quercetina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ , sob cada condição de modo variável por vez, ou seja, variando-se o volume injetado sob uma vazão fixa e, posteriormente, variando a vazão sob um volume fixo.

Nos sistemas BIA-MPA e BIA-AC, a micropipeta eletrônica permitiu a injeção das soluções sob três vazões diferentes ( $27,72$ ;  $45,45$  e  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$ ) e as correntes de pico médias das triplicatas em cada vazão são apresentadas na Figura 8.6A para o ECV (BIA-

## ARTIGO 3

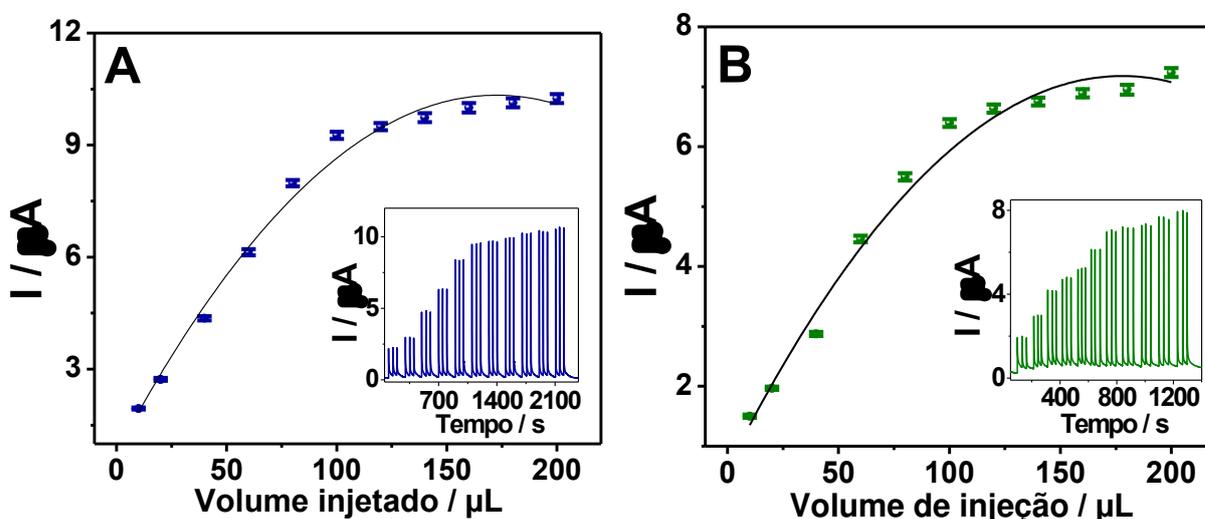
MPA) e na Figura 8.6B para o ECI (BIA-AC), sendo os sinais diretamente proporcionais às velocidades de injeção devido à diminuição da camada de difusão de Nernst (BACKES et al., 2017). Com base referente aos resultados, a vazão  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$  foi escolhida para realizar as demais medições.

Figura 8.6: Avaliação da taxa de distribuição da micropipeta programável ( $27,72$ ;  $45,45$  e  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$ ) para injeções em triplicata ( $n=3$ ) de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de quercetina em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH  $6,0$  água/etanol ( $80/20$ ), volume de injeção  $100 \mu\text{L}$ . (A) BIA-MPA usando o ECV com potencial de oxidação  $+0,30 \text{ V}$ , limpeza  $+1,30 \text{ V}$  e condicionamento  $0,00 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$  e (B) BIA-AD usando o ECI em  $+0,20 \text{ V vs Ag}$  (ERP).



Fonte: Autora do trabalho.

Figura 8.7: Avaliação do volume de injeção ( $10 - 200 \mu\text{L}$ ) obtidos pelo sistema BIA com detecção amperométrica para injeções em triplicata ( $n=3$ ) de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de quercetina em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH  $6,0$  água/etanol ( $80/20$ ), volume de injeção  $100 \mu\text{L}$ , taxa de injeção  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$ . (A) BIA-MPA usando o ECV no potencial de oxidação  $+0,3 \text{ V}$ , limpeza  $+1,3 \text{ V}$  e condicionamento  $0 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$  e (B) BIA-AC usando o ECI no potencial  $+0,2 \text{ V vs Ag}$  (ERP).



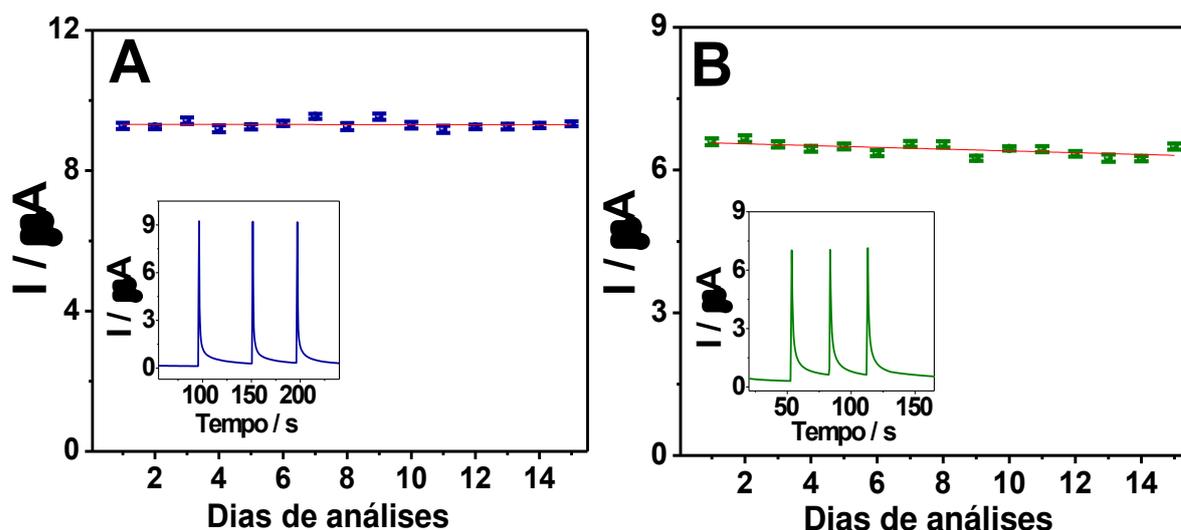
Fonte: Autora do trabalho.

No estudo do volume injetado em ambos sistemas, a micropipeta automática Rainin permitiu a injeção de volumes no intervalo de 10 a 200  $\mu\text{L}$ , e as correntes médias para injeções em triplicatas deste estudo são apresentadas na Figura 8.7A para o ECV e Figura 8.7B para o ECI. Neste estudo observou-se que quando volumes de 10 a 100  $\mu\text{L}$  são injetados a corrente aumenta significativamente com o aumento do volume injetado. No entanto, acima de 100  $\mu\text{L}$  estes sinais são praticamente constantes, sendo, portanto, este volume escolhido para realizar os demais experimentos.

### 8.3.2.2 Reprodutibilidade da quercetina sobre o ECV e o ECI

A reprodutibilidade foi avaliada durante quinze dias utilizando o ECV e o ECI no sistema BIA-MPA e BIA-AC, respectivamente, experimentos realizados em triplicata numa solução padrão de quercetina 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão fosfato 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  (pH 6,0) água/etanol (80/20). Em cada dia do referido estudo no início das medidas experimentais, o eletrodo de carbono vítreo foi polido em feltro contendo suspensão aquosa de alumina de granulometria 0,3  $\mu\text{m}$ . A análise com o eletrodo impresso foi realizada com a troca de um novo eletrodo a cada dia de leitura. Os sistemas avaliados (Figura 8.8) apresentaram DPR 1,19%, para o ECV e 2,03% para o ECI, mostrando a excelente reprodutibilidade inter-dias.

Figura 8.8: Gráfico do estudo de reprodutibilidade inter-dias. (A) BIA-MPA usando o ECV no potencial + 0,3 V vs Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub>; (B) BIA-AD usando o ECI no potencial + 0,2 V vs Ag (ERP).



Fonte: Autora do trabalho.

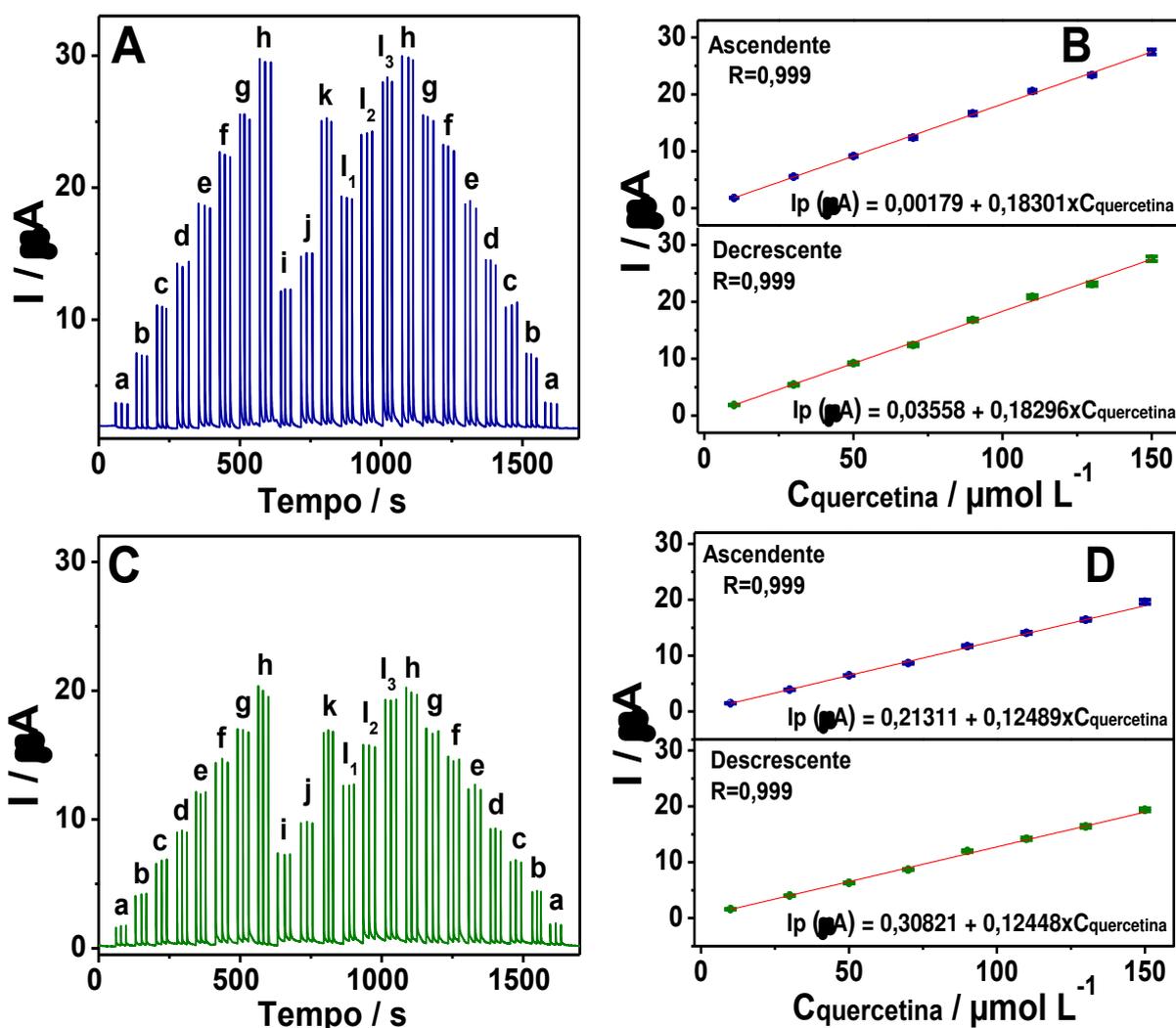
### 8.3.3. Aplicações Analíticas

Após a otimização das condições nos sistemas hidrodinâmicos com detecção amperométrica, soluções de concentrações crescentes do padrão de quercetina foram injetadas em triplicata, nos sistemas BIA-MPA e BIA-AC, o que permitiu obter alguns parâmetros de confiabilidade analítica, como sensibilidade, faixa linear e limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

As respostas amperométricas foram registadas no potencial + 0,30 V aplicado sobre o ECV (Figura 8.9A) e + 0,20V aplicado sobre o ECI (Figura 8.9C), para injeções em triplicatas, com concentrações crescentes de quercetina (a-h: 10 - 150  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Estas soluções foram injetadas na ordem crescente e decrescente de concentração e intermediada por injeções em triplicata de soluções dos extratos das plantas BU (i), VG (j), e AB-MA (k); e ainda uma solução de GV enriquecida com concentrações diferentes da solução padrão de quercetina ( $I_1$ ,  $I_2$  e  $I_3$ ). As respectivas curvas analíticas são mostradas nas Figura 8.9B e Figura 8.9D. A curva de calibração para a série de injeções apresentou um comportamento linear com um coeficiente de correlação de 0,999, para ambos os métodos. Uma comparação das curvas em ordem crescente e decrescente não apresentaram alterações significativas, indicando que não há efeito de memória (contaminação do eletrodo) entre injeções sucessivas, não havendo, portanto, diminuição da corrente de pico de oxidação da quercetina durante as injeções. Os parâmetros analíticos obtidos para ambos os métodos estão dispostos na Tabela 7.2 e mostram que os métodos apresentaram excelente linearidade, sensibilidade, baixos limites de detecção e quantificação, quando comparados a outros métodos propostos para determinação de quercetina (ABDELKAWY et al., 2017; MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ et al, 2010; TIMBOLA et al., 2006; BRETT & GHICA, 2003).

## ARTIGO 3

Figura 8.9: Amperogramas obtidos a partir de injeções em triplicatas de soluções contendo concentrações crescentes de quercetina ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ): a = 10; b = 30; c = 50; d = 70; e = 90; f = 110; g = 130; h = 150; amostras de extratos BU (i), VG (j) e AB-MA (k) e amostras do extrato VG enriquecidas com quercetina ( $l_1$ ,  $l_2$  e  $l_3$ ). Eletrólito suporte solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,0 água/etanol (80/20), taxa de injeção  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$ , volume de injeção  $100 \mu\text{L}$ . (A) BIA-MPA usando o ECV no potencial de oxidação + 0,3 V, limpeza + 1,3 V e condicionamento 0 V vs Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub>; (B) Respectiva curva de calibração; (C) BIA-AC usando o eletrodo de ECI no potencial + 0,2 V vs Ag (ERP); (D) Respectiva curva de calibração.



Fonte: Autora do trabalho.

Tabela 8.2: Características analíticas obtidas pelos métodos BIA-MPA e BIA-AC para determinação de quercetina.

Características Analíticas	BIA-MPA (ECV)	BIA-AC (ECI)
Range linear / $\mu\text{mol L}^{-1}$	10 – 150	10 - 150
Sensibilidade / $\mu\text{A } \mu\text{mol L}^{-1}$	0,182	0,128
LD / $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,004	0,027
LQ / $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,015	0,091
Frequência / $\text{h}^{-1}$	120	120

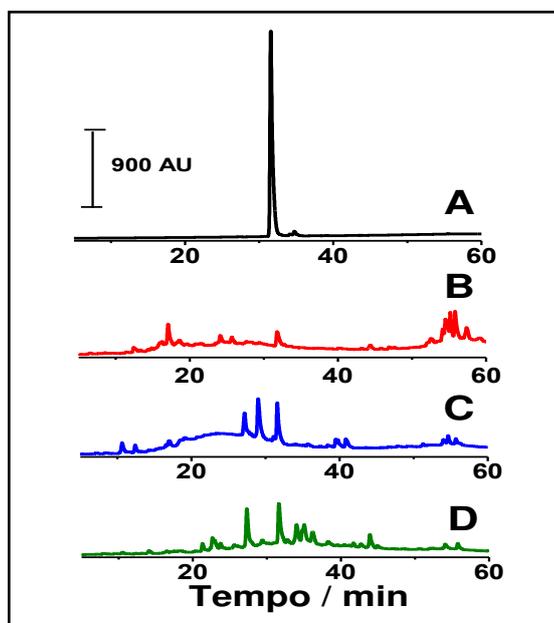
LD =  $(3 \times S_b/m)$  onde  $S_b$  representa o desvio padrão do sinal em branco e  $m$  a sensibilidade (inclinação da curva de calibração) e LQ =  $(10 \times S_b/m)$ .

Fonte: Autora do trabalho.

## ARTIGO 3

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi utilizada para fazer uma comparação com os resultados obtidos na determinação da quercetina nos extratos hidroalcoólicos utilizando o ECV e o ECI pelos métodos propostos. Nas condições experimentais empregadas, a quercetina apresentou um tempo de retenção de 31,5 minutos. As análises de HPLC foram feitas em triplicatas da solução padrão de quercetina e de cada solução de extrato. A Figura 8.10 mostra o perfil de uma injeção de cada análise. Os resultados obtidos para quantificação dos métodos BIA-MPA, BIA-AC e HPLC por cromatografia estão apresentados na Tabela 8.3 e mostram que a precisão e exatidão dos resultados obtidos pelos métodos propostos para determinação da quercetina são semelhantes aos apresentados por HPLC-UV.

**Figura 8.10:** Cromatogramas da solução padrão quercetina (A) e das amostras dos extratos vegetais BU (B), VG (C), AB-MA (D) (detector UV  $\lambda = 245$  nm).



Fonte: Autora do trabalho.

**Tabela 8.3:** Comparação dos resultados obtidos para determinação de quercetina por BIA-MPA, BIA-AC e HPLC (resultado médio, n = 3).

Amostras	BIA-MPA (ECV) mmol L <sup>-1</sup>	BIA-AC (ECI) mmol L <sup>-1</sup>	HPLC mmol L <sup>-1</sup>
BU	0,186 ± 0,006	0,185 ± 0,003	0,184 ± 0,009
VG	0,352 ± 0,003	0,358 ± 0,003	0,346 ± 0,012
AB-MA	0,628 ± 0,008	0,635 ± 0,004	0,643 ± 0,016

Fonte: Autora do trabalho.

### ARTIGO 3

A exatidão do método também foi avaliada pelo método de adição e recuperação e os resultados obtidos (Figura 8.9) apresentaram valores ente 98,19% e 99,70% para o método BIA-MPA e valores entre 98,12% e 98,97% para BIA-AC (Tabela 8.4), indicando a ausência de efeito de matriz nas amostras para ambos os métodos.

**Tabela 8.4:** Valores de recuperação obtidos pela análise em BIA-MPA e BIA-AC após fortificação com amostra padrão de quercetina ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).

Amostra	BIA-MPA (ECV)			BIA-AC (ECI)		
	Quercetina ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )		Recuperado %	Quercetina ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )		Recuperado %
	Adicionado	Encontrado		Adicionado	Encontrado	
VG	25,0	24,55 $\pm$ 0,22	98,19	25,0	24,53 $\pm$ 0,08	98,12
	50,0	49,85 $\pm$ 0,35	99,70	50,0	49,47 $\pm$ 0,12	98,97
	75,0	74,18 $\pm$ 0,32	98,91	75,0	73,89 $\pm$ 0,30	98,53

Fonte: Autora do trabalho.

Finalmente avaliações dos estudos de interferentes foram realizadas para demonstrar a robustez do método e validar seu uso. A seletividade dos métodos para determinação de quercetina em amostras de extratos vegetais foi investigada considerando possíveis interferências de dois compostos (rutina e catequina), que têm estruturas moleculares semelhantes às da quercetina (Figura 8.1). Experimentos (Apêndice B) foram realizados usando uma solução padrão de 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de quercetina na presença dos interferentes na solução padrão: concentração interferente proporções de 1: 1, 1: 2, 1:3 e 1:5. Os sinais atuais obtidos para estas soluções foram comparados com as obtidas para a solução padrão na ausência de quaisquer interferentes para ambos eletrodos. Para o método BIA-MPA (ECV), tanto rutina quanto catequina não mostraram qualquer interferência significativa, exceto na proporção de concentração de 1:3 para catequina e 1:5 para rutina, assumindo um limite de tolerância correspondendo a um erro relativo de  $\pm 5\%$ . Por outro lado, quando o método BIA-AC (ECI) foi avaliado, nem rutina e nem catequina mostraram qualquer interferência significativa, exceto na proporção de concentração de 1:2 para catequina e 1:3 para rutina, assumindo um limite de tolerância correspondendo a um erro relativo de  $\pm 5\%$ .

#### 8.4. Conclusão

Os métodos propostos para determinação de quercetina em extratos vegetais usando BIA-MPA com o ECV e BIA-AD com um ECI apresentaram resultados favoráveis como: baixo custo operacional, procedimento simples de preparo das amostras (somente dissolução e diluição), alta frequência analítica, alta precisão, baixo consumo de reagente e amostras e, conseqüentemente, geração de pequena quantidade de resíduos por análise. Além

**ARTIGO 3**

disso, os métodos apresentaram resultados comparáveis aos obtidos por HPLC. Adicionalmente, as características de portabilidade dos sistemas BIA, permitem serem aplicados em análises no campo.

**8.5. Referências**

ABDELKAWY, K. S.; BALYSHEV, M. E.; ELBARBRY, F. A new validated HPLC method for the determination of quercetin: Application to study pharmacokinetics in rats. **Biomedical Chromatography**, v. 31, n. 3, p. 3819, 2017.

BACKES, R. S.; GUEDES, T. J.; DOS SANTOS, W. T.; DA SILVA, R. A. Determinação rápida e simples de citrato de sildenafil (viagra® e genéricos) empregando eletrodo impresso de carbono em sistemas fia e bia com detecção amperométrica. **Química Nova**, v. 40, n. 7, p. 752-759, 2017.

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, n. 1, p. 191–203, 2006.

BRETT, A. M. O.; GHICA, M. E., Electrochemical oxidation of quercetin. **Electroanalysis**, v. 15, n. 22, p. 1745-1750, 2003.

D'ANDREA, G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications?. **Fitoterapia**, v. 106, p. 256–271, 2015.

DA ROCHA, C. Q.; DE FARIA, F. M.; MARCOURT, L.; EBRAHIMI, S. N.; KITANO, B. T.; GHILARDI, A. F.; FERREIRA, A. L.; DE ALMEIDA, A. C. A.; DUNDER, R. J.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; HAMBURGER, M.; VILEGAS, W.; QUEIROZ, E. F.; WOLFENDER, J-L. Gastroprotective effects of hydroethanolic root extract of *Arrabidaea brachypoda*: Evidences of cytoprotection and isolation of unusual glycosylated polyphenols. **Phytochemistry**, v. 135, p. 93-105, 2017.

DROPSSENS. Disponível em:

<[http://www.dropsens.com/en/screen\\_printed\\_electrodes\\_pag.html](http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html)>. Acesso em 30 de junho de 2018.

FREITAS, J. M.; OLIVEIRA, T. C.; GIMENES, D. T.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Simultaneous determination of three species with a single-injection step using batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection. **Talanta**, v. 146, p. 670–675, 2016.

GIMENES, D. T.; MARRA, M. C.; DE FREITAS, J. M.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Simultaneous determination of captopril and hydrochlorothiazide on boron-doped diamond electrode by batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 212, p. 411-418, 2015.

MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ, M.; ŠERUGA, M.; JAKOBEK, L.; NOVAK, I. Electrochemical and antioxidant properties of (+)-catechin, quercetin and rutin. **Croatica chemica acta**, v. 83, n. 2, p. 197–207, 2010.

PEREIRA, P. F.; SILVA, W. P.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. A simple and fast batch injection analysis method for simultaneous determination of phenazopyridine, sulfamethoxazole, and trimethoprim on boron-doped diamond electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 766, p. 87–93, 2016.

PLIUTA, K.; CHEBOTAREV, A.; KOICHEVA, A.; BEVZIUK, K.; SNIGUR, D. Development of a novel voltammetric sensor for the determination of quercetin onto electrochemically pretreated carbon-paste electrode. **Analytical Methods**, v. 10, n. 12, p. 1472-1479, 2018.

RIBEIRO, G. A. C., DA ROCHA, C. Q., TANAKA, A. A.; DA SILVA, I. S. A fast, direct, and sensitive analysis method for catechin determination in green tea by batch injection analysis with multiple-pulse amperometry (BIA-MPA). **Analytical Methods**, v. 10, n. 17, p. 2034-2040, 2018.

RICHTER, E. M.; TORMIN, T. F.; CUNHA, R. R.; SILVA, W. P.; PÉREZ-JUNQUERA, A.; FANJUL-BOLADO, P.; HERNANDEZ-SANTOS, D.; MUÑOZ, R. A. A compact batch injection analysis cell for screen printed electrodes: A portable electrochemical system for on-site analysis. **Electroanalysis**, v. 28, n. 8, p. 1856-1859, 2016.

SHAI DAROVA, L. G.; CHELNOKOVA, I. A.; DEGTEVA, M. A.; MAKHMUTOVA, G. F.; LEKSINA, Y. A.; GEDMINA, A. V.; BUDNIKOV, G. K. Amperometric detection under batch-injection analysis conditions of caffeine on an electrode modified by mixed-valence iridium and ruthenium oxides. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 49, n. 10, p. 49-52, 2016.

TORMIN, T. F.; CUNHA, R. R.; DA SILVA, R. A. B.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Combination of screen-printed electrodes and batch injection analysis: A simple, robust, highthroughput, and portable electrochemical system. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 202, p. 93-98, 2014.

OLIVEIRA, G. K. F.; TORMIN, T. F.; MONTES, R. H. de O.; RICHTER, E. M.; MUÇOZ, R. A. A. Electrochemical oxidation of astaxanthin on glassy carbon electrode and its amperometric determination using batch injection analysis (BIA). **Electroanalysis**, v. 28, n. 9, p. 2143 – 2148, 2016.

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, n. 1, p. 139-148, 2006.

WANG, J.; TAHA Z. Batch injection analysis. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 1053-1056, 1991.

WANG, W.; SUN, C.; MAO, L.; MA, P.; LIU, F.; Yang, J.; GAO, Y. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 56, p. 21-38, 2016.

---

---

*Capítulo 8*



*Considerações finais*

---

---

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

O presente trabalho demonstrou ótimos resultados na utilização da técnica análise por injeção em batelada com detecção amperométrica convencional (na determinação de quercetina usando eletrodo impresso comercial) e com amperometria de múltiplos pulsos (na determinação de catequina e quercetina usando um eletrodo de carbono vítreo). Para as determinações da catequina, foram utilizadas matrizes complexas como chá verde e extratos vegetais para determinação de quercetina.

A possibilidade de aplicação dos pulsos de potenciais de limpeza e condicionamento foi eficiente para evitar a passivação / contaminação / desativação do eletrodo de trabalho na maioria dos casos, exceto para a determinação da quercetina com o ECI que utilizou a amperometria convencional mostrando que não houve passivação por produtos de oxidação.

Os estudos propostos para determinação de cada substância bioativa apresentaram ótimos resultados em relação à sensibilidade, seletividade, repetibilidade ( $DPR < 3,5\%$ ), mesmo usando eletrodos não modificados.

Os resultados obtidos por BIA-MPA foram semelhantes aos obtidos por HPLC a um nível de confiança de 95%. No entanto, o método proposto apresenta vantagens, como simplicidade, portabilidade, alta frequência analítica (75 a 120 injeções  $h^{-1}$ ), baixo custo (de aquisição e manutenção), uso de pequenas quantidades de reagentes e amostras (geração mínima de resíduos por análise), etapas simples de preparo das amostras (somente dissolução e/ou diluição) e potencialidade para aplicações no campo.

Os aspectos acima mencionados fazem dos métodos aqui apresentados muito atrativos para a determinação de substâncias bioativas em diversas matrizes e abrem perspectivas de trabalhos futuros, dentre os quais empregar o sistema proposto com eletrodos modificados na determinação de analitos de interesses de áreas afins.

---

---

*Capítulo 9*



*Apêndice*

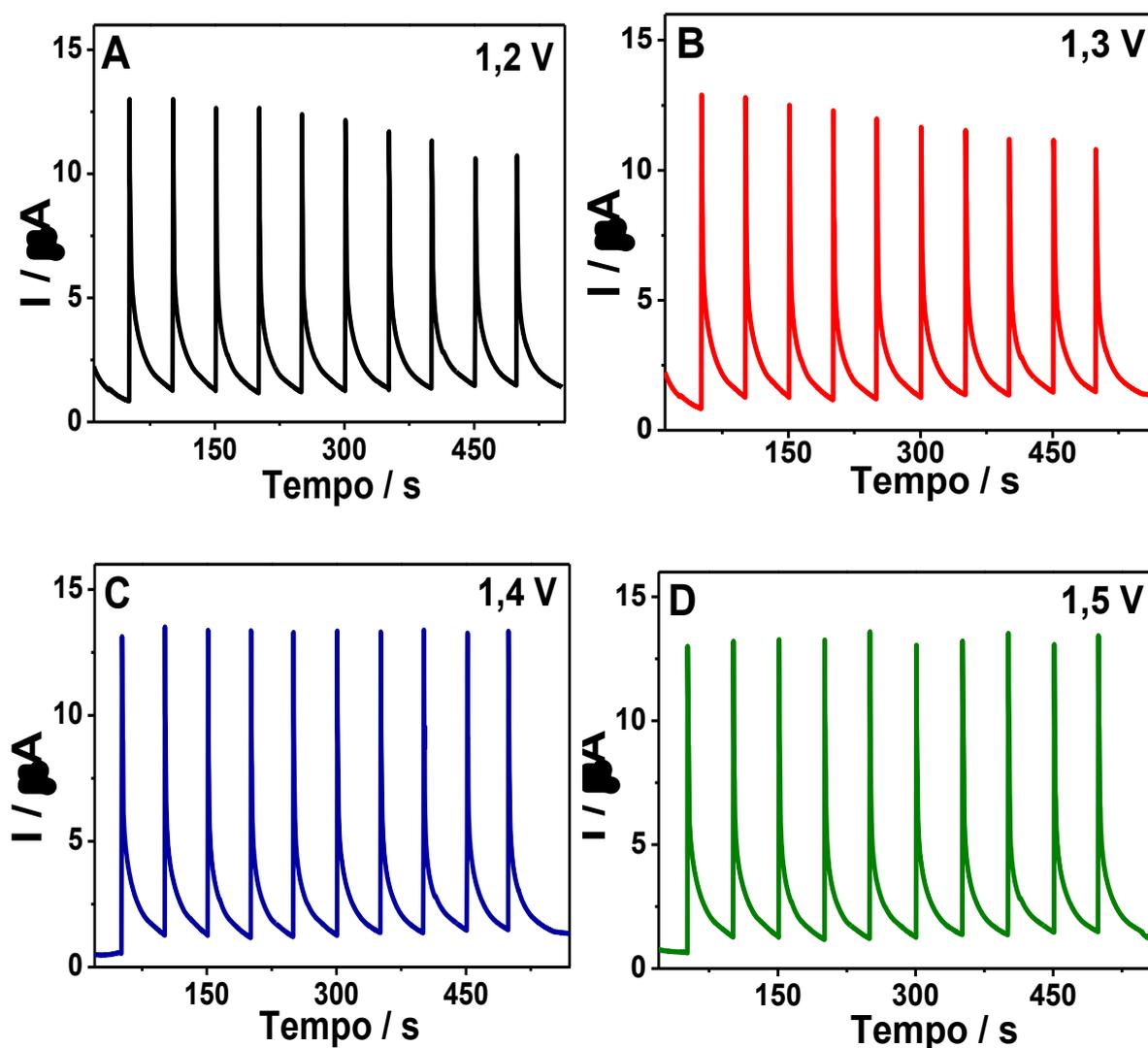
---

---

## APÊNDICE A - RESULTADOS PRELIMINARES NO ESTUDO DA CATEQUINA

### A.1. Avaliação do potencial de limpeza do ECV

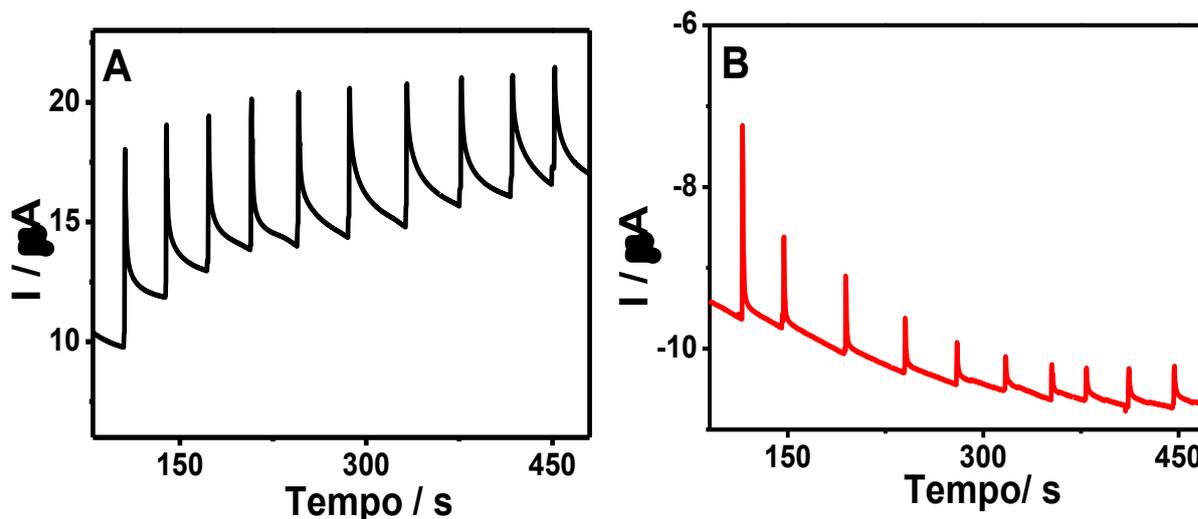
Figura 9.1: Amperogramas obtidos pelo sistema do BIA-MPA com ECV para dez ( $n=10$ ) injeções de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de catequina em solução tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,5, volume de injeção  $100 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção da micropipeta programável  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$  e  $0,1 \text{ s}$  como tempo de pulso aplicado. (A) potenciais  $0,4 \text{ V}$  (potencial de oxidação),  $1,2 \text{ V}$  (potencial de limpeza) e  $0,0 \text{ V}$  (potencial de condicionamento) vs  $\text{Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ ,  $\text{DPR} = 8,28\%$ ; (B) potenciais  $0,4 \text{ V}$  (potencial de oxidação),  $1,3 \text{ V}$  (potencial de limpeza) e  $0,0 \text{ V}$  (potencial de condicionamento) vs  $\text{Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ ,  $\text{DPR} = 7,11\%$ ; (C) potenciais  $0,4 \text{ V}$  (potencial de oxidação),  $1,4 \text{ V}$  (potencial de limpeza) e  $0,0 \text{ V}$  (potencial de condicionamento) vs  $\text{Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ ,  $\text{DPR} = 0,82\%$ ; e (D) potenciais  $0,4 \text{ V}$  (potencial de oxidação),  $1,5 \text{ V}$  (potencial de limpeza) e  $0,0 \text{ V}$  (potencial de condicionamento) vs  $\text{Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ ,  $\text{DPR} = 0,80\%$ .



Fonte: Autora do trabalho.

### A.2. Avaliação da utilização de dois potenciais no sistema BIA-MPA

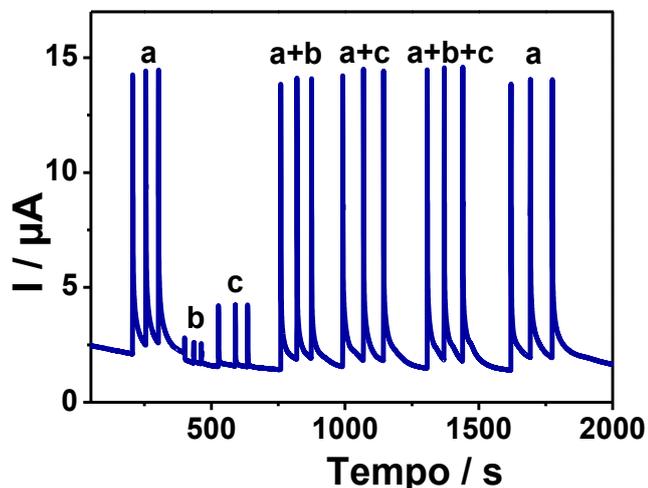
Figura 9.2: Amperogramas obtidos pelo sistema do BIA-MPA com ECV para 10 injeções de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de catequina em solução tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,5, volume de injeção  $100 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção da micropipeta programável  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$  e  $0,1 \text{ s}$  como tempo de pulso aplicado. (A) potenciais  $+0,4 \text{ V}$  e  $0 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ , média das correntes  $6,06 \pm 0,83 \mu\text{A}$ ,  $\text{DPR} = 13,67\%$ ; (B) potenciais  $+0,4 \text{ V}$  e  $1,4 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ , média das correntes  $0,84 \pm 0,63 \mu\text{A}$   $\text{DPR} = 75,10\%$ .



Fonte: Autora do trabalho.

### A.3. Avaliação de interferentes (BIA-MPA)

Figura 9.3: Amperograma obtido pelo sistema BIA-MPA com ECV para injeções em triplicatas ( $n=3$ ) contendo concentrações de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ : (a) catequina, (b) quercitrina, (c) rutina. Condições: solução tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,5; volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção da micropipeta programável  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$  e  $0,1 \text{ s}$  como tempo de pulso aplicado nos potenciais  $+0,4 \text{ V}$ ,  $+1,4 \text{ V}$  e  $0,0 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ .



Fonte: Autora do trabalho.

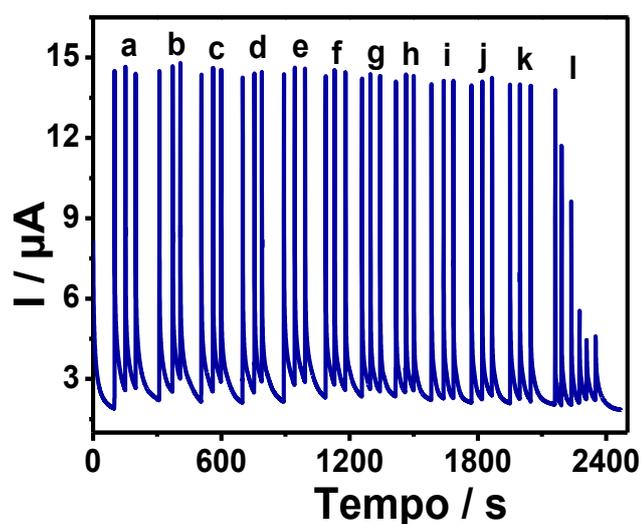
## APÊNDICE A

Tabela 9.1: Efeito dos interferentes quercitrina e rutina na determinação da catequina.

Amostras [50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ]	Média das Correntes ( $\mu\text{A}$ )	DPR %
Catequina	12,06 $\pm$ 0,03	0,24
Quercitrina	0,92 $\pm$ 0,02	1,74
Rutina	2,73 $\pm$ 0,03	1,05
Catequina + quercitrina	12,24 $\pm$ 0,04	0,30
Catequina + rutina	12,43 $\pm$ 0,03	0,32
Catequina + quercitrina + rutina	12,62 $\pm$ 0,03	0,26

Fonte: Autora do trabalho.

Figura 9.4: Amperograma obtido pelo sistema BIA-MPA com ECV para injeções em triplicatas ( $n=3$ ) de soluções contendo concentrações de 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de catequina e diferentes concentrações de quercitrina: (a) catequina; (b) catequina e quercitrina 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (c) catequina e quercitrina 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (d) catequina e quercitrina 150  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (e) catequina e quercitrina 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (f) catequina e quercitrina 250  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (g) catequina e quercitrina 300  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (h) catequina e quercitrina 350  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (i) catequina e quercitrina 400  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (j) catequina e quercitrina 450  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (k) catequina e quercitrina 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (l) catequina e quercitrina 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições: solução tampão acetato 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 4,5; volume de injeção: 100  $\mu\text{L}$ ; velocidade de injeção da micropipeta programável 76,92  $\mu\text{L s}^{-1}$  e 0,1 s como tempo de pulso aplicado nos potenciais 0,4 V, 1,4 V e 0,0 V vs Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub>.



Fonte: Autora do trabalho.

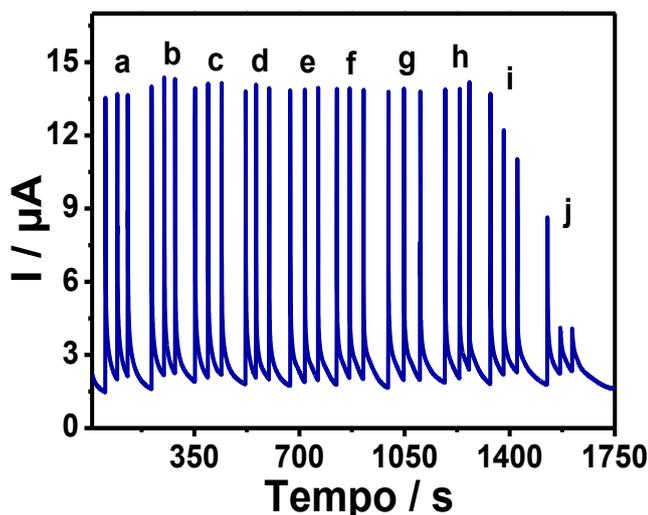
## APÊNDICE A

Tabela 9.2: Efeito da quercitrina em diferentes concentrações na determinação da catequina.

Amostras [ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ]	Média das Correntes ( $\mu\text{A}$ )	DPR %
Catequina [50]	$12,03 \pm 0,02$	0,20
Catequina [50] e quercitrina [50]	$12,00 \pm 0,02$	0,18
Catequina [50] e quercitrina [100]	$11,84 \pm 0,01$	0,09
Catequina [50] e quercitrina [150]	$11,83 \pm 0,06$	0,54
Catequina [50] e quercitrina [200]	$11,82 \pm 0,01$	0,10
Catequina [50] e quercitrina [250]	$11,80 \pm 0,01$	0,11
Catequina [50] e quercitrina [300]	$11,79 \pm 0,03$	0,22
Catequina [50] e quercitrina [350]	$11,73 \pm 0,03$	0,22
Catequina [50] e quercitrina [400]	$11,75 \pm 0,05$	0,43
Catequina [50] e quercitrina [450]	$11,74 \pm 0,05$	0,38
Catequina [50] e quercitrina [500]	$11,57 \pm 0,02$	0,18
Catequina [50] e quercitrina [1000]	$7,04 \pm 3,74$	53,09

Fonte: Autora do trabalho.

Figura 9.5: Amperograma obtido pelo sistema BIA-MPA com ECV para injeções em triplicatas ( $n=3$ ) de soluções contendo concentrações de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de catequina e diferentes concentrações de rutina: (a) catequina; (b) catequina e rutina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (c) catequina e rutina  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (d) catequina e rutina  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (e) catequina e rutina  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (f) catequina e rutina  $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (g) catequina e rutina  $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (h) catequina e rutina  $350 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (i) catequina e rutina  $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (j) catequina e rutina  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições: solução tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,5; volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção da micropipeta programável  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$  e  $0,1 \text{ s}$  como tempo de pulso aplicado nos potenciais  $0,4 \text{ V}$ ,  $1,4 \text{ V}$  e  $0,0 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ .



Fonte: Autora do trabalho.

## APÊNDICE A

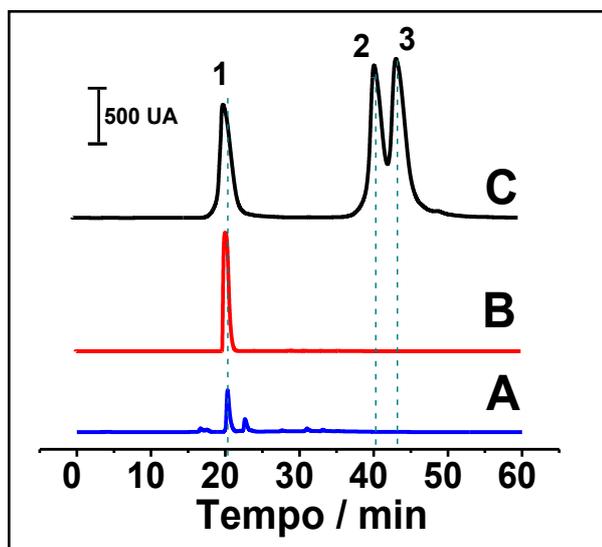
Tabela 9.3: Efeito da rutina em diferentes concentrações na determinação da catequina.

Amostras [ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ]	Média das Correntes ( $\mu\text{A}$ )	DPR %
Catequina [50]	$11,93 \pm 0,04$	0,26
Catequina [50] e rutina [50]	$12,11 \pm 0,04$	0,28
Catequina [50] e rutina [100]	$12,07 \pm 0,03$	0,24
Catequina [50] e rutina [150]	$12,09 \pm 0,03$	0,25
Catequina [50] e rutina [200]	$12,13 \pm 0,03$	0,23
Catequina [50] e rutina [250]	$12,10 \pm 0,03$	0,24
Catequina [50] e rutina [300]	$12,07 \pm 0,03$	0,26
Catequina [50] e rutina [350]	$12,04 \pm 0,03$	0,28
Catequina [50] e rutina [400]	$12,02 \pm 1,61$	15,77
Catequina [50] e rutina [500]	$3,36 \pm 2,98$	88,89

Fonte: Autora do trabalho.

### A.4. Avaliação de interferentes por HPLC na determinação de catequina em chá verde

Figura 9.6: Cromatogramas registrados para amostra de chá verde (A), da solução padrão de catequina (B) e da solução de misturas de padrões (C) (catequina (1), quercitrina (2) e rutina (3)) por detector de UV, 270 nm.



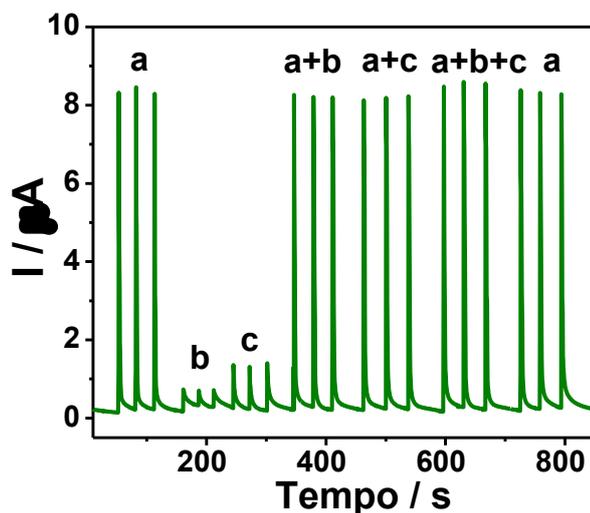
Fonte: Autora do trabalho.

As análises foram realizadas em triplicatas, os solventes de eluição foram acidificados com 0,02% de ácido fórmico em água (eluente A) e 0,02% de ácido fórmico em metanol (eluente B), a uma taxa de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , empregando um gradiente de 0% a 100% de B em 60 min e tempo adicional de 60 min a 70 min com 100% de B para limpeza do sistema. A coluna foi mantida a temperatura ambiente e o volume de injeção da amostra foi de  $10 \mu\text{L}$ . Os dados foram coletados e processados usando o software Shimadzu LC Solution v. 1.25.

## APÊNDICE A

### A.5. Avaliação de interferentes na determinação de catequina (BIA-AC)

Figura 9.7: Amperograma obtido pelo sistema BIA com eletrodo de carbono impresso para injeções em triplicatas ( $n=3$ ) contendo concentrações de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ : (a) catequina, (b) quercetina e (c) rutina. Condições: Eletrólito suporte solução tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,5, volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção da micropipeta programável  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$  e potencial  $0,3 \text{ V vs ERP}$ .



Fonte: Autora do trabalho.

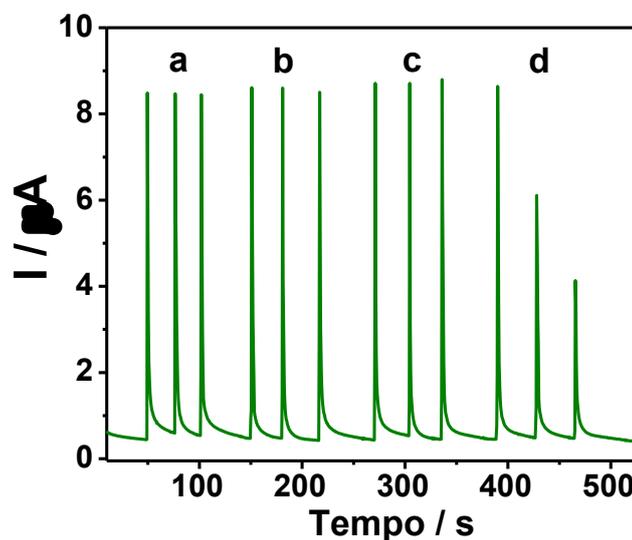
Tabela 9.4: Efeito dos interferentes quercetina e rutina na determinação da catequina (ECI).

Amostras [ $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ]	Média das Correntes ( $\mu\text{A}$ )	DPR %
Catequina	$8,08 \pm 0,08$	1,05
Rutina	$0,51 \pm 0,02$	4,69
Quercetina	$1,14 \pm 0,05$	4,24
Catequina e rutina	$7,94 \pm 0,04$	0,5
Catequina e quercetina	$8,39 \pm 0,08$	0,67
Catequina, rutina e quercetina	$8,66 \pm 0,08$	0,89

Fonte: Autora do trabalho.

## APÊNDICE A

Figura 9.8: Amperograma obtido pelo sistema BIA-AC com eletrodo de ECI para injeções em triplicatas (n=3) de soluções contendo concentrações de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de catequina e diferentes concentrações de quercetina: (a) catequina; (b) catequina e quercetina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (c) catequina e quercetina  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (d) catequina e quercetina  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições: Eletrólito suporte solução tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,5, volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção da micropipeta programável  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$  e potencial  $0,3 \text{ V vs ERP}$ .



Fonte: Autora do trabalho.

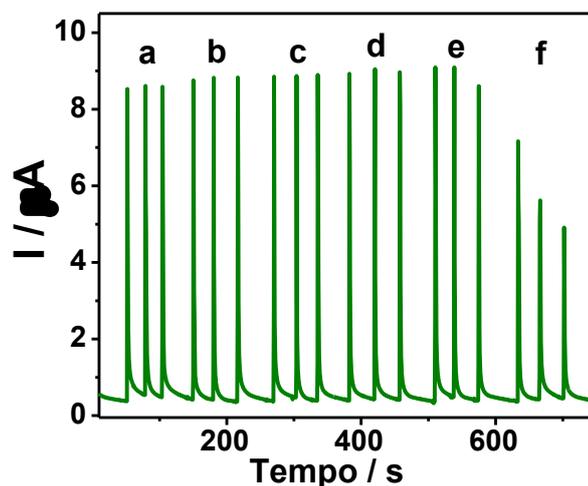
Tabela 9.5: Efeito da rutina em diferentes concentrações na determinação da catequina (C-SPE).

Amostras [ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ]	Média das Correntes ( $\mu\text{A}$ )	DPR %
Quercetina [50]	$7,93 \pm 0,08$	1,04
Quercetina [50] e rutina [50]	$8,11 \pm 0,03$	0,42
Quercetina [50] e rutina [100]	$8,26 \pm 0,08$	1,00
Quercetina [50] e rutina [150]	$2,27 \pm 2,27$	38,98

Fonte: Autora do trabalho.

## APÊNDICE A

Figura 9.9: Amperograma obtido pelo sistema BIA-AC com eletrodo de ECI para injeções em triplicatas ( $n=3$ ) de soluções contendo concentrações de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de catequina e diferentes concentrações de rutina: (a) catequina; (b) catequina e rutina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (c) catequina e rutina  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (d) catequina e rutina  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (e) catequina e rutina  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  e catequina e rutina  $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições: Eletrólito suporte solução tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,5, volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção da micropipeta programável  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$  e potencial  $0,3 \text{ V vs ERP}$ .



Fonte: Autora do trabalho.

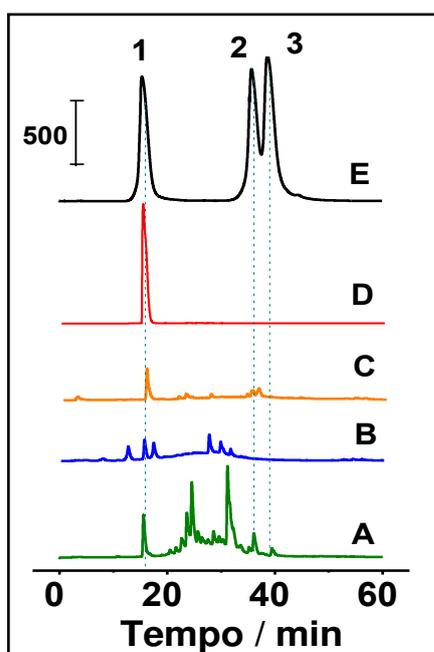
Tabela 9.6: Efeito da rutina em diferentes concentrações na determinação da catequina (C-SPE).

Amostras [ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ]	Média das Correntes ( $\mu\text{A}$ )	DPR %
Quercetina [50]	$8,06 \pm 0,02$	0,27
Quercetina [50] e rutina [50]	$8,39 \pm 0,06$	0,76
Quercetina [50] e rutina [100]	$8,43 \pm 0,05$	0,65
Quercetina [50] e rutina [150]	$8,54 \pm 0,05$	0,59
Quercetina [50] e rutina [200]	$8,48 \pm 0,27$	3,26
Quercetina [50] e rutina [250]	$5,46 \pm 1,18$	21,57

Fonte: Autora do trabalho.

**APÊNDICE A****A.6. Avaliação de interferentes por HPLC na determinação de catequina em extratos de plantas medicinais**

**Figura 9.10:** Cromatogramas registrados para solução dos extratos vegetais LP (A), RM (B) e AB-MG (C), da solução padrão de catequina (D) e da solução de misturas de padrões (E) (catequina (1), quercetina (2) e rutina (3)) por detector de UV, 280 nm.



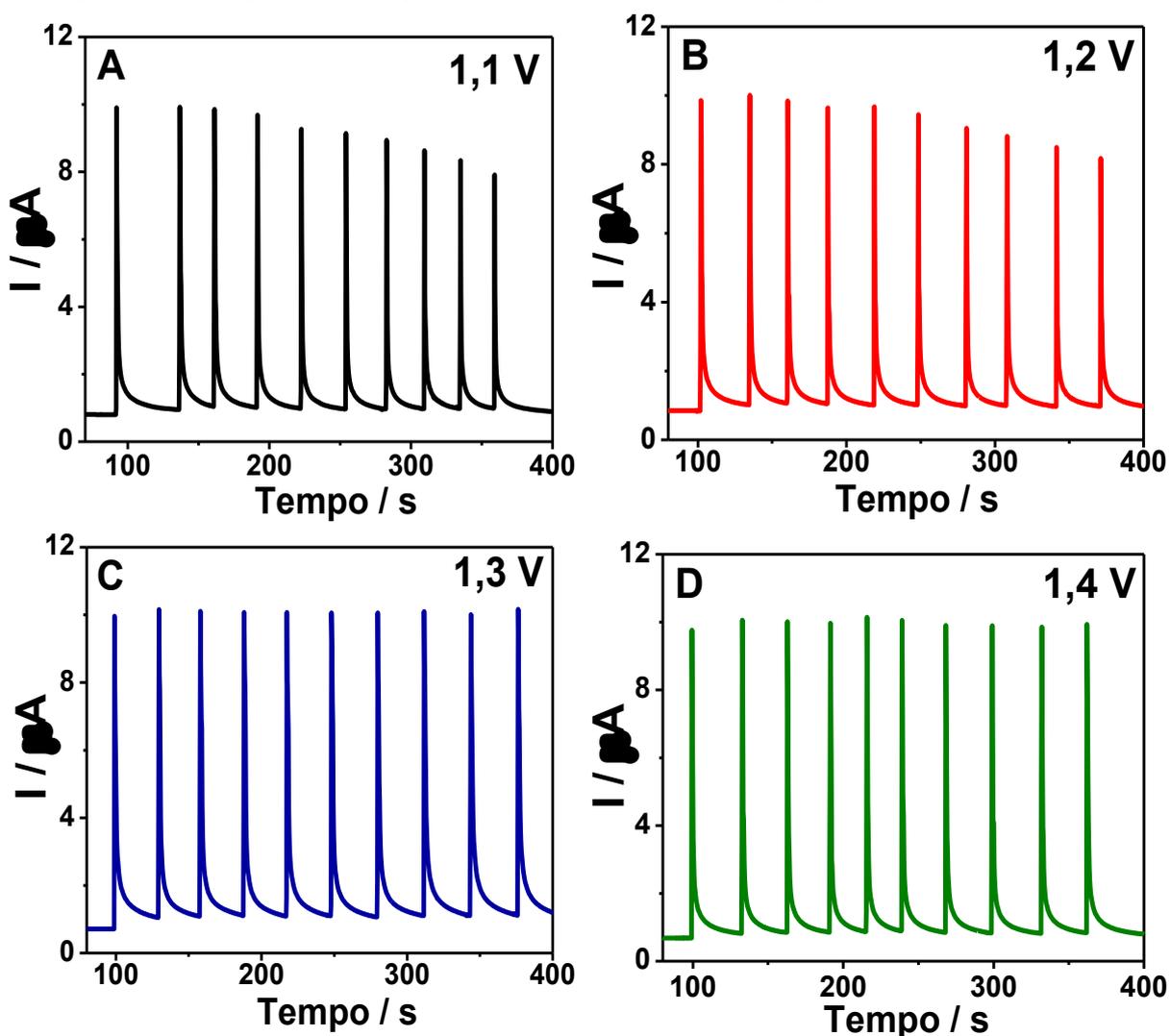
Fonte: Autora do trabalho.

As análises foram realizadas em triplicatas, os solventes de eluição foram água acidificada com 0,02% de ácido fórmico (eluente A) e metanol acidificado com 0,02% de ácido fórmico (eluente B), bombeados a uma taxa de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , empregando um gradiente de 0% até 100% B em 50 min e tempo adicional para limpeza do sistema de 50 min a 60 min com 100% B. A coluna foi mantida à temperatura ambiente e o volume de injeção da amostra foi de  $10 \mu\text{L}$ . A coleta e o processamento de dados foram realizados utilizando o software LC Solution v. 1.25 (Shimadzu).

## APÊNDICE B - RESULTADOS PRELIMINARES NO ESTUDO DA QUERCETINA

### B.1. Avaliação do potencial de limpeza do ECV

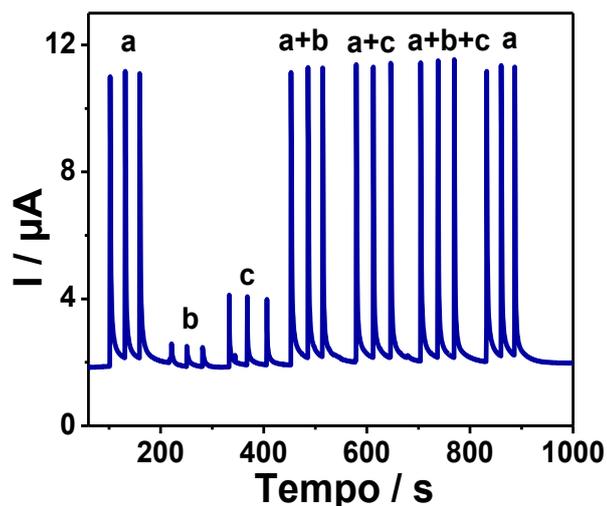
Figura 9.11: Amperogramas obtidos pelo sistema do BIA-MPA com ECV para dez ( $n=10$ ) injeções de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de quercetina em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,0 água/etanol (80/20), volume de injeção  $100 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção da micropipeta programável  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$  e  $0,1 \text{ s}$  como tempo de pulso aplicado. (A) potenciais + 0,3 V (potencial de oxidação), + 1,1 V (potencial de limpeza) e 0,0 V (potencial de condicionamento) vs Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub>, DPR= 8,19%; (B) potenciais + 0,3 V (potencial de oxidação), + 1,2 V (potencial de limpeza) e 0,0 V (potencial de condicionamento) vs Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub>, DPR= 7,63%; (C) potenciais + 0,3 V (potencial de oxidação), + 1,3 V (potencial de limpeza) e 0,0 V (potencial de condicionamento) vs Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub>, 3,0 M, DPR= 0,70%; e (D) potenciais 0,3 V (potencial de oxidação), + 1,4 V (potencial de limpeza) e 0,0 V (potencial de condicionamento) vs Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub> DPR= 0,65%.



Fonte: Autora do trabalho.

## B.2. Avaliação de interferentes (BIA-MPA)

Figura 9.12: Amperograma obtido pelo sistema BIA-MPA com ECV para injeções em triplicatas (n=3) contendo concentrações de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ : (a) quercetina, (b) rutina, (c) catequina. Eletrólito suporte solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,0 água/etanol (80/20); volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção da micropipeta programável  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$  e  $0,1 \text{ s}$  como tempo de pulso aplicado nos potenciais  $+ 0,3 \text{ V}$ ,  $+ 1,3 \text{ V}$  e  $0,0 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ .



Fonte: Autora do trabalho.

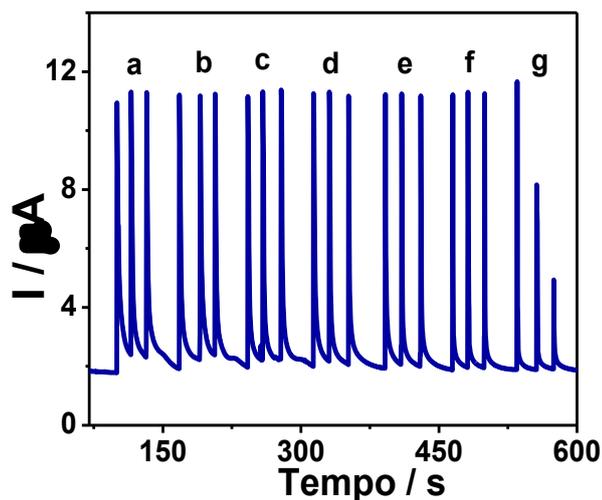
Tabela 9.7: Efeito dos interferentes rutina e catequina na determinação da quercetina (ECV).

Amostras [ $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ]	Média das Correntes ( $\mu\text{A}$ )	DPR %
Quercetina	$9,10 \pm 0,03$	0,34
Rutina	$0,72 \pm 0,01$	0,97
Catequina	$2,20 \pm 0,01$	0,46
Quercetina e rutina	$9,21 \pm 0,05$	0,51
Quercetina e catequina	$9,36 \pm 0,02$	0,22
Quercetina, rutina e catequina	$9,44 \pm 0,03$	0,34

Fonte: Autora do trabalho.

## APÊNDICE B

Figura 9.13: Amperograma obtido pelo sistema BIA-MPA com ECV para injeções em triplicatas (n=3) de soluções contendo concentrações de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de quercetina e diferentes concentrações de rutina: (a) quercetina; (b) quercetina e rutina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (c) quercetina e rutina  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (d) quercetina e rutina  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (e) quercetina e rutina  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (f) quercetina e rutina  $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (g) quercetina e rutina  $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Eletrólito suporte solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,0 água/etanol (80/20); volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção da micropipeta programável  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$  e  $0,1 \text{ s}$  como tempo de pulso aplicados nos potenciais  $0,3 \text{ V}$ ,  $1,3 \text{ V}$  e  $0,0 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ .



Fonte: Autora do trabalho.

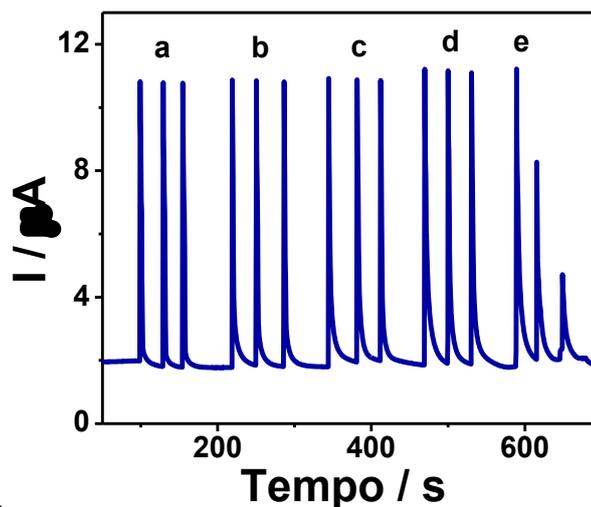
Tabela 9.8: Efeito da rutina em diferentes concentrações na determinação da quercetina (ECV).

Amostras [ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ]	Média das Correntes ( $\mu\text{A}$ )	DPR %
Quercetina [50]	$9,05 \pm 0,02$	0,25
Quercetina [50] e rutina [50]	$9,17 \pm 0,03$	0,32
Quercetina [50] e rutina [100]	$9,23 \pm 0,02$	0,27
Quercetina [50] e rutina [150]	$9,27 \pm 0,02$	0,26
Quercetina [50] e rutina [200]	$9,31 \pm 0,03$	0,28
Quercetina [50] e rutina [250]	$9,42 \pm 0,03$	0,35
Quercetina [50] e rutina [300]	$6,40 \pm 3,34$	52,15

Fonte: Autora do trabalho.

## APÊNDICE B

Figura 9.14: Amperograma obtido pelo sistema BIA-MPA com ECV para injeções em triplicatas (n=3) de soluções contendo concentrações de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de quercetina e diferentes concentrações de catequina: (a) quercetina; (b) quercetina e catequina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (c) quercetina e catequina  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (d) quercetina e catequina  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (e) quercetina e catequina  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Eletrólito suporte solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,0 água/etanol (80/20); volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção da micropipeta programável  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$  e  $0,1 \text{ s}$  como tempo de pulso aplicado nos potenciais  $+ 0,3 \text{ V}$ ,  $+ 1,3 \text{ V}$  e  $0,0 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ .



Fonte: Autora do trabalho.

Tabela 9.9: Efeito da catequina em diferentes concentrações na determinação da quercetina (ECV).

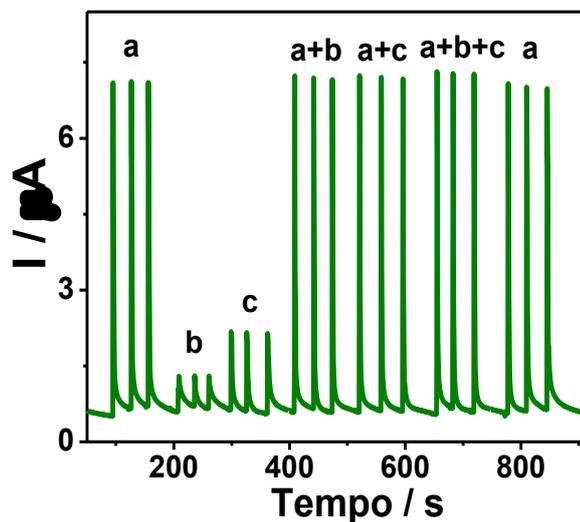
Amostras [ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ]	Média das Correntes ( $\mu\text{A}$ )	DPR %
Quercetina [50]	$9,00 \pm 0,02$	0,23
Quercetina [50] e catequina [50]	$9,15 \pm 0,03$	0,27
Quercetina [50] e catequina [100]	$9,28 \pm 0,03$	0,28
Quercetina [50] e catequina [150]	$9,40 \pm 0,02$	0,32
Quercetina [50] e catequina [200]	$6,21 \pm 3,38$	54,45

Fonte: Autora do trabalho.

## APÊNDICE B

### B.3. Avaliação de interferentes na determinação da quercetina (BIA-AC)

Figura 9.15: Amperograma obtido pelo sistema BIA-AC com ECI para injeções em triplicatas (n=3) contendo concentrações de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ : (a) quercetina, (b) rutina, (c) catequina. Condições: Eletrólito suporte solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,0 água/etanol (80/20); volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção da micropipeta programável  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$  e potencial  $0,2 \text{ V vs ERP}$ .



Fonte: Autora do trabalho.

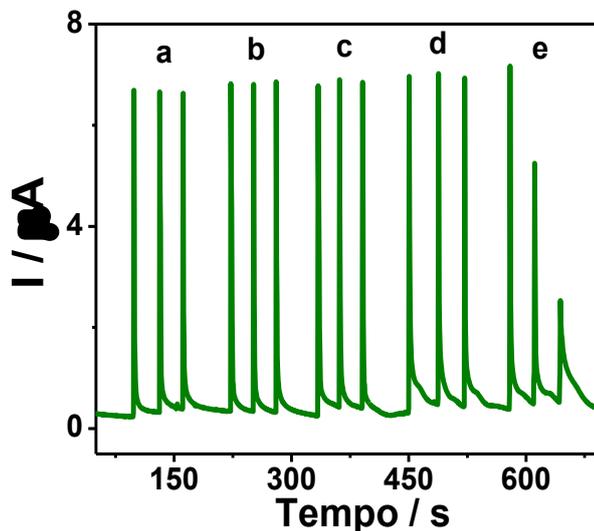
Tabela 9.10: Efeito dos interferentes rutina e catequina na determinação da quercetina (ECI).

Amostras [ $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ]	Média das Correntes ( $\mu\text{A}$ )	DPR %
Quercetina	$6,52 \pm 0,02$	0,26
Rutina	$0,64 \pm 0,01$	1,56
Catequina	$1,58 \pm 0,02$	0,97
Quercetina e rutina	$6,61 \pm 0,02$	0,20
Quercetina e catequina	$6,66 \pm 0,02$	0,26
Quercetina, rutina e catequina	$6,78 \pm 0,03$	0,28

Fonte: Autora do trabalho.

## APÊNDICE B

Figura 9.16: Amperograma obtido pelo sistema BIA-AC com o ECI para injeções em triplicatas (n=3) de soluções contendo concentrações de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de quercetina e diferentes concentrações de rutina: (a) quercetina; (b) quercetina e rutina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (c) quercetina e rutina  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (d) quercetina e rutina  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (e) quercetina e rutina  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições: Eletrólito suporte solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,0 água/etanol (80/20); volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção da micropipeta programável  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$  e  $0,2 \text{ V vs Ag (ERP)}$ .



Fonte: Autora do trabalho.

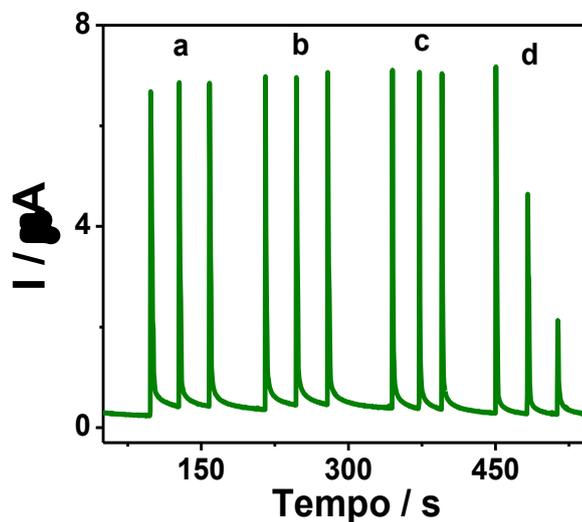
Tabela 9.11: Efeito da rutina em diferentes concentrações na determinação da quercetina (ECI).

Amostras [ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ]	Média das Correntes ( $\mu\text{A}$ )	DPR %
Quercetina [50]	$6,46 \pm 0,02$	0,28
Quercetina [50] e rutina [50]	$6,54 \pm 0,02$	0,29
Quercetina [50] e rutina [100]	$6,62 \pm 0,02$	0,27
Quercetina [50] e rutina [150]	$6,66 \pm 0,02$	0,31
Quercetina [50] e rutina [200]	$4,52 \pm 2,38$	52,70

Fonte: Autora do trabalho.

## APÊNDICE B

Figura 9.17: Amperograma obtido pelo sistema BIA-AC com o ECI para injeções em triplicatas (n=3) de soluções contendo concentrações de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de quercetina e diferentes concentrações de catequina: (a) quercetina; (b) quercetina e catequina  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (c) quercetina e catequina  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (d) quercetina e catequina  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições: Eletrólito suporte solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,0 água/etanol (80/20); volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção da micropipeta programável  $76,92 \mu\text{L s}^{-1}$  e potencial  $0,2 \text{ V vs ERP}$ .



Fonte: Autora do trabalho.

Tabela 9.12: Efeito da catequina em diferentes concentrações na determinação da quercetina (ECI).

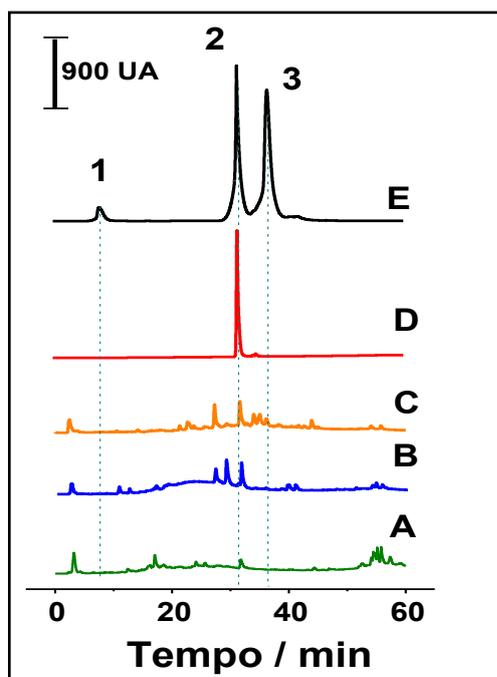
Amostras [ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ]	Média das Correntes ( $\mu\text{A}$ )	DPR %
Quercetina [50]	$6,51 \pm 0,02$	0,23
Quercetina [50] e catequina [50]	$6,62 \pm 0,02$	0,29
Quercetina [50] e catequina [100]	$6,75 \pm 0,02$	0,30
Quercetina [50] e catequina [150]	$4,41 \pm 2,48$	56,18

Fonte: Autora do trabalho.

## APÊNDICE B

## B.4. Avaliação de interferentes por HPLC na determinação de quercetina em extratos de plantas medicinais

Figura 9.18: Cromatogramas registrados para solução dos extratos vegetais BU (A), VG (B) e AB-MA (C), da solução padrão de quercetina (D) e da solução de misturas de padrões (E) (catequina (1), quercetina (2) e rutina (3)) por detector de UV, 245 nm.



Fonte: Autora do trabalho.

Os solventes de eluição foram 0,02% de ácido fórmico em água (eluente A) e 0,02% de ácido fórmico em metanol (eluente B), a uma taxa de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , empregando-se um gradiente de 5% a 100% de B em 50 min e tempo adicional para limpeza do sistema de 50 min a 60 min com 100% B. A coluna foi mantida à temperatura ambiente e o volume de injeção da amostra foi de  $10 \mu\text{L}$ . A coleta e o processamento de dados foram realizados utilizando o software LC Solution v. 1.25 (Shimadzu).

## APÊNDICE C - PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO DE REALIZAÇÃO DO DOUTORADO

---

### C.1. Artigos publicados em periódicos indexados

1. RIBEIRO, G. A. C.; SILVA, D. S. A.; SANTOS, C. C.; VIEIRA, A. P.; BEZERRA, C. W. B.; TANAKA, A. A.; SANTANA, S. A. A. Removal of Remazol brilliant violet textile dye by adsorption using rice hulls. **Polímeros**, v. 27, n. 1, p. 16-26, 2017.
2. RIBEIRO, G. A. C.; DA ROCHA, C. Q.; TANAKA, A. A.; DA SILVA, I. S. A fast, direct, and sensitive analysis method for catechin determination in green tea by batch injection analysis with multiple-pulse amperometry (BIA-MPA). **Analytical Methods**, v. 10, p. 2034-2040, 2018.
3. RIBEIRO, G. A. C., DA ROCHA, C. Q., VELOSO, W. B., FERNANDES, R. N., DA SILVA, I. S., TANAKA, A. A. Determination of the catechin contents of bioactive plant extracts using disposable screen-printed carbon electrodes in a batch injection analysis (BIA) system. **Microchemical Journal**, v. 146, p. 1249-1254, 2019.

### C.2. Livros publicados

AGUIAR, N. N.; RIBEIRO, G. A. C.; LIMA, P. C. Aplicação de Jogos Lúdicos no Ensino da Química (Ciências). 1. ed. Alemanha: Saarbrücken: Novas Edições Acadêmicas, 2016. v. 1. 42p.

### C.3. Artigos em fase submissão e correções

1. RIBEIRO, G. A. C.; DA ROCHA, C. Q.; DA SILVA, I. S.; TANAKA, A. A. Quick, simple and accurate determination of quercetin in bioactive plant extracts by amperometry associated to batch injection analysis (BIA).
2. DO NASCIMENTO, J. R.; RIBEIRO, G. A. C.; TANAKA, A. A.; LIMA, R. B.; DA SILVA, I. S.; DA ROCHA, C. Q. Voltammetric analysis of unusual dimeric flavonoids from *Fridericia platyphylla*: Relationship with the Anti-Trypanosoma cruzi and antileishmanial.
3. VELOSO, W. B.; RIBEIRO, G. A. C.; DA ROCHA, C. Q.; DA SILVA, I. S.; DANTAS, L. M. F. Fast, low cost and reliable amperometric determination of ampicillin on copper electrodes using batch injection analysis (BIA) system.

### C.4. Resumos Publicados em Congressos

1. RIBEIRO, G. A. C.; TANAKA, A. A.; FERNANDES, R. N.; SILVA, I. S. Oxidação eletroquímica da catequina sobre eletrodo de carbono vítreo e sua determinação amperométrica

**APÊNDICE C**

usando análise por injeção em batelada. Workshop de Biotecnologia do Maranhão “Integrando Regiões para o desenvolvimento”, São Luís (MA), 5 e 6 de abril, 2017. v. 1, p. 1.

2. RIBEIRO, G. A. C.; TANAKA, A. A.; FERNANDES, R. N.; SILVA, I. S. Determinação de catequina empregando técnicas eletroquímicas e análise por injeção em batelada (BIA), 17 a 21 de abril. In: XXI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2017, Natal (RN). Anais XXI SIBEE. Natal (RN): UFRN, 2017. v. 1. p. 1-3.

3. RIBEIRO, G. A. C.; ROCHA, C. Q.; SILVA, I. S.; TANAKA, A. A. Batch injection analysis with multiple-pulse amperometry (bia-mpa) for determination of (+)-catechin in green tea, 8 a 10 de novembro. In: US-Brazil Workshop on Biosensors and 5th. Bioanalytical School, 2017, Santo André (SP). Abstracts US-Brazil Workshop on Biosensors and 5th. Bioanalytical School. Santo Andre (SP): UFABC, 2017. v. 1. p. 1-1.

4. RIBEIRO, GEYSE ADRIANA CORRÊA; QUINTINO DA ROCHA, CLÁUDIA ; TANAKA, AURO ATSUSHI ; SANTOS DA SILVA, IRANALDO . Método de análise rápido, direto e sensível para determinação de catequina em chá verde por análise de injeção em batelada. In: III Workshop de Biodiversidade e Biotecnologia do Maranhão, 2018, São Luís -MA. III Workshop de Biodiversidade e Biotecnologia do Maranhão, 2018.

5. RIBEIRO, G. A. C.; VELOSO, W. B.; ROCHA, C. Q.; SILVA, I. S.; TANAKA, A. A. Determinação rápida e simples de catequinas em extratos vegetais usando eletrodo impresso em um sistema de análise por injeção em batelada (BIA), 16 a 19 de setembro. In: 19º Encontro Nacional de Química Analítica e 7º Congresso Ibero-Americano de Química Analítica, 2018, Caldas Novas (MG). Resumos. São Paulo: ABQ, 2018. v. 1. p. 1-1.

6. VELOSO, W. B.; RIBEIRO, G. A. C. ; SILVA, I. S. ; DANTAS, L. M. F. . Determinação de ampicilina empregando eletrodo de cobre em sistema bia com detecção amperométrica, 16 a 19 de setembro. In: 19º Encontro Nacional de Química Analítica e 7º Congresso Ibero-Americano de Química Analítica, 2018, Caldas Novas (MG). Resumos. São Paulo: ABQ, 2018. v. 1. p. 1-1.

7. RIBEIRO, G. A. C.; VELOSO, W. B.; ROCHA, C. Q.; SILVA, I. S.; TANAKA, A.A. Determinação de quercetina por amperometria de múltiplos pulsos sobre eletrodo de carbono vítreo usando análise por injeção em batelada (BIA-AMP). In: 58º Congresso Brasileiro de Química, São Luís (MA), 6 a 9 de novembro, 2018, São Luís (MA). Resumos. São Paulo: ABQ, 2018. v. 1. p. 1-5.

8. CHAGAS, J. W. L. B.; SEREJO, R. S.; PINHEIRO, G. G. M.; ABDALA, A. C. de S.; DE CARVALHO, P. A. V.; COSTA FILHO, A. P. da; RIBEIRO, G. A. C. Avaliação da composição química em amostras comercializadas como crack apreendidas no estado do Maranhão, In: 58º Congresso Brasileiro de Química, São Luís (MA), 6 a 9 de novembro, 2018, São Luís (MA). Resumos. São Paulo: ABQ, 2018. v. 1. p. 1-5.

9. CARVALHO, P. A. V.; ROCHA, B. R.; LOPES, I. C.; RIBEIRO, G. A. C; TANAKA, A. A. Estudo eletroquímico do fármaco anticancerígeno Carmustina (BCNU), In: 58º Congresso Brasileiro de Química, São Luís (MA), 6 a 9 de novembro, 2018, São Luís (MA). Resumos. São Paulo: ABQ, 2018. v. 1. p. 1-5.